

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
FAKULTÄT WISSENSCHAFTSZENTRUM WEIHENSTEPHAN
FÜR ERNÄHRUNG, LANDNUTZUNG UND UMWELT
LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE

Konstruktion und Charakterisierung von Anticalinen mit Spezifität für chromophore Liganden

Dipl.-Biol. (Univ.) Sven Christian Vopel

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. Dimitri Frischmann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra
2. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Die Dissertation wurde am 09.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 13.05.2016 angenommen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Arne Skerra danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit anzufertigen, ebenso für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine inspirierenden wissenschaftlichen Ideen.

Ein besonderer Dank geht an meinen Kollegen Christian Kirchner für eine langjährige, gute und freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München möchte ich für ihre Kollegialität und Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen langjährigen Kolleginnen und Kollegen Zala Lazar, Amber Nasreen, Hilke Zander, Ina Theobald, Jan-Peter Meyer, Margrit Winkler, Daniel Breustedt, Martin Schlapschy, Klaus Wachinger, Irmgard Neumaier, Uli Binder, Michaela Gebauer und Sabine Rauth für die gemeinsame Zeit, auch außerhalb des Laboralltages.

Frau Prof. Dr. Michel-Beyerle, Dr. Gagik Gurzadyan, Prof. Dr. Thorsten Bach und Birgit Prüger von der Technischen Universität München danke ich für die Zusammenarbeit innerhalb des Teilprojektes im Rahmen des SFB 533 der DFG.

Hermine Mühlbach, Nicole Bischof und Peter Fechner bin ich sehr dankbar für ihre wissenschaftlichen Beiträge, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten zu dieser Arbeit geleistet wurden.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Frau Yvonne und meinen Söhnen Konstantin und Johannes für Ihre Geduld und ihr Vertrauen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anticaline – Künstliche Bindungsproteine auf der Basis natürlicher Lipocaline	1
1.2	Das Fluorescein bindene Anticalin FluA und dessen Variante FluA(R95K).....	1
1.3	Die Ausweitung des Anticalin-Konzeptes auf spektroskopisch aktive Bindungspartner in Anlehnung an das GFP	4
1.4	Anticaline auf Grundlage des Retinol-bindenden Proteins – der Bindungspartner Retinal	6
1.5	Zielsetzung	9
2	Materialien und Methoden.....	11
2.1	Materialien.....	11
2.1.1	Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen	11
2.1.2	Oligodesoxynukleotide	13
2.1.2.1	Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese	13
2.1.2.2	Oligodesoxynukleotide der Assemblierungs- und Amplifizierungs-PCR....	13
2.1.2.3	Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung	13
2.1.2.4	Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese nach Kunkel.....	13
2.1.3	Enzyme und sonstige Proteine.....	14
2.1.4	Chemikalien.....	15
2.1.5	Standards und Kits.....	18
2.1.6	Geräte.....	18
2.1.7	Sonstiges Material	22
2.1.8	Medien, Antibiotika, allgemeine Lösungen	24
2.2	Mikrobiologische- und molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	29
2.2.2	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	29
2.2.2.1	Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen	30
2.2.2.2	Herstellung ultrakompetenter Zellen	30
2.2.2.3	Transformation chemisch-kompetenter Zellen.....	30
2.2.2.4	Herstellung elektrokompeter Zellen und Elektroporation	30
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Zelllyse	32
2.2.3.1	Plasmid-Minipräparation	32
2.2.3.2	Plasmid-Midipräparation	32
2.2.4	In vitro Modifizierung von DNA	32
2.2.4.1	5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	32
2.2.4.2	Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel.....	33
2.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.4.4	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	35
2.2.4.5	Ligierung von DNA-Fragmenten	35

2.2.5	Gelelektrophorese von DNA.....	36
2.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.2.5.2	Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese	37
2.2.6	Reinigung in-vitro modifizierter bzw. geelektrophoretisch getrennter DNA.....	38
2.2.6.1	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung.....	38
2.2.6.2	Fällung des Ligierungsansatzes zur Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek	39
2.2.6.3	Reinigung elektrolytisch getrennter DNA mittels JETSORB Gel Extraction Kit.....	39
2.2.6.4	Reinigung von PCR-Syntheseprodukten mittels des E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit.....	39
2.2.6.5	Präparative Reinigung elektrolytisch getrennter DNA aus „low melting point“-Agarose.....	40
2.2.7	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	40
2.3	Herstellung von Phagemid-Bibliotheken und Affinitätsanreicherung mittels <i>Phage-Display</i>	41
2.3.1	Propagierung von Helferphagen	41
2.3.2	Herstellung von Phagemid-Bibliotheken	42
2.3.2.1	Phagemid-Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38	42
2.3.2.2	Herstellung einer Glycerin-Stammlösung der Bibliothek und Herstellung einer Plasmid-Midipräparation	43
2.3.2.3	Aufarbeiten der Phagemide.....	43
2.3.2.4	Reamplifizierung der BBP-Bibliothek auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38	44
2.3.3	Nachweis des GdFP-Chromophor-Biotin-Konjugates mittels Dünnschichtchromatographie (DC)	44
2.3.4	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	45
2.3.4.1	Festphasen-Anreicherung.....	45
2.3.4.2	Übersicht der angewandten Elutionsmethoden.....	47
2.3.5	Amplifizierung selektierter Phagemide	48
2.3.6	Titerbestimmung von Phagemidlösungen.....	49
2.4	Kolonie-Filterstapeltest.....	49
2.5	Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten in <i>E. coli</i>	51
2.5.1	Proteinbiosynthese im 2 L-Maßstab	51
2.5.2	Proteinbiosynthese im 8 L-Laborfermenter	51
2.6	Proteinchemische Methoden	53
2.6.1	Chromatographische Verfahren	53
2.6.1.1	Streptavidin-Affinitätschromatographie	53
2.6.1.2	Größenausschluß-Chromatographie.....	54

2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.6.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	56
2.6.4	Konzentrierung von Proteinen.....	58
2.7	Physikochemische/biophysikalische Methoden	58
2.7.1	Absorptionsspektroskopie	58
2.7.1.1	Absorptionsspektrum von Retinal	58
2.7.1.2	Nachweis einer protonierten Schiff ^c -schen Base im RBP-Retinal-Komplex	58
2.7.1.3	Bestimmung des pK_s der Schiff ^c -schen Base im RBP(L35K, H154Q)-Retinal-Komplex.....	59
2.7.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	61
2.7.2.1	Proteinfluoreszenztitration.....	61
2.7.2.2	Ligandenfluoreszenzbestimmung für Fluorescein	61
2.7.2.3	Ligandenfluoreszenzmessung bei Titration einer Proteinlösung mit dem GdFP-Chromophor	62
2.7.2.4	Kompetitive Fluoreszenztitration	65
2.7.3	Circulardichroismus-Spektroskopie	68
2.8	Computerprogramme und Datenbanken.....	71
3	Ergebnisse.....	73
3.1	Verbesserung der Bindungsaffinität von FluA(R95K).....	73
3.1.1	Konstruktion von Varianten durch rationales Protein-Design – Auswahl der Aminosäurepositionen.....	73
3.1.2	Gentechnische Konstruktion der Varianten.....	76
3.1.3	Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Proteine	77
3.1.4	Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften mittels Fluoreszenztitration	79
3.1.4.1	FluA(R95K)-Varianten im Vergleich zum parentalen FluA bzw. der Variante FluA(R95K) – Proteinfluoreszenztitration	80
3.1.4.2	Der Effekt einzelner Varianten auf die Ligandenfluoreszenz – Unter- suchung des Quenching-Effektes mittels Ligandenfluoreszenzmessung	83
3.1.5	Analyse der Proteinfaltung ausgewählter Fluorescein bindender Varianten	87
3.1.5.1	Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes mittels Circulardichroismus- Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	87
3.1.5.2	Stabilität der FluA-Varianten gegenüber thermischer Denaturierung.....	88
3.2	Selektion von GdFP-Chromophor bindenden BBP-Varianten.....	90
3.2.1	Herstellung einer kombinatorischen Zufallsbibliothek von BBP-Varianten	91
3.2.2	Selektion aus der BBP-Zufallsbibliothek	93

3.2.2.1	Affinitätsanreicherung an immobilisierten GdFP-Chromophorgruppen	93
3.2.2.2	Affinitätsanreicherung unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel	96
3.2.2.3	Kolonie-Filterstapeltest	97
3.2.3	Charakterisierung selektierter BBP-Varianten.....	101
3.2.3.1	DNA-Analyse.....	101
3.2.3.2	Produktion ausgewählter BBP-Varianten in <i>E. coli</i>	103
3.2.3.3	Reinigung der rekombinanten BBP-Varianten mittels Streptavidin- Affinitätschromatographie	103
3.2.3.4	Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit dem Chromophor des GdFP durch Fluoreszenztitration.....	104
3.2.3.5	Emissionsspektrum des GdFP-Chromophors im Komplex mit Variante P7.11	107
3.2.4	Verbesserung der Bindungsaffinität der selektierten BBP-Variante P7.11 durch in vitro-Affinitätsmaturierung.....	108
3.2.4.1	Zufallsmutagenese mittels Error-Prone PCR von GdFP-P7.11 und Präparation einer Phagemidbibliothek	108
3.2.4.2	Selektion von P7.11-Varianten mit erhöhter Affinität unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel.....	109
3.2.4.3	Sequenzanalyse der selektierten P7.11-Varianten	110
3.2.5	Proteinkristallisation	112
3.2.5.1	Fermentation der Variante P7.11	112
3.2.5.2	Kristallisationsbedingungen.....	114
3.3	Biophysikalische Untersuchung artifiziieller Retinalproteine	115
3.3.1	Produktion der RBP-Varianten in <i>E. coli</i> und Reinigung der rekombinanten Proteine	115
3.3.2	Nachweis einer protonierten Schiff'schen Base im RBP-Retinal-Komplex mittels UV/VIS-Spektroskopie.....	117
3.3.3	Bestimmung des pK_S -Wertes der Schiff'schen Base im RBP-B-Retinal-Komplex	120
4	Diskussion.....	121
4.1	Verbesserung der Fluorescein-Bindung eines Anticalins durch rationales Protein-Design.....	121
4.2	Selektion GdFP-Fluorophor bindender Anticaline	124
4.3	Charakterisierung Retinal-bindender Varianten des Retinol-bindenden Proteins ...	126
5	Zusammenfassung.....	131
6	Literatur.....	133
7	Abkürzungsverzeichnis.....	147

1 Einleitung

1.1 Anticaline – Künstliche Bindungsproteine auf der Basis natürlicher Lipocaline

Anticaline bilden eine neuartige Klasse künstlicher Liganden-Bindungsproteine, die, ausgehend von natürlichen Vertretern der Lipocalin-Familie, durch Protein-Engineering gewonnen werden (Skerra, 2000). Die Lipocaline, eine Familie kleiner sekretorischer Proteine von 160 bis 180 Aminosäuren mit ähnlicher biologischer Funktion sowie Tertiärstruktur (Flower, 1996; Pervaiz & Brew, 1985), bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und sind mit einer molekularen Masse von nur ca. 20 kDa deutlich kleiner als Immunglobuline oder deren Fragmente. Ihr Name leitet sich von der Fähigkeit zur Bindung niedermolekularer hydrophober Moleküle in einer kelchförmigen Bindungstasche ab (griech.: *lipos* = Fett, *calyx* = Kelch) (Pervaiz & Brew, 1987). Die Peptidschleifen der einzelnen Lipocaline unterscheiden sich erheblich in ihrer Länge, Aminosäure-Zusammensetzung und Konformation. Am häufigsten vertreten sind die Lipocaline in Vertebraten und Arthropoden, sie sind jedoch auch in anderen Eukaryoten, wie Pflanzen, bekannt (Frenette Charron *et al.*, 2002). Einige Vertreter findet man sogar in den Prokaryoten (Bishop, 2000; David *et al.*, 2003), was auf eine sehr alte, in einem frühen Stadium der Evolution entstandene Strukturfamilie hindeutet. Ihre Hauptaufgabe besteht bei diversen Organismen im Transport oder der Speicherung von niedermolekularen hydrophoben Molekülen.

Alle Lipocaline besitzen als Hauptstrukturelement ein konserviertes β -Barrel, das aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen besteht, die sich rechtshändig um eine zentrale Achse winden. Der Boden der konisch geformten Bindungstasche wird durch dicht gepackte Seitenketten und kurze Peptidschleifen geschlossen. An der Öffnung des β -Barrels sind die vier Peptidschleifen kreisförmig angeordnet und bilden so den Eingang der Bindungstasche (Flower, 1996). Diese Schleifenregion zeigt enorme strukturelle Plastizität und eignet sich besonders für das Protein-Design, da diese Positionen vielfältige Seitenketten-Substitutionen tolerieren (Skerra, 2000). Mittels ortsgerichteter Zufallsmutagenese in Kombination mit einer *In-vitro*-Selektionsmethode, dem *Phage-Display* (Hoess, 2001; Skerra, 2008) sowie anschließendem Kolonie-Screening (Pini *et al.*, 2002; Skerra *et al.*, 1991) konnten artifizielle Lipocaline – sogenannte Anticaline – mit neuen Ligandenbindungseigenschaften isoliert werden.

1.2 Das Fluorescein bindene Anticalin FluA und dessen Variante FluA(R95K)

Der Ligand für eines der ersten kombinatorischen Protein-Designprojekte an Lipocalinen (Beste, 1998) war das Modellhapten Fluorescein (Voss, 1984a), ein weit verbreitetes Reporterpigment, das sich durch seine leuchtend grüne Emission, seine hohe chemische

Stabilität und einfache Synthese auszeichnet (Abbildung 1). Seine hohe molare Absorption, seine große Fluoreszenz-Quantenausbeute und die Verfügbarkeit vielfältiger Derivate zur Konjugation mit Makromolekülen haben Fluorescein zu einem der beliebtesten Fluoreszenzmarker gemacht (Sjöback, 1995).

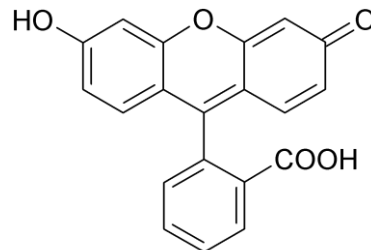


Abb. 1: Strukturformel von Fluorescein.

Neben dem Einsatz als Modellligand bei der Durchmusterung künstlicher Antikörperbibliotheken (Barbas *et al.*, 1992) ist Fluorescein schon seit langem ein etabliertes Modellhaptent für immunologische Studien (Kranz *et al.*, 1982; Voss, 1984a) sowie ein immunologisches Haptent, gegen das spezifische Anti-Fluorescein-Antikörper generiert werden konnten (Kranz *et al.*, 1982).

Obwohl chemisch völlig unterschiedlich, ist das Fluoresceinmolekül dem natürlichen Liganden des Bilin-Bindungsproteins (BBP), Biliverdin IX_γ, in Bezug auf die Raumauffüllung ähnlich und schien daher zur Generierung einer neuen Bindungsspezifität geeignet. Grundlage für dieses Protein-Design-Projekt zur Umformung der Bindungstasche bildete das Bilin-Bindungsprotein (BBP, Abbildung 2) aus dem heimischen Schmetterling *Pieris brassicae*.

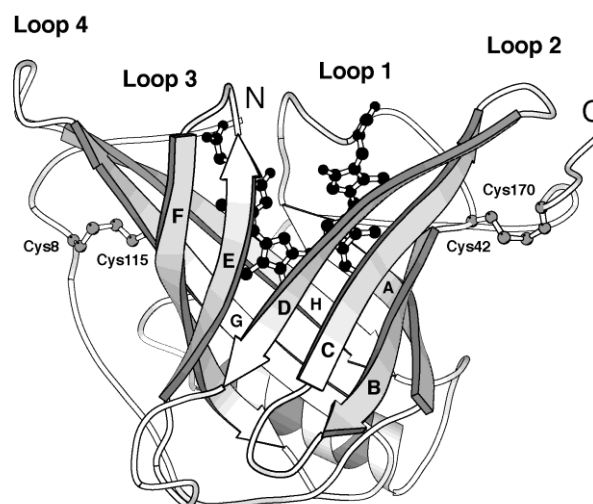


Abb. 2: Wildtyp-BBP mit seinem natürlichen Liganden Biliverdin IX_γ (Beste, 1998).

Durch gerichtete Zufallsmutagenese von 16 an der Bindung des natürlichen Liganden Biliverdin IX_γ beteiligten Aminosäuren dieses Lipocalins wurde zunächst eine genetische Zufallsbibliothek erzeugt (Beste, 1998). Mittels *Phage-Display* und Kolonie-Filterstapeltest wurden

daraus Varianten selektiert, die Affinität gegenüber Fluorescein aufwiesen. Bindungsaktivität konnte dabei mittels ELISA- bzw. Fluoreszenz-Titrationsexperimenten bei drei selektierten Varianten (FluA, FluB und FluC) nachgewiesen werden. Die Variante FluA mit einer Dissoziationskonstante von 35,2 nM wies dabei zusätzlich den größten Fluoreszenzlöschungseffekt für den Liganden auf ($Q = 99,7\% \pm 0,3$; (Beste *et al.*, 1999)). Zeitaufgelöste Absorptionmessungen ergaben, dass diesem Phänomen ein ultraschneller Elektronentransfer (400 fs) von der aromatischen Seitenkette des Trp129 auf den angeregten Chromophor – gefolgt von strahlungsloser Rekombination – zugrunde liegt (Götz *et al.*, 2002). Die aus weiteren Mutationsstudien hervorgegangene Variante FluA(R95K) konnte mit einer größeren Ausbeute als FluA in *E. coli* synthetisiert werden, ohne dabei an Bindungsstärke zu verlieren (Beste, 1998). Aus diesem Grund wurde es gegenüber den anderen Varianten bevorzugt als Ausgangspunkt der Protein-Engineering-Studien in dieser Arbeit verwendet.

Als Grundlage für diese Arbeit diente die auf 2 Å aufgelöste Kristallstruktur von FluA(R95K) ((Korndörfer *et al.*, 2003); Abbildung 3). Diese Strukturanalyse zeigte, dass trotz der insgesamt 21 ausgetauschten Aminosäurepositionen – 16 durch zielgerichtete Zufallsmutagenese, eine durch zufälligen Aminosäureaustausch und vier als gerichtete Mutationen – die charakteristische Lipocalinfaltung erhalten blieb. Während sich das β -Barrel und die daran gebundene α -Helix nach wie vor homolog zu BBP faltete, konnten in den Schleifenregionen größere Änderungen beobachtet werden, was für die Bindung des neuen Liganden Fluorescein verantwortlich zu sein scheint. Ebenso zeigte sich, dass Fluorescein viel tiefer in der Bindungstasche gebunden wird als der natürliche Ligand Biliverdin IX_γ; dabei weist der Xanthenolonring des Fluoresceins zum Boden der Bindungstasche, während der Carboxyphenylrest zum Lösungsmittel hin ausgerichtet ist (Abbildung 3).

Einige Varianten des Anticalins FluA(R95K) standen am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra bereits zur Verfügung (Mühlbach, 2003).

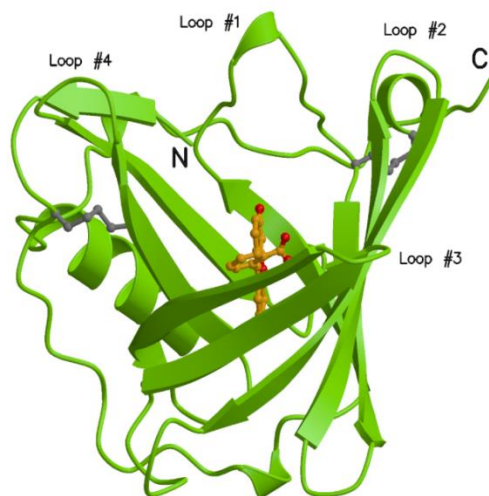


Abb. 3: Struktur des FluA mit dem in der Bindungstasche gebundenen Liganden Fluorescein (gelb), (Korndörfer *et al.*, 2003).

1.3 Die Ausweitung des Anticalin-Konzeptes auf spektroskopisch aktive Bindungspartner in Anlehnung an das GFP

Das grün fluoreszierende Protein (Abkürzung GFP, engl. *green fluorescent protein*; Abbildung 4) ist ein erstmals 1962 von Osamu Shimomura beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura *et al.*, 1962). Die Primärstruktur besteht aus 238 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 26,9 kDa. Der eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ innerhalb der Polypeptidkette, so dass die intrinsische Fluoreszenz nicht auf einer Modifizierung durch ein Enzym oder der Bindung externer Substanzen basiert und so vollständig ohne – eventuell zellspezifische – Prozessierungsschritte auskommt. Seine große Bedeutung in der Biologie, insbesondere der Zellbiologie, liegt in der Möglichkeit, GFP mit nahezu beliebigen anderen Proteinen transkriptionell als auch translationell zu fusionieren. Durch die Fluoreszenz des GFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung des zu untersuchenden Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt beobachtet werden.

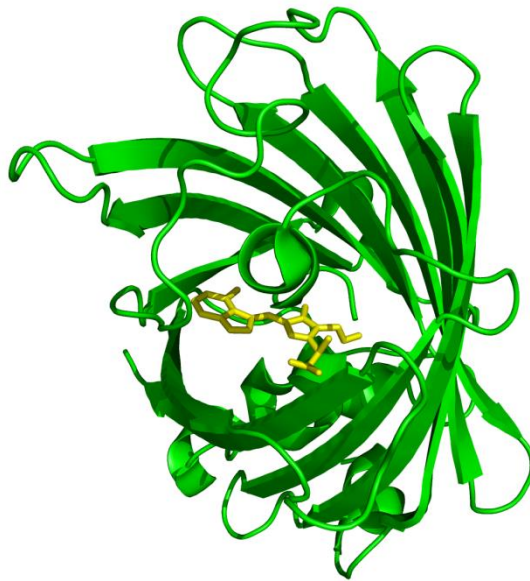


Abb. 4: Struktur des GFP mit seinem in Gelb dargestellten Chromophor (PDB Accession Number 1GFL, erstellt mit PYMOL, DeLano Scientific LCC; Yang, 1996).

Zahlreiche weiterentwickelte fluoreszierende Proteine konnten im Lauf der Jahre durch Protein-Engineering konstruiert werden, unter anderem das „goldfarbene fluoreszierende Protein“ (GdFP), eine Variante des GFP bzw. des Cyan fluoreszierenden Proteins (CFP) (Bae *et al.*, 2003). Allerdings sind derlei Studien grundsätzlich dahingehend beschränkt, daß die autokatalytische Bildung des zentralen Fluorophors erhalten bleiben muß (Barondeau *et al.*, 2005; Tsien, 1998), so daß der Einfluss der Proteinumgebung auf dessen spektroskopische Eigenschaften (z. B. Ladungsverteilung, sterische Verhältnisse, hydrophobe Kontakte) nur begrenzt durch Variation von Aminosäureseitenketten untersucht werden kann. Eine Ent-

kopplung von Ligandenfluoreszenz und Proteinfaltung/Katalyse sollte durch nicht kovalente Komplexbildung zwischen dem chemisch synthetisierten Fluorophor und einem maßgeschneiderten Bindeprotein gelingen, z. B. einem Anticalin. Mit der in der Diplomarbeit von B. Prüger etablierten Synthese des Analogons 6a; 4-(4-Aminoindolylmethyl)-imidazolinone (Prüger, 2007) (Abbildung 5) lag jetzt eine Sonde vor, mit der die Polarität und das Reorganisationsverhalten und damit die dynamische Antwort eines spezifischen Bindeproteins auf lichtinduzierte Ladungsumverteilung studiert werden könnte. Interessanterweise bildet der GdFP-Chromophor im spektroskopisch angeregten Zustand eine zwitterionische Struktur mit hohem Dipolmoment. In der Tat konnte gezeigt werden, dass es nach Anregung der synthetischen Verbindung zu einem intramolekularen Ladungstransfer mit einer relativ großen Änderung des Dipolmoments kommt (Prüger).

Übertragen auf die Situation in der Bindungstasche eines dafür maßgeschneiderten Anticalins sollte sich mit dem synthetisch zugänglichen Fluorophor eine strukturelle Antwort des Lipocalin-Proteins auf dessen optische Anregung gezielt induzieren lassen – damit sollte es erstmals möglich sein, die Photochemie dieser fluorophoren Gruppe sowie deren dynamische Wechselwirkungen mit der Proteinmatrix unabhängig vom Kontext des GFP/CFP zu studieren. Für die Selektion eines entsprechenden Anticalins wurde, auch angeregt durch Arbeiten zur organischen Synthese des ursprünglichen GFP-Fluorophors (Kojima, 1998), der GdFP-Chromophor mit zwei verschiedenen Substituenten am Imidazolinon-Stickstoff am Lehrstuhl für organische Chemie I der TU München präpariert (Abbildung 5); (Prüger, 2007).

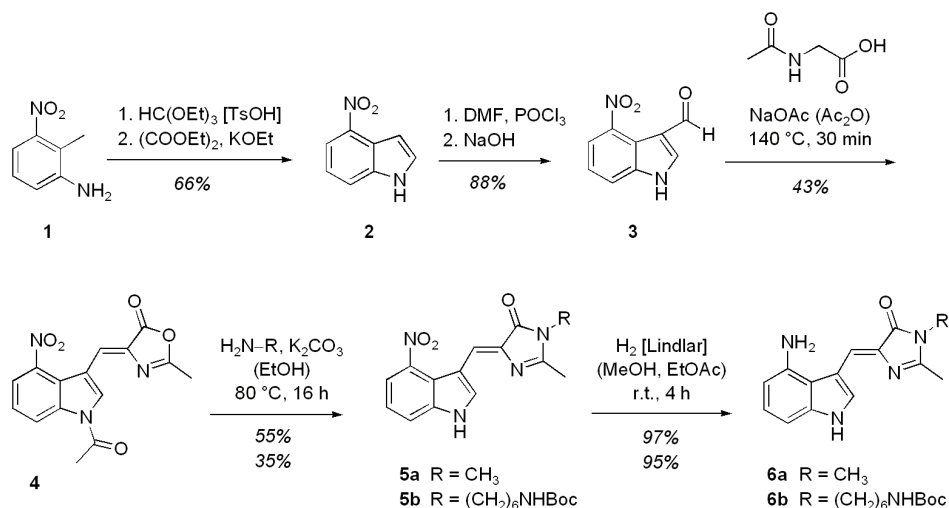


Abb. 5: Synthese des GdFP-Modellchromophors 6a.

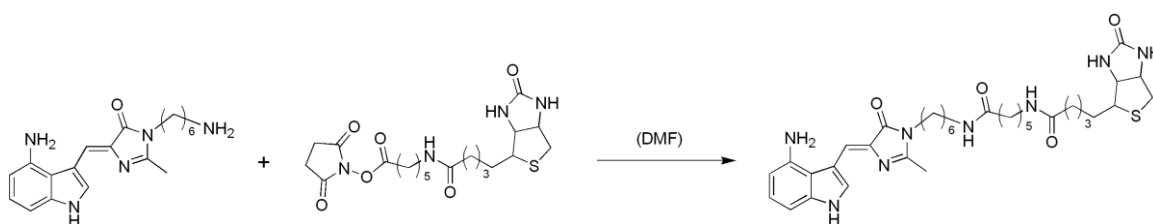


Abb. 6: Synthese des GdFP-Biotin-Konjugates.

Zur Immobilisierung des Liganden an mit Streptavidin beladene magnetische Partikel für die *Phage-Display*-Selektion wurde nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zudem ein entsprechendes GdFP-Biotin-Konjugat mit (+)-Biotinamidocapronsäure-NHS-ester synthetisiert (Prüger, 2007); Abbildung 6.

1.4 Anticaline auf Grundlage des Retinol-bindenden Proteins – der Bindungspartner Retinal

Lichtinduzierte Prozesse in Retinalproteinen wie Rhodopsin und Bacteriorhodopsin waren aufgrund der großen Bedeutung dieser Proteine für den Sehprozess und für phototrophe Mikroorganismen, bzw. auch als Modellsystem in der biophysikalischen Grundlagenforschung, Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen. Beim Sehpigment Rhodopsin regt Licht die Isomerisierung des über eine Schiff'sche Base gebundenen 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal an (Filipek *et al.*, 2003). In der Protonen-Pumpe Bacteriorhodopsin des Halobakteriums dagegen ist Retinal in der all-trans-Form als protonierte Schiff'sche Base gebunden (Lanyi, 2004). Hier bewirkt die Anregung des Chromophors eine Isomerisierung zu 13-cis-Retinal und löst den Protonentransport über die Plasmamembran aus.

Forschungsschwerpunkt waren in der letzten Zeit die Analyse der zum Teil enorm schnell verlaufenden Isomerisierungsschritte und ihrer Auswirkungen auf die Proteinumgebung (Herbst *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2001; Lanyi & Luecke, 2001). Die dafür notwendigen biophysikalischen Experimente stoßen jedoch an Grenzen, da sich Transmembranproteine schwer in Lösung untersuchen lassen. Es gab eine Reihe von Versuchen, die Wasserlöslichkeit dieser Proteine zu erhöhen – so wurden Varianten des Bacteriorhodopsins konstruiert, bei denen die hydrophoben, lipidzugewandten Seitenketten durch hydrophile ersetzt wurden (Mitra *et al.*, 2002). Allerdings blieben Bestrebungen zur Solvatisierung der intakten Membranproteine ohne den Einsatz von Detergentien bislang erfolglos.

Aufgrund der Limitierungen bei der Untersuchung lichtinduzierter Vorgänge in natürlichen Retinalproteinen wurden künstliche, wasserlösliche Retinalproteine in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra entwickelt, welche Retinal auf ähnliche Weise binden wie Rhodopsin, spektroskopisch aber leichter zu untersuchen sind als die Membranproteine. Diese basieren auf dem Retinol-bindenden Protein, einem Lipocalin, das im Plasma des Menschen und von Wirbeltieren für den Transport des schlecht wasserlöslichen und chemisch empfindlichen Vitamin A sorgt (Kawaguchi *et al.*, 2013). Diese neuartigen, artifiziellen Bindeproteine mit Dissoziationskonstanten zwischen 190 und 300 nM standen am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München zur Verfügung (Tabelle 1, Abbildung 7) (Bischoff, 2003; Fechner, 2005). Dabei unterschied sich die Sequenz des von D. Breustedt (Arbeitsgruppe Prof. Skerra) zur Verfügung gestellten hRBP-Gens (Breustedt, 2008) an der Position 154 von den PDB-Daten (1BRP). Das dort vorliegende Histidin wurde entsprechend der Sequenz der Kristall-

struktur durch ein Glutamin ersetzt. Die Mutante RBP (H154Q) wurde in dieser Arbeit als „Wildtyp“-Protein verwendet.

Um die Ausbildung von Disulfidisomeren zu vermeiden, wurde in den vorangegangenen Arbeiten ein Expressionsvektor gewählt, der die Koexpression der bakteriellen Proteindisulfidisomerase DsbC ermöglicht. Dazu wurden die RBP-Genvarianten auf dem Vektor pASK75-*dsbC* (Schmidt *et al.*, 1998) kloniert (Bischoff, 2003). Das bakterielle Gen für die Proteindisulfidisomerase *dsbC* bildete dabei ein dicistronisches Operon mit dem jeweiligen RBP-Gen, so dass dessen Expression ebenfalls vom induzierbaren tet-Promotor-/Operator kontrolliert wurde (Schmidt *et al.*, 1998).

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete artifizielle Retinal bindene Anticaline (Bischoff, 2003; Fechner, 2005).

hRBP-Variante	Arbeitsname
hRBP(H154Q)	RBP-A
hRBP(L35K/H154Q)	RBP-B
hRBP(L63K/H154Q)	RBP-C
hRBP(L35K/A71H/H154Q)	RBP-D
hRBP(L35K/A71E/H154Q)	RBP-E

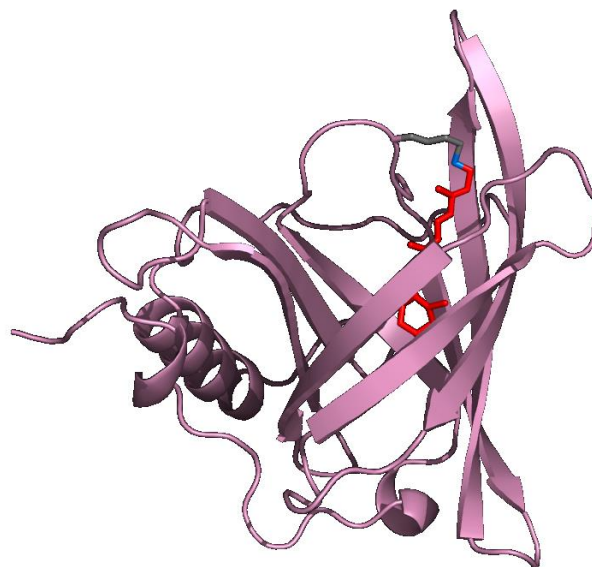


Abb. 7: Strukturmodell des Retinal-bindenden Anticalins RBP-B (all-*trans*-Retinal rot, Lysin35 blau/grau) auf der Grundlage der Kristallstrukturen des RBP von Mensch und Rind (PDB Accession Numbers 1BRP bzw. 1FEM). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A. Skerra, TU München.

Das humane Plasma-Retinol-Bindungsprotein wurde zuerst von Kanai (1968) isoliert; die erste Kristallstruktur wurde 1984 veröffentlicht (Newcomer *et al.*, 1984), und seit 1990 liegt die verfeinerte Struktur des Holo-Proteins mit einer Auflösung von 2,0 Å vor (Cowan *et al.*, 1990). Es handelt sich um ein monomeres Protein aus 183 Aminosäuren mit einer Molmasse von 21 kDa. Die langgestreckte, hydrophobe Bindungstasche besitzt hohe Oberflächenkomplementarität zum Liganden. Die Bindung des Retinols erfolgt so, dass der β -Iononring tief im Inneren des β -Barrels begraben ist und der Isoprenoidanteil annähernd parallel zur Achse des zyklischen Faltblatts verläuft. Die Hydroxygruppe liegt dabei an der Oberfläche. So lässt sich erklären, dass RBP auch mit anderen Retinoiden, die sich nur in dieser funktionellen Gruppe unterscheiden, einen Komplex bilden kann. So ist die Dissoziationskonstante für Retinsäure und Retinal ähnlich der für den Vitamin A-Alkohol (Cogan *et al.*, 1976).

Retinal wurde zuerst aus gebleichtem Rinderrhodopsin als gelbe Substanz isoliert und mit „Retinen“ benannt, später wurde erkannt, dass es sich dabei um den Aldehyd des Vitamin A-Alkohols handelt (Pepe, 1999). Das Molekül trägt vier Doppelbindungen, die jeweils *cis*- oder *trans*-konfiguriert sein können. Jedes der 16 möglichen Isomere konnte bereits isoliert werden, jedoch kommen nur wenige physiologisch vor. Bedeutung haben vor allem 11-*cis*-Retinal und all-*trans*-Retinal, da sie am Sehprozess beteiligt sind: 11-*cis*-Retinal wird von Opsin gebunden und bildet mit Lysin 296 eine protonierte Schiff'sche Base aus. Das so gebildete Rhodopsin ist ein heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Wird das integrale Membranprotein durch Licht angeregt, erfolgt eine Photoisomerisierung der prosthetischen Gruppe zum all-*trans*-Retinal. Durch sterische Wechselwirkungen des Liganden mit den Transmembranhelices wird Rhodopsin in eine angeregte Konformation versetzt und kann das G-Protein aktivieren. Die Salzbrücke zwischen Glutamat 113 und der protonierten Schiff'schen Base wird dabei gebrochen; daraufhin wird die Bindung deprotoniert und der Ligand wird freigesetzt (Bishop, 2000; Pepe, 1999). Anschließend wird das all-*trans*-Retinal mit einer Isomerase wieder in 11-*cis*-Retinal umgewandelt, welches dann erneut an Opsin binden kann. Da dieser Prozess jedoch sehr lange dauert und somit einmal aktiviertes Rhodopsin die Signalkaskade zu lange aufrecht erhalten würde, wird zusätzlich das Rhodopsin über folgende Reaktionsfolge inaktiviert und regeneriert: Rhodopsin wird durch eine spezifische Kinase phosphoryliert; an das phosphorylierte Rhodopsin bindet nun Arrestin. Dieses Arrestin dissoziiert erst wieder vom Rhodopsin, wenn das all-*trans*-Retinal durch Retinoldehydrogenase zu all-*trans*-Retinol reduziert wurde. Anschließend wird das Opsin durch die Phosphatase 2A dephosphoryliert. Das Rhodopsin kann nun mit 11-*cis*-Retinal regeneriert werden (Bennett & Sitaramayya, 1988; Chen *et al.*, 2001).

Im Bakteriorhodopsin, einer lichtgetriebenen Protonenpumpe, liegt all-*trans*-Retinal ebenfalls durch eine protonierte Schiff'sche Base an Lysin 216 gebunden vor (Lanyi, 2004). Hier bewirkt die Anregung des Chromophors eine Isomerisierung zu 13-*cis*-Retinal. Die protonierte Schiff'sche Base überträgt anschließend ihr Proton auf die Asparaginsäureseitenkette 85 und entlässt es schließlich über eine Reihe thermisch aktivierter Protonentransferschritte in

den Extrazellulärraum. Das Proton wird daraufhin durch ein anderes ersetzt, das von der Asparaginsäureseitenkette 96 stammt, die sich auf der cytoplasmatischen Membranseite befindet; Retinal isomerisiert anschließend zurück in die all-*trans*-Form.

1.5 Zielsetzung

Anhand der Kristall-Struktur des Anticalins FluA(R95K) sollten Aminosäure-Substitutionen durch Computer-Modelling geplant und realisiert werden, die zu einer Steigerung der Bindungsaffinität für Fluorescein führen. Diese Varianten sollten synthetisiert und durch biophysikalische Untersuchungsmethoden charakterisiert werden. Eine Bestätigung des aufgrund zeitaufgelöster Absorptionsmessungen und der Kristallstruktur postulierten Mechanismus eines Ladungstransfers zwischen dem gebundenen Liganden Fluorescein und dem Tryptophanrest 129 sollte durch ortsgerichtete Mutagenese zu Phenylalanin, Histidin oder Tyrosin erfolgen.

Weiterhin sollte durch kombinatorisches Protein Engineering ein neues Anticalin mit Bindungsaffinität zu dem synthetisch hergestellten Chromophor des goldfarbenen fluoreszierenden Proteins (GdFP) konstruiert werden. Potente Anticaline sollten durch Anwendung der *Phage Display*-Technik, des Filter Sandwich Colony Screening und verschiedener Methoden der Affinitätsmaturierung selektiert werden, die Charakterisierung ihrer Bindungseigenschaften sollte durch biophysikalische Messmethoden erfolgen.

Schließlich bestand das Ziel der Protein-Engineering-Studie auf Basis des RBP darin, ein Hybrid zwischen dem nicht-kovalenten Bindungsmechanismus für Retinoide im RBP und der kovalenten Bindung des Retinals in photoaktiven Pigmentproteinen als Modellsystem für spektroskopische/physikalische Studien herzustellen. Dazu sollten RBP-Varianten, bei denen durch ortsgerichtete Mutagenese ein Lysinrest so eingeführt wurde, dass eine Schiff'sche Base mit gebundenem Retinal gebildet werden kann, spektroskopisch analysiert werden.

Zusätzlich sollten durch Punktmutationen basische oder saure Seitenketten eingeführt werden, um einen basischen oder sauren Katalysemechanismus für die Ausbildung der Schiff'schen Base in diesem System zu realisieren.

2 Materialien und Methoden

In diesem Abschnitt werden Materialien und Methoden aufgeführt und beschrieben, die im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente Anwendung fanden. Dabei handelt es sich bei den Ausführungen zum Teil um allgemeine Arbeitsvorschriften aus dem Labor Prof. Skerra, die aus den jeweils angegebenen Zitaten adaptiert übernommen wurden.

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen

E. coli K12-Stämme:

Phage Display

XL1-Blue *endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169 [F': proAB, lacI^qZΔ15, Tn10(Tet^R)]*

(Bullock *et al.*, 1987)
von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

Kolonie-Filterstapeltest

TG1/F⁻ *supE, hsdD5, thi, D(lac-proAB)*
von Prof. Dr. A. Skerra, TU München (Kim *et al.*, 2009)

Mutagenese nach Kunkel

JM83 F⁻, *ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

CJ236i *dut, ung, thi, relA1 [F': proAB, lacI^qZ.M15, Tn10(Tetr)]*
(Geisselsoder *et al.*, 1987) von I. Theobald, TU München

Genexpression/Proteinbiosynthese

JM83 F⁻, *ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15*
(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

JM83proΔSkp JM83 *proAB*⁺
von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

MC4100ΔSkp F⁻, *araD139, Δ (argF-lac)U169, prsL150, relA1, deoC1, rbsR, fthD5301, fruA25, λ⁻*, (Peters *et al.*, 2003)
von Prof. Dr. M. Müller, Universität Freiburg

W3110 F⁻, *mcrA mcrB IN(rrnD-rrnE)I*, λ⁻ (Hayashi *et al.*, 2006)
 von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

Plasmide:

pBBP21

pBBP21FluA (R95K)

pRBP(H154Q)

pRBP(L35K, H154Q)

pRBP(L63K, H154Q)

pRB (L35K, A71H, H154Q)

pRBP(L35K, A71E, H154Q)

Phage Display

pBBP38 *ori*, tet^{D/o} (*Xba*I), *OmpA*, *bbp*-K87S, K41N; C42ochre, G43opal (*Bst*XI)-
 ΔΔpIII (217-406), *bla*
 von Pieris Proteolab AG, Freising

Kolonie-Filterstapeltest

pBBP22 *ori*, tet^{D/o}, *OmpA*, *bbp*-K87S (*Bst*XI)-*strep*II-*abd*, *bla* (Schlehuber, 2001)
 von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pBBP61 *ori*, tet^{D/o}, *OmpA*, T7-tag-DigA16H86N-K87S (*Bst*XI)-GGAVDANS-
*abd-strep*II, *bla*
 von Pieris Proteolab AG, Freising

Genexpression/Proteinsynthese

pBBP21 *ori*, tet^{D/o}, *OmpA*, *bbp*-K87S (*Bst*XI)-*strep*II, *dsb*C, *bla* (Beste, 1998)
 von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pTUM4 *ori*, p^{*fkpA*} *fkpA surA*, p^{*dsbA*} *dsbA dsbC*, p^{*cat*} *cat* (Schlapschy *et al.*, 2006)
 von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

Bakteriophagen:

VCS-M13 Helferphage; Stratagene GmbH, Heidelberg

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden in HPLC-gereinigter Qualität von der Firma IBA GmbH, Göttingen, bezogen.

2.1.2.1 Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese

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'

GB-3: 5' – CCA TGG TAA ATG GTG GGA AGT CGC CAA ATA CCC CNN
KNM SNN SNN KAA GTA CGG AAA GTG CGG A –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-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'

Die Oligodesoxynukleotide FS-15 GB-3, GB-4 und GB-11 wurden vor der Verwendung zusätzlich mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.2) gereinigt.

2.1.2.2 Oligodesoxynukleotide der Assemblierungs- und Amplifizierungs-PCR

FS-18: 5' – AGA TCT TTC CAA TCT TGG AGT CAC CAA CTG GGT AGG
CGG TAC CTT C –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'

2.1.2.3 Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

GB-7: 5' – GAC GGT GCC TGT CCC GA –3'

GB-8: 5' – GAC TAC TGG GGA GCC GA –3'

2.1.2.4 Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese nach Kunkel

FluA(R95K) Variante:

A45I	5' - TCA GGA GTG TAC TCG ATC CAT CCG CAC TTT CC -3'
A45V	5' - GGA GTG TAC TCC ACC CAT CCG CAC TTT C -3'
H127R	5' - GAG CAC CCA GAC ACG GTC CCA GTG TC -3'
H86F	5' - CCA ACA GTC CTG CTG AAG TAG ATC TTT CCA ATC -3'
L131F	5' - CCA TGC TTC TGG AGA ACA CCC AGA CAT GG -3'
S114I	5' - CTC GTC GTA GCG GCA GAT GTA TCC GAT GAT G -3'
S114R	5' - CTC GTC GTA GCG GCA CCT GTA TCC GAT GAT G -3'
S114T	5' - CTC GTC GTA GCG GCA CGT GTA TCC GAT GAT G -3'
W129F	5' - TCT GGA GAG CAC GAA GAC ATG GTC CC -3'
W129Y	5' - TCT GGA GAG CAC ATA GAC ATG GTC CC -3'
W29H	5' - CTT CTG GAG AGC ACA TGG ACA TGG TCC CAG -3'

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Aprotinin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Benzonase, Reinheitsgrad I (25 U / μ L)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovine Serum Albumin (BSA), Frak. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg;
	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ExtrAvidin®-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA), Frakt. V	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach;
	MBI Fermentas, St. Leon-Roth;
	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A (~90 U / mg und ~70 U / mg) aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
Taq DNA-Polymerase (5 U / μ L)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Transferrin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

T4 DNA-Ligase (3 U / μ L)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (1 U / μ L)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (6 Weiss U / μ L)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase (3 U / μ L)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase (5 U / μ L)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4 Chemikalien

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
N-Acetyl-L-Tryptophanamid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (Sequagel Concentrate & Diluent)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose (electrophoresis grade)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose (low melting point)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
4-Aminofluorescein, Reinheit \geq 97 % (Fluoresceinamin, Isomer I)	
Ammoniumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt;
	AppliChem, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure (ANS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Antifoam A-Stammlösung	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
dNTP-Satz (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
2'-Deoxy-P-nukleosid-5'-triphosphat (dPTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
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
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Eisen(III)-Chlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure p.a., 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Essigsäure, technisch	AppliChem, Darmstadt
Ethanol p. a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol, technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-Ethyl-diisopropylamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure-Na ² -Dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Ethylenglykol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fluorescein, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glutarsäureanhydrid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kobaltchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupferchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupfersulfat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid, Tetrahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (Heavy White Oil) für die PCR	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
Phenol, Reinheit ≥ 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat	Schuchardt & Co., Hohenbrunn (Tween 20)
Ponceau S	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
all-trans-Retinal	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure konz. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetrazyklin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan,	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe Ultra-Qualität (Tris)
tRNA (<i>S. cerevisiae</i>)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Xylencyanol FF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.5 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard (low range)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Marker, (broad range)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Kits zur DNA-Isolierung:

E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
Spin Kit	
QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Plasmid Midiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

DNA-Sequencing Kit, Big Dye Terminator Cycle Sequencing	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
---	--

2.1.6 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Bio-Mag 10 Magnetprüher	BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:	
BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Friocell	Medcenter Einrichtungen GmbH
Drehtisch zum Ausplattieren	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Durchflußdetektoren:	
2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau; Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern:	Eigenbau
G42	Biometra, Göttingen
Hoefer HE33	Amersham Biosciences, San Francisco, USA
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fermenter:	
5 und 10 L-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
O ₂ -Sensor (12 / 320 A-Typ)	Mettler-Toledo, Steinbach
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
Fraktionensammler:	
Gradi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
17000 Minirac	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geldokumentationssystem	LTF-Labortechnik, Wasserburg
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Glasspritze 50 µL	Hamilton Company, Reno, 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, München
HPLC:	
ÄKTA Purifier System	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA Explorer System	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Millipore Synergy 185 Reinstwasser-Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
Netzgeräte:	
Power Pack P25 und P30	Biometra, Göttingen
500/500	Renner GmbH, Dannstadt
PCR-Cycler:	
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
CG810	Schott-Geräte GmbH, Hofheim
pH 526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin
Pipettierhilfen:	
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet	Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200

P1000

Multipette 4780

Polaroid-Kamera MP4

Rollenmischer IDL TRM-V

Abimed Analysen-Technik GmbH,
LangenfeldEppendorf-Netheler-Hinz-GmbH,
HamburgPolaroid Corporation, Cambridge, MA,
USA

Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Signalschreiber:

REC 112

SE 120

BD40

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

ABB Goerz AG, Wien, Österreich

Kipp & Zonen, Delft, Niederlande

Schüttelapparate:

Typ 3012 und 3017

Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25

Modell TR-125/ITE-K

Multitron II

Thermoshake THO 5

New Brunswick Scientific Co., Inc.,
Edison, New Jersey, USA

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn

2003 Slab Gel Dryer

Spektrophotometer:

Fluoreszenzspektrophotometer LS 50B

Fluoreszenzspektrophotometer FluoroMax3

Spektropolarimeter J-810

UV/VIS Spektralphotometer Lambda 9

Ultrospec 2000

Ultrospec 3000

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA

HORIBA Jobin Yvon GmbH Grasbrunn

Jasco Labor- und Datentechnik GmbH,
Groß-Umstadt

Perkin Elmer GmbH Langen

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, FreiburgAmersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Speed-Vac-Konzentrator

UniEquip, Martinsried

Univapo UVC 150H UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen: Micro m3p PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C PAG Oerlikon Precisa 125 A	Sartorius GmbH, Göttingen W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
Varioklav Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Wasserbäder: Haake F6/C25 Haake DC30/K20 Julabo UC/5B	Thermo Haake, Karlsruhe Thermo Haake, Karlsruhe Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach.
Zentrifugen: Sigma 4K10 und 4K15 Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6 Sorvall RC 5B, RC 5C Plus und Evolution RC mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000 Eppendorf 5415 C und 5415 R	Sigma GmbH, Osterode Kendro Laboratory Products GmbH, München Kendro Laboratory Products GmbH, München Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
2.1.7 Sonstiges Material	
Dialyseschläuche: Spectra/Por, MWCO: 6–8 kDa Typ 27, MWCO: 12–6 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dispenser-Tips 2,5 und 5 mL	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal Biotech GmbH, Hamburg

Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20 und 60 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen; Henke- Sass Wolf, Tuttlingen
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 mL (safelock)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Größenausschlußchromatographie-Säulen:	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	
Superdex 200 HR 10/30	
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 4, MWCO: 5 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Amicon Ultra 4, MWCO: 10 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Amicon Ultra 4, MWCO: 30 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Mikrosep 10 K	Pall GmbH, Dreieich
Kunststoffröhrchen:	
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, Frickenhäusen
Membranfilter:	
Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrodialysiereinheiten (10 kDa MWCO)	Perbio Science GmbH, Bonn
Mikrotiter-Platten:	
Falcon Micro Test III flexible assay-plates	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Nunc-Immuno-sticks	Nunc GmbH, Wiesbaden
PD-10 Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Pipetten-Spitzen:

blau (200–1000 μL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5–200 μL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5–10 μL)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Quarzküvetten:	
Quarzküvette 104.002-QS, 700 μL	Hellma GmbH & Co., Müllheim
Fluoreszenzrührküvette 102-QS, 3500 μL	Hellma GmbH & Co., Müllheim
Fluoreszenzküvette 105.250-QS, 100 μL	Hellma GmbH & Co., Müllheim
Schwan-Stabilo-Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main

Filter:

Filtropur (0,45 und 0,22 μm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex HV (0,45 μm)	Millipore GmbH, Eschborn
Spin-X (0,45 μm)	Costar, Corning, NY, USA
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Zellschaber 3010	Costar, Corning, NY, USA

Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren JA-10 und JA-20, sowie für Sorvall- Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Nalgene Company, New York, USA
Zubehör SDS-PAGE Glasplatten, spacer, Dichtungen und Kämme	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Biometra, Göttingen

2.1.8 Medien, Antibiotika, allgemeine Lösungen

Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden autoklaviert oder durch Filtration keimarm filtriert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore-Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4°C, Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20°C gelagert, wässrige Lösungen wurden filtriert (0,45 μM).

Ampicillin (Amp)	100 mg/mL in H ₂ O (1/1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/mL in 70% Ethanol (1/1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan)	35 mg/mL in Wasser (1/500 zum Medium)
Tetrazyklin (Tet)	10 mg/mL in 70% v/v Ethanol (1/1000 zum Medium)

Lagerung bei -20 °C

Induktor-Stammlösungen:

Anhydrotetrazyklin (aTc)	2 mg/mL in DMF (1/10000 zum Medium) oder 5 mg/mL in DMF (1/10000 zum Medium)
--------------------------	---

Lagerung bei -20 °C

LB-Medium:

Bacto Trypton	10 g/L	
Bacto Hefe-Extrakt	5 g/L	
NaCl	5 g/L	
Bacto Agar	15 g/L	(nur für Kulturplatten)

Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklav sterilisiert.

Lösungen für die Fermentation:

Mineralsalzlösung:

31 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	5,51 g/L
19 mM KH ₂ PO ₄	2,58 g/L
25 mM NH ₄ Cl	1,33 g/L
5 mM Na ₃ -Citrat · 2 H ₂ O	0,47 g/L

Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9.

Glucoselösungen:

20% (w/v) Glucose (separat autoklaviert)

50% (w/v) Glucose (separat autoklaviert)

MgSO₄-Stammlösung:

1 M MgSO₄ (separat autoklaviert)

Thiamin-Stammlösung:

10,0 mg/mL Thiamin-Hydrochlorid (0,45 µm filtriert)

FeCl₃-Stammlösung:

35,0 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (mit konzentrierter HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert und 0,45 μm filtriert)

Zn-Acetat-Stammlösung:

8,0 g/L Zn-Acetat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,45 μm filtriert)

Spurenelement-Stammlösung (0,45 μm filtriert):

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	3,0 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
H_3BO_3	0,6 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,2 g/L
EDTA	4 mM

Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v) NH_3 zur pH-Regulierung

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

TAE-Puffer:

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele

Bromphenolblau	1 mg/mL
Xylencyanol	1 mg/mL
Glycerin	50 % v/v

Puffer für die SDS-PAGE:

1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson:

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/L

pH 8,8 stellt sich ein.

4x Lower-Tris:

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

4x Upper-Tris:

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

5x Auftragspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % w/v
Glycerin	25 % v/v
Bromphenolblau	0,25 mg/mL
2-Mercaptoethanol	12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v
Coomassie Brilliantblau R-250	0,25 % w/v

Entfärbelösung: wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v
Wasser	93 % v/v

Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:

Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24/1

Phenol:

Kristallines Phenol (Reinheit $\geq 99\%$; unter Schutzgas destilliert) wird bei 65°C im Wasserbad geschmolzen, mit $\frac{1}{2}$ Volumen Wasser gemischt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

Mit Wasser gesättigtes Phenol (s. o.) wird im Verhältnis 1/1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4°C aufbewahrt.

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4.8:

3 M Na-Acetat wird mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt

Sonstige Puffer:

AP-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
pH 8,8 mit HCl einstellen	

10 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid	98 % v/v
0,5 M EDTA	2 % v/v
Bromphenolblau	2 % w/v

PBS:

KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaCl	115 mM
pH 7,4 stellt sich ein	

PBS/T:

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

PBS/T 0,5:

PBS mit 0,5 % v/v Tween 20

Periplasma-Aufschlußpuffer:

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

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer):

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	50 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

TE-Puffer:

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

UV/VIS-Puffer:

NaH ₂ PO ₄	1 mM
Na ₂ HPO ₄	19 mM
NaCl	100 mM

Puffer für die Circular dichroismus-Spektroskopie (pH 8,0):

KH ₂ PO ₄	20 mM
K ₂ SO ₄	50 mM

2.2 Mikrobiologische- und molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

Die Bakterienkolonien eines *E. coli*-Stammes wurden durch Drei-Ösen-Ausstrich auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank vereinzelt. Die Selektion auf genomische Marker, Episome oder Plasmide erfolgte durch den Zusatz entsprechender Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu vier Wochen zum Animpfen neuer Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Für 4 mL Kulturen wurden dabei 13 mL-Kulturröhrchen verwendet. Kulturen größeren Maßstabs wurden in Erlenmeyer-Kolben mit dem 2,5-fachen Gefäßvolumen kultiviert. Bis zu einem Volumen von 50 mL wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 L wurden im Verhältnis 1/50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Die Zelldichte wurde im linearen Meßbereich optisch bei 550 nm (OD₅₅₀) mittels eines Ultrospec 2000- oder Ultrospec 3000-Spektralphotometers bestimmt. Die Meßwerte wurden jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen in 1/80 Volumen des ursprünglichen Kulturmediums in Selektivmedium einschließlich Glycerin (Endkonzentration 20%) versetzt und bei -20 °C für die mittelfristige bzw. nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C für die langfristige Lagerung eingefroren.

2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli*-Zellen zuvor in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde neben der klassischen CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972) und der Methode nach Inoue (1990) auch die Methode der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt.

Die chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wiesen dabei eine Transformationseffizienz zwischen 10⁵ bis 10⁹ cfu pro µg Plasmid-DNA auf. Zur Herstellung einer Zufallsbibliothek möglichst großer Diversität waren dagegen höhere Transformationsausbeuten erforderlich, die durch das leistungsfähigere Verfahren der Elektroporation erreicht wurden. Diese Methode besaß eine Transformationseffizienz von bis zu 10¹⁰ cfu pro µg Plasmid-DNA.

2.2.2.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

50 mL LB-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 mL-Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 mL eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 mL 50 mM CaCl₂, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µL entweder direkt für die Transformation verwendet oder, nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung ultrakompetenter Zellen

100 mL SOB-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 22 °C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Danach wurde der Kolben für 10 min. auf Eis, unter gelegentlichem Schwenken, inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 2500 g, 4 °C in 50 mL-Falcons zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Zellen wurden in insgesamt 30 mL TB-Puffer resuspendiert und für weitere 10 min. auf Eis inkubiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren (10 min, 2500 g, 4 °C) wurden die Zellen in insgesamt 8 mL TB-Puffer mit sterilfiltriertem, wasserfreiem DMSO (7 % v/v Endkonzentration) resuspendiert, vorsichtig gemischt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert und aliquotiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C.

2.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden 200 µL Zellsuspension mit einem Volumen von 5 µL der DNA-Lösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 45 sec auf 42 °C erwärmt, CaCl₂-kompetente Zellen anschließend in 2 mL LB-Medium, ultrakompetente Zellen in 2 mL SOC-Medium überführt und 45 min bei 37 °C geschüttelt. Abhängig von der erwarteten Zahl an Transformanden wurden 100 µL bis 2 mL der Zellsuspension auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Herstellung elektrokompeter Zellen und Elektroporation

Die Präparation elektrokompeter Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue für die Herstellung von Phagemidbibliotheken wurde in Anlehnung an die Vorschriften von Tung & Chow (1995) und (1996) durchgeführt.

Von einer am Vortag frisch ausgestrichenen XL1-Blue LB/Tet-Agarplatte wurde eine 5 mL Vorkultur in LB-Flüssigmedium inokuliert. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C, 180 rpm wurde eine 50 mL LB-Kultur im Verhältnis 1/1000 mit der stationären Vorkultur angeimpft und für weitere 12 Stunden bei 30 °C, 180 rpm inkubiert. 1,5 L LB-Medium wurden mit dieser 50 mL-Kultur angeimpft und bei 26 °C, 160 rpm bis zu einer $OD_{660} = 0,6$ inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten im Kühlraum unter Verwendung gekühlter Reagenzien und Materialien durchgeführt. Der Kulturkolben wurde zunächst für 30 min auf Eiswasser unter gelegentlichem Schwenken gleichmäßig gekühlt, die Zellsuspension anschließend für 15 min bei 4000 rpm, 4 °C zentrifugiert (SLA 3000). Das nach Dekantieren des Überstandes erhaltene Zellsediment wurde vorsichtig in insgesamt 800 mL bidestilliertem Wasser inklusive 10% Glycerin (autoklaviert) resuspendiert und auf 2 Zentrifugenbecher (SLA 3000) verteilt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min, 4000 rpm, 4 °C wurde das Zellsediment wie oben beschrieben resuspendiert und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, Flüssigkeitsreste vorsichtig mit der Pipette abgezogen und die Zellen in insgesamt 600 µL bidestilliertem Wasser inklusive 10% Glycerin (autoklaviert) aufgenommen und das Volumen letztendlich auf 2 mL aufgefüllt. Für die anschließende Elektroporation wurden die erhaltenen Zellen zu je 100 µL auf Eis aliquotiert und sofort eingesetzt.

Die Elektroporation wurde mit einem BioRad *MicroPulser* unter Verwendung bei -20 °C gekühlter BioRad-Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Für die Herstellung der Phagemid-Bibliotheken wurden je 100 µL der elektrokompetenten XL1-Blue Zellen mit je 10,0 µl entsprechend 2,0 µg ligierter und durch Fällung entsalzter (siehe Abschnitt 2.2.4.5), ligierter oder amplifizierter Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.4.3) eingesetzt. Zellen und Plasmid-DNA wurden zunächst auf Eis gemischt und für eine Minute inkubiert, bevor durch Anlegen eines Pulses von 12,5 kV/cm für 6 ms die Zellen transformiert wurden (*MicroPulse* Programm Ec2 für Bakterienzellen). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Elektroden frei von Kondenswasser waren, um Lichtbogenbildung, verbunden mit Thermoemission und Zelltod, zu vermeiden. Um die Zellvitalität zu gewährleisten wurde der Elektroporationsansatz ferner umgehend mit 2 mal 1 mL SOC-Medium gespült und das gesamte Volumen in einen bei 37 °C im Wasserbad vorinkubierten Schüttelkolben überführt. Nach Beendigung aller Transformationen wurde der gesamte Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C, 180 rpm inkubiert.

Im Anschluß wurden die Elektroporationsansätze entweder zur Herstellung von Phagemid-Bibliotheken (siehe Abschnitt 2.3.2) oder seltener für den Einsatz im Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) verwendet.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Zellyse

2.2.3.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Analyse einzelner Transformanden, die durch Infektion mit Phagemiden nach der Affinitätsanreicherung, nach Umklonierungen oder durch ortsgerichtete Mutagenese erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab isoliert. Die DNA wurde dabei aus stationären 4 mL-Übernachtskulturen unter Verwendung der Plasmid-Isolierungs-Kits der Firmen Genomed (*Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit*) oder Promega (*Wizard Plus SV Minipreps Kit*) nach Herstellerangaben präpariert und für Transformationen, Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt. Bei der Präparation wurden typischerweise 10 bis 20 µg DNA in 50 µL TE/10-Puffer erhalten. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Plasmid-Midipräparation

Um DNA-Mengen für präparative Restriktionsansätze zu gewinnen, bzw. zur Konservierung der BBP-Zufallsbibliotheken nach der Elektroporation, wurde die Plasmid-DNA im 50 mL-Maßstab isoliert. Ausgehend von einer stationären 50 mL-Kultur wurde die DNA mit Hilfe des Qiagen *Plasmid Midiprep Kits* gemäß Herstellerangaben präpariert. Die DNA-Ausbeuten betragen ca. 100 µg in 100 µL TE-Puffer. Zur vollständigen Entfernung von Exonukleasen und anderer inhibitorischer Biomakromoleküle wurde im Anschluss eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6.1). Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4 In vitro Modifizierung von DNA

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

2.2.4.1 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Durch eine 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden wurde deren kovalente Verknüpfung durch T4 DNA-Ligase mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls ermöglicht. Dies war z. B. für die Zirkularisierung des bei der Polymerase-Reaktion *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig (siehe Abschnitt 2.2.4.2).

Dazu wurden ca. 200 pmol des gereinigten Oligodesoxynukleotides zusammen mit 3 µL 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (700 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol, DTT), 1,2 µL 10 mM ATP, 0,5 µL (5 U) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 µL für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Polynukleotidkinase wurde anschließend bei 65 °C für 10 min zur Inaktivierung inkubiert. Restliche phosphorylierte

Oligodesoxynukleotide, die nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese eingesetzt wurden, wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.4.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Vorschrift von Geisselsoder (Geisselsoder *et al.*, 1987) entsprechend der Methode nach Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987) angewandt. Dabei wird zunächst ein die gewünschten Substitutionen tragendes Oligodesoxynukleotid mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmides unter Ausbildung entsprechender Basen-fehlpaarungen hybridisiert. Dabei dient das angelagerte Oligodesoxynukleotid in der anschließenden PCR-Reaktion als *Primer* für die *in vitro*-Synthese des zweiten DNA-Stranges, der dann mit Hilfe einer DNA-Ligase kovalent verknüpft und somit zirkularisiert wird.

Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i und dem damit verbundenen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*⁺-Stammes mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierten Mutationen selektiert.

Für die Hybridisierung wurden ca. 250 ng ssDNA mit 1 µL 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂) und 0,5 µL (3,3 pmol) des phosphorylierten Oligodesoxynukleotides (vgl. Abschnitt 2.2.4.1) in einem Gesamtvolumen von 10 µL gemischt. Die Lösung wurde 5 min lang in einem auf 80 °C vorgeheizten Metallblock inkubiert, und in diesem im Verlauf von 3 bis 4 h auf RT abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Für die Neusynthese und Zirkularisierung des zweiten DNA-Stranges wurden 1,0 µL 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µL (1,5 u) T4 DNA-Polymerase (NEB) und 1 µL (3 u) T4 DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und zunächst für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert. 5 µL dieser Lösung wurden im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer verdünnt, und von dieser Lösung wurden 5 µL für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet. Die verbleibenden 45 µL der Lösung wurden bei -20 °C gelagert. Das restliche Volumen des unverdünnten Reaktionsansatzes (ca. 8 µL) wurde zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion durch analytische Agarose-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR:

Für die konzertierte Mutagenese aller 16 Aminosäurepositionen wurde eine zweistufige *PCR*-Strategie verwendet (Beste, 1998) Diese beruhte auf dem Einsatz von vier degenerierten Oligodesoxynukleotiden, welche jeweils eine der vier zu mutierenden Peptidschleifen über-

spannte. Je ein *Primer*-Paar diente in der ersten Stufe der *PCR* der Erzeugung zweier Fragmente A und B mit den mutierten Schleifenregionen 1 und 2 sowie 3 und 4. Im zweiten *PCR*-Schritt wurde das Strukturgen der BBP-Varianten voller Länge mittels eines die Fragmente A und B flankierenden *Primer*-Paares und eines vermittelnden Oligodesoxynukleotides assembliert. Für den *PCR*-Ansatz wurden 10 ng Plasmid-Template-DNA des BBP-Strukturgens in einem Gesamtvolumen von 100 μL mit jeweils 200 μM der vier natürlichen dNTPs, sowie 50 μM der beiden zusätzlich gereinigten *Random-PCR* Oligodesoxynukleotide versetzt. Der Reaktionsansatz enthielt zusätzlich 10 μL 10-fach *Taq*-Puffer (Promega) und 2 μL (5 U/ μL) *Taq*-Polymerase (Promega). Die *PCR* wurde in aufeinanderfolgenden Thermozyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA für 1 min bei 94 °C; 2. Hybridisierung der Primer an die komplementären DNA-Sequenzen für 1 min bei 60 °C; 3. „Hot Start“-Synthese der DNA für 1,5 min bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 19-mal wiederholt und anschließend zur Vervollständigung der Polymerisationsprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde ein Kontrollansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt. Für die Ligierung eines 30 pmol-Ansatzes der Zufallsbibliothek wurde die Assemblierungs-*PCR* in einem 2 mL-Maßstab durchgeführt. Dieser bestand aus 200 μL 10-fach Reaktionspuffer, 40 μL dNTP-Mischung (10 mM-Stammlösung), je 100 μL der flankierenden Oligodesoxynukleotide (10 μM), je 1 pmol der gereinigten (siehe Abschnitt 2.2.5.2) *PCR*-Fragmente A und B, 20 pmol des zusätzlich gereinigten (siehe Abschnitt 2.2.5.2 und 3.7.2) vermittelnden *Primers*, 20 μL *Taq*-Polymerase (5 U/ μL) und wurde mit dem entsprechenden Volumen bidestilliertem Wasser auf 2 mL aufgefüllt. Die Synthese wurde mit den gleichen Parametern mit Ausnahme der auf 55 °C gesenkten Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Error Prone-PCR:

Um statistisch verteilt Mutationen in die Gene verschiedener BBP-Varianten einzuführen, wurde eine Fehler erzeugende *PCR* nach dem Protokoll von Zaccolo *et al.* (1996) durchgeführt. Dazu wurden die Nukleotidanaloga 2'-Desoxy-P-nukleosid-5'-triphosphat (dPTP) und 8-Oxo-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP) zusätzlich zu den natürlichen Desoxynukleotiden eingesetzt. In einem Ansatz von 20 μL Gesamtvolumen wurden 5 bis 10 fmol Plasmid-DNA als Matrize sowie je 10 pmol der beiden Oligodesoxynukleotide GB-1 und GB-2 mit 2 μL 10-fach *Taq*-Puffer, 1,6 μL 25 mM MgCl_2 , 4 μL dNTP-Mix und Nukleotidanaloga mit einer Endkonzentration von 60 μM im Ansatz versetzt. Nach initialer Denaturierung der Matrizen-DNA für 1 min bei 94 °C wurde die Amplifizierung der DNA in 20 Zyklen, bestehend aus 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA für 1 min bei 94 °C; 2. Hybridisierung der Primer an die komplementären DNA-Sequenzen für 1,5 min bei 60 °C; 3. Synthese der DNA für 1,5 min bei 72 °C durch einmaligen „Hot Start“ mit 5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega) durchgeführt. Eine nachfolgende

Vervielfältigung der Syntheseprodukte wurde mit 5 µl des *Error Prone-PCR*-Ansatzes als Matrize in Abwesenheit der Nukleotidanaloga durchgeführt, um gleichzeitig eine Verringerung der Restkonzentration an Analoga durch Verdünnung zu erreichen. Sonstige Reaktionsbedingungen waren identisch. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.6.5) isoliert und gereinigt.

2.2.4.4 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie die Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde entweder derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen oder, bei sehr unterschiedlichen Puffern, die Reaktionen nacheinander unter schrittweiser Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt.

Bei analytischen Spaltungen wurden typischerweise ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µL für 1 h inkubiert. Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50–100 µL für 2 h durchgeführt. Für Plasmid-Verdaus wurden dabei 2–10 µg DNA und 10–60 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Isolierte und gereinigte PCR-Fragmente wurden mit 60 U pro µg DNA gespalten. Für die Ligierung der mutierten BBP-Strukturgene mit dem Rückgrat des *Phage-Display*-Vektors pBBP38 wurden das assemblierte Fragment (siehe Abschnitt 2.2.4.1) und pBBP38 im präparativen Maßstab mit dem Restriktionsenzym *BstXI* (Promega) geschnitten. Das Volumen des Ansatzes betrug 10 µL pro µg DNA bei einer enzymatischen Aktivität von 5 U pro µg DNA. Ferner wurde strengstens darauf geachtet, eine konstante Temperatur von 50 °C einzuhalten und die Inkubationszeit von exakt 60 min einzuhalten, um eine effiziente Restriktion zu gewährleisten und unspezifisches Restriktionsverhalten zu vermeiden.

Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.1 und 2.2.6.5) isoliert und gereinigt.

2.2.4.5 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. In einem Standardansatz z. B. bei Umklonierungen, wurden dazu 50 bis 200 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µL in Gegenwart von 10-fach T4 DNA-Ligase Puffer und 1,5 Weiss *Units* T4 DNA-Ligase eingesetzt. Der Ansatz wurde für 2–20 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Für einfache Umklonierungen wurde das Enzymsystem der

Firma Fermentas verwendet. Für den Kolonie-Filterstapeltest war eine höhere Ligierungseffizienz notwendig, weshalb das Enzymsystem der Firma Promega verwendet wurde (siehe Abschnitt 3.7.1.2). Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C (Fermentas) bzw. 70 °C (Promega) für 10 min wurden jeweils 5 µL des Ligierungsansatzes für die Transformation eines chemisch-kompetenten *E. coli*-Stammes verwendet.

Für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek wurden die beiden DNA-Fragmente, d. h. das Vektor-Fragment und das PCR-Fragment, welches den der Zufallsmutagenese unterworfenen Teil des BBP-Gens enthielt, in äquimolarem Verhältnis eingesetzt. Die Ligierung erfolgte unter Zusatz von 1/10 Volumen 10-fach T4 DNA-Ligase-Puffer (Promega), 300 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT und 10 mM ATP bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/µL und einer Konzentration der T4 DNA-Ligase (Promega, 3 U/µL) von 0,1 U/µL. Der Ansatz wurde für 72 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert, durch Ethanol-Fällung (siehe Abschnitt 2.2.6.1) entsalzt und zur Transformation des *E. coli*-Stammes XL1-Blue mittels Elektroporation verwendet.

Die Elektroporationsküvetten wurden für den Einsatz in Testtransformationen oder die für den Kolonie-Filterstapeltest bestimmten Elektroporationsansätze regeneriert. Dazu wurden sie zunächst in H₂O aufbewahrt, um ein Austrocknen zu verhindern. Anschließend wurden die Küvetten für 10–15 min in 10 mM HCl pH 2,0 unter Rühren gewaschen und mindestens sechs Mal einzeln mit H₂O gespült. Nach dem Spülen mit 70 % Isopropanol wurden die Küvetten zwei bis drei Tage im Trockenschrank bei 80 °C vollständig getrocknet.

2.2.5 Gelelektrophorese von DNA

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte in horizontalen Agarosegelen (Sambrook & Russell, 2006) und wurde sowohl zur analytischen Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 1 % oder 1,5 % w/v Suspension von Agarose in TBE- oder TAE-Puffer in der Siedehitze homogenisiert, mit 1/10000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das polymerisierte Gel wurde anschließend in eine mit demselben Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Proben tasche mit 10 µL DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10-fach Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 60 min bei einer Spannung von 90 V. Durch Bestrahlen mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm wurden die DNA-Fragmente mittels der interkalierten Ethidiumbromidmoleküle sichtbar und konnten unter Verwendung eines Rotfilters photographisch dokumentiert werden. DNA-Konzentra-

tionen wurden anschließend durch eine analytische Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung von DNA-Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Herstellung von Agarosegelen zur präparativen Auftrennung und anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von „*low melting point*“-Agarose und TAE-Puffer. Hierbei wurden entsprechende Probenaschen mit einer Beladung bis max. 50 µg DNA verwendet und die Elektrophorese für 90 min bei 70 V betrieben. Die Banden einzelner DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA im Anschluss gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.6.5).

2.2.5.2 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Reinigung der für die Herstellung der Phagemidbibliothek notwendigen Oligodesoxynukleotide (siehe Abschnitt 2.1.2.1) wurde mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Ausgehend von einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff, 25 % w/v Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19/1 (*Sequagel Concentrate*), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (*Sequagel Diluent*) sowie 10-fach TBE-Puffer wurden 12 % w/v Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE-Puffer gemischt. Durch Zugabe von 40 µL TEMED und 1 mL 10 % w/v APS zu 100 mL dieser Lösung wurde die Polymerisation gestartet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TBE-Puffer verwendet.

Die Reinigung von Oligodesoxynukleotiden erfolgte durch vertikale Gelelektrophorese in 1,5 mm starken Gelen. Zur Herstellung des Geles wurden zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit entsprechenden Abstandhaltern durch Klammern fixiert, die polymerisierende Gellösung in die entstandene Gelkammer gefüllt und ein Geltaschenformer eingebracht. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 40 W für ca. 4 h durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker das Gelende erreicht hatte. Die Reinigung erfolgte ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes gemäß dem von Skerra (1989) ausgearbeiteten Protokoll.

Die Hälfte des lyophilisierten Rohproduktes wurde in 20 µL H₂O gelöst, mit 20 µL Formamid-Auftragspuffer (98 % v/v Formamid, entionisiert, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % w/v Bromphenolblau) versetzt, für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Lösung a 20 µL auf zwei Taschen des Polyacrylamid-Harnstoffgeles als möglichst schmale Zone aufgetragen und die Elektrophorese gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor fluoreszierendem Hintergrund sichtbar gemacht („*UV-Shadowing*“). Die Hauptproduktbande wurde dann exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung des Gelstücks wurde dieses in eine 1 mL-Einwegspritze überführt, deren Spitze vorher über der Flamme zugeschmolzen und nach

Erkalten mit einer gelben Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 mL TE-Puffer wurde das Gelstück durch die Bohrung gepreßt und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die Gelmasse wurde mit Hilfe einer *Spin-X*-Filtereinheit abgetrennt (Sorvall RMC 14, 18500 g, RT, 5 min) und das Filtrat (ca. 0,9 mL) dreimal mit je 1 mL 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 400 µL eingengt wird. Nach Zugabe von 40 µL 3 M NaOAc pH 4,8, 4 µL 1 M MgCl₂ und 1 mL Ethanol wurde die DNA bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 30 min), das Präzipitat mit 500 µL 70 % v/v Ethanol gewaschen, im Vakuum für 2 min getrocknet und in 50 µL H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration wurden 2 µL der Lösung mit 398 µL TE-Puffer verdünnt (1/200) und die Absorption bei 260 nm gegen TE-Puffer gemessen. Der Extinktionskoeffizient ergab sich näherungsweise aus der Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen (A: 15,0 mM⁻¹cm⁻¹; C: 7,4 mM⁻¹cm⁻¹; G: 11,8 mM⁻¹cm⁻¹; T: 8,8 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.6 Reinigung in-vitro modifizierter bzw. gelektrophoretisch getrennter DNA

2.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Um bei einer Plasmid-Präparation verbliebene Exonukleasen wirksam zu entfernen oder DNA, die nachfolgend enzymatisch verändert werden soll von inhibitorischen Biomakro-molekülen zu befreien (siehe Abschnitt 2.7.1.2), wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µL 3 M NaOAc pH 4,8 versetzt und das Volumen mit H₂O auf 400 µL eingestellt. Nach Zugabe von 400 µL Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und bis zur Phasen-trennung zentrifugiert (18500 g, RT, 4 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µL Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 1 mL eiskaltem Ethanol p. a. gemischt und für mindestens 1 h auf -20 °C gekühlt. Das nach Zentrifugation (18500 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µL 70 % v/v Ethanol p. a. gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und verworfen, das Präzipitat dagegen wurde für ca. 10 min bei 50 °C im Thermo-block bei offenem Deckel des Reaktionsgefäßes inkubiert. Das auf diese Weise sanft getrocknete Präzipitat wurde im Anschluß in 10–500 µL TE/10 resuspendiert und die DNA entweder langfristig bei -20 °C oder wie im Falle der für die Herstellung der Phagemid-Bibliothek bestimmten DNA kurzfristig bei 4 °C gelagert.

2.2.6.2 Fällung des Ligierungsansatzes zur Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek

Zur Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek wurde der Ligierungsansatz von Vektorrückgrat und *PCR*-Insert vor der Elektroporation entsalzt. Dazu wurde jeweils 14,25 µg DNA entsprechend 1425 µL des Ligierungsansatzes auf 15 mL-Polycarbonatröhrchen verteilt und mit 1 Vol 5 M NH₄OAc, 1/40 Vol tRNA aus *S. cerevisiae* (Stammlösung 10 mg/mL in TE-Puffer) sowie 4 Volumen Ethanol p.a. versetzt. Die Fällung erfolgte bei RT für 1 h. Die Ansätze wurden zentrifugiert (Sorvall SS34 mit Hartgummiadaptern für 15 mL-Röhrchen, 14000 rpm, 4 °C, 30 min) und das Präzipitat mit jeweils 2,0 mL 70 % v/v Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und verworfen, das Präzipitat dagegen wurde für einige Minuten bei 50 °C im Wasserbad oder im Thermoblock bei geöffnetem Deckel getrocknet. Das auf diese Weise sanft getrocknete Präzipitat wurde im Anschluß zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/µL in Wasser resuspendiert und kurzfristig bei 4 °C gelagert.

2.2.6.3 Reinigung elektrophoretisch getrennter DNA mittels JETSORB Gel Extraction Kit

Die im Rahmen von Standardklonierungen geschnittenen und elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente sowie die Syntheseprodukte des ersten *PCR*-Schrittes der Herstellung nativer BBP-Zufallsbibliotheken oder durch den Einsatz von Nukleotidanaloga zufällig mutierter Bibliotheken von BBP-Varianten für die Affinitätsmaturierung wurden mittels des *JETSORB Gel Extraction Kit* gereinigt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente zur Vermeidung von Strahlenschäden mit UV-Licht geringer Intensität (312 nm) sichtbar gemacht und gewünschte Fragmente mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Rückgewinnung aus dem Gelstückchen erfolgte mit dem *JETSORB Gel Extraction Kit*. Die DNA wurde in 10–20 µl TE/10-Puffer aufgenommen.

2.2.6.4 Reinigung von *PCR*-Syntheseprodukten mittels des E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit

Um die Syntheseprodukte von Polymerase-Kettenreaktionen nachfolgenden enzymkatalysierten Prozessen, wie Sequenzierungen und der Restriktion durch Endonukleasen, direkt zuführen zu können, mußten inhibitorische wirkende Biomakromoleküle entfernt werden. Dies geschah auch im Falle des für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek bestimmten, *PCR*-assemblierten BBP-Strukturgens mittels des E.Z.N.A. *Cycle-Pure Kit*. Die Elution der reinen DNA erfolgte mit 30–50 µL TE/10-Puffer.

2.2.6.5 Präparative Reinigung elektrophoretisch getrennter DNA aus „low melting point“-Agarose

Die nach der Elektrophorese ausgeschnittene DNA (siehe Abschnitt 2.2.5.1) wurde zunächst in Portionen von je 200 mg pro Gelstück auf 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit 200 µL LMP-Puffer (0,1 M Tris-Acetat pH 7,5; 0,5 M NaCl; 5 mM EDTA pH 8,0) versetzt. Das Gemisch wurde unter gelegentlichem Schütteln für 10 min bei 65 °C bis zum Zustand der Schmelze inkubiert. Auf RT abgekühlt wurde 400 µL Phenol zugegeben und gründlich geschüttelt. Nach Zentrifugation (Eppendorf 5415 C und 5415 R, 4 °C, 5 min, 15 000 rpm) wurde die klare obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktionsprozedur wurde mit 400 µL Phenol/Chloroform und anschließend 400 µL Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt.

Dann wurde die abgenommene wässrige Phase mit 1 mL Ethanol p.a. versetzt und mindestens 30 min auf –80 °C abgekühlt. Das nach Zentrifugieren (Eppendorf 5415 C und 5415 R, 4 °C, 30 min, 15 000 rpm) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µL 70 % v/v Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Fragment wurde in 20 µL TE/10 gelöst.

Die Konzentration der DNA wurde in einer analytischen Gelelektrophorese durch Abgleich mit einem internen Größenstandard bekannter Konzentration ermittelt.

2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

(nach Beste, 1998)

Die Analyse der Sequenzintegrität *PCR*-amplifizierter oder mutagenisierter DNA erfolgte mit dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977). Ausgehend von doppelsträngiger zirkulärer Plasmid-DNA wurde bei diesem Verfahren mittels des ABI PRISM® *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* und eines geeigneten Oligodesoxynukleotides (siehe Abschnitt 2.1.2.3) für die Sequenzierungs-*PCR* die DNA-Kette anhand der Matrize einzelsträngig neu synthetisiert. Das Substrat der im Kit enthaltenen modifizierten *Taq* DNA-Polymerase (Ampli*Taq* (Tabor & Richardson, 1995)) bestand neben den natürlichen dNTPs aus mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleosidtriphosphaten, den Terminornukleotiden (*BigDye Terminators* (Rosenblum *et al.*, 1997)), die statistisch zu einem Abbruch der Polymerisation bei gleichzeitiger 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung des Syntheseproduktes führten. Die so entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden anschließend mittels des ABI Prism 310 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) analysiert. Dazu wurden die Syntheseprodukte im Sequenzierautomaten durch Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6, Applied Biosystems) aufgetrennt und die fluoreszenten Gruppen am Ende der Laufstrecke durch einen Argonionenlaser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera bei vier verschiedenen Wellenlängen detektiert und als digitales Signal an einen Macintosh G3 Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Roh-

daten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (*DNA Sequencing Analysis* 3.3, Applied Biosystems) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Die lineare *PCR*-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 μL durchgeführt, wobei 4 μL des *BigDye Ready Reaction Mix* mit je 1–2 μL Plasmid-DNA ($\sim 200\text{ ng}$), 2 μL Sequenzierprimer (1,6 μM) und 2–3 μL H_2O vermischt. Diese Mischung enthielt Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxynukleotide sowie die fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotide in geeigneten Konzentrationen. Nach Überschichtung mit Mineralöl und erfolgter initialer Denaturierung bei 95 °C für 5 min wurde folgender *PCR*-Zyklus 25-mal durchlaufen: 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 60 °C, 4 min. Nicht umgesetzte Komponenten wurden sodann entfernt. Dazu wurden die Syntheseprodukte durch Zugabe von 2,5 μL 125 mM EDTA und 30 μL Ethanol p. a. für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (18500 g, RT, 30 min) wurde das Präzipitat mit 125 μL 70% (v/v) Ethanol p.a. vorsichtig gewaschen und bei RT getrocknet. Das Präzipitat wurde in 14 μL *Template Suppressor Reagent* (TSR)-Puffer resuspendiert. Die Sequenzanalyse wurde schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM 310 *Data Collection*) gestartet.

2.3 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken und Affinitätsanreicherung mittels *Phage-Display*

Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurden durch Elektroporation mit der Bibliothek der Phasmidvektoren transformiert, die für die Varianten des BBP-Fusionsproteins kodierten. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen wurden Phagemide erzeugt, die die Varianten des BBP-Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche präsentierten.

2.3.1 Propagierung von Helferphagen

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

50 mL 2YT/Tet-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in 2YT/Tet angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{550} = 0,3$ inkubiert. 10 mL dieser Kultur wurden in einen auf 37 °C temperierten, sterilen 50 mL-Erlenmeyer-Kolben überführt und die Zellen mit $2 \cdot 10^{10}$ pfu VCS-M13 Helferphagen (Stratagene, 10^{11} pfu/mL), entsprechend einer moi von 10, infiziert. Nach 30 min bei 37 °C und 200 rpm wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ eingestellt und für weitere 8 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Um die Bakterien abzutöten, wurde die Kultur anschließend im Wasserbad für 10 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt, in einen hitzesterilisierten Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SS-34, 12000 g, 4 °C, 15 min).

Der Überstand mit den Phagen wurde nach einer 0,45 µm-Filtration bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Für die Titerbestimmung der hergestellten Helferphagen wurden 50 mL 2YT/Tet-Medium im Verhältnis 1/100 mit einer stationären *E. coli* XL1-Blue-Kultur in 2YT/Tet angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurde 2YT-Weichagar durch Erhitzen verflüssigt und in ein 13 mL-Kunststoff-Kulturröhrchen zu je 3 mL abgefüllt und im Wasserbad auf 48°C temperiert. Jeweils 100 µl der exponentiell wachsenden XL1-Blue-Kultur sowie 100 µl der Helferphagenlösung zweier unabhängiger Verdünnungsreihen in 2YT-Medium in den Verdünnungsstufen 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ und 10⁻¹⁰ wurden zu dem Weichagar gegeben, vorsichtig vermischt und zügig auf 37°C temperierten 2YT/Tet-Agarplatten gegossen. Durch Schwenken der Platte wurde die Zellsuspension jeweils gleichmäßig verteilt, um einen einheitlichen Zellrasen zu erhalten. Nach Erstarren des Weichagars bei RT wurden die Platten für 8 h bei 37°C und vor dem Auszählen noch bis zu 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lagen zwischen 10¹¹ und 10¹² pfu/mL.

2.3.2 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von dem Phasmidvektor pBBP38 hergestellt. Der Vektor besaß die für die Replikation und Verpackung einzelsträngiger Phasmid-DNA erforderliche intergenische Region des filamentösen Phagen f1 und kodierte unter Kontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein der jeweiligen BBP-Variante und einer verkürzten Form des Phagenhüllproteins pIII (Aminosäuren 217–406; ΔΔpIII).

2.3.2.1 Phagemid-Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38

Die Zellsuspension der Transformation elektrokompenter XL1-Blue Zellen mit dem ligierten, das mutierte BBP-Strukturgen tragenden Plasmid pBBP38 (siehe Abschnitt 2.2.2.4) von ca. 50 mL (bei 23 Transformationsansätzen) wurde zunächst für 45 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde diese Zellsuspension in 4 L 2YT/Amp-Medium bis zu einer OD₅₅₀ = 0,1–0,2 verdünnt.

Zur Ermittlung der Diversität der Zufallsbibliothek wurde ein Aliquot (100 µL ausreichend) der Zellsuspension vor Verdünnung und nach Verdünnung (s. o.) abgenommen und jeweils 100 µL der Verdünnungsstufen 10⁻⁴–10⁻⁶ zweier unabhängiger Verdünnungsreihen in LB-Medium auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert, die auf 37°C temperiert waren. Die Platten wurden für etwa 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Zahl der erhaltenen Bakterienkolonien bestimmt.

Währenddessen wurde die verdünnte Bibliothek a 2·2 L in 5 L Erlenmeyer-Kolben bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 (Dauer etwa 6–8 h) weiter inkubiert. Anschließend wurden die 4 L vereinigt und auf 2·1 L auf zwei 5 L Erlenmeyer-Kolben verteilt (Rest der Kultur wurde

verworfen). 1 L der Kultur wurde jeweils zur Herstellung einer Glycerin-Stammlösung einschließlich einer Plasmid-Midipräparation der Bibliothek sowie zur Herstellung von Phagemiden der Bibliothek verwendet (siehe unten).

2.3.2.2 Herstellung einer Glycerin-Stammlösung der Bibliothek und Herstellung einer Plasmid-Midipräparation

1 L der Kultur wurde bei 37°C und 160 rpm bis zu einer $OD_{550} = 2,0$ weiter geschüttelt. Dann wurden 20 mL entnommen und in einem 500 mL Schüttelkolben mit 180 mL LB/Amp-Medium für 12 h bei 37°C, 160 rpm inkubiert. Nach Abzentrifugieren (SLA-3000, 5000 g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen bei -20°C gelagert oder die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.3.2).

Die restliche Kultur mit 980 mL wurde zentrifugiert (SLA-3000, 5000 g, 4°C, 15 min) und das Präzipitat in 12 mL 2YT inkl. 20% Glycerin resuspendiert. Die im Anschluß auf 12 sterile Kryo-Röhrchen aliquotierte Bibliothek wurde schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2.3 Aufarbeiten der Phagemide

1 L der Kultur wurde mit insgesamt $3,0 \cdot 10^{12}$ VCSM13-Helferphagen (siehe Abschnitt 2.3.1) infiziert ($moi = 10$) und bei 37°C für 45 min und 100 rpm inkubiert. Danach wurden 2 mL Kanamycin (Stammlösung 35 mg/mL) zugegeben und für weitere 10 min bei 26°C und 160 rpm inkubiert. Die Proteinbiosynthese der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 12,5 µL aTc (Stammlösung 2 mg/mL) pro 1 L-Kultur induziert und für 7–14 h bei 26°C, 160 rpm durchgeführt. Dann wurde die Kultur in 3 sterile 500 mL Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SLA-3000, 18000 g, 4°C, 30 min). Der Überstand wurde filtriert und auf drei 500 mL Zentrifugenbecher verteilt. Es wurde 1/4 Volumen 20% PEG 8000/15% NaCl (steril und eisgekühlt) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Fällung der Phagemide erfolgte auf Eiswasser über Nacht mindestens jedoch für 2 h. Nach neuerlichem Zentrifugieren (SLA-3000, 18000 g, 4°C, 30 min) wurde das Präzipitat in insgesamt 30 mL BBS/E-Puffer inklusive Benzamidin (Endkonzentration 50 mM = 7,83 mg/mL) mit einer 10 mL-Pipette gelöst und in sterile SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt. Die resuspendierten Phagemide wurden 1 h auf Eiswasser inkubiert und mit einer 10 mL-Pipette gemischt, bevor zentrifugiert wurde (SS34-Rotor, 40000 g, 4°C, 10 min). Vom Überstand wurden 100 µL für die Titerbestimmung der Phagemide (siehe Abschnitt 2.3.5) entnommen und der Rest in ein steriles 50 mL Falconröhrchen überführt. Der Überstand mit den Phagen wurde nach einer 0,45 µm-Filtration erneut mit 1/4 Volumen 20% PEG 8000/15% NaCl (steril und eisgekühlt) versetzt und 1 h auf Eiswasser gefällt. 1,8 mL wurden auf Eis belassen und für das anschließende Panning aufbereitet. Das restliche Volumen wurde als 2 mL Aliquots in Kryoröhrchen schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die 1,8 mL Lösung der gefällten Phagemide wurde zentrifugiert (18 000 g, 4 °C, 30 min). Das Präzipitat wurde in 300–600 µL PBS resuspendiert und bei 4 °C für 30 min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (18 000 g, 4 °C, 5 min) wurde der die Phagemide enthaltende Überstand abgenommen und bis zur Verwendung im *Phage-Display* lichtgeschützt auf Eiswasser gelagert.

2.3.2.4 Reamplifizierung der BBP-Bibliothek auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38

Die aufgearbeiteten und bei -80 °C aufbewahrten Phagemide wurden nach mehrmonatiger Lagerung nicht mehr unmittelbar für die Affinitätsanreicherung eingesetzt, da die Funktionalität der BBP-Fusionsproteine durch die enzymatische Aktivität vorhandener bakterieller Proteasen beeinträchtigt sein konnte. Deshalb wurde zunächst ein Aliquot der eingefrorenen Phagemide gefällt, nach Zentrifugieren in PBS gelöst (siehe vorheriger Absatz) und zur Reinfektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet.

Um dabei die ursprüngliche Komplexität der Zufallsbibliothek zu wahren, wurde für die Reinfektion ein 20-facher Überschuss an Phagemiden verglichen zur Diversität der Bibliothek eingesetzt. Gleichzeitig war ein zehnfacher Überschuss an XL1-Blue Zellen, verglichen zur Zahl der Phagemide notwendig, um nahezu hundertprozentige Infektionseffizienz zu gewährleisten. Das Kulturvolumen in 2YT-Medium wurde so gewählt, dass die benötigte Zellzahl bei einer $OD_{550} = 0,5$ entsprechend einer exponentiell wachsenden Kultur erreicht wurde.

Die XL1-Blue Zellen 2YT-Medium wurden bei einer $OD_{550} = 0,5$ mit den Phagemiden reinfiziert und bei 37 °C und 180 rpm für weitere 30 min inkubiert. Dann wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 mg/L zugegeben und erneut bei 37 °C und 180 rpm für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit zehnfachem Überschuss des Helferphagen VCS-M13 infiziert und für 30 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Daraufhin wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/L eingestellt, für 10 min bei 26 °C und 140 rpm inkubiert und schließlich die Biosynthese des BBP-Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin mit einer Endkonzentration von 25 µg/L für 7–14 h bei 26 °C und 160 rpm induziert. Die weiteren Schritte der Aufarbeitung der Phagemide entsprachen dem in diesem Abschnitt beschriebenen Vorgehen.

Grundsätzlich war die Reamplifizierung der BBP-Bibliothek auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38 auch mittels der konservierten Glycerin-Stammlösung (siehe oben selber Abschnitt) des transformierten XL1-Blue Stammes möglich.

2.3.3 Nachweis des GdFP-Chromophor-Biotin-Konjugates mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Der Nachweis des Produktes GdFP-Chromophor-Biotin (Abbildung 6) erfolgte durch analytische Dünnschichtchromatographie (DC). Die polare, stationäre Phase bestand aus DC Alu-

miniumoxid 60 F₂₅₄-Platten (20 × 20 cm; Merck, Darmstadt), die vor der Verwendung der Größe der Analysekammern entsprechend auf eine Länge von 10 cm und je nach Anzahl aufzutragender Proben auf eine maximale Breite von 10 cm passend geschnitten wurden. 1,5 cm oberhalb des unteren Randes der Dünnschichtfolie wurde mit Bleistift eine Startlinie gezeichnet. Zur Analyse wurden jeweils 1,0 µL der Konjugatprobe (siehe Abschnitt 2.9.1) sowie des freien Chromophors punktförmig auf die gezogene Startlinie aufgetragen. Anschließend wurden die Probenflecken durch Auflegen der Aluminiumplatte auf eine 50 °C temperierte Heizplatte für 10–20 Sekunden getrocknet, um restliches Lösungsmittel zu verdampfen. Das obere Ende der DC-Platte wurde etwa 1,5–2 cm unterhalb des Randes ebenfalls mit einer horizontalen Ziellinie für den Lauf des Lösungsmittels markiert.

Als mobile, eher apolare Lösungsmittelphase diente ein Chloroform/Methanol-Gemisch (3/1; v/v) von insgesamt 12 mL, mit dem die Analysekammer vor dem Lauf gesättigt wurde. Dazu wurde an den beiden schmalen Seiten der Kammer ein zurechtgeschnittenes Whatmann-Filterpapier 3MM (Bender & Hobein AG, München) senkrecht eingepaßt und nach Befüllen der Kammer mit dem Fließmittel bei geschlossenem Deckel die komplette Benetzung der Filter abgewartet.

Die Dünnschichtfolie wurde in die mit dem Lösungsmittel gesättigte Kammer gestellt und die Wanderung des Fließmittels entlang der DC-Platte bedingt durch Kapillarkräfte bis zur markierten Front des Laufmittels (ca. 5 min.) verfolgt. Anschließend wurde die Platte wiederum getrocknet. Der GdFP-Chromophor und das biotinylierte Konjugat konnten direkt durch die Gelbfärbung im sichtbaren Bereich identifiziert werden. Die Kopplungseffizienz der Umsetzung des Chromophors in das gewünschte Konjugat wurde anhand der Farbintensität der erhaltenen Probenpunkte abgeschätzt.

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der chemischen Synthese wurde der Retentionsfaktor R_f bestimmt. Dieser entspricht dem Verhältnis der Wanderungstrecke des Probenflecks (P) zur Wanderungstrecke des Lösungsmittelgemisches (L):

$$R_f = \frac{P}{L} \quad (1)$$

Die R_f -Werte stellen bei identischen Platten und demselben Laufmittel Stoffkonstanten dar.

2.3.4 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

2.3.4.1 Festphasen-Anreicherung

Adsorption des GdFP-Chromophor-Biotinkonjugates an funktionalisierte Polystyrolflügelstifte

Zur Anreicherung rekombinanter Phagemide durch Adsorption an eine Affinitätsoberfläche wurden sogenannte Immuno-Sticks (Nunc) verwendet, welche aus einem Polypropylen-

Röhrchen bestehen. Dieses dient als Aufbewahrungsgefäß für einen Flügelstift, dessen Polystyrol-Oberfläche eine hohe Protein-Bindungs Kapazität besitzt. Um eine effiziente Durchmischung der Lösungen zu erreichen, wurde das Röhrchen während der einzelnen Inkubationsschritte in einem Neigungswinkel von ca. 30° auf einem Rollenmischer langsam gedreht. Der Wechsel der einzelnen Inkubationslösungen erfolgte durch Überführen des Flügelstifts in ein neues Polypropylen-Röhrchen. Alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Adsorption des Zielmoleküls GdFP-Chromophor erfolgte dabei in Form eines Biotin-Konjugates (siehe Abschnitt 1.3) durch Ausbildung eines Wt-Streptavidin/Biotin-Komplexes. Der Wt-Streptavidin/Biotin-GdFP-Chromophor-Komplex wurde zunächst durch lichtgeschützte Inkubation unter Rühren von 800 µL Wt-Streptavidin (100 µg/mL) mit 6,5 µL einer 1:10 Verdünnung GdFP-Chromophor-Biotin (14,1 mM Stammlösung in DMF bezogen auf die Biotin-Gruppe; siehe Abschnitt 2.9.1) für 1 h bei RT ausgebildet. Anschließend wurden die Nunc-Immuno-Flügelstifte für 2 h lichtgeschützt und unter Rühren bei RT mit dem Wt-Streptavidin/Biotin-GdFP-Chromophor-Komplex beschichtet. Unbelegte Bindungsstellen wurden mit 1,2 mL 2% (w/v) RNase A (BioChemika; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) in PBS/T (Blockierungspuffer) für 1 h bei RT absättigt und dreimal für 2 min mit jeweils 1,2 mL PBS/T gewaschen. Die beschichteten Polystyrolstifte wurden anschließend mit einer Mischung aus 250 µL Phagemidlösung (zwischen $5,0 \cdot 10^{11}$ und $5,0 \cdot 10^{12}$ cfu/mL) und 500 µL Blockierungspuffer für 1 h lichtgeschützt und unter Rühren bei RT inkubiert, wobei sich der Komplex bindungsaktiver Phagemide mit dem präsentierten Liganden GdFP-Chromophor ausbildete. Dann wurde achtmal mit jeweils 950 µL PBS/T für 2 min lichtgeschützt und unter Rühren bei RT gewaschen. Die Elution der an das Zielmolekül komplexierten Phagemide erfolgte in diesem Fall durch Konkurrenz mit dem löslichen freien Liganden durch 30-minütige Inkubation bei RT (siehe Abschnitt 2.3.4.2).

Adsorption des GdFP-Biotin-Konjugates an Streptavidin-paramagnetische Partikel

Die Adsorption des Zielmoleküls GdFP-Chromophor erfolgte hier ebenfalls in Form des Biotin-Konjugates. Zunächst wurden 100 µL der Streptavidin-Magnet-Partikel (Roche) entsprechend 300 pmol zugänglicher Bindungsstellen dreimal für zwei Minuten unter Rotation bei RT mit je 400 µL PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Partikel mit 400 µL PBS/T inklusive 2% (w/v) RNase A (BioChemika; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) für 1 h unter Rotation bei RT blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit jeweils 400 µL PBS/T wurden die Partikel in den ersten beiden Zyklen der Affinitätsmaturierung mit einer Endkonzentration von 750 nM GdFP-Chromophor in Form des GdFP-Chromophor-Biotin-Konjugates (siehe Abschnitt 2.9.1) in 400 µL PBS inkubiert.

Im Falle der Affinitätsmaturierung mit saurer Elution (siehe Abschnitt 3.8.3) wurde die Konzentration des GdFP-Chromophors desselben Konjugates von Zyklus 1 und 2 mit 150 nM auf 30 nM in Zyklus 3 und 4, in einem zu Zyklus 4 parallel mitgeführten Ansatz 4* auf 7,5 mM gesenkt, im Falle der Affinitätsmaturierung mit basischer bzw. in Parallelansätzen

durchgeführten denaturierender Elution (siehe Abschnitt 3.2.4.2) wurde die Endkonzentration des GdFP-Chromophores innerhalb der vier Zyklen von 150 nM auf 1,5 nM jeweils um den Faktor 5 gesenkt.

Die Immobilisierung des Zielmoleküls erfolgte jeweils für 30 min lichtgeschützt und unter Rühren bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit jeweils 400 µL PBS/T0.1 wurden die Partikel in Gegenwart von 300 µL der Phagemidlösung (zwischen $5,0 \cdot 10^{11}$ und $5,0 \cdot 10^{12}$ cfu/mL) mit 100 µL PBS/T0,4 inklusive 8% (w/v) RNase A (BioChemika; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) für 30 min lichtgeschützt bei RT rotiert. Dabei wurde der Komplex zwischen bindungsaktiven Phagemiden und dem Zielmolekül GdFP-Chromophor ausgebildet. Nicht-gebundene, respektive niedrigaffine, unspezifisch gebundene Phagemide wurden in acht Waschschritten zu je 2 min mit jeweils 1 mL PBS/T abgetrennt. Bevor die Loslösung der an den Liganden komplexierten Phagemide mittels einer in Abschnitt 2.3.4.2 beschriebenen Elutionsmethode erfolgte, wurden die paramagnetischen Partikel im Zuge des achten Waschschrilles in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, um etwaige unspezifische, gegenüber der Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes bindungsaktive Phagemide, abzutrennen.

2.3.4.2 Übersicht der angewandten Elutionsmethoden

Saure Elution:

15 min mit 900 µL 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 unter Rotation bei RT; dann sofortige Neutralisation mit 210 µL 0,5 M Tris/HCl pH 4,1 (pH 7,4 stellt sich ein). Die Reinfektion des *E. coli* Stammes XL1-Blue erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Basische Elution:

30 min mit 900 µL 0,1 M Triethylamin pH 12,0 unter Rotation bei RT; Neutralisation mit 250 µL 1 M Tris/HCl pH 4,1 (pH 8,0 stellt sich ein). Bei Verwendung paramagnetischer Partikel während der Affinitätsmaturierung wurden diese nach der basischen Elution mit 1 mL der Reinfektionskultur von XL1-Blue in 2YT-Medium bei $OD_{550} = 0,5$ resuspendiert und für 30 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension mit den 3,0 mL XL1-Blue Zellen, die mit der korrespondierenden Elutionsfraktion reinfiziert worden war, vor Ausplattierung auf den großen LB-Amp-Platten (siehe Abschnitt 2.3.4) vereinigt, um eine quantitative Rückgewinnung der Phagemide zu gewährleisten.

Denaturierende Elution:

30 min mit 1,0 mL 4 M Harnstoff in PBS unter Rotation bei RT, es erfolgt eine Reinfektion von 3,0 mL XL1-Blue Zellen in 2YT-Medium bei $OD_{550} = 0,5$ mit der Elutionsfraktion und Inkubation bei 37°C, 200 rpm für 30 min (Harnstoffkonzentration bei der Reinfektion 1,0 M – keine Beeinträchtigung der Infektion und Zellvitalität). Bei Verwendung para-

magnetischer Partikel während der Affinitätsmaturierung wurden diese nach der denaturierenden Elution mit 1 mL der Reinfektionskultur von XL1-Blue in 2YT-Medium bei $OD_{550} = 0,5$ resuspendiert und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension mit den 3,0 mL XL1-Blue Zellen, die mit der korrespondierenden Elutionsfraktion reinfiziert worden war, vor Ausplattierung auf den großen LB-Amp-Platten (siehe Abschnitt 2.3.4) vereinigt, um eine quantitative Rückgewinnung der Phagemide zu gewährleisten.

Kompetitive Elution:

durch 30 min Inkubation bei RT mit 900 µL einer 1 mM Lösung des freien Liganden in PBS (10 mM Stammlösung in DMF). Die Reinfektion des *E. coli*-Stammes XL1-Blue erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

2.3.5 Amplifizierung selektierter Phagemide

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

Diejenigen Phagemide, die nach dem Elutionsschritt während der Affinitätsanreicherung erhalten wurden (siehe Abschnitt 2.3.3) – typischerweise 10^5 bis 10^9 cfu – wurden vor dem darauffolgenden Anreicherungszyklus amplifiziert, wobei in der Regel Phagemidlösungen mit einem Titer von ca. $5,0 \cdot 10^{11}$ bis $5,0 \cdot 10^{12}$ cfu/mL in 0,3–1,0 mL PBS erhalten wurden.

Aus einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in 5 mL LB-Medium, die bei 30 °C und 180 rpm inkubiert worden war, wurden 50 mL 2YT-Medium zu einer resultierenden OD_{550} zwischen 0,03 und 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Bei $OD_{550} = 0,5$ dieser exponentiell wachsenden Kultur wurden 4 mL davon mit der Elutionsfraktion infiziert und bei 37 °C und 180 rpm für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 2 min), in 600 µL 2YT/Amp-Medium resuspendiert und in Aliquots zu je 200 µL auf Agarplatten mit LB/Amp-Medium ($\varnothing = 14$ cm) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C für 12–14 h. Die Kultivierung auf Platten hatte im Vergleich zu Flüssigkulturen den Vorteil eines geringeren durch Wachstumsvorzüge bedingten Selektionsdruckes (Willats, 2002). Die Zellen der drei großen Elutionsplatten wurden anschließend resuspendiert. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber mit jeweils 10 mL 2YT von der Platte gelöst und in einem sterilen 50 mL Falconröhrchen vereinigt. Die Platten wurden anschließend mit 10 mL 2YT gespült, wobei die 10 mL Suspension von einer Platte auf die nächste überführt wurde. Die resultierenden 40 mL der Zellsuspension wurden gründlich homogenisiert und für das Animpfen von 50 mL 2YT/Amp zu einer $OD_{550} = 0,08$ verwendet. Diese Kultur wurde bei 37 °C, 180 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5$ inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und die weiteren Schritte der Herstellung, Reinigung und Konservierung der Phagemide erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

2.3.6 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

(nach Beste, 1998, Schlehuber, 2001)

Nach jedem Anreicherungszyklus wurde die Phagemid-Konzentration ausgewählter Waschlösungen sowie der Elutionslösung bestimmt, um den Verlauf der Selektion zu beurteilen. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10^{-8} , d. h. mit einem typischen Phagemidgehalt von 10^3 bis 10^4 cfu/mL hergestellt. 90 μ L der exponentiell wachsenden Zellkultur, die auch zur Amplifizierung eluierter Phagemide benutzt wurde (Abschnitt 2.3.2.2), wurden zu 10 μ L der kurz zuvor auf 37 °C temperierten Phagemidverdünnung gegeben und für 30 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur auf Kontaminationen wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit PBS hergestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und die gesamte Suspension von 100 μ L auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtiter durch Auszählen der Klone als cfu/mL bestimmt und um den Verdünnungsfaktor korrigiert. Nach Normalisierung der erhaltenen Phagentititer gegen den Ausgangstitel der eingesetzten Phagemide, dessen Wert auf 1 gesetzt wurde, wurde mittels KaleidaGraph V 3.6 (siehe Abschnitt 2.10) der Verlauf der Selektion graphisch dargestellt.

2.4 Kolonie-Filterstapeltest

(nach Schlehuber, 2001)

Nach der Affinitätsanreicherung wurde ein *Filter Sandwich Colony Screening Assay* (Skerra *et al.*, 1991) zur Identifizierung bindungsaktiver BBP-Varianten durchgeführt. Die angereicherten Varianten des BBP wurden deshalb als Fusionsproteine mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) hergestellt. Diese Domäne diente der gerichteten Immobilisierung der Varianten auf einer mit humanem Serum-Albumin (HSA) beschichteten Oberfläche (Konig & Skerra, 1998).

Das Fusionsgen wurde, ausgehend von der gereinigten Plasmid-DNA der angereicherten BBP-Varianten (siehe Abschnitt 2.2.3.2) durch Restriktion der *Bst*XI-Genkassette (siehe Abschnitt 2.2.4.4) und anschließender Subklonierung (siehe Abschnitt 2.2.4.3, 2.2.5.1 und 2.2.6.3) auf das analog verdaute Rückgrat der Vektoren pBBP22 oder pBBP61 (siehe Abschnitt 2.1.1), der für eine verbesserte Löslichkeit des Fusionsproteins zwischen dem Strukturgen des BBP und der AB-Domäne den natürlichen *Linker* des Protein G trug, hergestellt. Der Ligierungsansatz wurde entweder zur Transformation ultrakompetenter (siehe Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.3) oder elektrokompeter (siehe Abschnitt 2.2.2.4) *E. coli* TG1-F Zellen verwendet.

Die Transformanden wurden anschließend auf die Produktion von BBP-Varianten mit Bindungsaktivität durchmustert. Dazu wurden auf LB/Amp-Agarplatten passend geschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membranen (Millipore, Typ GVWP, Porengröße

0,22 μm) aufgelegt. Auf diese Membranen wurden 20 μL der jeweiligen Zellsuspension in 180 μL LB aus den Transformationsansätzen gleichmäßig ausplattiert, wobei bis zu 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platten wurden für 7,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurden ebenfalls passend zurechtgeschnittene, hydrophobe Membranen (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 μm) nach Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet, d. h. nacheinander für je 5 min in 20 mL Methanol, Wasser und PBS geschwenkt. Anschließend wurden sie für 4 h bei RT in 15 mL einer Lösung von 10 mg/mL HSA in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit dem gleichen Volumen 3 % w/v BSA, 0,5 % v/v Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 mL PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 mL LB/Amp-Medium, dem 200 $\mu\text{g/L}$ Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 $\mu\text{g/L}$ Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die vorbereiteten, mit den Kolonien bewachsenen hydrophilen Membranen wurden daraufhin so auf jeweils eine hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatten mit den beiden Membranen wurden bei 22 °C für 12–15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen BBP-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 mL PBS/T gewaschen und anschließend für 1 h in 10 mL einer 1 μM -Lösung von GdFP-Chromophor-Biotin in PBS/T inkubiert. (= 7,1 μL GdFP-Chromophor-Biotin (1,4 mM Arbeitslösung in DMF) in 10 mL PBS/T).

Um durch die BBP-Varianten gebundenes Chromophor-Biotin nachzuweisen, wurden die Membranen nach zweimaligem Waschen für 5 min in 20 mL PBS/T für 1 h mit 10 mL ExtrAvidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:10000 verdünnt in PBS/T) inkubiert. Die Membranen wurden danach für jeweils 5 min zweimal mit 20 mL PBS/T und zweimal mit 20 mL PBS gewaschen und schließlich kurz in AP-Puffer geschwenkt. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984; Stuyver *et al.*, 2003) wurden die Membranen in 10 mL AP-Puffer, dem 30 μl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, 50 mg/mL in Dimethylformamid) und 5 μl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 mg/mL in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten BBP-Varianten, in Form der Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II und der ABD, für das Zielmolekül GdFP-Chromophor nachgewiesen.

Kolonien, die starke Farbsignale zeigten, wurden ausgewählt und als Doppeldots auf eine Masterplatte transferiert.

Diese wurde zunächst 12 h bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert wurde. Die Masterplatte diente als Ausgangspunkt für die Erstellung der Sekundärfilter.

2.5 Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten in *E. coli*

(nach Schlehuber, 2001)

2.5.1 Proteinbiosynthese im 2 L-Maßstab

Zur Produktion rekombinanter BBP-Varianten in *E. coli* wurde das Expressionsplasmid pBBP21 verwendet. 50 mL LB/Amp-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie der *E. coli*-Stämme JM83 oder TG1-F⁻ (siehe Abschnitt 2.1.1), der für die Herstellung löslicher BBP-Varianten mit internen *Amber*-Stoppkodons geeignet war, angeimpft und bei 30°C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 L LB/Amp-Medium im Verhältnis 1/50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ durch Inkubation der Kultur bei 22°C und 200 rpm wurde die Biosynthese der rekombinanten Proteine durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (2 mg/mL in DMF) mit einer Endkonzentration von 200 µg/L induziert und in Abhängigkeit des herzustellenden Proteins für weitere 2,5–3 h inkubiert.

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (SLA-3000, 4200 g, 4°C, 15 min) erhalten. Das Medium wurde vollständig dekantiert und das Zellsediment in insgesamt 1/100 des Kulturvolumens (20 mL) eiskaltem Saccharose-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden in einem 50 mL-Falconröhrchen vereinigt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 4420 g, 4°C, 20 min sowie SS-34, 27200 g, 4°C, 15 min). Der erhaltene periplasmatische Extrakt wurde filtriert (0,45 µm) und über Nacht gegen 2 L SA-Chromatographie-Puffer (siehe Abschnitt 2.6.1.1) dialysiert.

Zur späteren SDS-PAGE-Analyse der Proteinherstellung wurden Gesamtzellaufschlussproben präpariert. Dazu wurde 1 mL der Kultur vor Initialisierung der Proteinbiosynthese sowie am Ende der Synthese entnommen, zentrifugiert (18500 g, 4°C, 2 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 80 µL Benzonase-Lösung (12,5 U/mL in Benzonase-Puffer) resuspendiert und mit 20 µL 5-fach Auftragspuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE gemischt. Nach einstündiger Inkubation auf Eis und Hitzebehandlung (5 min, 95°C) wurde das Gesamtzellprotein bei -20°C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE verwendet.

2.5.2 Proteinbiosynthese im 8 L-Laborfermenter

Für die physikochemische/biophysikalische Charakterisierung der BBP-Varianten (siehe Abschnitt 2.7) wurden teilweise größere Mengen der rekombinanten Proteine benötigt und

nach einem von Schiweck und Skerra (1995) etablierten diskontinuierlichen Fermentationsverfahren in *E. coli* produziert.

Die Bakterienzellen wurden dazu in einem 10 L Fermenter in 8 L synthetischem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle bei Bedarf zugeführt wurden. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen über den gesamten Verlauf der Fermentation gewährleistet.

Es wurden die *E. coli* K12-Stämme JM83pro Δ Skp, MC4100 Δ Skp und W3110 (siehe Abschnitt 2.1.1) mit dem Expressionsplasmid pBBP21 bzw. dessen BBP-Varianten kodierenden Plasmidderivaten transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.3). In einigen Fällen wurden die Zellen zusätzlich mit einem zweiten Plasmid, pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006), kotransformiert. Dieses Plasmid kodierte für die Faltungshelferproteine DsbA, DsbC, FkpA und SurA und verbesserte die Vitalität der Wirtszellen durch Verbesserung der zellulären Löslichkeit der rekombinanten Proteine. Da die Selektion auf das Plasmid pTUM4 durch Chloramphenicol-Resistenz vermittelt war, wurde in diesem Fall das entsprechende Kulturmedium zusätzlich mit 30 mg/L dieses Antibiotikums versetzt.

Als Initialkultur wurden 2 mL LB-Selektivmedium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 10–12 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 360 mL Mineralsalzlösung, der 40 mL 20 % (w/v) Glucose, 4 mL 1 M MgSO₄, 400 μ L Antibiotika-Stammlösung und 400 μ L Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1/1000 mit der Initialkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert.

Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD₅₅₀ = 1,5–2. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben mit der Mineralsalzlösung entsprechend verdünnt. Der 10 L Fermenter wurde mit 7 L Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf der Magnetrührereinheit fixiert. Vor dem Animpfen wurde auf 30 °C temperiert und über einen Trichter folgende sterile Lösungen zugegeben: 800 mL 20 % (w/v) Glucose, 80 mL 1 M MgSO₄, je 8 mL entsprechende Antibiotika- und Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung, je 4 mL FeCl₃- und Zn(OAc)₂-Lösung, 10 mL Spurenelement-Lösung und 200 μ L 30 %-ige Antifoam A-Lösung. Die Belüftung fand zu Beginn mit Druckluft statt, woraufhin dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert „100%“ zugewiesen wurde. Während der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck auf einem Wert \geq 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. später reinem Sauerstoff gehalten. Gleichzeitig wurde der pH-Wert durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur inokuliert und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und erneut 600 μ L Antifoam A-Lösung zugegeben. Die Bakterienkultur konnte nun bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₅₅₀ \approx 5 am nächsten

Morgen, maximal jedoch für acht Stunden unbeaufsichtigt gelassen werden. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zudosiert:

Ab einer Zelldichte von $OD_{550} = 7,5$: Zugabe von 28 mL/h
= 12,5: Zugabe von 40 mL/h
= 18,5: Zugabe von 60 mL/h
= 22,5: Zugabe von 80 mL/h

Desweiteren wurden der Kultur bei $OD_{550} = 13$ nochmals je 4 mL $FeCl_3$ - und $Zn(OAc)_2$ -Stammlösung sowie 10 mL der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 20$ durch Zugabe von 0,5 mg aTc/L Kultur (Stammlösung 5 mg/mL in DMF) induziert, die Kultivierung für weitere 1,75–2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugieren in auf 4 °C gekühlten Zentrifugenbecher (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A-Rotor, 5000 rpm, 4 °C, 20 min) sedimentiert.

Die sedimentierten Zellen wurden mittels eines Spatels vorsichtig abgeschabt und in ein eiskaltes 1000 mL-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}^{-1}$. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg Lysozym/mL (Stammlösung 20 mg/mL in Aufschlußpuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluß zu erzielen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugierungsschritt (SLA-1500 Rotor, 11500 rpm, 4 °C, 20 min) von den Sphäroplasten grob getrennt und in einem nachfolgenden zweiten (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) von Zellresten geklärt. Anschließend wurde der periplasmatische Proteinextrakt gegen SA-Puffer dialysiert (dreimal gegen 10 L). Präzipitate wurden durch Zentrifugieren (SLA-1500-Rotor, 11500 rpm, 4 °C, 30 min) und anschließendes Filtrieren (0,45 µm) abgetrennt. Die so erhaltene Proteinlösung wurde entweder sofort zur Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1.1) eingesetzt oder portioniert bei -20 °C gelagert.

2.6 Proteinchemische Methoden

(nach Beste, 1998; Schlehuber 2001)

2.6.1 Chromatographische Verfahren

2.6.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die in dieser Arbeit beschriebenen, eigenständig produzierten Proteine lagen als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Skerra & Schmidt, 2000) vor und konnten daher mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* (siehe Abschnitt 2.5) in einem Schritt gereinigt werden. Dazu wurde das extrahierte Periplasma einer 2 L Schüttelkultur über Nacht bei 4 °C gegen das einhundertfache

Volumen SA-Puffer dialysiert, wohingegen das nach einer Fermentation erhaltene Periplasmaextrakt dreimal gegen das 10-fache Volumen an SA-Puffer dialysiert wurde. Danach wurde diese Proteinlösung zur Entfernung von Proteinaggregaten filtriert (0,45 µm). Es wurden abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein Streptavidin-Sepharose-Säulen mit kovalent immobilisierter Streptavidin-Mutante Nr. 1, dem so genannten Strep-Tactin (Voss & Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/mL mit Bettvolumina von 2 mL, 4 mL, 8 mL oder 16 mL bei Flußraten von 20 mL/h, 40 mL/h, 80 mL/h bzw 160 mL/h betrieben. Zunächst wurden die Chromatographiesäulen mit SA-Puffer bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie, die anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt wurde, äquilibriert. Nach dem Applizieren der Periplasmafraktion auf die Säule wurde diese mit SA-Puffer gespült, bis die Absorption des Säulendurchlaufs annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde anschließend mit einer 2,5 mM Lösung von D-Desthiobiotin in SA-Puffer kompetitiv eluiert. Zur Regeneration wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung aufwies. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Waschen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Chromatographiesäule und Einstellung der Basislinie entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und bei 4 °C gelagert.

2.6.1.2 Größenausschluß-Chromatographie

Die Größenausschlußchromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe sowie Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Integrität und des monomeren Charakters des rekombinant hergestellten Wt-BBP und seiner angereicherten Varianten verwendet (siehe Abschnitt 3.7.2). Alle verwendeten Chromatographie-Puffer wurden vor Verwendung filtriert (0,45 µm) und für 30 min unter Rühren durch Anlage eines Vakuums entgast. Für die analytischen Säulenläufe wurde eine Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule mit einem Säulenbettvolumen von 24 mL und einem Auflösungsbereich von 3–75 kDa verwendet. Die Chromatographiesäule wurde an einem Äkta Purifier-HPLC-System mit einer konstanten Flussrate von 0,5 mL/min bei einem maximalen Druck von 1,8 MPa betrieben. Zunächst wurde die Säule mit dem gewählten Chromatographiepuffer mit zwei Säulenvolumina äquilibriert, bevor die Probe durch Injektion mittels einer Proben-schleife von 200 oder 500 µL auf die Säule appliziert wurde. Die Elution erfolgte mit einem Säulenvolumen des Chromatographiepuffers, wobei die gewünschten, das Protein enthaltenden Eluatfraktionen mittels eines Fraktionskollektors zu je 0,1–1,0 mL erhalten wurden.

Alle Säulen wurden, sofern sie nicht vollkommen neu waren, mit Proteinen bekannter Molekülmasse kalibriert, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Der Verlauf der Chromatographie und die Retentionszeiten bzw. -volumina wurden anhand der Absorption des Eluats bei 280 nm beobachtet. Anschließend wurde die Reinheit bzw. der Proteingehalt

ausgewählter Fraktionen mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.6.2) bzw. Absorptionsmessung (siehe Abschnitt 2.6.4) analysiert.

Die Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge, gefolgt von einem Säulenvolumen bidestilliertem Wasser, regeneriert. Daraufhin wurde die Säule entweder für einen erneuten Lauf äquilibriert oder in einem Säulenvolumen 20 % Ethanol bei RT gelagert.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Homogenität und Integrität von Proteinlösungen (siehe Abschnitt 2.6.1) wurde mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE (Laemmli, 1970) mit dem Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) durchgeführt. Durch Anlagerung der aliphatischen SDS-Moleküle an das Peptidrückgrat des Proteins erhält das Biomakromolekül eine negative Nettoladung. Bedingt durch den Molekularsieffekt des Polyacrylamid-Geles verhält sich die elektrophoretische Mobilität des Proteins annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus seiner Molmasse. Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die getrennten Proteine durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht. Die Gele wurden in einem sorgfältig gesäuberten, über einen Abstandshalter getrennten Paar Glasplatten (10 cm x 8 cm) gegossen. Dazu wurden die Platten übereinandergelegt, mit einer Silikondichtung versehen und mit Metallklammern fixiert. Die so entstandene Gelkammer wurde anschließend mit 4,5 mL des Trenngelgemisches mit einem Polyacrylamidgehalt von 15 % zügig befüllt. Diese Gelmischung bestand aus 5 mL 30 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 mL 4-fach lower Tris, 2,5 mL Wasser und 2,5 µL TEMED. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µL einer 10 % (w/v) Lösung des Radikalstarters APS gestartet. Das Gel wurde anschließend vorsichtig mit 1–2 mL Isopropanol überschichtet. Diese den Luftzutritt verhindernde Schutzschicht wurde nach etwa 45 min vom entstandenen Polymer abgegossen. Das Sammelgel setzte sich aus 1,0 mL 30 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid-Stammlösung, 1,5 mL 4-fach upper Tris, 3,5 mL Wasser und 3,0 µL TEMED zusammen. Durch Zugabe von 36 µL 10 % (w/v) APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet und die Sammelgelmischung auf das Trenngel pipettiert. Dann wurde ein Geltaschenformer luftblasenfrei eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingesetzt, deren Pufferreservoirs mit Laufpuffer befüllt wurden. Die Proteinproben wurden in einem Volumen von 20 µL angesetzt, mit 5 µL 5-fach Auftragspuffer (reduzierend oder nicht reduzierend) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden nach Entfernen des Geltaschenformers und Spülen der Taschen mit Puffer mittels einer Pipette zu jeweils 20 µL in die Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA für eine Dauer von 160 min oder bis zum Austreten des Bromphenolblau-Markers aus dem Trenngel vollzogen.

Das Gel wurde anschließend von den Glasplatten separiert und, nach vorsichtiger Abtrennung des Sammelgels, angefärbt. Dazu wurde das Gel komplett mit Coomassie Brilliant Blau R250-Färbelösung bedeckt und für 20 min geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum Verblässen des Hintergrundes unter Schwenken inkubiert. Die Entfärbelösung wurde dabei von Zeit zu Zeit erneuert. Die Lagerung des Gels erfolgte in Aufbewahrungslösung bei 4 °C. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Proteingele auf Whatman-Papier 3MM im Gelrockner bei 80 °C für 1 h unter Vakuum getrocknet. Um sie zu dokumentieren, wurden die Gele entweder fotografiert oder durch Scannen digitalisiert.

2.6.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration c von Proteinlösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1$ unter Korrektur der Absorption des Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet:

$$A_{280} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Der Extinktionskoeffizient ε des jeweiligen Proteins wurde nach der Methode von Edelhoch (1967) mittels des auf dem *ExpASy Server* frei zugänglichen Computerprogrammes ProtParam (Wilkins *et al.*, 1999) ermittelt (siehe Tabelle 2). Dabei wurden die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette (Gill & von Hippel, 1989) addiert. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, ob es sich um freie oder verbrückte Cysteinreste handelte. Ferner wurden für die Trp- und Tyr-Aminosäuren die von Pace (1995) ermittelten Extinktionskoeffizienten zugrunde gelegt.

Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten rekombinanten Proteine nach Abspaltung der Signalsequenz.

Protein	ϵ_{280} [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
wtBBP	56840
FluA(R95K)	59270
FluA(R95K/W129F)	53580
FluA(R95K/W129Y)	54860
FluA(R95K/W129H)	53580
FluA(R95K/A45H)	59270
FluA(R95K/A45I)	59270
FluA(R95K/A45V)	59270
FluA(R95K/H86F)	59270
FluA(R95K/H127R)	59270
FluA(R95K/L131F)	59270
FluA(R95K/S114I)	59270
FluA(R95K/S114R)	59270
FluA(R95K/S114T)	59270
FluA(R95K/A45I/S114R)	59270
FluA(R95K/A45I/S114T)	59270
FluA(R95K/A45I/S114T/W129F)	53580
FluA(R95K/A45I/S114T/W129Y)	54860
FluA(R95K/S114R/L131F)	54620
RBP (H154Q)	38870
RBP (L35K, H154Q)	38870
RBP (L63K, H154Q)	38870
RBP (L35K, A71H, H154Q)	38870
RBP (L35K, A71E, H154Q)	38870
GdFP-P7.11	55350
DigA16	53580

2.6.4 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene physikochemische/biophysikalische Experimente (siehe Abschnitt 2.7) waren konzentrierte Proteinlösungen erforderlich. Dazu wurde die gereinigte Proteinlösung (siehe Abschnitt 2.6.1) zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Anschließend wurde das Volumen der Proteinlösung unter Verwendung einer Amicon-Konzentratoreinheit der Ausschlußgröße 10 kDa durch Zentrifugieren (Sigma 4K10, 4°C, 3000 g) entsprechend eingengt. Etwaiges aggregiertes Protein wurde durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 4°C, 1 min, 14000 rpm) der Proteinlösung durch eine Spin-X Filtrationseinheit (0,45 µm) entfernt. Die Konzentration einer entsprechend verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt, die Proteinlösung bei 4°C gelagert. Die Integrität der Ultrafiltrationsmembran wurde durch Messung des Proteingehaltes im Permeat des Konzentrators überprüft.

2.7 Physikochemische/biophysikalische Methoden

2.7.1 Absorptionsspektroskopie

2.7.1.1 Absorptionsspektrum von Retinal

Zur Bestimmung des Absorptionsmaximums von all trans-Retinal in Ethanol (Endkonzentration 3 µM) wurde ein Spektrum im Bereich von 250 bis 600 nm aufgenommen. Dazu wurden 5 µL einer 300 µM Retinal-Stammlösung in Ethanol in 500 µL UV-VIS-Puffer pipettiert und gut durchmischt. Anschließend wurde mit einem Perkin Elmer Lambda 9 Spektralphotometer das Spektrum der Reaktionslösung im Bereich von 600 nm – 250 nm in einer Hellma Quarzglasküvette aufgenommen. Als Referenz diente eine 1 % v/v Ethanol-lösung in UV-VIS-Puffer.

2.7.1.2 Nachweis einer protonierten Schiff'schen Base im RBP-Retinal-Komplex

Die protonierte Schiff'sche Base im RBP-Retinal-Komplex weist ein Absorptionsmaximum bei ca. 450 nm auf (Pepe, 1999). Da weder das Protein noch der Ligand Retinal bei dieser Wellenlänge absorbieren war es hier möglich, die Ausbildung der protonierten Schiff'schen Base spektroskopisch zu verfolgen.

Dazu wurden 1,5 mL einer 3 µM Lösung der untersuchten RBP-Varianten (zweimal gegen das 100-fache Volumen UV-VIS-Puffer dialysiert) mit 0,5 M NaOH auf pH 9 eingestellt. Nach Zugabe von 15 µL 300 µM Retinal in Ethanol (Endkonzentration 3 µM), wurde 90 min im Dunkeln auf Nasseis inkubiert. Anschließend wurden mit einem Perkin Elmer Lambda 9 Spektralphotometer ein Spektrum der Reaktionslösung im Bereich von 600 nm – 250 nm in einer Hellma Quarzglasküvette aufgenommen. Als Referenz diente eine 1 % v/v Ethanol-lösung in UV-VIS-Puffer.

Anschließend wurde die Reaktionslösung schrittweise durch definierte Zugabe von 0,5 M HCl angesäuert, der pH-Wert gemessen und jeweils erneut ein Spektrum aufgenommen.

2.7.1.3 Bestimmung des pK_s der Schiff'schen Base im RBP(L35K, H154Q)-Retinal-Komplex

Analog zu 2.7.1.1 wurde die Variante RBP(L35K/H154Q) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption des Ansatzes bei 450 nm bei dessen schrittweisem Ansäuern verfolgt; der pH-Wert wurde nach jeder HCl-Zugabe bestimmt.

Die so erhaltenen Absorptionswerte wurden ausgehend von einem Zweizustandsmodell in das Verhältnis $f(pH)$ umgerechnet, das den Anteil der deprotonierten Spezies widerspiegelt. Bei $f(pH) = 1$ liegen 100 % der Schiff'schen Base in der deprotonierten Form vor, bei $f(pH) = 0$ ist die Schiff'sche Base vollständig protoniert:

$$f(pH) = \frac{[A]}{[A] + [AH^+]} = \frac{y_{obs} - y_{AH^+}}{y_A - y_{AH^+}} \quad (3)$$

Mit $[A]$ = Konzentration der deprotonierten Form, $[AH^+]$ = Konzentration der protonierten Form, y_{obs} = gemessene OD_{450} , y_A = Beitrag der deprotonierten Spezies zu y_{obs} , y_{AH^+} = Beitrag der protonierte Spezies zu y_{obs} .

Die normierten experimentellen Werte $f(pH)$ wurden anschließend um die prätransitionelle und um die posttransitionelle Änderung der A_{450} korrigiert.

$$y_A = m_A \cdot pH + b_A \quad (4)$$

$$y_{AH^+} = m_{AH^+} \cdot pH + b_{AH^+} \quad (5)$$

y_A entspricht der prätransitionellen Änderung der Extinktion der deprotonierten Schiff'schen Base bei pH-Wert-Erniedrigung; y_{AH^+} entspricht der posttransitionellen Änderung der protonierten Spezies.

Damit ergibt sich $f(pH)$ zu

$$f(pH) = \frac{[A]}{[A] + [AH^+]} = \frac{y_{ges} - y_{AH^+}}{y_A - y_{AH^+}} = \frac{y_{ges} - (m_{AH^+} \cdot pH + b_{AH^+})}{(m_A \cdot pH + b_A) - (m_{AH^+} \cdot pH + b_{AH^+})} \quad (6)$$

Die Parameter für die Korrektur m_A , m_{AH^+} , b_A und b_{AH^+} wurden jeweils durch einen linearen Fit über die ersten vier Messpunkte an beiden Enden des abgedeckten pH-Bereichs ermittelt.

Die so korrigierten Werte wurden gegen den pH-Wert aufgetragen.

Im Reaktionsgemisch lag ein Gleichgewicht zwischen der protonierten und der deprotonierten Form der Schiff'schen Base vor. Nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung gilt

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A]}{[AH^+]} \quad (7)$$

Es ergibt sich mit $[A]_{ges} = [A] + [AH^+]$ nach Auflösen und Einsetzen

$$[A] = \frac{[A]_{ges}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (8)$$

Die Gesamtextinktion setzt sich aus den Beiträgen des protonierten und der deprotonierten Schiff'schen Base zusammen.

$$E(pH) = E(AH^+) + E(A) \quad (9)$$

Diese wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gleichung 1) berechnet.

$$E(A) = \varepsilon_A \cdot [A] \cdot d \quad (10)$$

$$E(AH^+) = \varepsilon_{AH^+} \cdot [AH^+] \cdot d \quad (11)$$

ε_A : Extinktionskoeffizient der deprotonierten Schiff'schen Base

ε_{AH^+} : Extinktionskoeffizient der protonierten Schiff'schen Base

(7), (10) und (11) in (9) ergeben

$$E(pH) = \varepsilon_{AH^+} [A]_{ges} d - \varepsilon_{AH^+} [A] d + \varepsilon_A [A] d \quad (12)$$

(8) in (12) ergibt

$$E(pH) = \varepsilon_{AH^+} [A]_{ges} d - \varepsilon_{AH^+} \frac{[A]_{ges}}{1 + 10^{pK_a - pH}} d + \varepsilon_A \frac{[A]}{1 + 10^{pK_a - pH}} d \quad (13)$$

(9) und (10) in (12) ergeben

$$E(pH) = E_A + (E_{AH^+} - E_A) \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (14)$$

Da nicht die Extinktion, sondern $f(pH)$ aufgetragen wurde, wurden E_A und E_{AH^+} durch die Parameter B_A und B_{AH^+} ersetzt. Daraus folgt:

$$f(pH) = B_A + (B_{AH^+} - B_A) \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (15)$$

B_A entspricht dem Wert von $f(pH)$ bei sehr basischem pH und B_{AH^+} bei sehr saurem pH. In Gleichung 15 wurden die normierten Messwerte durch nicht-lineare Regression mit dem pK_a -Wert als freiem Parameter angepasst.

2.7.2 Fluoreszenzspektroskopie

2.7.2.1 Proteinfluoreszenztitration

(nach Beste, 1998)

Die Liganden-Bindungseigenschaften von BBP-Varianten wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. Ermittelt wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden, das sogenannte „Quenching“. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bzw. FluoroMax3 (Jobin Yvon) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Spaltbreite 4 bzw. 10 nm) und einer Emissionswellenlänge von 340 nm (Spaltbreite 6 bzw. 10 nm). Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine signifikante Eigenfluoreszenz oder – abgesehen von Fluorescein – Eigenabsorption.

Als Puffersystem diente PBS unter Zusatz von 1 mM EDTA (PBS/E). Die Lösung des jeweiligen gereinigten rekombinanten Proteins wurde viermal gegen diesen Puffer dialysiert und durch Verdünnen bzw. Ultrafiltration auf eine Konzentration von 1 μM eingestellt. Alle verwendeten Proteinlösungen wurden filtriert (0,45 μm). Zur Messung wurden 2 mL der Proteinlösung in einer Quarzglasküvette (1 cm^2) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Photometers innerhalb von 15 min. auf 25 °C temperiert. Anschließend wurden insgesamt bis zu 40 μL einer 100 μM bis 1 mM Lösung des jeweiligen Liganden in DMF (GdFP-Fluorophor) oder PBS (Fluorescein) in Schritten von 1 μL bis 4 μL zupipettiert (Gilson P10). Die dabei stattfindende Verdünnung der vorgelegten Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung bei verdecktem Anregungslicht für 1 min unter Rühren inkubiert und das Fluoreszenzsignal anschließend als Mittelwert über 10 s gemessen. Nach Subtraktion des geringfügigen Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale gegebenenfalls um den inneren Filtereffekt des Liganden korrigiert (siehe 2.7.2.2) und auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

2.7.2.2 Ligandenfluoreszenzbestimmung für Fluorescein

Da Fluorescein eine starke Eigenfluoreszenz besitzt wurde die Ausbildung des Protein-Ligandkomplexes auch durch Quenching des Fluoreszenzsignales bei einer Excitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 512 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug bei beiden Wellenlängen 4 nm. Für die Messung wurde eine Messreihe mit einer konstanten Ligandenkonzentration von 1 μM und variierenden Proteinkonzentrationen von 0 bis 2 μM bzw. 0 bis 4 μM hergestellt. Die Lösung mit einem Gesamtvolumen von 150 μL wurde in eine Quarz-Mikroküvette (Hellma, 1 mm) gegeben und diese vor jeder Messung 1 min im temperierbaren Küvettenhalter auf 25°C temperiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal als Mittelwert über einen Zeitraum von 10 s aufgenommen. Der

verwendete PBS/E-Puffer zeigte bei der verwendeten Wellenlänge keine Eigenfluoreszenz, daher wurden die erhaltenen Werte ohne weiteren Abzug auf einen Anfangswert von 100 % normiert und ausgewertet.

2.7.2.3 Ligandenfluoreszenzmessung bei Titration einer Proteinlösung mit dem GdFP-Chromophor

Im Falle der mit geringen Ausbeuten synthetisierbaren, angereicherten BBP-Varianten wurde der Versuchsaufbau des Nachweises der Ligandenfluoreszenz umgestellt. Die zu testenden, filtrierten (0,45 μm) Proteine wurden in einer Konzentration von 5,0 μM bis 40 μM in PBS/E in einem Gesamtvolumen von 2,0 mL in einer Quarzküvette (Hellma, 1 cm^2) mit einem Magnetührstäbchen im thermostatisierbaren Küvettenhalter des FluoroMax3 Fluoreszenzphotometers (Yobin Yvon) vorgelegt und für 10 min unter Rühren auf 25 °C temperiert. Die anschließende Titration mit dem GdFP-Chromophor erfolgte ausgehend von der 1,0 mM Stammlösung des Liganden in wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perflormdehydhydratisiert). Die intrinsische Fluoreszenz des Ligandenfluorophors wurde selektiv bei 428 nm und 10 nm Schlitzweite angeregt. Der Nachweis der Fluoreszenzemission erfolgte bei 605 nm und einer Schlitzweite von 10 nm. Die Titration erfolgte durch definierte, portionsweise Zugabe der Ligandenlösung zur Proteinlösung in Volumina von 1,0–4,0 μL . Die Endkonzentration des Liganden betrug dabei zwischen 10,0 μM und 25 μM . Zur Einstellung des Gleichgewichtes wurde die Lösung nach jeder Zugabe unter Rühren 90 Sekunden unter Lichtausschluss inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde dann über 10 s integriert gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (bis zu 20 μL entsprechend 1 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Nach Abzug des Fluoreszenzbeitrages des Puffers (titriert mit wasserfreiem DMF entsprechend des Schemas der Titration mit dem Liganden GdFP-Fluorophor) wurden die erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Bei der Komplexbildung des Fluorophors mit dem Protein wurde eine Steigerung der Fluoreszenzemission des Fluorophors im Vergleich mit der Referenztitration des Liganden in Abwesenheit des Proteins erwartet.

Korrektur des inneren Filtereffekts mit N-Acetyl-L-Tryptophanamid:

Bei der Verwendung von Fluorescein bzw. des GdFP-Chromophors als Ligand wurden die gemessenen Fluoreszenzdaten aufgrund deren Eigenabsorption bei der Anregungswellenlänge von 280 nm um diesen Betrag korrigiert. Dagegen wurde die bei der Emissionswellenlänge von 340 nm ebenfalls vorhandene geringe Eigenabsorption nicht explizit mit in die Korrektur einbezogen.

Die Verringerung der gemessenen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Fluorescein bzw. GdFP-Chromophor wurde durch Fluoreszenztitration mit einer geeignet konzentrierten N-Acetyl-L-tryptophanamid-Lösung ermittelt. Da die verwendeten Liganden nicht mit N-Acetyl-L-tryptophanamid durch molekulare

Komplexbildung wechselwirken, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Ligandenlösung in erster Linie auf dessen Eigenabsorption zurückzuführen. (Samworth *et al.*, 1988).

Für die Fluoreszenz F eines Proteins P gilt allgemein (Beste, 1998):

$$F = f_p \cdot [P] \cdot I_{Anregung}^0 \quad (16)$$

mit f_p = molare Fluoreszenz des Proteins, $[P]$ = Proteinkonzentration und $I_{Anregung}^0$ = Ausgangsintensität des nicht abgeschwächten Anregungslichtes.

Abhängig von der Konzentration des Liganden in Lösung verringerte dessen Eigenabsorption die als Produkt der Intensität des Anregungslichtes nachweisbare Emission in unterschiedlichem Ausmaß. Für die gemessene, apparente Fluoreszenz F_{app} gilt daher mit $I_{Anregung} < I_{Anregung}^0$:

$$F_{app} = f_p \cdot [P] \cdot I_{Anregung} \quad (17)$$

Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes läßt sich das Verhältnis von $I_{Anregung}$ zu $I_{Anregung}^0$ beschreiben:

$$\log \frac{I_{Anregung}^0}{I_{Anregung}} = \varepsilon_L \cdot c_L \cdot d \quad (18)$$

mit ε_L = Extinktionskoeffizient des Liganden bei der Anregungswellenlänge, c_L = Ligandenkonzentration, d = Distanz des Anregungslichtes vom Küvettenrand bis zum Ort des Fokus für die Emission.

Durch Umformen erhält man:

$$I_{Anregung} = I_{Anregung}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (19)$$

Damit ergibt sich aus Gleichung (17):

$$F_{app} = f_p \cdot [P] \cdot I_{Anregung}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (20)$$

bzw.

$$F_{app} = F \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (21)$$

Bei halblogarithmischer Auftragung der bei der Titration von N-Acetyl-L-tryptophanamid mit dem Liganden erhaltenen (auf einen Anfangswert von 100 % skalierten) Fluoreszenzsignale kann der apparente Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{app} = \varepsilon_L \cdot d$ durch lineare Regression als Steigung der Regressionsgeraden bestimmt werden:

$$\log F_{app} = \log F - \varepsilon_{app} \cdot c_L \quad (22)$$

Die Korrektur der bei der Titration der Proteinlösungen gemessenen Fluoreszenzintensitäten erfolgte dann gemäß folgender Gleichung

$$F = F_{app} \cdot 10^{\epsilon_{app} \cdot c \cdot L} \quad (23)$$

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

Bei jedem Schritt der Fluoreszenztitration stehen die Bindungspartner miteinander im Assoziations/Dissoziations-Gleichgewicht. Das Gleichgewicht wird durch die Dissoziationskonstante K_d beschrieben:

$$K_d = \frac{[P] \times [L]}{[P \cdot L]} \quad (24)$$

mit $[P]$ = Konzentration des unkomplexierten Proteins, $[L]$ = Konzentration des unkomplexierten Liganden; $[P \cdot L]$ = Konzentration des Protein/Ligand-Komplexes.

Die meßtechnisch nicht direkt erfaßbaren Konzentrationen der nicht komplexierten Bindungspartner können durch $[P] = [P]_t - [P \cdot L]$ und $[L] = [L]_t - [P \cdot L]$ (mit $[P]_t$ = Protein-Gesamtkonzentration; $[L]_t$ = Liganden-Gesamtkonzentration) substituiert werden und man erhält:

$$K_d = \frac{([P]_t - [P \cdot L])([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]} \quad (25)$$

Durch Auflösen nach $[P \cdot L]$ ergibt sich daraus:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (26)$$

und durch erneute Substitution entsprechend:

$$[P] = \frac{[P]_t - [L]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (27)$$

$$[L] = \frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (28)$$

Die gemessene Fluoreszenz ergibt sich als Summe der Fluoreszenzbeiträge der im Gleichgewicht vorliegenden Moleküle. Für ein durch Gleichung (24) charakterisiertes System mit drei Komponenten läßt sich die gemessene Fluoreszenz F mit der molaren Fluoreszenz f und der jeweiligen Konzentration des Moleküls daher wie folgt beschreiben:

$$F = f_P [P] + f_L [L] + f_{PL} [P \cdot L] \quad (29)$$

Nach Substitution von $[P]$, $[L]$ und $[P \cdot L]$ gemäß der Gleichungen (13), (14) und (12) ergibt sich schließlich:

$$F = \left([P]_t - [L]_t - K_D \right) \frac{f_P}{2} + \left([P]_t + [L]_t + K_D \right) \frac{f_{PL}}{2} + \left([L]_t - [P]_t - K_D \right) \frac{f_L}{2} + (f_P + f_L - f_{PL}) \sqrt{\frac{\left([P]_t + [L]_t + K_D \right)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (30)$$

Als anzupassende Parameter verbleiben die molaren Fluoreszenzen f_P , f_L und f_{PL} sowie die gesuchte Dissoziationskonstante K_D . Die Anpassung der Titrationskurven an die gemessenen Wertepaare $F/[L]_t$ oder $F/[P]_t$ durch nicht-lineare Regression wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ durchgeführt.

Bei der Messung der Proteinfluoreszenz unter den in Abschnitt 2.3.6.1 angegebenen Bedingungen zeigten die Liganden selbst keine Fluoreszenz. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte daher unter Verwendung von Gleichung (30) mit $f_L = 0$. Entsprechend lieferte das Protein bei der Messung der Ligandenfluoreszenz keinen Fluoreszenzbeitrag, in diesem Fall wurde $f_P = 0$ gesetzt.

2.7.2.4 Kompetitive Fluoreszenztitration

Der spektroskopisch aktive Ligand 8-Anilino-1-Naphthalin-Sulfonsäure (ANS) wurde als Komplexierungspartner einer angereicherten BBP-Variante und des Wt-BBP (als Kontrollprotein) verwendet, um durch seine Verdrängung mit dem GdFP-Fluorophor aus der Bindungstasche der genannten Proteine die Affinität für das Zielmolekül zu ermitteln.

Dazu wurde zunächst die Affinität der Proteine für das ANS mittels Ligandenfluoreszenzmessung bei Titration der Proteinlösung gemessen. Im Falle des ANS zeigte die Titrationskurve eine Zunahme der Fluoreszenz des Liganden in Abhängigkeit von dessen Konzentration. Zur Messung wurden 2 mL der 1,0 μ M Proteinlösung in der Quarzküvette vorgelegt und die Fluoreszenzemission bei 370 nm (Spaltbreite 10 nm) angeregt und bei 475 nm (Spaltbreite 10 nm) detektiert. Die Ligandenlösung (1,0 mM ANS in wasserfreiem DMF; über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) wurde der Proteinlösung in Portionen von 1 μ L–10 μ L bis zu einer Endkonzentration von 20,0 μ M zugesetzt und zur Einstellung des Gleichgewichtes jeweils für 1 min unter Rühren und Lichtausschluss inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend über 10 Sekunden integriert nachgewiesen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (40 μ L, entsprechend 2%) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Nach Abzug des Fluoreszenzbeitrages des nicht komplexierten Liganden (durch Titration der ANS-Lösung in dem verwendeten Puffer) wurden die erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die zutitrierte Ligandenkonzentration

aufgetragen. Gleichung (30) vereinfachte sich wegen der molaren Fluoreszenzkoeffizienten $f_P = 0$ und $f_L = 0$ entsprechend, so dass die erhaltenen Daten unter Anpassung der Dissoziationskonstante K_d und des relativen molaren Fluoreszenzkoeffizienten $f_P \cdot L$ mittels des Computerprogrammes KaleidaGraph 3.6 durch nicht-lineare Regression ermittelt wurden.

Das anschließende Verdrängungsexperiment wurde ausgehend von jeweils 2 mL der 1,0 μM Proteinlösung durchgeführt. Zur Ausbildung des Protein/ANS-Komplexes enthielt die Proteinlösung zusätzlich jeweils 3,5 μM ANS (aus der 1,0 mM Stammlösung des ANS in wasserfreiem DMF; über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert), entsprechend der Konzentration halbmaximaler Sättigung der Ligandenbindungsstellen der Proteine, wie durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (siehe oben) bestimmt. Diese Lösung wurde zunächst in einer Quarzküvette (Hellma, 1 cm^2) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Fluoreszenzphotometers für 15 min auf 25 °C temperiert und so die Gleichgewichtseinstellung des Komplexes vollzogen. Die Titration erfolgte durch portionsweise Zugabe einer 1,0 mM Lösung des GdFP-Chromophor in PBS/E in Volumina von 1–20 μL zur Lösung des Protein/ANS-Komplexes. Die Endkonzentration betrug dabei 20,0 μM . Zur Einstellung des Gleichgewichtes wurde jeweils für 1 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert. Durch die kompetitive Verdrängung des ANS durch den GdFP-Chromophor aus der Bindungstasche der Proteine wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des komplexierten ANS beobachtet. Dazu wurde die Fluoreszenz bei 370 nm (Spaltbreite 15 nm) angeregt und die Emission bei 475 nm (Spaltbreite 15 nm) beobachtet. Das Fluoreszenzsignal wurde über 10 sec integriert nachgewiesen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (80 μL , entsprechend 4%) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Aufgrund der nicht vernachlässigbaren Eigenabsorption des GdFP-Chromophors bei der Anregungswellenlänge von 370 nm wurden die Messwerte hinsichtlich dieses inneren Filtereffektes durch Titration einer 3,5 μM ANS-Lösung mit dem GdFP-Chromophor in Abwesenheit des Proteins korrigiert (siehe Abschnitt 2.7.4.2). Da der GdFP-Chromophor nicht mit dem ANS wechselwirkte, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei der Titration vornehmlich auf die Eigenabsorption des GdFP-Chromophors zurückzuführen. Die erhaltenen Rohdaten wurden zusätzlich um den Fluoreszenzbeitrag des Puffers bereinigt. Die Auftragung der Titrationskurve erfolgte in Form von ΔF gegen die GdFP-Chromophor-Konzentration $[D]_T$. Dabei entsprach ΔF der Fluoreszenzabnahme, die bedingt durch Verdrängung des ANS aus der Bindungstasche der Proteine durch den GdFP-Chromophor beobachtet wurde. ΔF_{Max} stellt den Asymptotenwert der Sättigung der Bindungsstellen des Proteins mit dem Liganden dar. Die Daten wurden dahingehend normalisiert, dass die maximale Änderung, d. h. die Löschung der Fluoreszenz dem theoretischen Maximalwert von 1,0 entsprach.

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

In einem kompetitiven Experiment ist das Protein prinzipiell in der Lage, einen Komplex mit beiden in Lösung befindlichen Liganden A und B einzugehen (Lindahl *et al.*, 1991; Wang, 1995):

$$P + A \Leftrightarrow P \cdot A \quad K_{DA} = \frac{[P] \cdot [A]}{[P \cdot A]} \quad (31)$$

$$P + B \Leftrightarrow P \cdot B \quad K_{DB} = \frac{[P] \cdot [B]}{[P \cdot B]} \quad (32)$$

Unter Beibehaltung der Massenbilanz folgt daraus:

$$[A]_T = [A] + [P \cdot A] \quad (33)$$

$$[B]_T = [B] + [P \cdot B] \quad (34)$$

$$[P]_T = [P] + [P \cdot A] + [P \cdot B] \quad (35)$$

mit K_{DA} und K_{DB} als Dissoziationskonstanten des Proteins P für die Liganden A und B; $[P]$ = Konzentration des Proteins; $[A]$ und $[B]$ = Konzentration des Liganden A und B; $[P \cdot A]$ und $[P \cdot B]$ = Konzentration des jeweiligen Protein/Liganden-Komplexes; mit T bezeichnet sind die Gesamtkonzentrationen. Es folgt für die Konzentration der Komplexe $[P \cdot A]$ und $[P \cdot B]$:

$$[P \cdot A] = \frac{[P] \cdot [A]_T}{K_{DA} + [P]} \quad (36)$$

$$[P \cdot B] = \frac{[P] \cdot [B]_T}{K_{DB} + [P]} \quad (37)$$

setzt man Gleichung (36) und (37) in (35) ein ergibt sich ein kubischer Ausdruck der Form:

$$[P]^3 + a \cdot [P]^2 + b \cdot [P] + c = 0 \quad (38)$$

mit $a = K_{DA} + K_{DB} + [A]_T + [B]_T - [P]_T$

$$b = K_{DB} \cdot ([A]_T - [P]_T) + K_{DA} \cdot ([B]_T - [P]_T) + K_{DA} \cdot K_{DB}$$

$$c = -K_{DA} \cdot K_{DB} \cdot [P]_T$$

Unter der Annahme einer 1 : 1-Bindungsstöchiometrie sowohl des ANS als auch des GdFP-Chromophores mit dem Wt-BBP und der BBP-Varianten und der im vorliegenden Fall gegebenen Bedingung, dass die Konzentration $[ANS]_{\text{frei}} \approx [ANS]_T$ entspricht, lässt sich diese Formel vereinfachen (Olson *et al.*, 1995; Stootman *et al.*, 2006). Die Titrationskurve der normalisierten Fluoreszenzabnahme ΔF gegen die GdFP-Chromophor-Konzentration $[D]_T$ lässt sich danach mit folgender Gleichung durch nicht-lineare Regression anpassen:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{Max}}{2 \cdot [P]_T} \cdot \left\{ K_{DD} \cdot \left(1 + \frac{[A]_T}{K_{DA}} \right) + [D]_T + [P]_T \right. \\ \left. - \sqrt{\left\{ K_{DD} \cdot \left(1 + \frac{[A]_T}{K_{DA}} \right) + [D]_T - [P]_T \right\}^2 + 4 \cdot K_{DD} \cdot [P]_T \cdot \left(1 + \frac{[A]_T}{K_{DA}} \right)} \right\} \quad (39)$$

mit $[P]_T$ = Gesamtkonzentration des Proteins; $[A]_T$ = eingesetzte ANS-Konzentration; K_{DA} = Dissoziationskonstante des ANS/Protein-Komplexes und K_{DD} = Dissoziationskonstante des GdFP-Chromophor/Protein-Komplexes. K_{DD} und ΔF_{Max} wurden als frei anzupassende Parameter mittels des Computerprogrammes KaleidaGraph v 3.6 ermittelt.

2.7.3 Circular dichroismus-Spektroskopie

Circular dichroismus (CD) tritt auf, wenn sich die Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R für die gegenläufigen zirkular polarisierten Komponenten, in die sich linear polarisiertes Licht zerlegen läßt, beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium voneinander unterscheiden (Kawamura *et al.*, 2000). Bei der CD-Spektroskopie von Proteinen, bei denen das Phänomen des Circular dichroismus deutlich zu beobachten ist, unterscheidet man einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptid-Bindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). Letztere erlauben eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. Dagegen erlauben CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung Aufschluß über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente. Messungen der CD-Signale im Bereich zwischen 190 und 220 nm eignen sich daher zur Messung von Konformationsänderungen, z. B. bei der thermischen Denaturierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CD-Spektroskopie sowohl zur qualitativen Abschätzung struktureller Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen in BBP-Varianten als auch für Untersuchungen zur Proteinestabilität einzelner Varianten durch thermische Denaturierung eingesetzt.

Zur Vorbereitung für die Messungen wurden die zu untersuchenden BBP-Varianten nach der Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie zunächst viermal gegen 20 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2SO_4 , pH 8,0 dialysiert. Dann wurden die Proteinproben mit einer Konzentration von ca. 210 $\mu\text{g/mL}$ in eine Spezialküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 mm pipettiert, mit einem zugehörigen Teflonstopfen luftdicht verschlossen und ca. 20 min. im Probenhalter des Jasco J-810 Spektropolarimeters auf exakt 22 °C temperiert.

CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm wurden durch Akkumulation von 20 Einzelspektren (Response 2 s, Bandwidth 1 nm, Data pitch 0,2 nm, Scan speed 50 nm/min) bei einer Proben temperatur von 22 °C erhalten. Die bei der Messung der CD-Spektren ermittelten Werte für die Elliptizität Θ bei der Wellenlänge λ wurden für jede BBP-Variante nach

Gleichung (40) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{\text{MRW}}$ (MRW = *Mean Residue Weight*) umgerechnet (Schmid, 1989):

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta_{\lambda} M_R}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \text{ [deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] \quad (40)$$

Dabei bezeichneten M_R die Molmasse der BBP-Variante, N_A die Anzahl der Aminosäuren, c die Konzentration (in mg/mL) und d die Schichtdicke (in cm).

Zur Aufnahme von thermischen Entfaltungsübergängen wurde zunächst die jeweilige Wellenlänge bestimmt, bei der die maximale Änderung des CD-Signals zu beobachten war. Hierzu wurde das CD-Spektrum einer vollständig denaturierten Proteinprobe bei 95 °C vom CD-Spektrum einer Probe des nativen Proteins bei 22 °C subtrahiert und das Differenzmaximum bestimmt. Die ermittelten Wellenlängen lagen hierbei in Abhängigkeit von der untersuchten BBP-Variante bei 212 oder 213 nm.

Für die Messung des Entfaltungsüberganges wurden frische Proteinlösungen verwendet. Die Änderung des CD-Signals bei der entsprechenden Wellenlänge wurde während der gesamten kontinuierlichen Aufwärm- bzw. Abkühlphase in Temperaturabständen von 0,1 °C verfolgt und die gemessene Elliptizität Θ gegen die Temperatur aufgetragen. Hierbei wurde, abhängig vom untersuchten Protein, ein Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C bzw. 95 °C bei einem Temperaturgradienten von 40 K/h überstrichen. Die übrigen Einstellungen des Spektrometers entsprachen denen für die Aufnahme der CD-Spektren (s. o.).

Für die Anpassung der Rohdaten wurde ein Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung zugrunde gelegt (Lumry, 1966), welches voraussetzt, dass nur natives (N) und vollständig denaturiertes (U) Protein in signifikanten Mengen vorliegen, nicht jedoch Intermediate. Die Gleichgewichtskonstante K_U der Denaturierung



ist definiert als:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f(u)}{1-f(u)} \quad (42)$$

Durch Auflösen nach dem relativen Bruchteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ ergibt sich:

$$f(u) = \frac{K_U}{1+K_U} \quad (43)$$

Existiert eine Observable, die die Unterscheidung zwischen N und U erlaubt (in diesem Fall das CD-Signal y_{obs}), kann der Anteil des ungefalteten Proteins nach

$$f(u) = \frac{y_{\text{obs}} - y_N}{y_U - y_N} \quad (44)$$

bestimmt werden. Die Parameter y_N und y_U bezeichnen dabei die Elliptizitätswerte des vollständig gefalteten bzw. entfaltenen Zustandes und können unter Annahme linearer prä- bzw. posttransitioneller Steigungen der Denaturierungskurve jeweils folgendermaßen als Funktion der Temperatur ausgedrückt werden:

$$y_N = m_N T + b_N \quad (45)$$

$$y_U = m_U T + b_U \quad (46)$$

Die Parameter b_N und b_U stehen für die Ordinatenabschnitte der Basislinien von nativem und denaturiertem Zustand, während m_N und m_U die Steigungen der jeweiligen Basislinien in Abhängigkeit von der Temperatur beschreiben. Durch Gleichsetzen von Gleichung (43) und (44) und Auflösen der Beziehung nach y_{obs} ergibt sich:

$$y_{obs} = \frac{y_U K_U + y_N}{1 + K_U} \quad (47)$$

Vernachlässigt man die Temperaturabhängigkeit der Enthalpie der Denaturierung ΔH_m , so kann mit Hilfe der van't Hoff'schen Reaktionsisochore aus der Gleichgewichtskonstanten $K_U = 1$ bei der Schmelztemperatur T_m die Gleichgewichtskonstante K_U bei einer anderen Temperatur T errechnet werden:

$$K_U = \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (48)$$

Unter Substitution von K_U , y_N und y_U in Gleichung (47) durch Gleichungen (45), (46) und (47) erhält man (Brumano *et al.*, 2000):

$$y_{obs} = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \left\{ \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\}}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (49)$$

In dieser Gleichung, mit der die Anpassung der Rohdaten der thermischen Denaturierungskurven erfolgte, steht y_{obs} für die Elliptizität Θ (in mdeg), T für die Temperatur (in K), R für die Gaskonstante ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T_m für die Schmelztemperatur des Proteins am Mittelpunkt des Überganges und ΔH_m für die Enthalpie des Entfaltungsüberganges bei T_m (van't Hoff'sche Enthalpie in $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Um die Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen BBP-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung (44) unter Verwendung der aus der nicht-linearen Regression nach Gleichung (49) gewonnenen Parameter b_N , b_U , m_N und m_U auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Die so erhaltenen normierten

Entfaltungskurven konnten anschließend nach Gleichung (50), die sich aus Gleichung (43) und (48) ergibt, angepaßt werden:

$$f(u) = \frac{\exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]} \quad (50)$$

Die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen (25 °C) $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ kann bei Annahme einer temperaturunabhängigen Entfaltungsenthalpie ΔH_m unter Verwendung der van't Hoff'schen Reaktionsisochore (Gleichung (48)) mit der Schmelztemperatur T_m für $T = 298,15 \text{ K}$ berechnet werden:

$$\Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = -RT \ln K_U^{25^\circ\text{C}} \quad (51)$$

2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die dazugehörige PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE und PEPTIDE-SORT aus dem Programmpaket „UWGCG“ (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt.

Für die Planung der FluA(R95K)-Varianten wurde das Programm InsightII (Biosym, MSI) an einer Indigo2-Workstation der Firma Silicon Graphics verwendet.

Dreidimensionale Strukturen von Protein-Varianten wurden mit den Programmen INSIGHT II (BIOSYM/MSI/ACCELRYS) und PYMOL (DeLano Scientific LCC) analysiert und visualisiert.

Zur Analyse und Bearbeitung von DNA-Sequenzdateien wurde das Programmpaket GCG V 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) unter dem Betriebssystem UNIX verwendet (Devereux *et al.*, 1984). Die graphische Darstellung von Sequenzdateien wurde ferner mittels des Programmes GeneDoc V 2.6.02 (Free Software Foundation Inc., Boston, MA, USA) durchgeführt.

Die Auswertung von Meßdaten aus biophysikalischen Analysen erfolgte mit den Programmen KaleidaGraph v 3.6 (Synergy Software, Reading, USA) oder Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

PAGE-Gele wurden mit Hilfe eines Scanners und des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen sowie deren Untersuchung wurden unter Verwendung der kostenlos zugänglichen Datenbanken Protein Data Bank und ExPASy-Molecular Biology Server sowie mit den darin enthaltenen Analyseprogrammen erhalten.

3 Ergebnisse

3.1 Verbesserung der Bindungsaffinität des Anticalins FluA(R95K)

3.1.1 Konstruktion von Varianten durch rationales Protein-Design: Auswahl der Aminosäurepositionen

Das hier verwendete Anticalin FluA wurde durch kombinatorisches Design erzeugt, indem, ausgehend von der Struktur des natürlichen Lipocalins BBP, Positionen ausgewählt wurden, an denen Aminosäuren durch Zufallsmutagenese ausgetauscht wurden (Beste *et al.*, 1999). Mit Hilfe der *Phage-Display*-Technologie und des Kolonie-Filterstapeltests konnten so aus einer Molekülbibliothek diejenigen Mutanten selektiert werden, die Affinität gegenüber Fluorescein zeigten. Das Anticalin FluA wies dabei die höchste Affinität und den größten Löschungseffekt auf die Fluoreszenz des Liganden auf und ließ sich zudem sehr gut in *E. coli* produzieren. Weitere Mutationsstudien ergaben, dass die optimierte Variante FluA(R95K) mit einer noch größeren Ausbeute in *E. coli* hergestellt werden kann, ohne dabei an Bindungsstärke zu verlieren (Beste, 1998). Aus diesen Gründen wurde die neue Variante FluA(R95K) bevorzugt gegenüber den anderen Varianten als Ausgangspunkt für das Protein-Design in dieser Arbeit verwendet.

Die Strukturinformationen, die aus deren Kristallstrukturanalyse gewonnen wurden (Korndörfer *et al.*, 2003) lieferten eine Grundlage für das rationale Protein-Design, da zum einen die Faltung bekannt war und zum anderen die zur Bindung des Liganden entscheidenden Aminosäuren mit Hilfe von Modelling-Programmen visualisiert werden konnten. Anhand dieser Daten konnten Annahmen getroffen werden, welche Aminosäuren einen weniger günstigen Beitrag zur Komplexierung liefern – diese sollten durch geeignetere Seitenketten ersetzt werden. Dabei musste neben der Auswirkung einer Aminosäuresubstitution auf die Ligandenaffinität zusätzlich auch der Effekt auf die Proteinfaltung berücksichtigt werden.

Die Planung der Mutanten wurde mit Hilfe des Modelling-Programms Insight II durchgeführt, wobei angenommen wurde, dass das Proteinrückgrat im wesentlichen erhalten bleibt und die ausgetauschten Aminosäuren typische Rotamerkonformationen annehmen (Ponder & Richards, 1987). Auffällig an der Bindungstasche von FluA(R95K) waren vor allem die beiden Aminosäuren Ala 45 und Ser 114. Beide Positionen sind von sehr kleinen Aminosäuren besetzt, wodurch jeweils eine deutliche Lücke zwischen dem Protein und dem gebundenen Fluorescein entsteht (Abbildung 8).

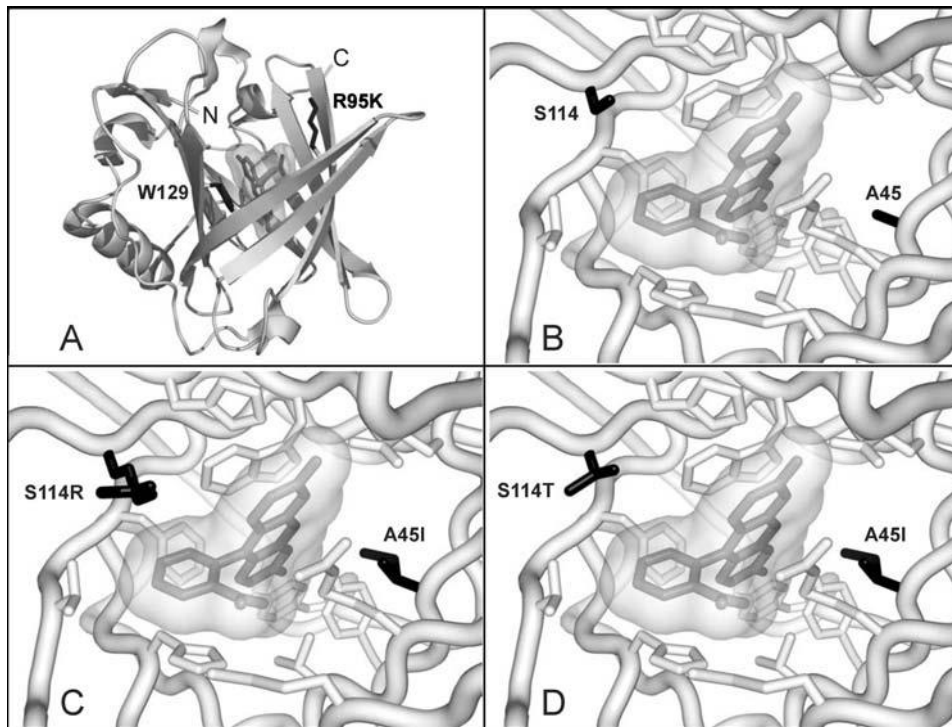


Abb. 8: (A) Bändermodell von FluA im Komplex mit Fluorescein (grau), das Tryptophan an Position 129 sowie das Lysin an Position 95 sind dunkelgrau dargestellt.

(B) Blick in die Bindungstasche von FluA(R95K) mit den ursprünglichen Seitenketten Ala45 und Ser114 (dunkelgrau) sowie weitere Aminosäuren, die sich in einem maximalen Abstand von 4 Å zum gebundenen Fluorescein befinden.

(C) FluA-Variante mit den Seitenkettensubstitutionen A45I und S114R.

(D) Version mit den Seitenkettensubstitutionen A45I und S114T.

Die Modellierung wurde mit der Software Insight II (Accelrys, San Diego, CA) durchgeführt, die grafische Darstellung erfolgte mit PyMol (DeLano Scientific, San Carlos).

Während Ala 45 bereits im natürlichen BBP erhalten war, wurde an der Aminosäureposition 114 bei der Generierung des Anaticalins das natürliche Tyrosin gegen Serin ersetzt. Ala 45 ist tief in der Bindungstasche lokalisiert und weist in Richtung der Ethergruppe im Xanthenolonring. Aufgrund dieser begrabenen Position von Ala 45 innerhalb des Proteins wurden die beiden größeren hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Valin in Betracht gezogen, um hydrophobe Kontakte zum Liganden zu schaffen und die Faltung des β -Barrels nicht zu beeinträchtigen. Ile schien aus sterischen Gründen besonders günstig, da die berechneten Oberflächen der Seitenkette und des Fluoresceins nahezu perfekt aneinandergränzten, ohne sich zu überlappen.

Als weiterer Substituent wurde an dieser Stelle Histidin ausgewählt, da ein mögliches Rotamer nahe an die Ethergruppe heranragt und dadurch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erzeugen kann. Auch hier wurde im Modell die ursprüngliche Lücke zwischen Protein und Ligand gut ausgefüllt.

Ähnliche Ausgangsbedingungen lagen bei Ser 114 vor, das ebenfalls zu weit von dem Liganden entfernt ist, um Wechselwirkungen einzugehen. Anders als Ala 45 befindet sich Ser 114 an dem dem Lösungsmittel zugänglichen Eingang der Bindungstasche, so dass dort nicht nur hydrophobe Seitenketten in Frage kommen. In diesem Fall wurden wiederum zwei unterschiedliche Seitenketten in Betracht gezogen. Dies war zum einen Ile, das aus sterischen Gründen gewählt wurde und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Liganden ausbilden konnte; zum anderen Thr, das aufgrund seines amphipatischen Charakters sowohl teilweise Wechselwirkungen mit dem Liganden als auch dem Lösungsmittel ausbilden konnte. Außerdem ist Thr nur geringfügig größer als Ser und erlaubt damit die Untersuchung der Auswirkung einer Seitenkette mit mittlerem Platzbedarf.

Eine dritte Seitenkette für die Aminosäureposition 114 wurde durch einen Sequenzvergleich der insgesamt vier von Beste identifizierten Flu-Varianten, A – D, ausgewählt (Beste, 1998). So konnte festgestellt werden, dass in FluB bis FluD an dieser Stelle jeweils Tyr durch Arg ersetzt war, wohingegen nur bei FluA ein Ser auftrat. Arg scheint nicht direkt mit Fluorescein in Wechselwirkung zu treten, kann aber möglicherweise das polare Netzwerk von Arg 88, Lys 95 und Arg 116 am Eingang der Bindungstasche erweitern und so durch elektrostatische Einflüsse zur Bindung des bei pH 8 negativ geladenen Fluoresceins beitragen. Auch hydrophobe Kontakte mit dem aliphatischen Seitenkettenteil sind nicht auszuschließen. An dieser Position können von einem Argininrest mehrere Seitenketten-Rotamerkonformationen eingenommen werden, ohne dass Überlappungen mit anderen Aminosäuren auftreten.

Eine andere Mutation wurde an Leu 131 vorgenommen, dessen Seitenkette wie Ala 45 auf den Ether-Sauerstoff des Xanthenolrings weist, jedoch auf der anderen Seite des Ringsystems liegt. Durch eine Substitution des Leu durch Phe sollten hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Xanthenolring verstärkt und die Form der Bindungstasche besser an Fluorescein angepasst werden.

Alle oben genannten Mutationen wurden an Positionen durchgeführt, bei denen die vorhandene Aminosäure offensichtlich nicht auf die Komplexierung von Fluorescein optimiert war. Für ein abschließendes Mutationsexperiment wurde die Seitenkette His 86 in Betracht gezogen, die, obwohl sie in FluA gegenüber dem BBP nicht mutiert war, relativ gut an den neuen Liganden angepasst war. His 86 befindet sich am Eingang der Bindungstasche, wobei sich dessen Imidazolgruppe an die Carboxylgruppe des Fluorescein anlagert. Da der Imidazolring bei neutralem bis basischem pH nicht geladen ist, sollten dabei keine elektrostatischen Wechselwirkungen auftreten. An diese Stelle wurde Phenylalanin eingeführt, da es sich besser an die Carboxyphenylgruppe anlagern kann.

Eine weitere interessante Mutation war H127R. Das His127 trägt in FluA(R95K) durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer Hydroxylgruppe im Xanthenolring entscheidend zur Bindung bei (Korndörfer *et al.*, 2003). Auch bei den selektierten Varianten FluA, FluB und FluC von Beste (1998) war diese Mutation konserviert. Arg127 könnte mit seiner Guanidiniumgruppe ebenfalls eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe des Liganden aus-

bilden. Abhängig von der Deprotonierung zum Fluorescein-Dianion ist in diesem Fall sogar eine elektrostatische Wechselwirkung möglich.

3.1.2 Gentechnische Konstruktion der Varianten

Ausgehend von dem Plasmid pBBP21FluA(R95K) (Beste, 1998) wurde Einzelstrang-DNA präpariert und jeweils eine Mutagenese nach Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987) mit den entsprechenden Primern durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Die erhaltenen Mutationen wurden durch Restriktionsverdau überprüft (A45I mit *DpnI*; S114T mit *AflIII* und L131F mit *Bsp1286I*), bevor sie durch Sequenzierung bestätigt wurden.

Zusätzlich wurden Doppelmutanten hergestellt, nachdem sich bei den ersten Fluoreszenz-titrations-Experimenten herausstellte, dass sich die Varianten A45I, S114R, S114T und L131F besonders günstig auf die Dissoziationskonstante des Komplexes auswirkten (siehe Tabelle 5). Da die entsprechenden Aminosäuren auf verschiedenen Seiten des fast planaren Liganden Fluorescein liegen und sich dadurch sterisch gegenseitig nicht beeinträchtigen sollten, erschienen entsprechende Doppelmutanten interessant. Dazu wurden die Mutationen S114T und S114R in das bestehende Plasmid pBBP21FluA(R95K/A45I) umklontiert. Die Vektoren pBBP21FluA(R95K/S114T) und pBBP21FluA(R95K/A45I) wurden jeweils mit *BglII* und *HindIII*, pBBP21FluA(R95K/S114R) und pBBP21FluA(R95K/A45I) jeweils mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten. Diese Enzyme schneiden jeweils nur ein einziges Mal im Plasmid, und es entstehen zwei gegenüberliegende Fragmente, die jeweils eine der Mutationsstellen tragen. Diese Fragmente wurden in entsprechender Kombination ligiert und durch Restriktionsverdau auf das Vorliegen der beiden Mutationen überprüft. Dazu wurde das neu entstandene Plasmid pBBP21FluA(R95K/A45I/S114T) zum einen mit *HindIII* und *BglII*, sowie zum anderen jeweils einzeln mit *AflIII* (S114T) und *DpnI* (A45I) zur Überprüfung auf die Mutationen verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die primäre Analyse des Plasmids pBBP21FluA(R95K/A45I/S114R) erfolgte durch Restriktionsverdau mit *XbaI* und *HindIII*. Der endgültige Nachweis der Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung des mutierten DNA-Bereichs.

Die Doppelmutante pBBP21FluA(R95K/S114R/L131F) wurde ausgehend von Einzelstrang-DNA des Plasmids pBBP21FluA(R95K/S114R) mittels Kunkel-Mutagenese (siehe Abschnitt 2.2.4.2) realisiert. Die Überprüfung erfolgte durch einen analytischen Restriktionsverdau mit *XbaI* und *HindIII* sowie durch Sequenzierung.

Um die Rolle des Tryptophan an Position 129 bei der Fluoreszenz-Löschung des gebundenen Fluoresceins zu untersuchen, wurden an dieser Position ebenso Aminosäuresubstitutionen vorgenommen. Die Indolseitenkette des Trp129 liegt koplanar über dem Xanthenolon-Ring-System des Fluoresceins, so dass die beiden aromatischen Systeme fast parallel zueinander zu liegen kommen. Daher sollte sich der postulierte Ladungstransfer (Götz *et al.*, 2002) zwischen

dem in der Anticalin-Bindungstasche angeregten Fluorescein und dem Tryptophanrest 129 durch ortsgerichtete Mutagenese zu den drei anderen aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Histidin beeinflussen und ggf. bestätigen lassen. Wiederum von dem Plasmid pBBP21FluA(R95K) ausgehend wurde Einzelstrang-DNA präpariert und eine Kunkel-Mutagenese mit dem jeweiligen Primer durchgeführt. Die neuen Varianten wurden durch analytischen Restriktionsverdau überprüft (*Xba*I, *Hind*III), bevor sie durch Sequenzierung bestätigt wurden. Daneben sollte die Untersuchung des erwähnten Elektronentransfers auch auf die Doppelmutante FluA(R95K/A45I/S114T) ausgeweitet werden, die eine deutlich geringere Dissoziationskonstante als das parentale FluA(R95K) aufwies (siehe Abschnitt 3.1.4.1). Dazu wurde Einzelstrang-DNA des Plasmids FluA(R95K/A45I/S114T) präpariert und eine Kunkel-Mutagenese mit den die jeweilige Mutation W129F oder W129Y tragenden Primern durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA der neuen Varianten wurde einer Restriktionsanalyse sowie einer Sequenzierung unterzogen.

3.1.3 Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Als Expressionssystem diente das Plasmid pBBP21FluA(R95K) bzw. dessen Varianten im *E. coli* K12-Stamm JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Bevor die Proteinproduktion im präparativen 2 L Maßstab begonnen wurde, erfolgten zunächst Versuche mit den Varianten FluA(R95K/A45H), FluA(R95K/A45I), FluA(R95K S114I) und FluA(R95K/S114T) in einem kleineren Maßstab (100 mL LB-Amp Schüttelkultur), um den optimalen Erntezeitpunkt der Zellen zu bestimmen. Die Produktion der Varianten erfolgte bei 22 °C, wobei die Kulturen bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ mit 200 µg/L Anhydrotetracyclin (aTc) induziert wurden. Es wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen und stündlich eine Probe des Gesamtzellproteins entnommen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert und die entsprechende Bande durch *Western-Blotting* identifiziert (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass bei allen untersuchten Varianten effiziente Proteinbiosynthese durch eine Kultivierung über Nacht (ca. 14 h) möglich war, ohne dass Zellyse auftrat. Durch diese längere Inkubationsdauer konnte zwar die Proteinausbeute gegenüber der dreistündigen Inkubation (Daten nicht gezeigt) gesteigert werden, jedoch wurde die des FluA(R95K) mit keinem der anderen Anticaline erreicht (Mühlbach, 2003).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf weitere Vorversuche verzichtet und in jedem der Fälle die Proteinbiosynthese über Nacht durchgeführt. Dabei wurden unterschiedlich hohe Proteinausbeuten erzielt, wobei jedoch die des FluA(R95K) – welche sich mit besonders hoher Effizienz im Periplama von *E. coli* produzieren läßt (Beste, 1998) – mit keinem der anderen Anticaline erreicht werden konnte; die Ausbeute lag zwischen 0,5 mg/L Kultur für die Variante S114I und 3,5 mg/L Kultur für S114T (Tabelle 3).

Tabelle 3: Nach Reinigung erhaltene Proteinmengen von FluA(R95K) und dessen Varianten bei einer Proteinbiosynthese über Nacht in *E. coli* JM83 pro L Kulturmedium

FluA-Variante	Ausbeute
R95K	4,0 mg/L
R95K/W129F	2,0 mg/L
R95K/W129Y	1,5 mg/L
R95K/W129H	1,4 mg/L
R95K/A45H	1,9 mg/L
R95K/A45I	2,1 mg/L
R95K/A45V	1,8 mg/L
R95K/H86F	1,5 mg/L
R95K/H127R	1,6 mg/L
R95K/L131F	1,5 mg/L
R95K/S114I	0,5 mg/L
R95K/S114R	1,2 mg/L
R95K/S114T	3,5 mg/L
R95K/A45I/S114R	3,0 mg/L
R95K/A45I/S114T	1,4 mg/L
R95K/A45I/S114T/W129F	2,0 mg/L
R95K/A45I/S114T/W129Y	2,0 mg/L
R95K/S114R/L131F	0,5 mg/L

Die Anticalin-Varianten, die jeweils als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) produziert wurden, konnten aus dem Periplasmaextrakt in einem Schritt durch Streptavidin-Affinitätschromatografie gereinigt werden (siehe Abschnitt 2.6.1.1).

Bei den während der Elution gesammelten Fraktionen wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt und damit die Proteinkonzentration errechnet; die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden durch SDS-PAGE analysiert. Dabei erwiesen sich die Anticaline als so homogen, dass keine weiteren Reinigungsschritte erforderlich waren (Abb. 9).

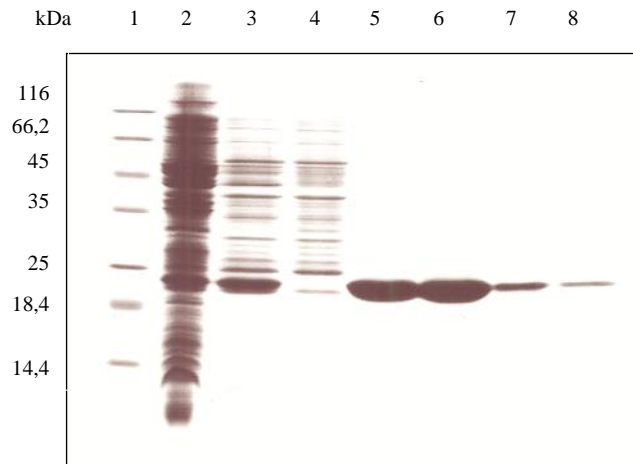


Abb. 9: SDS-PAGE zur Dokumentation der bakteriellen Produktion und Einschritt-Reinigung der Anticalin-Variante FluA(R95K/A45I/S114R) mit einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel; die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blau.

Spur 1: MBI Protein-Marker, Spur 2: Gesamtzellaufschluss zum Zeitpunkt der Ernte, Spur 3: Periplasmaextrakt, Spur 4: Waschlösung der SA-Chromatographie, Spuren 5 – 8: Elutionsfraktionen.

Des Weiteren ergab die Analyse durch SDS-PAGE im nichtreduzierten Zustand, dass die Disulfidbrücken jeweils korrekt ausgebildet wurden und keine weiteren Isomere vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Alle Proteine zeigten annähernd gleiches, homogenes Laufverhalten; eine Ausnahme bildete FluA(R95K/A45H), bei der in geringer Intensität eine weitere Bande bei etwa 22 kDa zu sehen war. Bei einigen der Varianten waren zudem Banden sichtbar, die auf eine geringfügige Dimerisierung der Proteine durch Disulfidbrücken schließen ließen. Da sich alle Proteine in für die funktionelle Charakterisierung ausreichenden Mengen produzieren ließen, wurde auf eine weitere Optimierung der Proteinbiosynthese im Einzelfall verzichtet.

3.1.4 Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften mittels Fluoreszenztitration

Die Ermittlung der Liganden-Bindungseigenschaften in Lösung erfolgte mit Hilfe der Protein-Fluoreszenztitration. Dieses Verfahren beruht auf der Änderung der Fluoreszenzintensität hauptsächlich von Tryptophan- und weniger von Tyrosin-Resten des Proteins, deren direkte oder indirekte Beteiligung an der Komplexbildung mit dem Liganden zu einer Abnahme der messbaren Fluoreszenzintensität, dem so genannten „Quenching“ führen kann. Durch Messung der Fluoreszenzintensität nach der Gleichgewichtseinstellung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration wurden Titrationskurven erhalten, aus denen mittels nicht-linearer Regression die Komplex-Dissoziationskonstanten ermittelt werden kann (Vogt & Skerra, 2001).

Aufgrund der bekannten Absorptionseigenschaften der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin erfolgte deren gemeinsame Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm; die Emissionswellenlänge für die Proteinfluoreszenzmessungen wurde, aufgrund des Maximums des Emissionsspektrums bei 340 nm, auf diesen Wert festgelegt. Da der Ligand Fluorescein in diesem Wellenlängenbereich ebenfalls geringfügig absorbiert, mussten die erhaltenen Messwerte um diesen sogenannten inneren Filtereffekt korrigiert werden (Beste *et al.*, 1999). Dazu wurden Fluoreszenztitrationen mit dem Liganden unter Verwendung einer N-Acetyl-L-tryptophanamid-Lösung anstelle der Proteinlösung durchgeführt. Die gemessene Abnahme der Fluoreszenzintensität beruht hierbei nicht auf Bindungswechselwirkungen, sondern nur auf der Eigenabsorption des Fluoresceins. Die Messwerte wurden logarithmisch gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und gemäß der in Abschnitt 2.7.2.3 beschriebenen Auswertung der apparente Extinktionskoeffizient (ϵ_{app}) des Liganden durch lineare Regression bestimmt. Dieser wurde anschließend mit Gleichung (23) für die Korrektur der bei Titration der BBP-Varianten erhaltenen Fluoreszenz-Intensitätswerte eingesetzt.

3.1.4.1 Analyse der FluA(R95K)-Varianten durch Protein-Fluoreszenztitration

Zur Messung der Proteinfluoreszenz wurde jeweils eine 0,5 bzw. 1 μM Lösung von FluA(R95K) bzw. seiner Varianten mit einer konzentrierten Stammlösung des Liganden titriert (siehe Abschnitt 2.7.2.1). Die auf einen Anfangswert von 100 % skalierten und um den inneren Filtereffekt des Liganden korrigierten Fluoreszenzintensitätswerte aus einer Titrationsreihe (vgl. Abschnitt 2.7.2.2) wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (30) angepaßt (Abb. 10). Alle Messreihen (mit Ausnahme von FluA(R95K/A45H), die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, konnten ausgewertet und auf diese Weise die thermodynamischen Dissoziationskonstanten der Protein/Ligand-Komplexe bestimmt werden (Tabelle 4).

Als Referenz wurden zunächst die Anticaline FluA und FluA(R95K) durch Fluoreszenztitration untersucht. Für FluA ergab sich eine Dissoziationskonstante $K_D = 54,8 \pm 3,4$ nM und für FluA(R95K) von $64,0 \pm 10,5$ nM (siehe Abbildung 9). Diese Werte wichen zwar von den von Beste (1999) bestimmten Dissoziationskonstanten um den Faktor 2–3 ab (FluA: $K_D = 152 \pm 24$ nM; FluA(R95K): $K_D = 117 \pm 20$ nM), scheinen aber aufgrund der Datenqualität wohl genauere Werte darzustellen. Der Quenching-Effekt des Fluoresceins auf die Proteinfluoreszenz war mit $94,2 \pm 0,2$ % im Fall des FluA bzw. $93,3 \pm 0,8$ % für FluA(R95K) jeweils sehr ähnlich und stimmte auch mit den von Beste (1999) zuvor ermittelten Werten überein.

Deutliche Steigerungen der Affinität zu Fluorescein im Vergleich zu FluA zeigten die Varianten FluA(R95K/A45V) und FluA(R95K/A45I). Die Mutation von Alanin an der Position 45 zu Valin führte zu einer stark erhöhten Bindungsaffinität gegenüber dem Liganden und zeigte die niedrigste Dissoziationskonstante $K_D = 6,2 \pm 1,6$ nM aller erzeugten Einfachmutanten. Dies entspricht einer Steigerung der Bindungsaffinität um mehr als das 10-

fache im Vergleich zum ursprünglichen FluA(R95K) und ist vermutlich durch Ausbildung verbesserter hydrophober Kontakte mit der Xanthenolon-Gruppe des Liganden zu erklären. Der gemessene Quenching-Effekt lag mit $87,8 \pm 10,9 \%$ etwas niedriger als bei der Ausgangsvariante FluA(R95K). Eine ähnlich niedrige Dissoziationskonstante, $K_D = 7,0 \pm 1,1 \text{ nM}$, und einem $Q_{\text{max}}^{\text{Protein}} = 93,1 \pm 0,2 \%$ wies die Variante FluA(R95K/A45I) auf; in diesem Fall führte die Einführung dieser Mutation zu einem Anstieg der Affinität um den Faktor 9. Auch hier scheinen hydrophobe Interaktionen der Ile-Seitenkette mit dem Xanthenolonring des Liganden für die bessere Bindung verantwortlich zu sein.

Einen drastischen Verlust des spektroskopischen Effektes des Quenching zeigte die Variante FluA(R95K/A45H) mit einer Fluoreszenzlöschung von etwa $Q_{\text{max}}^{\text{Protein}} = \text{ca. } 40 \%$. Dabei wurde ein eher linearer Abfall der Proteinfluoreszenz beobachtet; die Dissoziationskonstante konnte in dem verwendeten Messbereich daher nicht korrekt bestimmt werden. Vermutlich bewirkt eine geänderte Rotamerenkonformationen in Verbindung mit den polaren Eigenschaften dieser Seitenkette eine Umlagerung benachbarter Seitenketten. Einer der eventuell betroffenen Aminosäurereste ist Arginin 58, der eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt (Korndörfer *et al.*, 2003).

Der drittgrößte Effekt auf die Affinitätssteigerung, mit einem Faktor zwischen drei und vier, wurde sowohl für die Substitution von Serin 114 zu Threonin als auch zu Arginin beobachtet (siehe Tabelle 4). Der bei diesen beiden Aminosäuren auftretende positive Effekt ist aufgrund der unterschiedlichen Größe und Natur der beiden Seitenketten erstaunlich. (Abbildung 8). Im Gegensatz dazu hatte die Substitution des Serinrestes durch den voluminöseren Isoleucinrest praktisch keinen Effekt auf die Affinität. So sank die Dissoziationskonstante auf $K_D = 48,8 \pm 6,3 \text{ nM}$, wobei $Q_{\text{max}}^{\text{Protein}} = 83,3 \pm 0,6 \%$ geringfügig abnahm.

Auch die Einzelmutationen L131F und H127R führten nur zu moderaten Affinitätssteigerungen; die Substitution von Histidin 86 zu Phenylalanin zeigte sogar eine signifikante Verringerung der Bindungsstärke um den Faktor 3 (Tabelle 4).

Ein signifikanter Anstieg der Ligandenaffinität konnte dagegen bei den Doppelmutanten FluA(R95K/A45I/S114R) und FluA(R95K/A45I/S114T) beobachtet werden. Beide Mutanten zeigten Dissoziationskonstanten um 1 nM (Abbildung 10, Tabelle 4). Diese insgesamt etwa 30-fache Steigerung der Affinität gegenüber FluA(R95K) scheint durch einen additiven Effekt der beiden Aminosäure-Austausche zustande gekommen. Dies steht auch im Einklang mit ihren räumlich separaten Positionen innerhalb der Bindungstasche des Anticalins; ihre Seitenketten nähern sich dem Liganden im Wesentlichen aus entgegengesetzten Richtungen und scheinen keine gegenseitige Wechselwirkung ausüben (Abbildung 8).

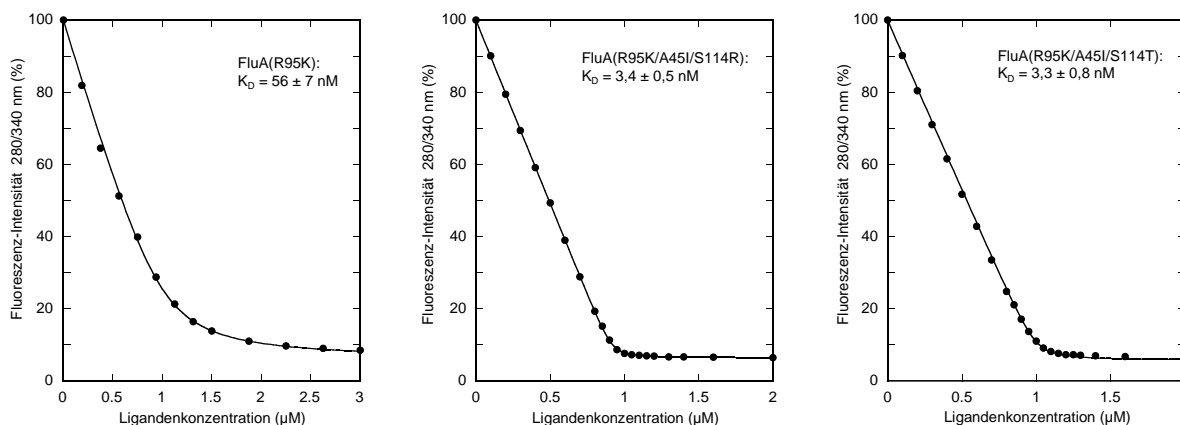


Abb. 10: Protein-Fluoreszenztitrations von FluA(R95K) und den Varianten FluA(R95K/A45I/S114R) sowie FluA(R95K/A45I/S114T) mit Fluorescein

Die Fluoreszenztitration der jeweils 1 μ M Proteinlösungen bei pH 7,4, wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von Fluorescein durchgeführt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280$ nm und $\lambda_{\text{Em}} = 340$ nm). Nach Korrektur um den inneren Filtereffekt des Liganden wurden die Datenpunkte durch nicht-lineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst. Die daraus resultierenden individuellen K_D -Werte dieser Messungen sind angegeben (vgl. Tabelle 5).

Obwohl sich auch die beiden Einzel-Substitutionen S114R und L131F an unterschiedlichen Positionen in der Bindungstasche befinden und eine gegenseitige Wechselwirkung unwahrscheinlich erscheint, war trotz der affinitätsverbessernden Effekte bei der jeweiligen Einzelaustausche ein weniger deutlicher Effekt bei der Doppelmutation FluA(R95K/S114R/L131F) zu beobachten; hier konnte die Affinität mit einer $K_D = 12,7 \pm 5,6$ nM insgesamt um den Faktor 5 verbessert werden (Tabelle 4).

Der Ersatz von Trp129, dessen Rest für den spektroskopischen Effekt auf den gebundenen Liganden Fluorescein entscheidend ist (Götz *et al.*, 2002; Korndörfer *et al.*, 2003), durch andere aromatische Seitenketten in FluA(R95K) resultierte in erheblich verminderten Affinitäten, beginnend bei einem Faktor von ca. 4 für Phenylalanin und etwa 135 für Histidin, dessen kleinere und deutlich polare Imidazolseitenkette wahrscheinlich ungünstig mit dem Liganden Fluorescein wechselwirkt oder gar eine andere Konformation annimmt. Eine ca. 90-fache Verringerung der Affinität im Fall des Austausches von Trp129 gegen Tyrosin war dagegen unerwartet, da solch eine Seitenkettensubstitution in der Regel als konservativ angesehen wird.

Der Austausch von Trp129 durch Phe in der Doppelmutante FluA(R95K/A45I/S114T) resultierte in einem etwas stärkeren Verlust der Affinität um den Faktor 10, wohingegen der Austausch zu Tyr wiederum zu einer drastischen Verringerung um den Faktor 85 führte (Tabelle 4). Die gegenüber Trp kleinere aromatische Tyrosin-Seitenkette an Position 129 scheint genügend Flexibilität zu besitzen, um die Passform der Bindungstasche für den Liganden Fluorescein zu stören.

3.1.4.2 Der Effekt einzelner Seitenketten auf die Ligandenfluoreszenz – Untersuchung des Quenching-Effektes mittels Ligandenfluoreszenzmessung

Aufgrund des bekannten Quenching-Effekts des Fluorescein bindenden Antikörpers 4-4-20 ($Q_{\max}^{\text{Ligand}} = 83,6 \%$; (Denzin *et al.*, 1991)) und des Anticalins FluA ($Q_{\max}^{\text{Ligand}} = 99,7 \%$; (Beste *et al.*, 1999)) auf die Eigenfluoreszenz des Liganden wurde hier untersucht, ob bestimmte Seitenkettensubstitutionen in der Bindungstasche des Anticalins die Fluoreszenzeigenschaften des Liganden beeinflussen. Um die Rolle des maßgeblichen Tryptophanrestes an Position 129 für den postulierten Ladungstransfer zu untersuchen, wurde dieser durch die aromatischen Reste His, Tyr und Phe in FluA(R95K) ausgetauscht. Mittels einer Liganden-Fluoreszenztitration mit Fluorescein wurde der maximale stationäre Fluoreszenzlöschungseffekt für diese Varianten bestimmt. Als Kontrolle diente das Anticalin FluA(R95K), welches Fluorescein nicht nur mit annähernd gleicher Affinität wie das ursprünglich durch *Phage-Display* selektierte FluA bindet, sondern mit $99,8 \pm 0,2 \%$ auch einen ähnlichen Quenching-Effekt wie FluA ($99,7 \pm 0,3 \%$) aufweist, aber eine höhere Ausbeute bei der Biosynthese in *E. coli* zeigt. Neben der Untersuchung des Quenching-Effektes kann auch die thermodynamische Dissoziationskonstante über die hier zu beobachtende Abnahme der Ligandenfluoreszenz während der Komplexbildung mit dem Protein verfolgt werden (Beste *et al.*, 1999). Das Absorptionsmaximum für die Anregung des Fluoresceins liegt bei 490 nm und für die Emission bei 512 nm (Sjöback, 1995; Yang *et al.*, 2009). Bei der experimentellen Durchführung handelte es sich nicht um eine Titration im praktischen Sinn, sondern um Messreihen von $0,5 \mu\text{M}$ oder $1 \mu\text{M}$ Fluoresceinlösungen in Gegenwart variierender Proteinkonzentration. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden normiert, gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und der Graph durch nicht-lineare Regression angepasst (siehe Abschnitt 2.7.2.2). Eine Korrektur der gemessenen Fluoreszenzwerte – wie sie bei der Proteinfluoreszenztitration durchgeführt werden musste – war dabei nicht nötig.

Der Austausch von Trp 129 gegen die mehr polare Aminosäure Histidin wirkte sich äußerst ungünstig auf die Affinität aus; diese konnte mittels Proteinfluoreszenztitration zu $8639 \pm 1827 \text{ nM}$ bestimmt werden, was einem Anstieg der Dissoziationskonstante um einen Faktor 135 entspricht. Aus diesem Grund konnte hier die Extrapolation der asymptotischen Fluoreszenzlöschung nicht auf zuverlässige Weise erfolgen.

Bei der Variante FluA(R95K/W129Y), welche Fluorescein im Vergleich zu FluA(R95K) mit einer 45-fach geringeren Affinität bindet ($1430 \pm 544 \text{ nM}$, Tabelle 4), wurde auch ein deutlich reduziertes maximales Quenching mit $71,3 \pm 10,7 \%$ gemessen. Dieses Ergebnis war unerwartet und erstaunlich, da Tyrosin sowohl ähnliche strukturelle Eigenschaften als auch ein vergleichbares Redoxpotential (ca $0,7 \text{ eV}$) wie Trp besitzt (Götz *et al.*, 2002). Dieses stark abweichende spektroskopische Verhalten des Fluorescein-Komplexes ist möglicherweise in einer Strukturänderung der Ligandenbindungstasche dieser Anticalin-Variante begründet und könnte so auch den Affinitätsverlust gegenüber Fluorescein erklären.

Im Vergleich dazu zeigte die Variante FluA(R95K/W129F) einen signifikant stärkeren Quenching-Effekt auf die stationäre Fluoreszenz des Liganden ($97,7 \pm 0,7 \%$), der nur etwas geringer war als bei FluA(R95K); die im Vergleich dazu ermittelte Dissoziationskonstante war bloß um den Faktor 3 erhöht (Tabelle 4). Aufgrund des unterschiedlichen Redoxpotentials von Phenylalanin und Tryptophan war es in diesem Fall eher unwahrscheinlich, dass ein ähnlicher Elektronentransfer-Prozess wie bei Tryptophan stattfinden konnte. Falls es sich auch hier um eine Veränderung der Geometrie der Bindungstasche handelte, musste in Betracht gezogen werden, dass eine andere Tyrosin- oder Tryptophanseitenkette innerhalb der Bindungstasche als Elektronendonator fungierte.

Zusätzlich wurde der Einfluss des Aminosäureaustausches W129Y und W129F in der hochaffinen Variante FluA(R95K/A45I/S114T) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die jeweilige Seitenkettensubstitution zu ähnlichen relativen Effekten im Bezug auf die Ligandenaffinität führte wie bei FluA(R95K); die Dissoziationskonstante war im Vergleich zu FluA(R95K/A45I/S114T) ($K_D = 1,0 \pm 0,4$) im Fall von W129F ca. 10-fach, bei W129Y ca. 85-fach erhöht. Mit einem Fluoreszenzquenching Q_{\max}^{Ligand} von ca. 100 % unterschied sich die Variante W129F überhaupt nicht, und die Variante W129Y ($Q_{\max} = 98,8 \pm 1,7$) nur geringfügig von dem Ausgangsprotein FluA(R95K/A45I/S114T) ($Q_{\max} = 100 \%$; Tabelle 4).

Weitere Liganden-Fluoreszenztitrationen wurden zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante mit ausgewählten Varianten durchgeführt. So konnte für die Variante FluA(R95K/A45I) die Dissoziationskonstante zu $4,0 \pm 1,3$ nM bei einem Q_{\max} von $71,3 \pm 10,7 \%$ bestimmt werden. Die schon anhand der Proteinfluoreszenz beobachtete Affinitätssteigerung beim Austausch des Serins an Position 114 zu Arginin bzw. Threonin ($K_D = 18,5 \pm 3,6$ bzw. $8,4 \pm 4,9$) konnte durch diese Messungen bestätigt werden. Dies war auch der Fall bei der Variante mit der Kombination der Austausche A45I und S114R, hier wurde diesmal mit $K_D = 0,4 \pm 0,2$ die niedrigste Dissoziationskonstante aller durchgeführten Einzelmessungen erreicht und bestätigte somit das Ergebnis der Protein-Fluoreszenztitration (Abbildung 11, Tabelle 4).

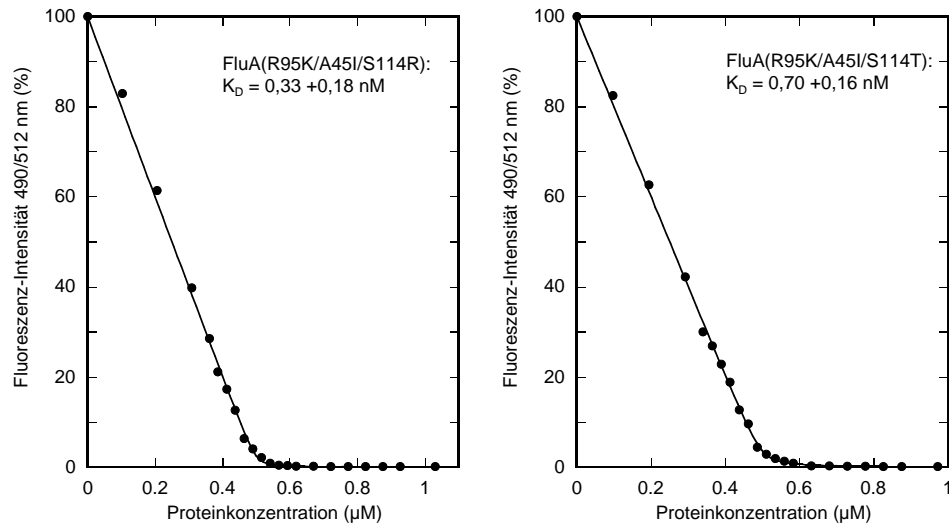


Abb. 11: Liganden-Fluoreszenzbestimmung der Varianten FluA(R95K/A45I/S114R) und FluA(R95K/A45I/S114T) mit Fluorescein.

Die Fluoreszenz-Messungen ($\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 512 \text{ nm}$) wurden mit $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ Fluoresceinlösungen in Gegenwart unterschiedlicher Proteinkonzentrationen bei pH 7,4 durchgeführt. Die normierten Fluoreszenzintensitäten wurden durch nichtlineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst. Die daraus resultierenden individuellen K_D -Werte aus diesen Messungen sind angegeben (siehe auch Tabelle 4).

Tabelle 4: Dissoziationskonstanten (K_D) und Quenching-Effekt des Proteins (Q_{\max}^P ; $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm) oder des Liganden Fluorescein (Q_{\max}^L ; $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 512$ nm) der Komplexbildung zwischen FluA-Varianten und Fluorescein. Die Werte wurden separat nach Fluoreszenztitration des gereinigten Proteins mit Fluorescein^a oder umgekehrt^b bestimmt. Angegeben sind die Durchschnittswerte von jeweils drei individuellen Messungen mit den Standardabweichungen.

FluA-Variante	K_D^a [nM]	Q_{\max}^P [%]	K_D^b [nM]	Q_{\max}^L [%]
R95K	64.0 ± 10.5	92.4 ± 0.1	31.2 ± 13	99.8 ± 0.2
R95K/W129F	233.2 ± 49.2	90.4 ± 0.3	96.8 ± 36.6	97.7 ± 0.7
R95K/W129Y	5669 ± 901	86.4 ± 2.9	1430 ± 544	71.3 ± 10.7
R95K/W129H	8639 ± 1827	31.6 ± 3.1		
R95K/A45H	> 300	~ 40	> 300	~ 40
R95K/A45I	7.0 ± 1.1	93.1 ± 0.2	4.0 ± 1.3	99.8 ± 0.4
R95K/A45V	6.2 ± 1.6	87.8 ± 10.9		
R95K/H86F	174.0 ± 5.3	94.2 ± 0.2		
R95K/H127R	39.1 ± 3.5	88.1 ± 6		
R95K/L131F	32.7 ± 3.8	93.4 ± 0.3		
R95K/S114I	48.8 ± 6.3	83.3 ± 0.6		
R95K/S114R	16.9 ± 1.6	93.1 ± 0.2	18.5 ± 3.6	99.5 ± 0.5
R95K/S114T	18.6 ± 2.1	84.0 ± 0.5	8.4 ± 4.9	99.3 ± 0.6
R95K/A45I/S114R	1.8 ± 0.8	94.5 ± 1.5	1.4 ± 0.5	~ 100
R95K/A45I/S114T	3.0 ± 0.5	92.4 ± 3.8	1.2 ± 0.6	~ 100
R95K/A45I/S114T/W129F	18.7 ± 6.4	92.6 ± 1.5	9.9 ± 3	~ 100
R95K/A45I/S114T/W129Y	348.3 ± 65.3	90.3 ± 2.3	85.5 ± 38.6	98.8 ± 1.7
R95K/S114R/L131F	12.7 ± 5.6	71.6 ± 7.5		

Insgesamt bestätigen die Liganden-Fluoreszenzmessungen die zuvor durch die Protein-Fluoreszenzmessungen ermittelten selektiven Bindungseigenschaften von FluA(R95K) und dessen Varianten, wobei des durchaus geringe Abweichungen – mit einem maximalen Unter-

schied um einen Faktor ca. vier für die Variante R95K/A45I/S114T/W129Y – gab. Somit konnten mit beiden experimentellen Strategien, der Protein-Fluoreszenz-Titration als auch der Liganden-Fluoreszenzmessung, ähnliche Bindungsaffinitäten festgestellt werden.

Zusätzlich zeigten ausgewählte, hier untersuchte FluA-Varianten aufgrund der Quenching-eigenschaften eine über den reinen Bindungseffekt hinausgehende funktionelle Analogie zu FluA und FluA(R95K), aber auch zu den Fluorescein bindenden Antikörpern.

3.1.5 Analyse der Proteinfaltung ausgewählter Fluorescein bindender Varianten

Ausgewählte FluA-Varianten wurden mittels der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) untersucht, da diese die Charakterisierung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen im nativen, entfalteten und im partiell gefalteten Protein erlaubt (van Mierlo & Steensma, 2000). Somit kann der Einfluss eingeführter Aminosäuren auf die Struktur und die thermodynamische Faltungstabilität untersucht werden.

3.1.5.1 Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes mittels Circular dichroismus-Spektroskopie

CD-Spektren der gereinigten Proteine wurden im Fern-UV-Bereich zwischen 190 und 240 nm aufgenommen, um eine Aussage zu möglichen strukturellen Veränderungen der Varianten im Vergleich zur Ausgangsvariante FluA bzw. FluA(R95K) machen zu können. In diesem Wellenlängenbereich werden die spektralen Eigenschaften des Proteins vorwiegend durch die Sekundärstrukturelemente bestimmt (Johnson, 1988). Dabei haben α -Helix, β -Faltblatt und Random-Coil-Strukturen deutlich unterschiedliche Spektren, sodass deren Anteil in einem Protein aus dessen CD-Spektrum abgeschätzt werden kann. Die ermittelten Werte für die Elliptizität wurden für das jeweilige Protein nach Gleichung (40) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure umgerechnet (Abschnitt 2.7.3) und gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abbildung 12).

Die Spektren der Varianten FluA(R95K) und FluA(R95K/A45I/S114R) zeigten im Wesentlichen dieselben Merkmale wie die des Anticalins FluA (Abbildung 12). Das breite Minimum im Bereich zwischen 205 und 215 nm ist für eine vorherrschende β -Faltblatt-Struktur kennzeichnend. Ähnliche Spektren wurden für die Varianten FluA(R95K/W129F) und FluA(R95K/W129Y) beobachtet; obwohl hier die Affinität für Fluorescein mehrere Größenordnungen kleiner ist als bei der Variante FluA(R95K), hat offensichtlich keine der beiden Seitenkettensubstitutionen einen signifikanten Effekt auf die Konformation. Der Vergleich der Anticaline zum rekombinanten Wildtyp-BBP, dessen Spektrum dem eines Proteins mit dominierender β -Faltblatt-Struktur entspricht (Huber *et al.*, 1987), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Bei allen untersuchten Anticalinen war also die

Grundstruktur des natürlichen Lipocalins erhalten geblieben; und der Austausch einzelner Aminosäuren hatte nicht zu einer signifikanten Strukturveränderung geführt.

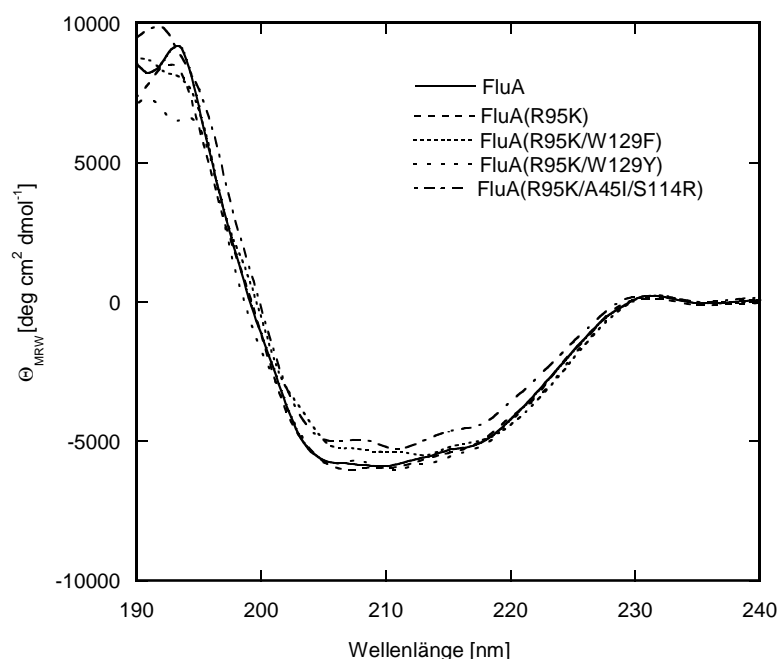


Abb. 12: Fern-UV CD-Spektren ausgewählter FluA-Varianten.

Dargestellt sind die überlagerten Spektren des Anticalins FluA und FluA(R95K) sowie seiner Varianten W129F, W129Y und A45I/S114R. Die CD-Spektren wurden bei 22 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm aufgenommen und für jedes Protein auf die molare Elliptizität Θ_{MRW} normiert. Die Proteinlösungen (ca. 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$) lagen in Messpuffer vor (50 mM Kaliumsulfat, 20 mM Kaliumphosphat, pH 8,0).

3.1.5.2 Stabilität der FluA-Varianten gegenüber thermischer Denaturierung

Die Bestimmung der thermodynamischen Faltungsstabilität der einzelnen FluA-Varianten erfolgte durch Messung der Übergangstemperaturen vom nativen zum denaturierten Zustand durch CD-Spektroskopie. Hierzu wurde die Veränderung des Sekundärstrukturgehaltes mit Hilfe von Elliptizitätsmessungen im Fern-UV-Bereich bei 212 nm untersucht (Abschnitt 2.7.3). Durch kontrolliertes kontinuierliches Erhitzen der Proteine und gleichzeitiges Messen des CD-Signales wurden Denaturierungskurven erhalten, die nach der Methode von Cohen und Pielak (Cohen, 1994) ausgewertet wurden (Schlehuber & Skerra, 2002). Dabei wurde ein Zwei-Zustand-Modell des Überganges vom nativen zum denaturierten Protein zugrunde gelegt (Lumry *et al.*, 1966).

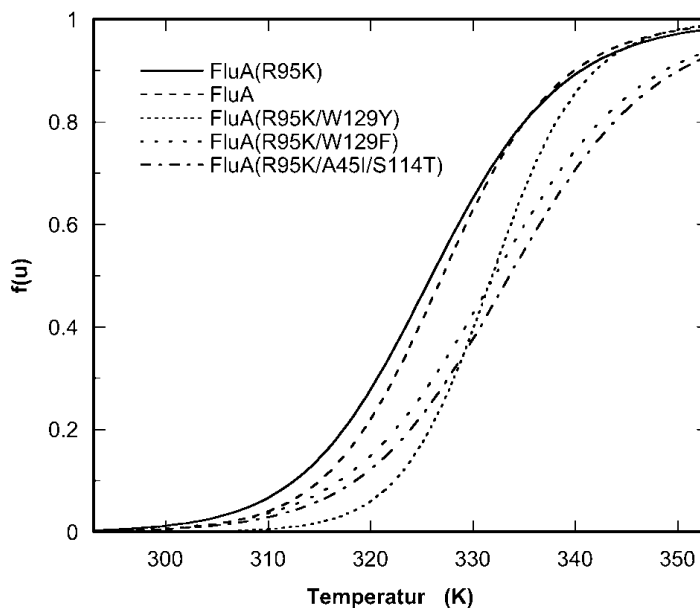


Abb. 13: Thermische Denaturierung von FluA-Varianten bestimmt durch CD-Messung im fernen UV-Bereich.

Dargestellt sind die normalisierten Denaturierungskurven des Anticalins FluA und FluA(R95K) sowie seiner Varianten W129F, W129Y und A45I/S114T. Um den Anteil von entfaltetem Protein $f(u)$ zu bestimmen, wurden die Proteine bei einer konstanten Rate von 60 K/h erhitzt und die Elliptizität bei 212 nm verfolgt. T_m -Werte sowie weitere thermodynamische Parameter wurden aus den Rohdaten durch Kurvenanpassung (siehe Abschnitt 2.7.3) ermittelt und sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Die Denaturierungskurven wurden gemäß dem Formalismus in Abschnitt 2.7.3 angepasst und auf diese Weise die Übergangstemperatur und die freie Enthalpie der Denaturierung, extrapoliert auf Standardbedingungen, für die einzelnen FluA-Varianten bestimmt (Tabelle 5). Dabei wurde aus den ermittelten Parametern auch der Anteil des denaturierten Proteins ($f(u)$) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt, um die Denaturierungskurven der einzelnen Proteine unter normierten Bedingungen miteinander vergleichen zu können (Abbildung 13).

Diese Analyse ergab für das Anticalin FluA eine Schmelztemperatur $T_m = 53,9^\circ\text{C}$. Die Variante R95K hatte mit $52,9^\circ\text{C}$ einen um 1°C niedrigeren Schmelzpunkt. Alle anderen Proteine wiesen jedoch höhere Schmelztemperaturen auf mit $T_m = 58,9^\circ\text{C}$ für FluA(R95K/W129Y), $T_m = 59,2^\circ\text{C}$ für FluA(R95K/W129F) und $T_m = 60,6^\circ\text{C}$ für die Variante FluA(R95K/A45I/S114T) (Tabelle 5).

Aufgrund der leicht verminderten Kooperativität des Entfaltungsüberganges, die sich in der Enthalpie des Denaturierungsüberganges ΔH_m ausdrückt, betrug die freie Denaturierungsenthalpie jedoch lediglich 13,1 kJ/mol bei FluA(R95K/W129F) und 13,7 kJ/mol bei FluA(R95K/A45I/S114T). Demgegenüber zeigte die Variante FluA(R95K/W129Y) den steilsten Übergang und damit die größte Kooperativität der Entfaltung. Dies unterstützt die Hypothese, dass der Austausch von Trp129 zu Tyr zu einer wesentlichen strukturellen Veränderung in der Bindungstasche des engineereten Lipocalins führt.

Bei zwei der hier untersuchten FluA-Varianten konnte unter den angegebenen Pufferbedingungen (siehe Abschnitt 2.7.3) durch langsames Abkühlen der denaturierten Proteinprobe und Bestimmung der temperaturabhängigen Elliptizität die Reversibilität der Denaturierung beobachtet werden. Dabei ergab sich für FluA(R95K) $T_{1/2}^{unfolding} = 326,0$ K und $T_{1/2}^{refolding} = 326,7$ K. Allerdings zeigte sich, dass die Elliptizität beim Erreichen der Anfangstemperatur nicht mehr vollständig auf den Ausgangswert zurückging, sondern nur noch 76 % des ursprünglichen CD-Signals betrug. Ein Teil des Proteins wurde daher vermutlich irreversibel denaturiert und konnte während des Abkühlungsprozesses seinen nativen Zustand nicht wieder erlangen. Im Fall der Variante FluA(R95K/A45I/S114R) wurde eine noch größere Hysterese beobachtet ($T_{1/2}^{unfolding} = 333,2$ K gegenüber $T_{1/2}^{refolding} = 331,8$ K).

Die hier untersuchten Varianten führten allesamt zu einer erhöhten Schmelztemperatur im Vergleich zum FluA und damit zu einer stabileren Konformation. Verglichen mit dem Wildtyp-BBP, welches eine Schmelztemperatur von 61,3 °C besitzt (Schlehuber & Skerra, 2002), besitzen diese Varianten dennoch einen leicht erniedrigten Schmelzpunkt. Möglicherweise hängt dies mit der Ansammlung von positiven Ladungen am Eingang der Bindungstasche der engineerierten Anticaline zusammen, welche für die spezifische Erkennung des Fluorescein-Dianions verantwortlich zu sein scheinen (Korndörfer *et al.*, 2003).

Tabelle 5: Thermodynamische Parameter für die thermische Entfaltung ausgewählter FluA-Varianten, ermittelt durch Circular dichroismus-Spektroskopie bei 212 nm und pH 8,0

FluA-Variante	T_m [K]	T_m [°C]	ΔH_m [kJ/mol]	ΔG° [kJ/mol]
FluA	327.0 ± 0.2	53.9 ± 0.2	157.5 ± 4.3	13.9 ± 0.4
R95K	326.0 ± 0.2	52.9 ± 0.2	139.1 ± 3.8	11.9 ± 0.3
R95K/W129F	332.2 ± 0.2	59.1 ± 0.2	127.4 ± 2.7	13.1 ± 0.3
R95K/W129Y	331.9 ± 0.1	58.8 ± 0.1	205.5 ± 4.8	20.9 ± 0.5
R95K/A45I/S114R	333.2 ± 0.3	60.1 ± 0.3	181.7 ± 10.2	19.1 ± 1.1
R95K/A45I/S114T	333.6 ± 0.2	60.5 ± 0.2	129.1 ± 2.8	13.7 ± 0.3

3.2 Selektion von GdFP-Chromophor bindenden BBP-Varianten

Interessante Sonden für das Studium der Polarität und des Reorganisationsverhaltens und damit der dynamischen Antwort eines Proteins auf lichtinduzierte Ladungsumverteilung sind solche Chromophore, die im spektroskopisch angeregten Zustand eine zwitterionische Struktur mit hohem Dipolmoment ausbilden, wie der Chromophor des „goldfarbenen

fluoreszierenden Proteins“ (GdFP), einer in der Arbeitsgruppe von Dr. N. Budisa am MPI für Biochemie Martinsried, konstruierten Variante des GFP (Bae *et al.*, 2003).

Ziel dieser Arbeit war die Schaffung eines neuen Modellsystems, in dem mit Hilfe dieses spezifisch komplexierten GdFP-Chromophors der Einfluss spektral induzierter Wechselwirkungen auf die Proteinumgebung im Hinblick auf strukturelle und dynamische Phänomene studiert werden kann. Dafür sollte, ausgehend von dem natürlichen Lipocalin BBP, ein künstliches, für die Komplexierung des synthetisch hergestellten GdFP-Fluorophors (Prüger, 2007) maßgeschneidertes Anticalin erzeugt werden.

3.2.1 Herstellung einer kombinatorischen Zufallsbibliothek von BBP-Varianten

Da die hochkomplexe Zufallsbibliothek auch für andere Selektionsexperimente herangezogen werden sollte, erfolgte die Planung, Herstellung und Auswertung in Zusammenarbeit mit Christian Kirchner, Lehrstuhl für Biologische Chemie. Hierzu wurde das bereits etablierte System (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber *et al.*, 2000) für die Generierung einer BBP-Bibliothek herangezogen, bei dem 16 für die Interaktion mit dem natürlichen Liganden verantwortliche Aminosäuren identifiziert und randomisiert wurden.

Zur konzertierten Mutagenese der Aminosäuren in den vier für die Ligandenbindung verantwortlichen Peptidschleifen des BBP wurde die von (Schmidt, 1995) entwickelte mehrstufige PCR-Strategie verfolgt. Das Konzept basiert auf der Verwendung von vier Oligodesoxynukleotiden, die jeweils von einem der vier zu mutierenden Sequenzabschnitte abgeleitet und die an denjenigen Basentriplets, welche den zu mutierenden Aminosäurepositionen entsprechen, degeneriert sind. Jeweils zwei Oligodesoxynukleotide bilden ein *Primer*-Paar für die beiden ersten, parallel durchgeführten PCRs mit der für das BBP kodierenden Nukleinsäure als Matrize. In der zweiten PCR erfolgt die Verknüpfung und Amplifizierung der beiden zuvor erhaltenen Teilfragmente mittels zweier flankierender *Primer* sowie eines vermittelnden Oligodesoxynukleotids (Skerra, 2001).

Um eine auf dem Strukturgen des nativen Bilin-Bindungsproteins basierende Zufallsbibliothek zu erzeugen, wurde durch Verdau von 200 µg (entsprechend 72 pmol) Phasmidvektor pBBP38 mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI das BBP-Strukturgen aus dem Plasmid entfernt und das Vektorrückgrat präparativ mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Phenol/Chloroform Extraktion isoliert. Dabei wurde eine Ausbeute von etwa 50 % erzielt. Gleichzeitig wurden über die zweistufige Polymerasekettenreaktion erstens die gewünschten Zufallsmutationen innerhalb der Sequenz des BBP eingeführt und zweitens ein randomisiertes Strukturgen voller Länge assembliert. 18,0 µg (entsprechend 77 pmol) des assemblierten PCR-Produktes wurden im Anschluss ebenfalls mit *Bst*XI geschnitten, um kompatible Enden zur gerichteten Inserierung in den Phasmidvektor pBBP38 zu erzeugen. Durch gelelektrophoretische Auftrennung des enzymatischen Ansatzes und nachfolgende

Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das beidseitig verdaute Insert zugunsten hoher Reinheit lediglich mit einer Ausbeute von 20 % isoliert. Die beiden präparierten DNA-Fragmente (*Insert* und *Vektorrückgrat*) wurden anschließend in einem 15 pmol Ansatz bei 1 : 1 Stöchiometrie ligiert und anschließend quantitativ gefällt.

Die Transformation des für das *Phage-Display* geeigneten *E. coli* Stamms XL1-Blue mit der ligierten BBP-Zufallsbibliothek erfolgte in 23 Elektroporationsansätzen mit jeweils 2,0 µg DNA. Die Transformationseffizienz der Zellen, getestet mit 100 ng Phasmidvektor pBBP38, betrug $6,0 \cdot 10^8$ pro µg DNA. Die erhaltene Bibliothek zeigte mit einer Komplexität von $2,5 \cdot 10^{10}$ unabhängigen Transformanden eine Verbesserung um nahezu einen Faktor 70 im Vergleich zur nativen BBP-Zufallsbibliothek von Beste (1999).

Die Erhöhung der Komplexität der Bibliothek war auf die Erhöhung der DNA-Menge um den Faktor 3,6 von 4,2 pmol auf 15,0 pmol bei der Herstellung des Ligierungsansatzes zurückzuführen. Die aus der Optimierung experimenteller Abläufe resultierende zusätzliche Komplexitätssteigerung um das 19-fache ist vor allem auf eine erhöhte Transformations-effizienz der elektrokompenten Zellen des *E. coli* Wirtstammes XL1-Blue zurückzuführen.

Die Effizienz der elektrokompenten Zellen konnte von $6,0 \cdot 10^8$ pro µg DNA für den Phasmidvektor pBBP20 (Beste, 1998) auf $8,2 \cdot 10^9$ pro µg DNA für den Phasmidvektor pBBP38 gesteigert werden, entsprechend eines Faktors von ca. 14. Die Anzahl der benötigten Elektroporationsansätze wurde dabei begrenzt, um die bereits transformierten Ansätze schnellstmöglich weiter zu verarbeiten. Aus diesem Grund wurde pro Elektroporationsansatz eine DNA Menge von 2,0 µg verwendet. Diese lag über der maximalen Menge von 1,3 µg DNA/Ansatz, bis zu der die Zahl der erhaltenen Transformanden proportional steigt (Stibora, Beste & Skerra, unveröffentlicht); allerdings bezieht sich diese Proportionalität auf Testtransformationsansätze mit zirkulärem Vektor. Dessen Anteil betrug in den durchgeführten Ansätzen mit je 2,0 µg ca. 200 ng, da die Obergrenze der Ligierungseffizienz bei etwa 10 % lag. Aus diesem Grund galt die für die Positivkontrolle mit 100 ng Phasmidvektor pBBP38 ermittelte Transformationseffizienz bei der Elektroporation nur als Richtwert für die Eignung der elektrokompenten Zellen. Eine im Vorfeld durchgeführte theoretische Kalkulation offenbarte einen dreifachen Überschuss eingesetzter Zellen im Vergleich zur Molekülanzahl an ligiertem, zirkulärem Vektor pro Elektroporationsansatz, was eine quantitative Transformation noch zuließ.

Die elektrokompenten Zellen wurden unmittelbar vor der Transformation frisch präpariert, da durch Einfrieren und Auftauen der Zellen bei früheren Versuchen ein Abfall der Transformationseffizienz um den Faktor 10 beobachtet worden war.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Elektroporation ist die Vermeidung einer Lichtbogenbildung und daraus resultierender Thermoemission, die die Überlebensfähigkeit der Zellen drastisch senkt. Diese Wärmeentwicklung kann durch Herabsetzen der Leitfähigkeit der Elektroporationsansätze verringert werden. Deshalb wurde die für die Elektroporation bestimmte ligierte DNA nach der Fällung in Wasser gelöst. Auch die elektrokompenten

Zellen wurden nicht mit GYT-Medium (Dower *et al.*, 1988) sondern lediglich in Wasser gewaschen, um sämtliche ionischen Rückstände zu entfernen. Abschließend wurden die Zellen in Wasser resuspendiert.

3.2.2 Selektion aus der BBP-Zufallsbibliothek

Zur Herstellung von Phagemiden, die das mutierte BBP auf ihrer Hülle präsentieren, wurde das oben beschriebene PCR-Fragment mit der genetischen Zufallsbibliothek in den Phasmidvektor pBBP38 inseriert und *E. coli* XL1-Blue-Zellen in 23 separaten Elektroportationsansätzen mit dem Ligierungsprodukt transformiert. Zur Phagemidproduktion wurde dann wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben verfahren. Eine vergleichende Sequenzanalyse zufällig ausgewählter Klone zeigte eine deutliche Steigerung funktioneller *bbp*-Gensequenzen von 50 auf 80 % bei Verwendung gereinigter Oligodesoxynukleotide gegenüber der Herstellung von Bibliotheken mit ungereinigten Oligodesoxynukleotiden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.1 Affinitätsanreicherung am immobilisierten GdFP-Chromophor

Mit der so gewonnenen BBP-Phagemidbibliothek wurden *Phage-Display*-Affinitätsanreicherungen am immobilisierten Chromophor durchgeführt. Zwecks Immobilisierung des Liganden an mit Streptavidin beladenen magnetischen Partikeln wurde ein entsprechendes GdFP-Biotinkonjugat (vgl. Abbildung 6) synthetisiert (Prüger, 2007). Das Konjugat wurde mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie auf Reinheit überprüft, wobei ein deutlicher Spot mit einem R_f -Wert = 0,4 erkennbar war (siehe Abschnitt 2.3.3). Ein weiterer Spot an der Startlinie deutete allerdings auf nur partielle Umsetzung mit Biotin hin (Abbildung 14).

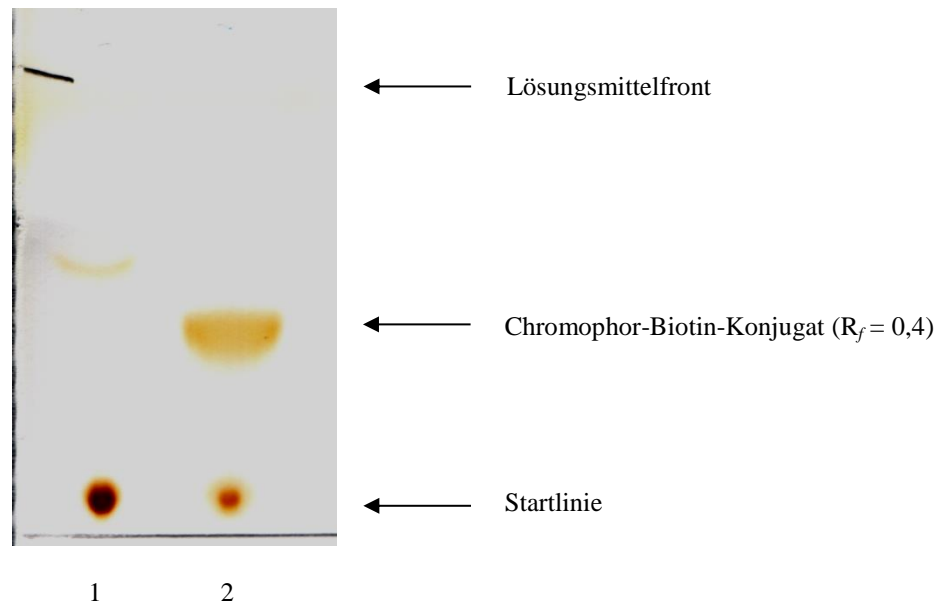


Abb. 14: Nachweis des Chromophor-Biotin-Konjugats mittels Dünnschichtchromatographie.

An der Startlinie wurden der freie Chromophor (1) und der mit Biotin konjugierte Chromophor (2) aufgetragen und bis zum Verdampfen des Lösungsmittels DMF getrocknet. Die chromatographische Trennung erfolgte anschließend vertikal in einer mit dem Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH}$ (3 : 1) gesättigten Kammer. Der Retentionsfaktor R_f wurde als Quotient der Laufstrecke der jeweiligen Substanz zur Gesamtstrecke der Lösungsmittelfront bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.3).

Dieses Chromophor-Biotin-Konjugat wurde an einer mit Streptavidin beladenen Polystyrolfestphase – Nunc Immuno-Flügelstifte mit hoher Proteinbindungskapazität und kurzen Diffusionswegen für schnelle Einstellung des statischen Gleichgewichts (Butler, 2000) – immobilisiert. Unbesetzte Bindungsstellen wurden mit RNaseA abgesättigt, um unspezifische Adsorption von Phagemiden zu verhindern (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Nach Inkubation der beladenen Flügelstifte mit der Phagemid-Bibliothek zwecks Komplexierung der bindungsaktiven Varianten wurden nicht bindende Phagemide in insgesamt acht Waschschrritten abgetrennt. Die verbliebenen Phagemide wurden anschließend kompetitiv mit einer Lösung von 1 mM freiem Chromophor in PBS/T, 20 % DMF eluiert und nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue amplifiziert (Abschnitt 2.3.5). Insgesamt wurden fünf Selektionszyklen durchgeführt; zur Analyse dieser einzelnen Selektionszyklen wurde der Phagemidtitel der Waschfraktionen eins und acht sowie der Elutionsfraktion bestimmt und der relative Anteil bezogen auf die für den Selektionsprozess insgesamt eingesetzten Phagemide graphisch aufgetragen (Abbildung 15).

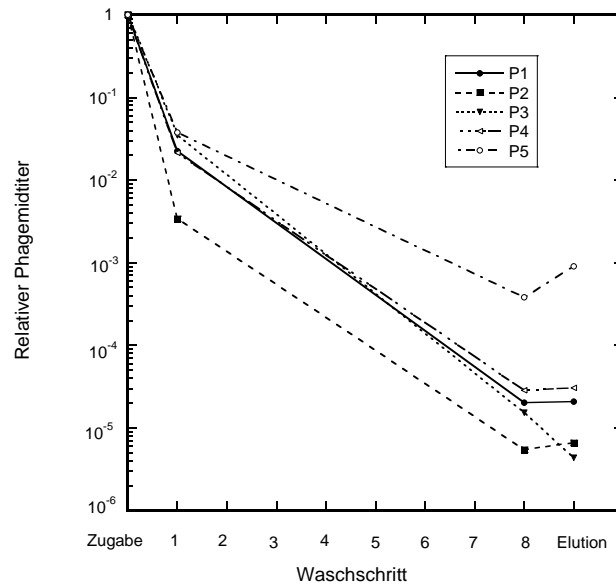


Abb. 15: Überlagerte Elutionsprofile der Selektionszyklen eins bis fünf im Verlauf der Anreicherung GdFP-Chromophor-bindender BBP-Varianten aus der nativen Zufallsbibliothek mittels *Phage Display*.

Nach Inkubation eines mit Chromophor-Biotin im Komplex mit Streptavidin beschichteten Nunc-Flügelstiftes mit ca. 5×10^{11} Phagemiden für eine Stunde wurden nicht bindende Phagemide durch wiederholtes Waschen des Flügelstiftes mit PBS/T entfernt. Nach dem achten Waschschrift wurden die gebundenen Phagemide mit einer 1 mM Chromophorlösung kompetitiv eluiert. Der Phagemidtitel ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion wurde bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen.

Die für die Adsorption eingesetzten Phagemidtitel lagen bei den einzelnen Zyklen zwischen $1,8 \cdot 10^{11}$ und $7,5 \cdot 10^{10}$ cfu. Bei den ersten drei Anreicherungszyklen zeigte sich ein stetiger Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschfraktionen wie auch der Elutionsfraktion, wobei beim dritten Zyklus der Elutionstiter sogar unterhalb dem des letzten Waschschriftes lag. Ab dem vierten Selektionszyklus konnte dagegen ein leichter Anstieg des Phagemidtiters in der Elutionsfraktion beobachtet werden, der sich beim fünften Zyklus im Vergleich zur vorangegangenen Selektionsrunde um den Faktor drei erhöhte. Bei diesem fünften Zyklus konnten 0,051 % der eingesetzten Phagemide wieder eluiert werden. Der beobachtete Effekt war durch die Anreicherung bindungsaktiver Protein-Varianten zu erklären und ist in ähnlicher Weise bei der Selektion aus Antikörper-Bibliotheken beobachtet worden (Marks *et al.*, 1991). Die Phagemide, die im Elutionsschritt des fünften Anreicherungszyklus erhalten wurden, wurden zur Untersuchung der individuellen Liganden-Bindungseigenschaften der jeweils kodierten BBP-Varianten herangezogen.

Insgesamt 20 aus einem Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) ausgewählte Klone wurden ausgewählt und einer Sequenzanalyse unterzogen. Dabei wurden im Gegensatz zur früheren Anreicherung von gegen Fluorescein (Beste, 1998) und Digoxigenin (Schlehuber, 2001) gerichteten BBP-Varianten keine identischen Aminosäuresequenzen erhalten. Es fanden sich drei Varianten mit Verschiebungen im Leseraster, acht Varianten wiesen

mindestens ein freies Cystein auf, drei Varianten enthielten ein, eine Variante sogar zwei zusätzliche Prolinreste außerhalb der mutierten Schleifenregionen.

Die resultierenden sechs funktionellen Varianten ohne zusätzliche Cysteine sowie eine Variante mit zwei zusätzlichen Cysteinseitenketten wurden einer weiteren Analyse unterzogen. Dazu wurden die rekombinaten Proteine in löslicher Form in *E. coli* hergestellt (siehe Abschnitt 2.5.1) und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.6.1.1). Hierbei zeigte sich, dass die Ausbeute an löslichem Protein im Vergleich zum wt-BBP deutlich geringer war (0,025 bis 0,19 mg pro 2 L Medium gegenüber ca. 4 mg pro 2 L Medium für das wt-BBP). Die mit diesen Varianten durchgeführten Protein-Fluoreszenztitrationsexperimente mit dem GdFP-Chromophor zeigten kaum ein Quenching der Proteinfluoreszenz, auch lagen die ermittelten apparenten Dissoziationskonstanten in einem nicht zufriedenstellenden mikromolaren Bereich (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen sollte das Selektionsexperiment unter stringenteren Bedingungen unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel für drei Zyklen weitergeführt werden, da die ersten fünf Selektionsrunden offenbar primär zu einer Anreicherung unspezifisch bindender Phagen geführt hatten.

3.2.2.2 Affinitätsanreicherung unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel

Der zuvor präparierte Phasmid-DNA-Genpool aus dem Anreicherungszyklus 5 wurde zur Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen eingesetzt und auf diese Weise $4,5 \cdot 10^8$ Transformanden erhalten. Ausgehend davon wurden erneut Phagemide produziert und einer weiteren Affinitätsanreicherung mittels *Phage-Display* unterzogen.

Die Immobilisierung des GdFP-Chromophors erfolgte auch hier in Form des Biotin-Konjugates an Streptavidin-Magnet-Partikeln (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Die Ligandenkonzentration in den drei durchgeführten Selektionszyklen wurde mit 750 nM konstant gehalten und es wurde wiederum die Methode der kompetitiven Elution angewandt (siehe Abschnitt 2.3.4.2). Zur Beurteilung der Anreicherung wurden sowohl die Titer der eingesetzten Phagemide als auch ausgewählter Wasch- und der Elutionsfraktionen bestimmt.

Die für die Adsorption eingesetzten Phagemidzahlen lagen zwischen $3,79 \cdot 10^{11}$ cfu und $9,54 \cdot 10^{11}$ cfu. Alle drei Anreicherungszyklen zeigten einen steten Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschfraktionen. Im siebten Selektionszyklus stieg der Anreicherungsfaktor des Elutionstiters im Vergleich zum Titer des letzten Waschschrtes deutlicher als im darauffolgenden achten Zyklus (Abbildung 16).

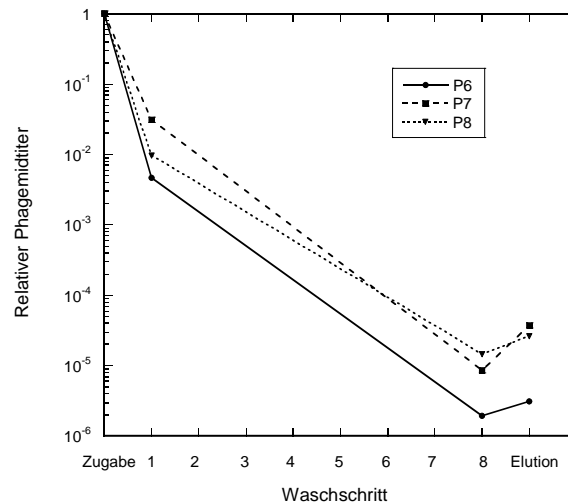


Abb. 16: Überlagerte Elutionsprofile der fortgeführten Selektionszyklen sechs bis acht.

Die Immobilisierung des GdFP-Chromophors erfolgte in Form des Biotin-Konjugats an Streptavidin-Magnet-Partikeln. Nach Inkubation der Partikel mit der Phagemidbibliothek wurden nicht bindende Phagemide durch acht Waschschriffe entfernt und gebundene Phagemide schließlich kompetitiv durch Zugabe von 1 mM Ligandenlösung eluiert. Die Phagemidtitel der ersten und achten Waschfraktion sowie der Elutionsfraktion wurden bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen.

3.2.2.3 Kolonie-Filterstapeltest

Neben einer spezifischen Anreicherung ligandenaffiner BBP-Varianten während der *Phage-Display*-Selektionszyklen kommt es zusätzlich zur Anreicherung von Phagemiden, die während der Vervielfältigung in *E. coli* aufgrund hoher Infektiosität bzw. schnellerer Assemblierung bevorzugt werden (Levitan, 1998). Zur effizienten Durchmusterung einer großen Zahl von BBP-Varianten wurde im Anschluss an die Phagemidselektion der Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra et al., 1991) durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4).

Der dafür verwendete Vektor pBBP22 kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem rekombinanten BBP bzw. dessen Varianten, dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel (Schmidt et al., 1996; Skerra & Schmidt, 2000), einem Pro-Ser-Ala-Peptid-„Linker“ und der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD) (Konig & Skerra, 1998). Die ABD besteht aus einer einzelnen, 46 Reste umfassenden Domäne des Protein G von *Streptococcus* G148 (Akerstrom et al., 1987) und ermöglicht die funktionelle Immobilisierung der rekombinanten Fusionsproteine auf der Oberfläche eines mit humanem Serumalbumin (HSA) beschichteten Membranfilters (Schlehuber, 2001).

Aus dem präparierten Phasmid-DNA Genpool der Anreicherungszyklen 7 und 8 wurde die *Bst*XI-geschnittene Genkassette auf dem analog verdauten Plasmid pBBP22 subkloniert und *E. coli* TG1/F⁻ mit dem Ligierungsansatz transformiert. Der *amber*-Suppressor-Stamm *E. coli* TG1/F⁻ (Kim et al., 2009) diente dabei der Herstellung funktioneller Fusionsproteine auch für

diejenigen Varianten, die aufgrund der Mutagenese-strategie interne *amber*-Stoppkodons aufwiesen, und verhinderte gleichzeitig Phagenkontamination. Die erhaltene Suspension der transformierten Zellen wurde jeweils direkt auf einer hydrophilen Membran ausplattiert. Das dem LB-Agar-Medium zugegebene Anhydrotetrazyklin regte die Proteinbiosynthese des Fusionsproteins im Zytoplasma an, gefolgt vom OmpA-vermittelten Export des maturen Proteins in das Periplasma (Ghrayeb *et al.*, 1984; Movva *et al.*, 1980). Die lange Inkubationszeit der Zellen erhöhte die Permeabilität der äußeren Membran und ermöglichte die Freisetzung des kompakten Fusionsproteins in den extrazellulären Raum (Choi & Lee, 2004; Tong *et al.*, 2000) verbunden mit der lokalen Passage durch die Poren der hydrophilen Membran. Über seine AB-Domäne wurde es auf der darunter liegenden zweiten, mit HSA beschichteten Membran nicht-kovalent verankert und gerichtet präsentiert.

Die BBP-Varianten mit Affinität zum Chromophor wurden in zwei, jeweils für Zyklus 7 und 8, primären Kolonie-Filterstapel-Tests anhand ihrer Komplexbildung mit einer 1,0 μM Chromophor-Biotin-Konjugatlösung und nachfolgender Inkubation mit dem Biotin-spezifischen ExtraAvidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Nachweisreaktion identifiziert (Abbildung 17, Abschnitt 2.4). Das dem Streptavidin funktionell orthogonale ExtraAvidin wurde wegen der Anwesenheit des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel innerhalb des Fusionsproteins verwendet (Gaj *et al.*, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). Zudem erlaubte es eine vom makromolekularen Einfluss des Streptavidins, das während der Selektion im Komplex mit GdFP-Biotin präsentiert wurde, unabhängige Beurteilung der spezifischen Bindungsaktivität der BBP-Varianten gegenüber dem Chromophor. Die Kolonien zuzuordnenden, gefärbten Punkte (ca. 90% der untersuchten Transformanden) (Abbildung 17) wiesen bei beiden Filtern eine sehr ähnliche Morphologie und Intensität auf. Es wurden insgesamt 100 Kolonien (50 Kolonien des ersten Filters, 50 Kolonien des zweiten Filters), die ein deutliches Farbsignal zeigten, auf eine LB-Platte überführt und einem sekundären Kolonie-Filterstapel-Test nach oben beschriebener Methode unterzogen.

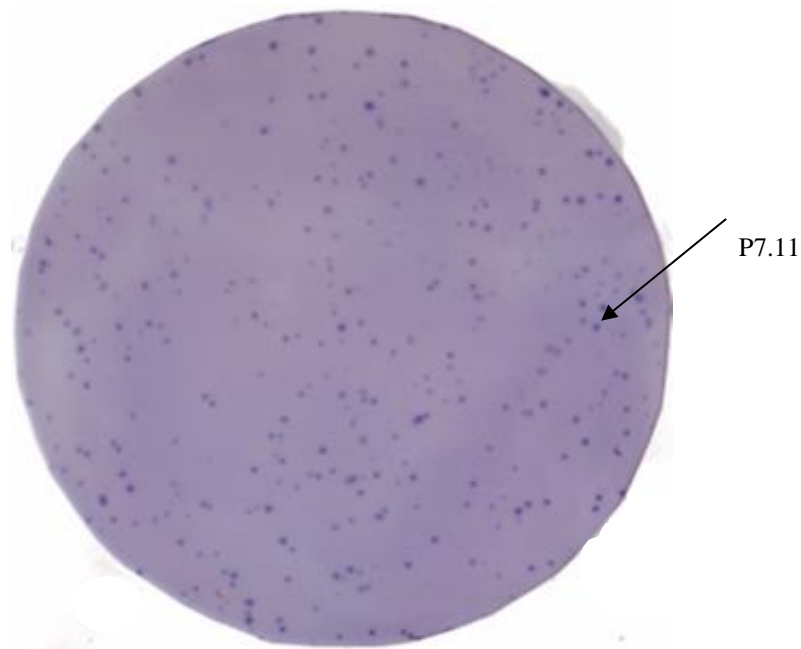


Abb. 17: Ergebnis des primären Kolonie-Filterstapel-Tests zur Selektion von Varianten mit Affinität zum GdFP-Chromophor.

Die Phasmid-DNA der gepoolten Phagemide aus dem Elutionsschritt des siebten *Phage-Display*-Anreicherungszyklus (Abb. 16) wurde präpariert und auf dem Vektor pBBP22 (Abschnitt 2.4) subkloniert. Entsprechend transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf einer hydrophilen Membran ausplattiert und die mittels Komplexbildung zwischen ABD und HSA auf einer hydrophoben Membran funktionell immobilisierten BBP-Varianten auf ihre individuellen Bindungseigenschaften untersucht. Dargestellt ist der Membranfilter, der nach Behandlung mit dem Chromophor-Biotin-Konjugat und anschließender Inkubation mit Extravidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Reaktion entwickelt wurde. Der Pfeil deutet auf den Farbspot, der schließlich zur Isolierung der BBP-Variante P7.11 führte.

Auf den sekundären Filter wurden die ausgewählten Elternkolonien jeweils doppelt aufgetragen, wobei Kolonien, die das Wt-BBP-Fusionsprotein sezernierten, als Kontrolle dienten (Abbildung 18).

Die Abwesenheit von Signalen auf der Negativkontrollmembran ohne das Chromophor-Konjugat deutete auf spezifische Erkennung des Zielmoleküls durch die BBP-Varianten. Das natürliche Bilin-Bindungsprotein zeigte dagegen eine deutliche Färbung, was wohl auf eine intrinsische Affinität zum Chromophor hindeutet; einige der immobilisierten Varianten wiesen allerdings unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Koloniegrößen eine stärkere Farbintensität auf (Abbildung 18).

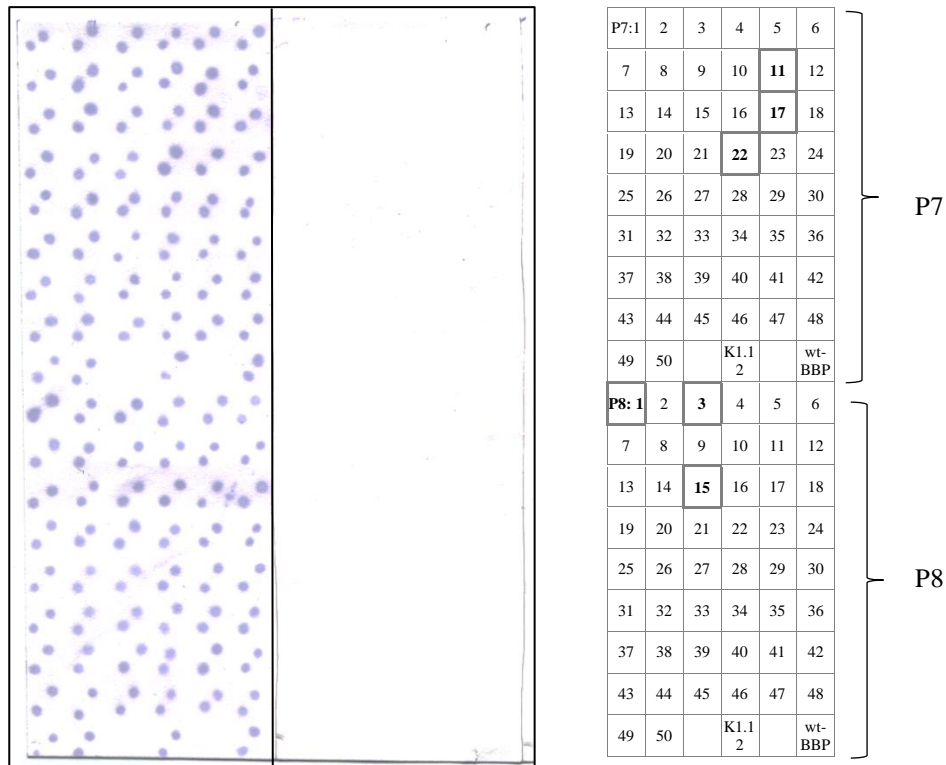


Abb. 18: Sekundärer Filter zur Differenzierung GdFP-Chromophor bindender Varianten.

Die zuvor identifizierten BBP-Varianten mit Affinität zum GdFP-Chromophor wurden in dem sekundären Kolonie-Filterstapeltest auf Komplexbildung mit einer 10 nM Chromophor-Biotin-Lösung (links) geprüft. Die rechte Seite des Filters entspricht dem Duplikat der linken Seite in Abwesenheit der Chromophor-Biotin-Konjugatlösung. Die chromogene Nachweisreaktion erfolgte nach Inkubation mit einem Biotin-spezifischen ExtrAvidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (siehe Abschnitt 2.4). Es wurden jeweils drei Kolonien aus Selektionszyklus 7 und 8 mit den intensivsten Farbsignalen ausgewählt (markierte Klone im Raster) und einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.7).

Zur Analyse der spezifischen Bindung des Chromophors in der Bindungstasche der selektierten BBP-Varianten wurde zusätzlich ein Verdrängungsexperiment durchgeführt. Dieses Experiment wurde mit ANS (8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure), einem vielfach angewandten biophysikalischen Marker durchgeführt, da dieser Affinität für hydrophobe Oberflächen von Makromolekülen aufweist und in der hydrophoben Bindungstasche des Wt-BBP mit einer $K_D \approx 9,0 \mu\text{M}$ komplexiert wird (Breustedt, 2006).

Dazu wurde der Filter mit einer 200 nM Chromophor-Biotin Lösung und zeitgleich mit der tausendfachen Konzentration, entsprechend 200 μM , an freiem ANS inkubiert. Dies führte bei allen Kolonien einschließlich des wtBBP zu einer im Ausmaß variierenden, verminderten Signalstärke (Daten nicht gezeigt). Jeweils drei Klone aus dem 7. Selektionszyklus (P7.11, 17 und 22) und dem 8. Selektionszyklus (P8.1, 3, 15), die sowohl im sekundären Filterstapel-Test im Vergleich zum Wt-BBP die intensivsten Farbsignale zeigten als auch im Konkurrenzexperiment die deutlichsten Signalunterschiede gezeigt hatten wurden, auch unter Vergleich der Koloniengrößen, einer Sequenzanalyse unterzogen.

3.2.3 Charakterisierung selektierter BBP-Varianten

3.2.3.1 DNA-Analyse

Von den sechs anhand des Kolonie-Filterstapeltests ausgewählten *E. coli*-Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und im Bereich des mutierten Strukturgens sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.7). Dabei erwies sich die erhaltene Sequenz der Variante P8.3 als nicht auswertbar. Innerhalb des Abschnittes der mutierten *BstXI*-Genkassette, die auf dem Phasmidvektor pBBP38 subkloniert worden war, zeigten vier Klone einen Leserahmen, der für funktionelle BBP-Varianten kodierte, wohingegen Variante P8.1 Frame-Shift Mutationen zeigte (Abbildung 19). Variante P7.22 enthielt ein zusätzliches freies Cystein in der dritten Schleifenregion. Außerhalb der sechzehn randomisierten Kodons wurden keine Aminosäureaustausche beobachtet; nur die Varianten P7.11 und P7.22 trugen je eine zusätzliche stille Mutation. Die Sequenzanalyse zeigte eine Vielzahl apolarer Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungstasche im Vergleich zum Wt-BBP; der Einbau kleinerer aliphatischer Aminosäuren deutete auf einen raumschaffenden Effekt hin. Auffällig war auch der Einbau multipler Prolinreste.

```

                20                30                40                50
wt-bbp : CCAGTACCATGFAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCAACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTCCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGT
          -GlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAsnSerValGluLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSer
GdFP7.11 : .....T.GACA.CCC.....
          : - IleAspIlePro
GdFP7.17 : .....GTT.TCCAGT.....
          : - ValPheGlnEnd
GdFP7.22 : .....C.TCTG.ACCT.....
          : - HisLeuAspLeu
GdFP8.1 : .....TGG.TT.AAA.A.....
          : - TrpPheGluLys
GdFP8.15 : .....CCGA.TCCG.TT.....
          : - ProThrProVal

                60                70                80
wt-bbp : GTCAAAGTTTCGAACTAC-CACGTAATCCACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAACTGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCAC
          VallysValSerAsnTyr-HisValIleHisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHis
GdFP7.11 : .....CC...-CG.....CCC...T..C.....
          : Pro...-Pro Pro
GdFP7.17 : .....GG...-CT.....C.C...T..C.....
          : Arg...-Pro Leu
GdFP7.22 : .....G...-CG.....C.C...T..C.....
          : Ser...-Pro Leu
GdFP8.1 : .....-CG.....TAG...T..C.....
          : Ser...-Pro End
GdFP8.15 : .....CG...-A.G.....CAG...T..C.....
          : Arg...-Lys Gln

                90                100                110
wt-bbp : AGCCTGACTTACGGAGGTGTACCAAGGAGAACGTATTCAACGTACTCTCCACTGACACACAAGAACTACATCATCGGATACTACTGCAAATACGACGAGG
          SerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnValPheAsnValLeuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyrAspGluA
GdFP7.11 : ...T.C...A.G...TA...GCC...C.T.....GCG...GTG.....
          : Phe Lys Tyr Ala...His Ala Val
GdFP7.17 : ...TAC...CTT...T.G...CC...CT.....C.T...CCC.....
          : Tyr Leu Leu Thr...Thr His Pro
GdFP7.22 : ...CC...CCG...TG...CGC...GCT.....T.....GGG...CGC.....
          : Pro Pro Cys Arg...Ala Gly Arg
GdFP8.1 : ...TCC...G.G...A...-GC...CT.....--AC..G..GTG.....
          : Ser Glu Asp -AlaArgLeuTyrSerThrTyrSerProLeuThrThrArgThrThrSerSerGlu--HisGlyVal
GdFP8.15 : ...GC...ATG...C.G...C...T.G.....A.G...GC.....
          : Arg Met Leu Thr...End Lys Ser

                120                130
wt-bbp : ACAAGAAGGGACACCAAGACTTCGTCTGGGTGCTCTCCAGAAGCATG
          spLysLysGlyHisGlnAspPheValTrpValLeuSerArgSerMet
GdFP7.11 : .....A.G...CCG.....
          : Lys...Pro
GdFP7.17 : .....AGC...ACT.....
          : Ser...Tyr
GdFP7.22 : .....TCG...GAT.....
          : Ser...Asp
GdFP8.1 : .....T.C...A.T.....
          : Tyr...Ile
GdFP8.15 : .....G.G...A.G.....
          : Glu...Met

```

Abb. 19: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der aus der nativen Bibliothek selektierten BBP-Varianten mit Affinität für den GdFP-Chromophor im Vergleich zum Wildtyp-BBP.

Der Sequenz-Ausschnitt des Wt-BBP umfasst die Aminosäurepositionen 19 bis 133. Das unter Verwendung der degenerierten Primer-Paare GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 in einer zweistufigen PCR randomisierte Gensegment ist beiderseits von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease BstXI (Kasten) flankiert. Aminosäurepositionen, die für die Konstruktion der Bibliothek einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind hinterlegt. Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz des BBP angegeben (mit Punkten für unveränderte Basen). Im Fall der selektierten Varianten sind nur die von der Sequenz des Wildtyp-BBP verschiedenen Basen zusammen mit den kodierten Aminosäuren angegeben. Identische Basen sind durch Punkte markiert. Die geänderte Sequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 ist auf die Einführung der KpnI-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragments zurückzuführen (Beste, 1998).

3.2.3.2 Produktion ausgewählter BBP-Varianten in *E. coli*

Die vier funktionalen Varianten wurden einer weiteren biochemischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die rekombinanten Proteine in löslicher Form synthetisiert, wobei wt-BBP und DigA16 (Schlehuber, 2001) als Kontrollproteine dienten. Die bakterielle Produktion der BBP-Varianten erfolgte mit dem Expressionsplasmid pBBP21; hierzu wurde die kodierende Genkassette der Varianten aus dem jeweils vorliegenden Phasmid des Typs pBBP22 subkloniert und der Ligierungsansatz zur Transformation kompetenter *E. coli* JM83-Zellen (Variante P7.11, P7.22, wt-BBP) bzw. TG1/F⁻ (P7.17, P8.15) eingesetzt. Die bakterielle Produktion der rekombinanten Proteine erfolgte im 2-Liter-Kulturmaßstab (siehe Abschnitt 2.5.1) bei 22 °C, wobei die Kulturen bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 mit 200 µg/L aTc für 3 Stunden induziert wurden. Hierbei wurde die jeweilige BBP-Variante als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus synthetisiert und in das Periplasma sekretiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (OD₅₅₀ zum Zeitpunkt der Ernte zwischen 1,0 und 1,2) und die periplasmatische Proteinfraction präpariert.

3.2.3.3 Reinigung der rekombinanten BBP-Varianten mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie

Aus dem periplasmatischen Proteinextrakt wurden das BBP und seine Varianten mit Hilfe des C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt & Skerra, 2007) in einem Einschnitt-Reinigungsverfahren isoliert (siehe Abschnitt 2.6.1.1).

Dazu wurde der periplasmatische Proteinextrakt nach Dialyse gegen SA-Chromatographiepuffer über eine mit der Streptavidinmutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997) beladene und äquilibrierte Chromatographiesäule gepumpt. Ungebundene *E. coli*-Proteine wurden durch Waschen der Säule mit SA-Puffer entfernt. Das über das *Strep*-tag II an die Affinitätsmatrix gebundene rekombinante Protein wurde schließlich kompetitiv mit *D*-Desthiobiotin in löslicher, nativer Form von der Säule eluiert (siehe Abschnitt 2.6.1.1).

Die Elutionsfraktionen zeigten dabei keine mittels SDS-PAGE nachweisbaren Verunreinigungen durch Fremdproteine (Daten nicht gezeigt). Die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm erfolgte für die rekombinanten Proteine unter Verwendung der kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten (ϵ_{denat}) (siehe Abschnitt 2.6.3) von 56 840 M⁻¹ · cm⁻¹ (wt-BBP), 55 350 M⁻¹ · cm⁻¹ (P7.11, P7.17), 53 580 M⁻¹ · cm⁻¹ (DigA16; Schlehuber 2001) sowie 53 860 M⁻¹ · cm⁻¹ (P7.22, P8.15). Die damit bestimmten Proteinausbeuten in *E. coli* waren für die einzelnen BBP-Varianten sehr unterschiedlich (Tabelle 6) und im Vergleich zum wt-BBP deutlich geringer.

Tabelle 6: Molekulargewicht, Extinktionskoeffizient und Ausbeute der in *E. coli* hergestellten BBP-Varianten.

Protein	Molekulargewicht [Da]	Extinktions- koeffizient [M⁻¹cm⁻¹]	Ausbeute pro 1 L Medium
DigA16	20808,0	53580	450 µg
wt-BBP	21007,4	56840	900 µg
P7.11	20801,3	55350	30 µg
P7.17	20855,3	55350	50 µg
P7.22	20745,1	53860	53µg
P8.15	20844,4	53860	65 µg

Die gelelektrophoretische Mobilität der Varianten in der SDS-PAGE war sowohl im reduzierten als auch im nicht reduzierten Zustand annähernd identisch mit der des BBP. Im Fall des nicht reduzierten Zustands war sie in allen Fällen deutlich erhöht, was auf die Anwesenheit der beiden Disulfidbrücken und die daraus resultierende kompaktere Form der Polypeptidkette zurückzuführen war. Darüber hinaus zeigten alle Varianten nur jeweils eine diskrete Bande unter diesen Bedingungen. Die beiden Disulfidbrücken wurden demzufolge bei allen BBP-Varianten einheitlich ausgebildet.

3.2.3.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten mit dem Chromophor des GdFP durch Fluoreszenztitration

Die Komplexbildung zwischen dem Liganden und dem jeweiligen Protein in Lösung wurde durch Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften eines der Komplexpartner verfolgt und die Dissoziationskonstante mittels nicht-linearer Regression, wie schon in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, ermittelt.

Zur Messung der Proteinfluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 280 nm wurde jeweils eine 1 µM Lösung der BBP-Varianten schrittweise mit entsprechenden Lösungen des Liganden titriert (siehe Abschnitt 2.7.2.1). Da auch der Ligand, also der GdFP-Chromophor, in diesem Wellenlängenbereich absorbiert, mußten die bei der Messung der Proteinfluoreszenz erhaltenen Daten korrigiert werden. Dazu wurden Fluoreszenztitrationen mit dem Liganden unter Verwendung einer 5 µM N-Acetyl-L-tryptophanamid-Lösung anstelle der Proteinlösung durchgeführt. Die Meßwerte wurden logarithmisch gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen (Abb. 20), und gemäß der in Abschnitt 2.7.2.3 beschriebenen Auswertung wurde der apparente Extinktionskoeffizient (ϵ_{app}) des Liganden als Steigung der

Geraden durch lineare Regression bestimmt. Dieser wurde anschließend mit der Gleichung (23) für die Korrektur der bei Titration der BBP-Varianten erhaltenen Fluoreszenz-Intensitätswerte eingesetzt.

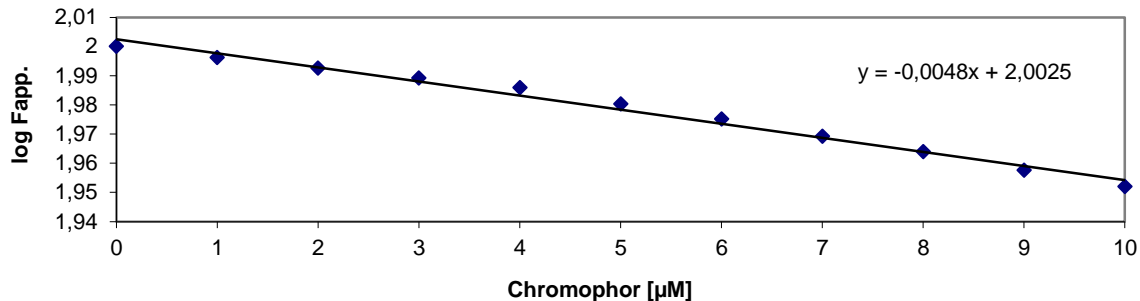


Abb. 20: Fluoreszenztitration von N-Acetyl-L-Tryptophanamid mit dem GdFP-Chromophor.

2 mL einer 1 μM N-Acetyl-L-Tryptophanamid-Lösung in PBS/E wurden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm (FluoroMax 3, Jobin Yvon) mit einer 500 μM Chromophorlösung in PBS/E in 4 μL Schritten bis zu einer Endkonzentration des Liganden von 10 μM bei 25 °C titriert. Die angegebene Steigung wurde über lineare Regression mit dem Programm Excel berechnet.

Die auf einen Anfangswert von 100 % skalierten und um den inneren Filtereffekt des Liganden korrigierten Fluoreszenzintensitätswerte aus einer Titrationsreihe (vgl. Abschnitt 2.7.2.1) wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (30) angepaßt. Dabei zeigte das Kontrollprotein wt-BBP mit einem linearen Abfall der Proteinfluoreszenz ($Q(10 \mu\text{m}) = 3,5 \%$) gegenüber dem verwendeten Liganden keine nennenswerte Bindung. Ein ähnlicher Kurvenverlauf mit ($Q(10 \mu\text{m}) = 2 \%$) wurde bei Variante P7.22 wie auch bei DigA16 ($Q(10 \mu\text{m}) = 16\%$), dessen Bindungstasche für den Bindungspartner Digoxigenin optimiert war und keine Affinität zum GdFP-Chromophor zeigen sollte, beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Dagegen konnten wesentlich stärkere Quenching-Effekte bei den selektierten BBP-Varianten nachgewiesen werden, was die Ermittlung von Dissoziationskonstanten für die Variante P7.11 (siehe Abbildung 21) von $7 \mu\text{M} \pm 0,5 \mu\text{M}$, für P7.17 von $5 \mu\text{M} \pm 0,5$ und von $5 \mu\text{M} \pm 0,4$ für die Variante P8.15 erlaubte. Dabei war das Quenching der Proteinfluoreszenz mit ($Q(10 \mu\text{m}) = 23 \%$) bei der Variante P7.11 im Vergleich zu 12 % bei P7.17 und 16 % bei Variante P8.15 etwas stärker ausgeprägt.

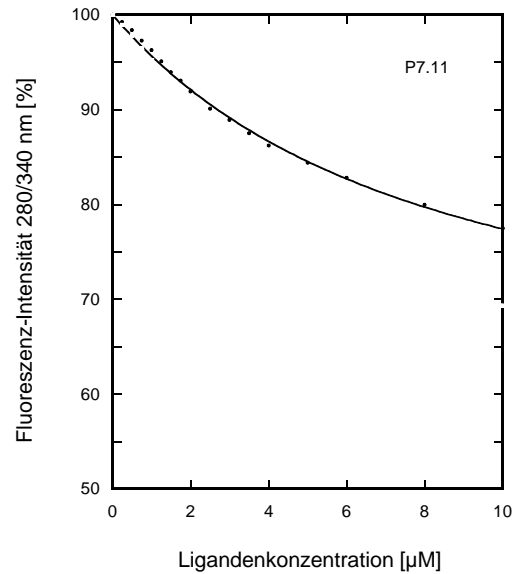


Abb. 21: Protein-Fluoreszenztitration von Variante P7.11 mit dem GdFP-Chromophor.

Die Fluoreszenztitration der 1 µM Proteinlösung bei pH 7,4 wurde mit einer konzentrierten Stammlösung des Chromophors bei 25 °C durchgeführt ($\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 340 \text{ nm}$). Nach Korrektur der Daten um den inneren Filtereffekt des Liganden wurden die Datenpunkte durch nicht-lineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst. (Spektralphotometer FluoroMax3, Jobin Yvon, Schlitzweite je 2 nm, Integrationszeit 10 s).

Durch Proteinfluoreszenzmessungen bei höheren Konzentrationen mit einer 5 µM P7.11-Proteinlösung und einer Liganden-Endkonzentration von 25 µM konnten die Dissoziations- und Quenchingwerte reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Annahme eines Anstiegs der Ligandenfluoreszenz in der maßgeschneiderten Bindungstasche des Anticalins wurden zur besseren Charakterisierung der Variante P7.11 Ligandenfluoreszenz-Messungen durchgeführt. Zur Messung wurde jeweils eine 5 µM Lösung des Anticalins P7.11 mit einer Lösung des Chromophors bis zu dessen Endkonzentration von 25 µM titriert (siehe Abschnitt 2.7.2.3). Die bei einer Anregungswellenlänge von 428 nm gemessene Zunahme der Fluoreszenzintensität bei 605 nm wurde – nach Abzug des anfänglichen Proteinfluoreszenzwertes – gegen die Ligandenfluoreszenz unter Pufferbedingungen korrigiert und durch nicht-lineare Regression angepaßt (Abbildung 22A). Dabei wurde eine Dissoziationskonstante von ca 1 µM ermittelt, was im Einklang mit der mittels Proteinfluoreszenztitration erhaltenen K_D steht. Die Kontrollmessung für das BBP führte im Vergleich zu P7.11 zu einer deutlich geringeren Intensitätszunahme des Liganden (Faktor 4; Abbildung 22B).

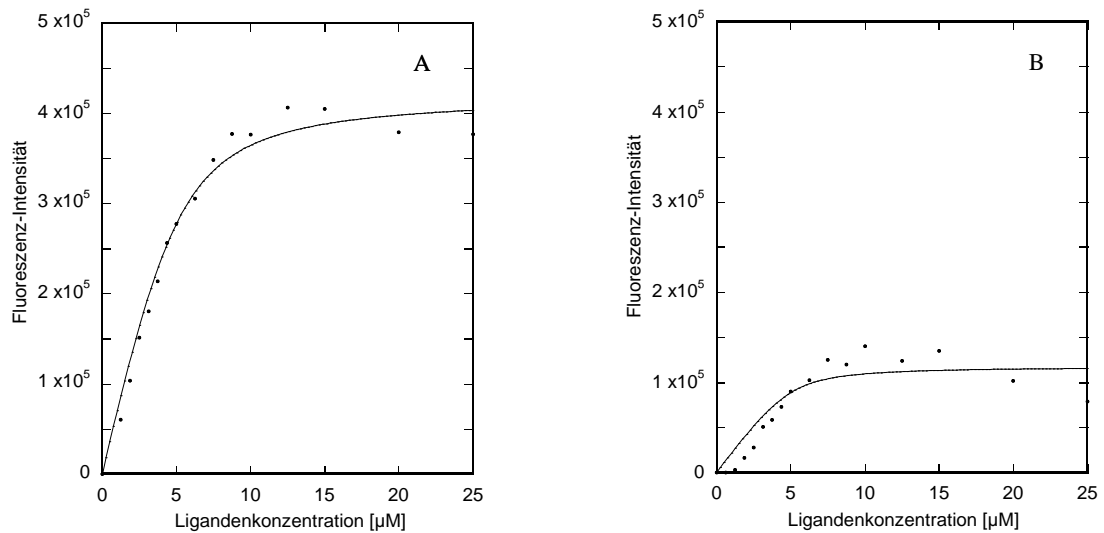


Abb. 22: Liganden-Fluoreszenzmessung der Variante P7.11 (A) sowie des Wt-BBP (B) mit dem GdFP-Chromophor.

Zu jeweils 5 μM Proteinlösung bei pH 7,4 wurde schrittweise eine konzentrierte Stammlösung des Chromophors bei 25 °C zupipettiert (Endkonzentration des Liganden 25 μM) und dessen Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Ex}} = 428 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 605 \text{ nm}$) gemessen. Die Datenpunkte wurden durch nicht-lineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst (siehe Abschnitt 2.7.2.3).

Die Bestimmung der Bindungseigenschaften der BBP-Variante P7.11 in Lösung mittels Fluoreszenztitration zeigte also, dass dieses aus der Molekülbibliothek selektierte Bindungsprotein eine neue Bindungseigenschaft besitzt.

3.2.3.5 Emissionsspektrum des GdFP-Chromophors im Komplex mit Variante P7.11

Der Fluoreszenzanstieg des Liganden im Komplex mit dem Anticalin sollte zusätzlich anhand des Emissionsspektrums untersucht werden. Dazu wurden Spektren einer 5 μM P7.11-Lösung mit 20 μM Ligand bzw. 15 μM Ligandenlösung alleine in 50 mM HEPES, pH 7,4 im Bereich von 525 bis 750 nm aufgenommen und ein Differenzspektrum ermittelt (was einer Mischung aus 5 μM Protein und 5 μM Ligand entspricht) (Abbildung 23). Wie aufgrund der ermittelten Komplex-Dissoziationskonstante erwartet, war der Fluoreszenzanstieg zwar noch moderat, jedoch deutlich erkennbar. Auffällig ist v. a. der breite Emissionspeak über einen Wellenlängenbereich von 600 bis 675 nm. Im Vergleich zum Emissionsspektrum des GdFP mit einem nicht sonderlich deutlich ausgeprägten Maximum der Emission bei 670 nm findet sich hier eine leichte Verschiebung des Maximums in den kürzerwelligen Bereich mit einem Maximum im Bereich um 660 nm.

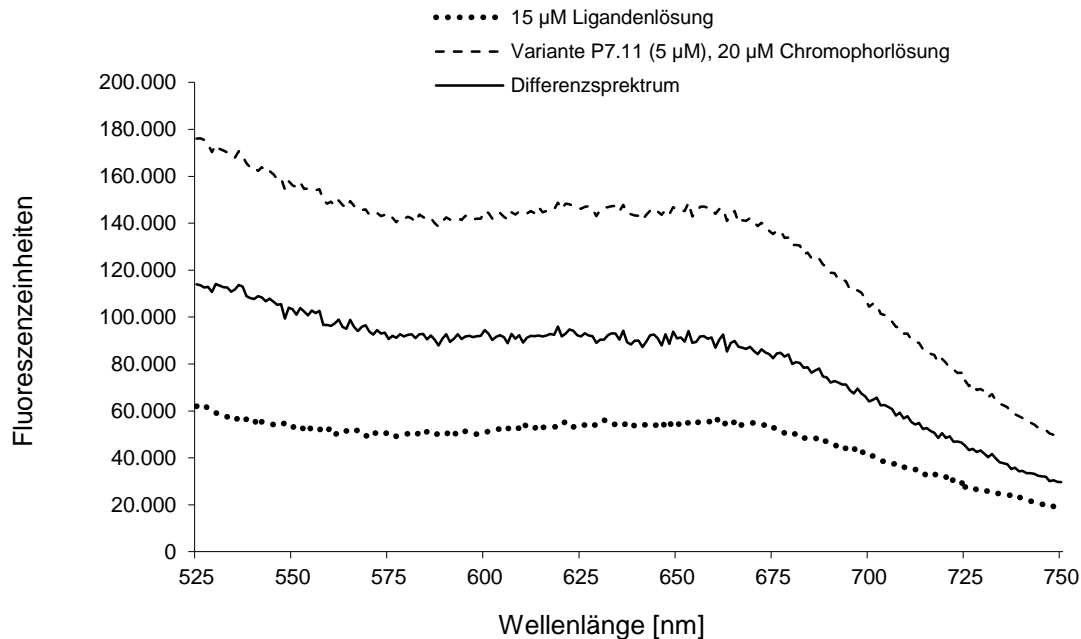


Abb. 23: Aufnahme von Emissionspektren nach Anregung bei 428 nm im Bereich von 525 bis 750 nm. Es wurden Spektren einer 5 µM P7.11-Lösung mit 20 µM Ligand bzw. 15 µM Ligandenlösung allein in 50 mM HEPES, pH 7,4 aufgenommen und ein Differenzspektrum errechnet.

3.2.4 Versuche zur Verbesserung der Bindungsaffinität der selektierten BBP-Variante P7.11 durch in vitro-Affinitätsmaturierung

Die Variante GdFP-P7.11 war aus einer Bibliothek von BBP-Varianten selektiert worden, die durch die Randomisierung von 16 Aminosäurepositionen in allen vier Schleifenbereichen generiert worden war. In einem Versuch zur weiteren Verbesserung der Affinität sollte eine Bibliothek aus P7.11-Varianten mit Zufallsmutationen innerhalb der BstXI-Kassette einem erneuten Selektionsprozess unterworfen werden. Zur weiteren Optimierung der BBP-Variante P7.11 wurde die Methode der Fehler erzeugenden (*Error-Prone*) PCR gewählt. Um dabei die korrekte Faltung des Anticalins nicht zu beeinträchtigen, wurde eine Mutationsrate von zwei bis fünf Aminosäureaustauschen angestrebt (Gregory, 2004).

3.2.4.1 Zufallsmutagenese mittels Error-Prone PCR von GdFP-P7.11 und Präparation einer Phagemidbibliothek

Die am häufigsten angewandte Strategie der *Error Prone* PCR bedient sich der Erzeugung von Basenfehlpaarungen durch den Einsatz der Nukleotidanaloga dPTP (2'-Desoxy-P-nucleosid-5'-triphosphat) und 8-oxo-dGTP (8-Oxo-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat); (Zaccolo *et al.*, 1996). Beide Analoga zeichnen sich durch hohe Mutageneseeffizienz, Stabilität unter PCR-Bedingungen sowie Akzeptanz als Substrat der *Taq*-DNA-Polymerase aus. Dabei bildet dPTP stabile Basenpaarungen mit A und G und generiert infolgedessen Transitionen, vorzugsweise A → G und T → C. 8-oxo-dGTP hingegen ist eines der wenigen

Nukleotidanaloga, welches Transversionen verursacht (Pavlov *et al.*, 1994; Purmal *et al.*, 1994; Zaccolo *et al.*, 1996). Es geht Basenpaarungen mit A und C ein, was zu den Mutationen $T \rightarrow G$ und $A \rightarrow C$ führt.

Ausgehend von der kodierenden DNA für GdFP-P7.11 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 (Schlehuber, 2001) als Matrize wurde eine PCR (siehe Abschnitt 2.2.4.3) mit den flankierenden Oligodesoxynukleotiden GB1 und GB2 in Gegenwart äquimolarer Konzentrationen der dNTPs und je 50 μM der beiden Nukleotidanaloga durchgeführt. Der von den Oligodesoxynukleotiden eingeschlossene Sequenzbereich umfasste die *Bst*XI-Kassette mit den Aminosäurepositionen 28 bis 127, und beinhaltete alle vier Schleifenregionen mit den verbindenden β -Faltblattsträngen (Abbildung 2). Die mittels Sequenzanalyse ermittelte Mutationsfrequenz lag bei ein bis sieben Basenpaaren, was einer bis fünf Aminosäuresubstitutionen entsprach.

Die damit hergestellte Zufallsbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.2) für die Affinitätsmaturierung beruhte auf einem Ligierungsansatz von 15,0 pmol, entsprechend 36,0 μg *Bst*XI verdautem Vektorrückgrat des Plasmids pBBP38 und 4,0 μg der *Bst*XI-Kassette des mutierten Strukturgens der Variante GdFP-P7.11. Die ligierte DNA wurde mit 19 Elektroporationsansätzen zur Transformation von elektrokompetenten XL1-Blue Zellen eingesetzt, wobei $1,4 \cdot 10^{10}$ unabhängige Transformanden erhalten wurden.

3.2.4.2 Selektion von P7.11-Varianten mit erhöhter Affinität unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel

Ausgehend von der auf der Variante GdFP-P7.11 basierenden Genbibliothek erfolgte die *Phage-Display*-Anreicherung bindungsaktiver Phagemide in vier Selektionszyklen. Die Immobilisierung des Zielmoleküls GdFP-Chromophor erfolgte hierbei in Form des Biotin-Konjugates an Streptavidin-Magnet-Partikel (siehe Abschnitt 2.3.4.1). Zur Blockierung nicht abgesättigter Bindungsstellen diente wiederum RNaseA. Während der ersten beiden Zyklen fand die Selektion an der Festphase des ausgebildeten GdFP-Biotin/Streptavidin-Komplexes statt, wohingegen die Phagemide in den Zyklen 3 und 4 mit dem GdFP-Biotin-Konjugat in Lösung vorinkubiert wurden. Während die Ligandenkonzentration in den beiden ersten Zyklen mit 150 nM konstant gehalten wurde, wurde in den Zyklen 3 und 4 die Ligandenkonzentration auf 30 nM, im parallel durchgeführten Zyklus 4* auf 7,5 nM abgesenkt.

Um im Vergleich zur Ausgangsvariante GdFP-P7.11 höher affine Phagemide effizient vom Zielmolekül GdFP-Fluorophor zu eluieren, wurde die Methode der sauren Elution angewandt (siehe Abschnitt 2.3.4.2). Zur Beurteilung der Anreicherung wurden sowohl die Titer der eingesetzten Phagemide als auch ausgewählter Wasch- und der Elutionsfraktion bestimmt. Daraus wurde der relative Anteil bezogen auf die für den Selektionsprozess insgesamt eingesetzten Phagemide errechnet und ein Anreicherungsprofil erstellt (Abbildung 24).

Alle Anreicherungszyklen zeigten einen steten Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschschrte. Der Anreicherungsfaktor des Elutionstiter im Vergleich zum Titer des achten Waschschrtes stieg von Runde eins mit 1,76 auf 3,41 in Runde vier, was auf einen Selektionseffekt schließen ließ.

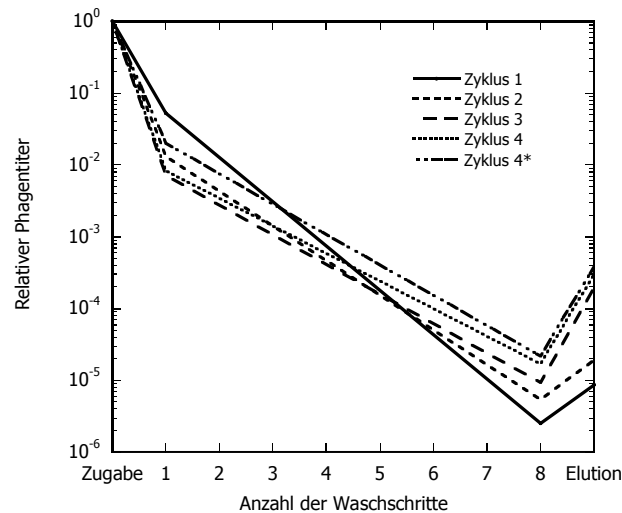


Abb. 24: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1 bis 4 bzw. 4* im Verlauf der Anreicherung GdFP-bindender GdFP-P7.11-Varianten mittels *Phage Display*.

Die Immobilisierung des GdFP-Chromophors erfolgte in Form des Biotin-Konjugates an Streptavidin-Magnet-Partikel. In den beiden ersten Zyklen dieses Anreicherungsversuches wurde an der Festphase des zuvor ausgebildeten GdFP-Biotin/Streptavidin-Komplexes selektiert, die effektive Ligandenkonzentration betrug hierbei 150 nM. In Zyklus 3 und 4 wurde die Stringenz durch Erniedrigung der Ligandenkonzentration um den Faktor 5 (im Fall des Zyklus 4* nochmals um Faktor 4) sowie durch Präinkubation der Phagemide mit GdFP-Biotin in Lösung erhöht. Die für die Adsorption eingesetzten Phagemidzahlen lagen zwischen $7,13 \cdot 10^{11}$ cfu und $9,19 \cdot 10^{11}$ cfu. Nicht bindende sowie schwach spezifisch und unspezifisch bindende Phagemide wurden in acht Waschschrten mit PBS/T abgetrennt. Der Phagemidtiters ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion (siehe Abschnitt 2.3.6) wurde bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen.

3.2.4.3 Sequenzanalyse der selektierten P7.11-Varianten

Zur Identifizierung GdFP-bindender Varianten wurde der Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) verwendet. Hierbei wurde das stärkste farbliche Signal bei der Ausgangsvariante GdFP-P7.11 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Sechs Bakterienkolonien (jeweils drei aus Zyklus 4 bzw. 4*), die daneben die stärksten Farbsignale zeigten, wurden ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.3.1) und analysiert.

	BstXI 20	30	Loop 1	40	50
GdFP7.11	<u>CCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCATCGACATCCCAGTACGGAAAGTGGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGCCTACCC</u>				
	<u>GlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProIleAspIleProLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerProTyrPr</u>				
P4/8	:G.....				
	:Gly.....				
P4/15	:G.....G.....C.....				
	:Gly Arg Arg Arg Arg.....				
P4/17	:G.....G.....G.....				
	:Ala.....				
P4*/6	:G.....G.....				
	:Arg.....				
P4*/32	:G.....G.....T.....				
	:Val Val.....				
P4*/39	:G.....G.....G.....G.....				
	:Gly Arg Gly Gly.....				
	60	70	80	Loop 3	90
GdFP7.11	<u>GGTAATCCACGGCAAGGAATACCTTCCCGAAGGTACCCCTACCCAGTTGGTGACTCCAGAGATTGGAAAAATCTACCACAGCTTCACTAAGGGAGGTACACCCCGGAGCATGTATTCAA</u>				
	<u>oValIleHisGlyLysGluTyrPheProGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerPheThrLysGlyGlyTyrThrAlaGluHisValPheAs</u>				
P4/8	:G.....G.....C.....				
	:Arg Gly.....				
P4/15	:G.....G.....G.....				
	:Arg Arg Arg.....				
P4/17	:G.....G.....G.....				
	:Gly As.....				
P4*/6	:G.....G.....				
	:T.....				
P4*/32	:G.....G.....				
	:Ser Ala Ala.....				
P4*/39	:G.....G.....G.....				
	:Ala Gly.....				
	100	110	Loop 4	120	BstXI
GdFP7.11	<u>CGTACTCCACTGACAACAAGAACTACATCATCGGATACCGCTGCGTGTACGACGAGGACAAGAGGGACACAGGACCCGGTCTGGGTGCTCTCCAGAAGCATGG</u>				
	<u>nValIleuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrAlaCysValTyrAspGluAspLysLysGlyHisLysAspProValTrpValLeuSerArgSerMet</u>				
P4/8	:C.....				
	:Thr.....				
P4/15	:A.....C.....C.....				
	:Asn His Arg.....				
P4/17	:C.....C.....G.....				
	:ProPro Gly.....				
P4*/6	:C.....				
	:Pro.....				
P4*/32	:C.....				
	:Thr.....				
P4*/39	:C.....G.....				
	:Thr Arg.....				

Abb. 25: DNA- und korrespondierende Aminosäuresequenzen der aus der Affinitätsmaturierung der Variante GdFP-P7.11 hervorgegangenen Varianten.

Der gezeigte Sequenz-Ausschnitt, der von den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *BstXI* (grau hinterlegt) flankiert ist, umfasst die Aminosäurepositionen 19 bis 133. Die randomisierten Aminosäurepositionen der nativen Bibliothek sind unterstrichen, die Aminosäureaustausche in der Variante GdFP-P7.11 im Vergleich zum Wt-BBP sind rot hervorgehoben. Die randomisierten Nukleotide der Varianten aus der Affinitätsmaturierung sind im Vergleich zur Ausgangsvariante P7.11 mit den kodierte Aminosäuren angegeben.

Die DNA-Sequenzierung ergab, dass diese sechs Varianten unterschiedlich waren und keine Leserahmenverschiebungen oder Stoppcodons aufwiesen und somit im Prinzip Funktionalität zeigten. Sie trugen zwei bis neun Mutationen auf Aminosäureebene, die über alle vier Schleifenbereiche und das β -Barrel verteilt waren. Auffällig war bei Variante P4/15, dass beide Cys-Reste innerhalb der *BstXI*-Kassette durch Arg ausgetauscht waren; wegen der fehlenden Disulfidbindungen war eine weitere Charakterisierung dieser Variante nicht angezeigt.

Insgesamt fällt an diesen Sequenzen eine höhere als die beabsichtigte Mutationsfrequenz sowie eine überwiegende Zahl von Arginin-Mutationen auf. Bei zukünftigen Experimenten sollten daher andere Mutagenesemethoden eingesetzt und anstelle der sauren Elution andere Bedingungen gewählt werden.

Die durchgeführte Affinitätsmaturierung zur Selektion höheraffiner Anticalinvarianten hatte trotz Variierung der Stringenz und der Elutionsmethoden offenbar nicht zu Varianten mit verbesserter Affinität geführt. Als Alternative bietet sich ein rationales Protein-Design, wofür jedoch die Röntgenstrukturanalyse des Anticalin-GdFP-Komplexes notwendig ist.

3.2.5 Proteinkristallisation

Zur Gewinnung von Strukturinformationen über den P7.11-GdFP-Chromophor-Komplex wurde versucht, das P7.11-*Strep*-tag II-Fusionsprotein zu kristallisieren.

3.2.5.1 Fermentation der Variante P7.11

Hinsichtlich der für die Proteinkristallisation notwendigen Proteinmengen wurde das rekombinante Protein im Laborfermenter produziert. Hierfür wurde ein *Fed-Batch* Fermentationsverfahren verwendet, das ursprünglich zur funktionellen Produktion von Antikörperfragmenten entwickelt worden war (Schiweck & Skerra, 1995).

Für die Fermentation wurde der *E. coli* Wildtyp-Stamm W3110 eingesetzt, der mit dem Expressionsvektor pBBP21-GdFP(P7.11) transformiert worden war. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit 8 L Nutzvolumen und einsetzbarem Rührwerk mit Umwurfzylinder (siehe Abschnitt 2.5.2). Während des Fermentationsverlaufs wurden durch die integrierte Meß- und Regeltechnik die Temperatur bei 25 °C, der pH-Wert bei 7,5 und der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei mindestens 30 % Luftsättigung konstant gehalten. Als Medium wurde ein Mineralsalz-Medium mit 20 % Glucose, essentiellen Spurenelementen und Ampicillin verwendet. Dabei war Glucose die einzige Kohlenstoffquelle, während die zur pH-Regelung titrierte 12,5 %-ige (w/v) Ammoniaklösung gleichzeitig als Stickstoffquelle diente. Die Zellen zeigten reproduzierbares exponentielles Wachstum und hatten nach ca. 20 h Stunden einen OD_{550} -Wert von 20 erreicht, woraufhin die Induktion mit 0,5 mg aTc pro Liter Kultur erfolgte.

Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen typischerweise bei $OD_{550} = 35$ geerntet und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Reinigung erfolgte mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1.1 und 2.6.1.2) und Größenausschlußchromatographie, um evtl. vorhandene Proteinaggregate bzw. Oligomere abzutrennen.

Bei dieser Chromatographie zeigte sich, daß die Retentionszeit der Variante P7.11 mit der des rekombinanten Bilin-Bindungsproteins übereinstimmte, wobei zusätzlich Aggregat- bzw. Dimerpeaks identifiziert wurden (Abbildung 26).

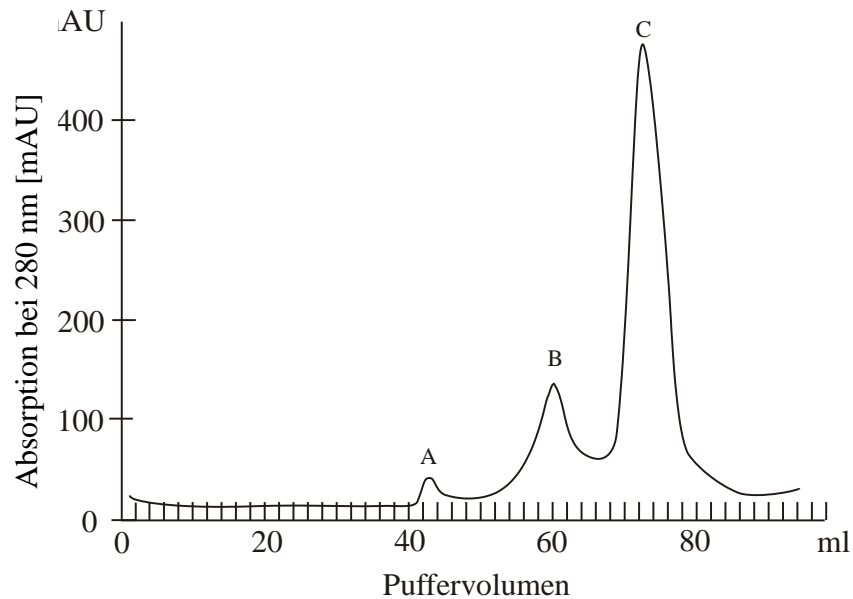


Abb. 26: Chromatogramm der präparativen Größenausschlußchromatographie der Variante P7.11 im Anschluss an die Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte Proteinlösung (1800 μ L, ca. 1 mM) der Variante P7.11 in 50 mM HEPES, pH 7.4 wurde auf eine präparative Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade Säule mit einem Bettvolumen von 120 mL aufgetragen und in dem gleichen Laufpuffer aufgetrennt. A: Aggregatfraktion; B: Dimerfraktion der Variante P7.11; C: Monomerfraktion.

Das Protein des Monomerpeaks (Abbildung 26, C) wurde isoliert und die Reinheit der beiden Fraktionen mit der höchsten Absorption mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 27). Die beiden betrachteten Fraktionen erwiesen sich als homogen; die Analyse im nicht reduzierten Zustand zeigte zudem, dass die Disulfidbrücken jeweils korrekt gebildet waren. Die Ausbeute aus einer Fermentation im 8 L-Maßstab betrug im Durchschnitt 16 mg gereinigtes Protein.

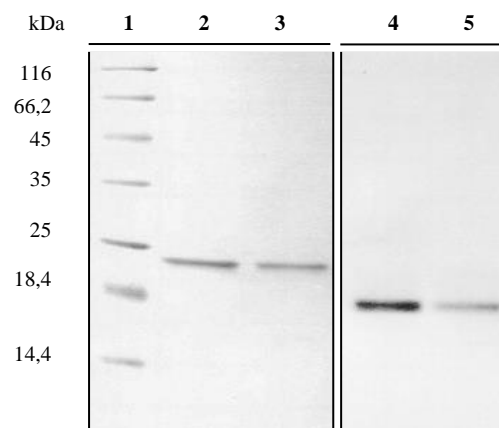


Abb. 27: SDS-PAGE zur Dokumentation der bakteriellen Produktion und Reinigung der Variante P17 in 15 %-igem SDS-Polyacrylamidgel; die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blau. Spur 1: Größenstandard; Spur 2: Fraktion 37 der Größenausschlusschromatographie unter reduzierenden Bedingungen, Spur 3: Fraktion 38 der Größenausschlusschromatographie unter reduzierenden Bedingungen, Spur 4, 5: Fraktion 37 und 38 unter nicht reduzierenden Bedingungen.

3.2.5.2 Kristallisationsversuche

Versuche zur Kristallisation des Komplexes aus der Variante P7.11 und dem GdFP-Chromophor erfolgten mit der „Sitting or Hanging Drop Vapour-Diffusion Technique“ (McPherson, 1999). Dazu wurden Kombinationen von Fällungsmitteln und Puffern verwendet, die sich statistisch als erfolgreich erwiesen haben, sogenannte „Sparse Matrix Crystallization Screens“ (Jancarik & Kim, 1991; McPherson, 1999). Die Ansätze wurden automatisiert mit je 100 nL Lösung (ca. 10 mg/mL) des Proteins im Komplex mit GdFP und 100 nL des jeweiligen Fällungspuffers pipettiert.

Unter diesen Kristallisationsbedingungen wurden jedoch auch nach mehrmonatiger Inkubationsdauer bei 20 °C keine Kristalle erhalten (Dr. A. Eichinger, persönliche Mitteilung).

3.3 Biophysikalische Untersuchung artifizieller Retinalproteine

3.3.1 Produktion der RBP-Varianten in *E. coli* und Reinigung der rekombinanten Proteine

Gegenstand eines weiteren Teilprojektes dieser Doktorarbeit waren Varianten des Retinolbindenden Proteins (RBP), bei denen durch ortsgerichtete Mutagenese ein Lysinrest so eingeführt wurde, dass eine Schiff'sche Base mit gebundenem Retinal gebildet werden kann (siehe Abschnitt 1.4; (Bischoff, 2003; Fechner, 2005). Diese sollten nach Biosynthese in *E. coli* und Reinigung der rekombinanten Proteine durch Streptavidin-Affinitätschromatographie spektroskopisch analysiert und so die Schiff'sche Base nachgewiesen werden.

Als Expressionssystem wurde das Plasmid pASK75-*dsbC*-RBP mit der jeweiligen Mutation im *E. coli* Stamm JM83 verwendet. Zwei zur Produktion der RBP-Varianten benötigte Plasmide, pASK75-*dsbC*-RBP-D (L35K/A71H) und pASK75-*dsbC*-RBP-E (L35K/A71E), die aus einer Bachelorarbeit (Bischoff, 2003) stammten, wurden zunächst durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Insgesamt wurden vier Varianten studiert (Tabelle 6).

Die Ausbeuten der gereinigten RBP-Varianten sind in Tabelle 7 angegeben. Sie lagen bei 300 µg/L Medium bei den RPB-Varianten D und E sowie bei 650 µg/L Medium bei Variante C. Die höchste Ausbeute mit 750 µg/L Medium wurde bei der Variante RBP-B erzielt, im Vergleich zu 450 µg/L bei der Ausgangsvariante RBP-A. Um die Reinheit der rekombinanten Proteine zu überprüfen und die korrekte Ausbildung der Disulfidverbrückung zu kontrollieren, wurden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt (Abbildung 28). Dabei zeigte sich, dass die RBP-Varianten frei von Kontaminationen durch andere Proteine waren. Unter nicht reduzierenden Bedingungen hatten die Proteine höhere Mobilität als unter reduzierenden Bedingungen, was auf korrekte Ausbildung der drei Disulfidbrücken im RBP hindeutete.

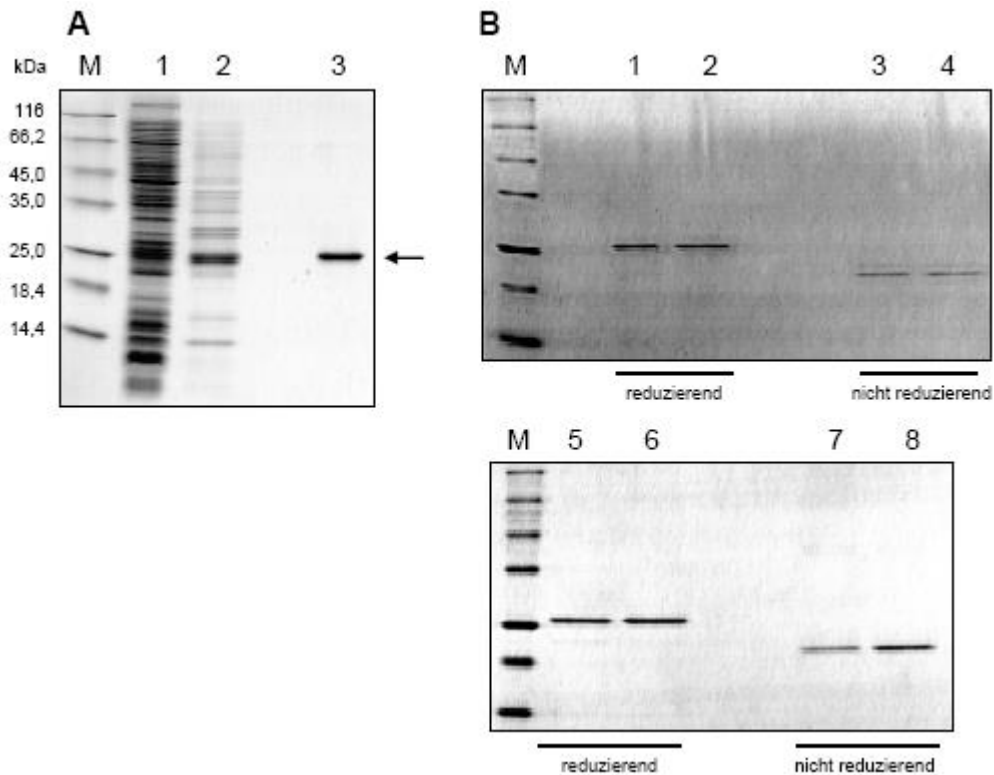


Abb. 28: SDS-PAGE zur Dokumentation der bakteriellen Produktion und Reinigung der rekombinanten Proteine. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blau.

A: SDS-PAGE nach Proteinreinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie, exemplarisch gezeigt für RBP-A: Spur M: Größenstandard, Spur 1: Gesamtzellaufschluss zum Zeitpunkt der Ernte; Spur 2: Periplasmaextrakt; Spur 3: Elutionsfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie. RBP-A ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

B: Überprüfung der Disulfid-Verbrückung der produzierten Proteine durch Vergleich des Laufverhaltens der RBP-Varianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen: RBP-A (1 und 3), RBP-B (2 und 4), RBP-D (5 und 7) und RBP-E (6 und 8).

Tabelle 6: Extinktionskoeffizienten und Ausbeuten der in *E. coli* hergestellten Proteine nach Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Protein/Variante	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Ausbeute pro L Medium
RBP-A	38870	450 µg
RBP-B(L35K)	38870	700 µg
RBP-C(L63K)	38870	650 µg
RBP-D(L35K/A71H)	38870	300 µg
RBP-E(L35K/A71E)	38870	300 µg

3.3.2 Nachweis einer protonierten Schiff'schen Base im RBP/Retinal-Komplex mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Liganden Retinal und dem im RBP am Eingang zur Bindungstasche eingeführten Lysinrest wurde durch UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Da bekannt war, dass die protonierte Schiff'sche Base des Retinals eine charakteristische Absorption bei 440 nm aufweist (Pepe, 1999), wurde eine Änderung der absorptionsspektroskopischen Eigenschaften des Protein/Ligand-Komplexes im Fall solches kovalenten Bindungsmechanismus erwartet.

Das Absorptionsmaximum des freien Retinal in Ethanol liegt bei 385 nm (siehe Abschnitt 2.7.1.1, Spektrum nicht gezeigt); für den nicht-kovalenten Protein-Ligand-Komplex mit RBP-A lag das entsprechende Maximum aufgrund des hypsochromen Effekts der Proteinumgebung zwischen 370 nm und 380 nm. Diese Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kürzerwelligen Bereich war bei allen RBP-Varianten einschließlich der Ausgangsvariante bei pH 8 zu sehen.

Zum Nachweis der Ausbildung einer Schiff'schen Base mittels UV/VIS-Spektroskopie wurden die Proteine jeweils mit Retinal für 90 min bei pH 9 unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden Absorptionsspektren der inkubierten Lösungen bei pH 9 sowie nach schrittweisem Ansäuern durch definierte Zugabe von HCl im Bereich von 500 nm bis 250 nm aufgenommen (siehe Abschnitt 2.7.1.2).

Bei der Ausgangsvariante RBP-A, die keinen Lysinrest in sterisch geeigneter Position trägt, nahm erwartungsgemäß auch nach der Ansäuerung die Absorption bei 450 nm nicht zu. Bei 380 nm zeigte sich ein breites Maximum, das auf die Absorption von Retinal zurückzuführen ist (s. o.). Bei den Varianten RBP-B, RBP-D und RBP-E wurde dieses Maximum während der Inkubationszeit deutlich schmaler und erschien gegen 370 nm verschoben (Abbildung 30).

Zusätzlich nahm bei diesen Varianten die Intensität der Retinal-Absorption beim Ansäuern ab, und es trat eine neue Bande bei 440 nm auf, im Einklang mit der Ausbildung einer Schiff'schen Base im Protein/Retinal-Komplex (Abbildung 30). Die Bildung einer deutlich definierten Absorptionsbande bei 440 nm war bei RBP-B am stärksten ausgeprägt, die Variante RBP-C zeigte diesen Effekt dagegen bloß ansatzweise (Daten nicht gezeigt). Die Aminosäureposition 35 schien also für die Ausbildung einer Schiff'schen Base besser geeignet zu sein als die Position 63, die sich weniger weit vom Liganden befindet.

Auch bei den Varianten, die zusätzlich zur Mutation L35K an Position 71 zusätzlich entweder ein Histidin (RBP-L35K/A71H) oder ein Aspartat (RBP-L35K/A71E) trugen, konnte die Absorption der protonierten Schiff'schen Base nach Ansäuern der Lösung bei 440 nm beobachtet werden. Allerdings bildete sich die Schiff'sche Base bei diesen beiden Varianten verglichen mit RBP-B in wesentlich schwächerem Maße aus.

Die pH-abhängigen Spektren von RBP-B zeigen einen isobestischen Punkt bei ca. 400 nm. Isobestische Punkte in Absorptionsspektren weisen auf einheitliche Reaktionen hin, d. h. es

absorbieren bei dieser Wellenlänge keine Nebenprodukte oder Intermediate in der Lösung, sondern nur die Schiff'sche Base und der RBP-Retinal-Komplex. Bei stärkerem Ansäuern durchlaufen die Spektren nicht mehr diesen definierten isobestischen Punkt, was für das Auftreten einer neuen Spezies in der Lösung spricht, die bei 400 nm absorbiert. Dies ist wahrscheinlich auf die Denaturierung des Proteins zurückzuführen. Demnach scheint der RBP-B-Retinal-Komplex erst bei einem niedrigerem pH-Wert zu denaturieren als die übrigen RBP-Varianten; bei RBP-D ist die Denaturierung am deutlichsten erkennbar.

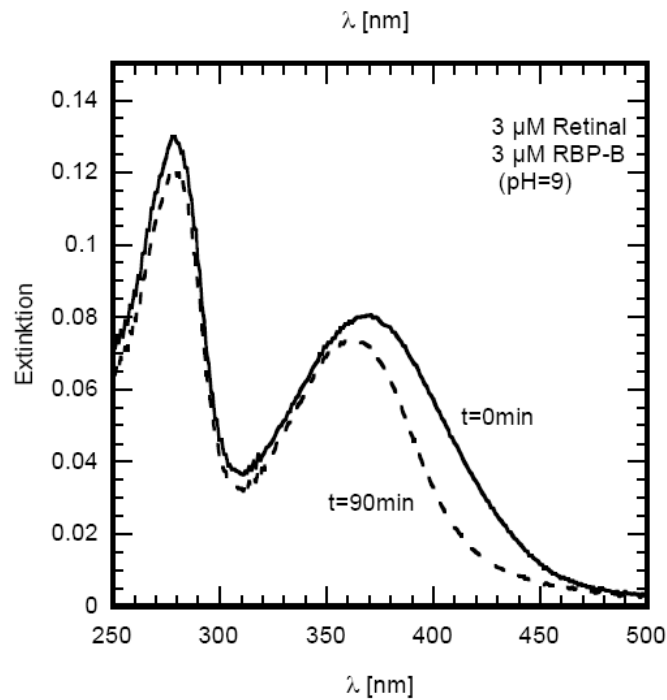


Abb. 29: Spektren einer 3 µM RBP-B- und einer 3 µM Retinal-Lösung direkt nach dem Mischen bzw. nach 90 minütiger Inkubation bei pH 9.

Das Diagramm zeigt die Veränderungen im Spektrum des RBP/Retinal-Komplexes vor und nach der Inkubation für 90 min unter Lichtausschluß, aufgenommen mit einem Perkin Elmer $\lambda 9$ -Spektrometer. Die Inkubation führt zu einer Verschmälerung des Maximums bei 370 nm und zu einer leichten Verschiebung in den kürzerwelligen Bereich.

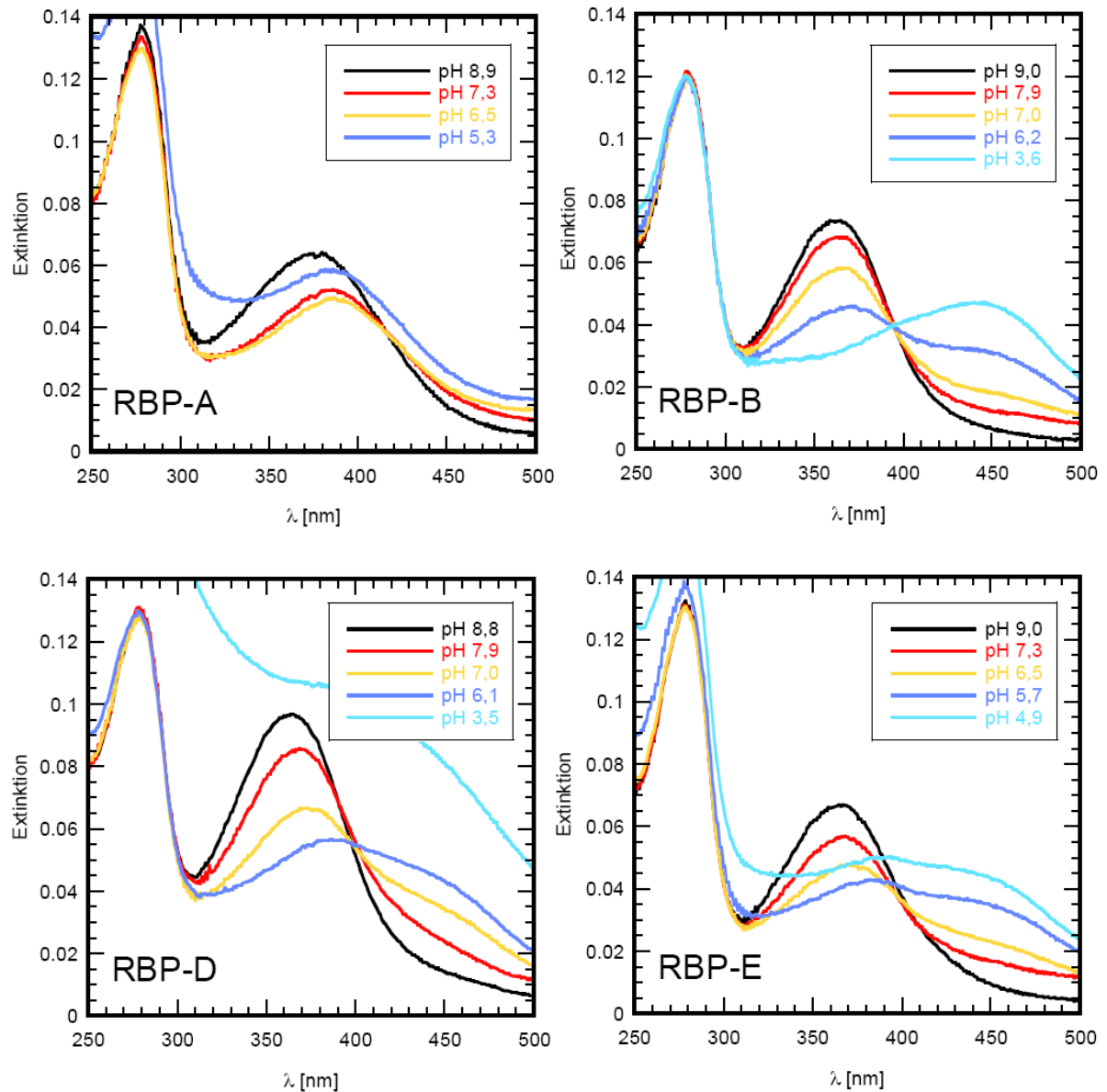


Abb. 30: UV/VIS-Spektren der RBP/Retinal-Komplexe im Bereich von 250 bis 500 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert der gemessenen Lösung.

Jeweils 3 μM RBP und 3 μM Retinal in UV/VIS-Puffer wurden 90 min unter Lichtausschluss auf Eis bei einem pH-Wert von 9 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze schrittweise mit HCl angesäuert, der pH-Wert mittels pH-Meter bestimmt und mit einem Perkin Elmer $\lambda 9$ -Spektrometer Spektren aufgenommen. Alle Spektren zeigen das für Proteine typische Absorptionsmaximum bei 280 nm. Bei RBP-B, RBP-D und RBP-E führt das Ansäuern zu einem Anstieg der für protonierte Schiff'sche Basen typischen Absorption bei 450 nm. Dieser Effekt ist bei RBP-B am deutlichsten ausgeprägt, bei RBP-A tritt er nicht auf, RBP-C zeigt diesen Effekt nur ansatzweise (Spektrum nicht gezeigt). Oberhalb eines bestimmten pH-Wertes zeigen die Spektren der Varianten, welche eine Schiff'sche Base aufweisen, einen isobestischen Punkt.

3.3.3 Bestimmung des pK_s -Wertes der Schiff'schen Base im RBP/B-Retinal-Komplex

Die Schiff'sche Base, die sich bei Inkubation der künstlichen Retinal-Proteine bei pH 9 ausbildet, kann reversibel protoniert werden. Zur Charakterisierung wurde der pK_s -Wert der Schiff'schen Base im RBP(-B)/Retinal-Komplex bestimmt, wo der Effekt am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 31).

Eine 3 μM Proteinlösung in UV-VIS-Puffer wurde 90 min mit einer 3 μM Retinallösung bei pH 9 inkubiert und anschließend durch Zugabe definierter HCl-Mengen angesäuert. Die Absorption bei 450 nm wurde jeweils gemessen und gegen den pH-Wert aufgetragen (Abbildung 32). Durch Anpassung der Daten durch nicht lineare Regression mit Gleichung (15), Abschnitt 2.7.1.3, konnte ein pK_s von $6,00 \pm 0,04$ ermittelt werden. Dies ist ein klares Indiz für die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen der RBP-Variante und Retinol.

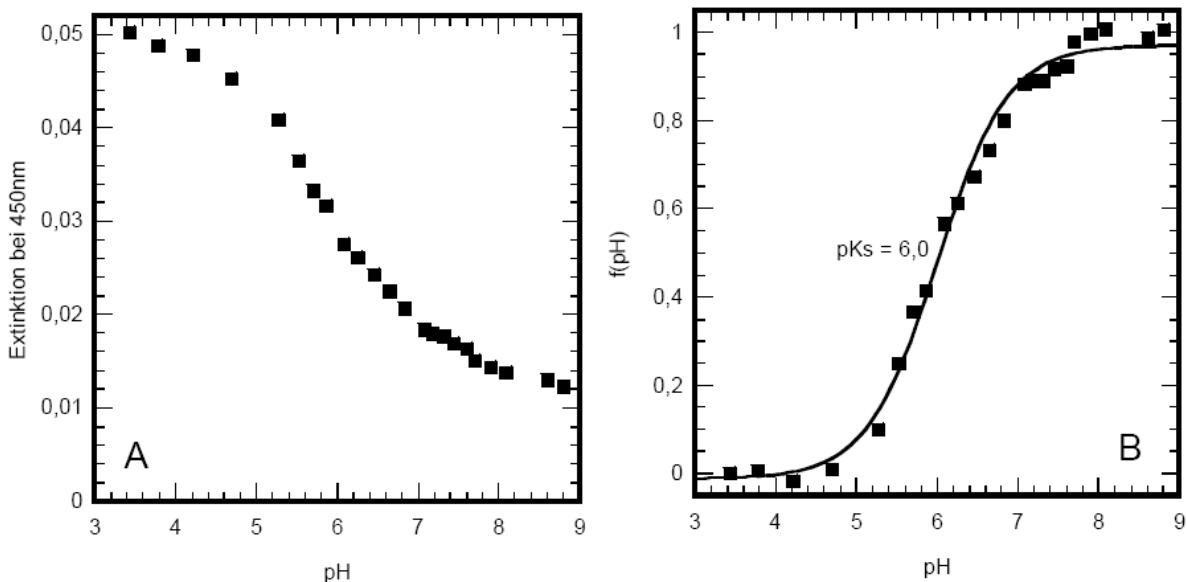


Abb. 31: Bestimmung des pK_s -Wertes der Schiff'schen Base im Komplex aus RBP-B und Retinal.

Eine 3 μM RBP-B-Lösung wurde 90 min mit 3 μM Retinal bei pH 9 unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend schrittweise mit HCl angesäuert. An einem Perkin Elmer $\lambda 9$ -Spektrometer wurde jeweils die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Die Änderung der für protonierte Schiff'sche Basen typischen Absorption bei 450 nm wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes aufgetragen (A). Diese Rohdaten wurden normalisiert, um die prä- und posttransitionelle Änderung der Extinktion korrigiert und mit Gleichung 15 durch nichtlineare Regression angepasst (B).

4 Diskussion

4.1 Verbesserung der Fluorescein-Bindung eines Anticalins durch rationales Protein-Design

Indem er einzelne Mutationen anhand von Sequenzvergleichen auswählte, konnte Beste (1998), dem keine Kristallstruktur zur Verfügung stand, nur eine eineinhalbfache Steigerung der Affinität von FluA zu FluA(R95K) erzielen (Beste, 1998). In dieser Arbeit sollte sich nun der Vorteil des rationalen Protein-Designs zeigen; so ließ die zwischenzeitlich bekannte Kristallstruktur von FluA (Korndörfer *et al.*, 2003) mehrere Positionen in der Bindungstasche erkennen, an denen durch Einführung größerer Seitenketten eine bessere Einbettung des Liganden Fluorescein erreicht werden könnte. Folglich wurden alle Aminosäurepositionen im Bereich der Bindungstasche auf solche Seitenketten hin überprüft, die zu weit entfernt waren, um einen engeren Kontakt mit dem Liganden zu bilden. Als Ergebnis wurden drei vielversprechende Reste identifiziert, A45, L131, S114 (Tabelle 4), die entweder einzeln oder in Kombination ersetzt wurden.

Diese Varianten sollten durch biochemische und -physikalische Untersuchungsmethoden charakterisiert werden. Für die funktionelle Synthese der rekombinanten Proteine wurde die heterologe Produktion in *E. coli* herangezogen; dabei wird das rekombinante Protein mittels bakterieller Signalsequenz in den periplasmatischen Raum des Wirtsbakteriums sekretiert (Mergulhao *et al.*, 2005). Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten FluA-Varianten konnten mittels des an ihren C-Terminus fusionierten *Strep*-tag II (Skerra & Schmidt, 2000) als lösliche Proteine in hoher Reinheit aus der periplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* isoliert werden. Unerwünschte Protein-Dimere oder Disulfidisomere wurden nicht beobachtet. Zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante des Liganden-Komplexes wurde die Methode der Fluoreszenztitration verwendet. Da Fluorescein eine Eigenabsorption bei den relevanten Wellenlängen besitzt, mussten die Messwerte bei den Proteinfluoreszenzmessungen korrigiert werden. Darum wurde eine Titration mit N-Acetyl-L-Tryptophanamid anstelle der Proteinlösung durchgeführt. Die hier auftretende Abnahme der gemessenen Fluoreszenz sollte nur auf der Eigenabsorption des Liganden beruhen, da keine spezifische Bindung stattfindet. Jedoch zeigte sich im Vergleich mit den Ligandentitrationsexperimenten, dass der ermittelte Filtereffekt vermutlich zu hoch ist, da alle Varianten mit Ausnahme von FluA(R95K/S114R) hierbei niedrigere Dissoziationskonstanten aufwiesen. Die Korrektur wurde dennoch vorgenommen, da damit eine bessere Anpassung der Werte bei der nicht-linearen Regression anhand des Massenwirkungsgesetzes erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen mit den neu konstruierten Proteinvarianten zeigten, dass eine Affinitätssteigerung auf Grundlage rationalen Proteindesigns möglich ist. So konnte die Ligandenbindung bei allen FluA(R95K)-Varianten mit einem Aminosäureaustausch, mit Ausnahme der Varianten A45H und H86F, verbessert werden (Tabelle 4). Der drastische Abfall der Bindungsaktivität bei Variante A45H ist möglicherweise darauf zurückzuführen,

dass eine der möglichen Rotamerenkonformationen in Verbindung mit den polaren Eigenschaften der Seitenkette eine Umlagerung von benachbarten Seitenketten bewirkt. Einer der eventuell betroffenen Aminosäureresten ist Arg 58, der eine wichtige Rolle bei der Ligandenbindung spielt (Korndörfer *et al.*, 2003).

Basierend auf den Ergebnissen der Einzelmutationen wurden die günstigsten Aminosäure-Austausche kombiniert. Auf diese Weise wurden bei den Varianten FluA(R95K/A45I/S114R) und FluA(R95K/A45I/S114T) Dissoziationskonstanten um 1 nM im Vergleich zu dem Ausgangsprotein FluA(R95K) mit $K_D = 31,2 \pm 13$ nM erreicht. Diese ca. 30-fache Steigerung der Affinität entspricht einer fast additiven Wirkung der beiden neuen einzelnen Aminosäureaustausche. Die erhöhte Affinität der Doppelmutante beruht vermutlich einerseits auf einer hydrophoben Interaktion der Ile-Seitenkette mit dem Xanthenolonring, andererseits auf dem bivalenten Charakter des Thr, dass die Position an der Grenze zwischen hydrophilem Lösungsmittel und hydrophober Bindungstasche besser erfüllt als die ursprüngliche Aminosäure Serin. Der additive Effekt steht auch im Einklang mit den räumlich getrennten Positionen der beiden Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche des Anticalins; ihre Seitenketten nähern sich dem Liganden im Wesentlichen aus entgegengesetzten Richtungen und scheinen sich dabei nicht gegenseitig zu beeinflussen (siehe Abbildung 8).

Interessanterweise wirkte sich die Substitution S114T weit günstiger aus als S114I – obwohl S114T immer noch zu klein ist, um einen direkten Kontakt mit dem Liganden auszubilden. Da die berechneten Oberflächen von Ile und Fluorescein ähnlich gute Kontakte bildeten wie bei der Substitution A45I mit dem Liganden, wurde auch hier eine ähnliche Absenkung der Komplex-Dissoziationskonstante erwartet. Möglicherweise wurde jedoch ein anderes Rotamer als das Simulierte bevorzugt.

Weitere Mutationsstudien mit einem Austausch L131F scheinen erfolgversprechend, da diese Mutation ebenfalls mit S114R bzw. S114T und A45I kompatibel scheint: Diese Positionen haben keinen direkten Kontakt zueinander, und ein Austausch entsprechender Aminosäuren sollte daher bezüglich der Geometrie der Bindungstasche kombiniert werden können.

Betrachtung des Quenchingeffektes auf die Ligandenfluoreszenz

Fluorescein wird oft als Marker für biochemische und biophysikalische Untersuchungen eingesetzt, wobei dessen Fluoreszenzlöschung von praktischer Bedeutung ist. Verschiedene Anti-Fluorescein-Antikörper wurden hergestellt und charakterisiert (Jimenez *et al.*, 2003; Terzyan *et al.*, 2004; Voss, 1984b) oder waren Gegenstand von Protein-Engineering Studien (Midelfort *et al.*, 2004). Insbesondere der monoklonale Antikörper 4-4-20 erkennt Fluorescein spezifisch mit hoher Affinität (Kranz *et al.*, 1982), und er bewirkt bei der Komplexbildung ein Quenching der Fluoresceinfluoreszenz von etwa 96 % (Omelyanenko *et al.*, 1993). Demgegenüber ist der Effekt für das Anticalin FluA(R95K) ($Q_{\max}^{\text{Ligand}} = 99,8 \pm 0,2$ %) deutlich stärker.

Für die Variante FluA(R95K/W129Y), die Fluorescein mit einer ca. 45-fach geringeren Affinität im Vergleich zu FluA(R95K) bindet, wurde dagegen eine deutlich reduzierte maximale Fluoreszenzlöschung von $71,3 \pm 10,7$ % gemessen. Dieses Ergebnis ist überraschend, da Tyr ähnliche strukturelle Merkmale und ein vergleichbares Redoxpotential (ΔG ca. 0.7 eV) wie Trp besitzt (Götz *et al.*, 2002). Dieses stark abweichende spektroskopische Verhalten könnte durch eine Veränderung in der Struktur der Ligandenbindungstasche verursacht werden, wobei ein weniger günstiger Kontakt zwischen Fluorescein und der aromatischen Seitenkette gebildet wird, was auch im Einklang mit dem erheblichen Verlust der Ligandenaffinität steht.

Im Vergleich dazu zeigte die Variante FluA(R95K/W129F) wieder einen deutlich stärkeren Effekt auf die stationäre Fluoreszenz des Liganden ($Q_{\max}^{\text{Ligand}} = 97.7\% \pm 0,7\%$), wenn auch leicht niedriger als für die Ausgangsvariante. Darüber hinaus stieg in diesem Fall die Dissoziationskonstante nur mäßig um einen Faktor von ca. 3 (siehe Tabelle 4). Auf der Basis der Redoxpotentiale sollten nur Trp- bzw. Tyr-Reste als Elektronendonoren infrage kommen, nicht aber Phenylalanin, wie an einigen Flavoproteinen (Mataga, 2002) und am Beispiel des Dodecins (Gurzadyan, in prep.) gezeigt wurde.

Angesichts des sehr unterschiedlichen Redoxpotentials von Phe ist es eher unwahrscheinlich, dass ein ähnlicher Elektronentransfer-Prozess wie bei Trp auftreten kann, obwohl es in der jüngeren Literatur durchaus Beispiele gibt, die Phe als Elektronendonator diskutieren (Wang *et al.*, 2005). Möglicherweise ist in diesem Fall auch die Geometrie der Bindungstasche dahingehend verändert, dass ein anderer in der Nähe liegender Trp- oder Tyr-Seitenrest die Rolle des Elektronendonors übernimmt (Gurzadyan *et al.*, in prep.).

Die fluoreszenzlöschenden Eigenschaften fluoresceinbindender Antikörper wurden in der Praxis bereits zur Bestimmung der Orientierung von Transmembranproteinen (Bar-Noy *et al.*, 1984; Darmon, 1985) oder zur Ermittlung der Dynamik von Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen auf der Zelloberfläche (Sklar *et al.*, 1984) ausgenutzt. Aufgrund des noch besseren Quenchingeffekts könnte sich die Verwendung von hochaffinen FluA-Varianten wie z. B. FluA(R95K/A45I/S114R) für ähnliche Anwendungen vorteilhaft erweisen. Auch ist ein Nachweis von fluoresceinmarkierten Biomolekülen mittels hochaffiner FluA(R95K)-Varianten, ggf. gekoppelt mit Reporterenzymen, als Alternative zur radioaktiven Markierung denkbar. Für fluoresceinbindende Antikörper sind entsprechende Anwendungen im Bereich der Immunhistologie, der Immunocytochemie sowie allgemein für Immunassays beschrieben (Dirks *et al.*, 1990; Harmer & Samuel, 1989; Luna *et al.*, 1982; Van der Loos *et al.*, 1989).

Zusammenfassend zeigte sich bei allen Anticalin-Varianten, mit denen Ligandenfluoreszenzmessungen durchgeführt wurden, nach wie vor ein effektives Quenching der stationären Ligandenfluoreszenz, was nahelegt, dass der Mechanismus der Fluoresceinkomplexierung – ggf. bei dichterem hydrophober Packung um den Liganden – im wesentlichen erhalten geblieben ist. Bei der Variante FluA(R95K/A45I/S114T) konnte die Fluoresceinfloureszenz wie mit FluA selbst (Götz *et al.*, 2002) beinahe quantitativ gelöscht werden ($Q_{\max}^{\text{Ligand}} =$

99,9 ± 0,5 %). Es sei aber darauf hingewiesen, dass in diesem System nicht von einer Korrelation zwischen der Ligandenaffinität einerseits und dem Quenching-Effekt auf die Ligandenfluoreszenz andererseits ausgegangen werden kann. Die Affinität wird von der freien Enthalpiedifferenz zwischen dem Komplex und den frei solvatisierten Komponenten (Protein und Ligand) bestimmt, wohingegen für den Quenching-Effekt elektronische Wechselwirkungen zwischen den beiden Partnern im angeregten Zustand des Liganden innerhalb seiner spezifischen Umgebung in der Bindungstasche des Anticalins maßgeblich sind.

Für den praktischen Einsatz wäre die Variante FluA(R95K/A45I) jedoch möglicherweise von Vorteil, da sie sich im Labormaßstab deutlich besser produzieren lässt (Faktor 3,5) und die K_D mit $4,0 \pm 1,3$ nM nur geringfügig höher ist als die der Doppelmutante mit $K_D = 1,6 \pm 1,5$ nM.

Generell weisen die Anticaline Vorteile gegenüber Antikörpern auf. Da sie nur aus einer Peptidkette aufgebaut sind, können sie besser produziert und einfacher gereinigt werden. Zudem müssen für die Erzeugung kombinatorischer Bibliotheken nur vier Bereiche anstelle der sechs CDRs mutiert werden. Das hier durchgeführte rationale Protein-Design auf Grundlage der hochaufgelösten Kristallstruktur in Verbindung mit dem kombinatorischen Ansatz, der von Beste (1998) zur Herstellung von FluA verfolgt wurde, stellt eine effektive Methode dar, um Lipocaline in Bezug auf neue Ligandenspezifitäten zu verändern bzw. zu optimieren.

4.2 Selektion GdFP-Fluorophor bindender Anticaline

Ziel dieses Teilprojektes war die Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung von Protein/Chromophor-Interaktionen; so sollten sich zum einen die Fluoreszenz, die Dynamik und die Photochemie des Chromophors und zum anderen die Protein/Ligand-Bindungswechselwirkung studieren lassen. Das System sollte aus den beiden individuell manipulierbaren Komponenten ‚Anticalin‘ und ‚GdFP-Chromophor‘ bestehen, die durch Protein-Engineering bzw. synthetische Chemie jeweils individuell modifiziert werden können. Verglichen mit dem nativen GFP liegt der Vorteil dieses Zwei-Komponenten-Systems in der Unabhängigkeit von der GFP-Faltung selbst wie auch vom autokatalytischen Bildungsprozess seines intrinsischen Chromophors.

Zwei Regionen innerhalb der Lipocaline eignen sich für das Protein-Design, da deren Aminosäure-Positionen Mutationen gut tolerieren (Skerra, 2001). Dies sind zum einen die vier Peptidschleifen, die in den natürlichen Lipocalinen sowohl in ihrer Sequenz als auch in der Länge variieren, zum anderen die Oberfläche des β -Barrels selbst. Grundlage für die Selektion GdFP-Fluorophor bindender Anticaline war hier das Bilin-Bindungsprotein (BBP), welches bereits die Herstellung Fluorescein bzw. Digoxigenin bindender Anticaline gestattet hat (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber, 2001). Zur konzertierten Mutagenese der Aminosäuren in den vier für die Ligandenbindung verantwortlichen Peptidschleifen des BBP wurde auch hier die mehrstufige PCR-Strategie verfolgt (Beste, 1998); in einem hier durchgeführten Selektionsexperiment konnten jedoch aus einer Molekülbibliothek mit einer Diversität von

$2,2 \cdot 10^8$ unabhängigen Transformanten keine bindungsaktiven Lipocalinvarianten isoliert werden. Dabei zeigte sich vermutlich die Abhängigkeit der ligandenspezifischen Anreicherung von der Qualität und Diversität der eingesetzten Molekülbibliothek (Firth & Patrick, 2005; Reetz & Carballeira, 2007; Tuck Seng, 2007), da sich in dieser zu ca. 50 % *Frame-Shift* und Deletionsmutanten, die kein funktionelles Fusionsprotein präsentierten, fanden.

Als Ergebnis weiterer Optimierung wurde eine Proteinbibliothek mit einer Komplexität von $2,5 \cdot 10^{10}$ unabhängigen Transformanten und einer Integrität des Leserahmens für das BBP-Fusionsgen von 80 % generiert. In den ersten fünf Zyklen einer *Phage Display*-Selektion konnten keine Varianten mit Bindungsaffinität zum GdFP-Fluorophor aufgrund einer möglichen Anreicherung unspezifisch bindender Phagemide selektiert werden. Zur Anreicherung von höher affinen Varianten wurden weitere drei Selektionszyklen durchgeführt (Levitan, 1998; Persson, 2006). Dass eine erfolgreiche Selektion in späteren Selektionszyklen möglich ist, zeigte die Herstellung eines Digoxigenin bindenden Anticalins; die Digoxigenin bindende Variante DigA mit einer Dissoziationskonstante von ca. 300 nM wurde erst aus dem Selektionszyklus 9 einer *Phage Display*-Selektion identifiziert (Schlehuber *et al.*, 2000). Auch die Anticalinvariante Tb7 mit hoher Affinität (ca. 400 pM) zu einem Lanthanid(III)-Chelatkomplex wurde erst aus dem Selektionszyklus 7 eines Affinitätsmaturierungsexperimentes isoliert (Kim *et al.*, 2009).

Zur Bestimmung der thermodynamischen Dissoziationskonstante der isolierten Varianten wurde auch in diesem Teilprojekt die Methode der Fluoreszenztitration angewandt. Als Ergebnis wurde die GdFP bindende Variante P7.11 mit einer moderaten Dissoziationskonstante von ca. 1 μ M erhalten. Auch die Steigerung der stationären Fluoreszenz des Liganden in der Bindungstasche war mäßig; möglicherweise wurde durch den Selektionsprozess zwar die Geometrie der Kavität für den Liganden angepasst, doch scheinen die Seitenketteninteraktionen mit dem gebundenen Liganden noch nicht optimal ausgeprägt zu sein.

Auffällig an der Sequenz des Anticalins P7.11 war der Einbau kleinerer aliphatischer Seitenketten, was auf einen raumschaffenden Effekt innerhalb der Bindungstasche hindeutet; auch der Einbau von fünf Prolinresten konnte zu der Anpassung der Kavität an den präsentierten Liganden beitragen. Die Affinität des auf dem BBP basierenden Anticalins ließ sich in Versuchen zur *in-vitro*-Affinitätsmaturierungen nicht weiter verbessern.

Ziel der Arbeit war die Schaffung eines Modell-Systems, mit dem die Dynamik und Photochemie des GdFP-Fluorophores und dessen Interaktion mit der strukturell definierten Bindungstasche des Anticalins untersucht werden können. Ein wesentlicher Aspekt dabei war die Frage nach der Fähigkeit der Proteinumgebung, auf den intramolekularen Ladungstransfer des Fluorophors zu reagieren (Schutz & Warshel, 2001).

Die Affinität der selektierten BBP-Variante P7.11 mit einer Dissoziationskonstante von ca. 1 μM reicht für ein derartiges Modellsystem noch nicht aus, da aufgrund des Massenwirkungsgesetzes unkomplexiert vorliegende Komponenten die spektroskopische Analyse des protein-gebundenen Fluorophors erschweren. Allerdings bietet sich mit dieser Variante die Möglichkeit des rationalen Protein-Designs. Hilfreich dazu wäre die Kristallstruktur des Anticalins, wo die für die Bindung des Liganden verantwortlichen Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur identifiziert werden können. Des Weiteren gibt es mittlerweile weitere Lipocalin-Gerüststrukturen, die die Grundlage für neue Anticalinbibliotheken darstellen könnten (Richter, 2014).

4.3 Charakterisierung Retinal-bindender Varianten des Retinolbindenden Proteins

Das Retinol-bindende Protein (RBP) ist ein kleines, dreifach disulfidverbrücktes Lipocalin. Um die korrekte Ausbildung der Disulfidbindungen zu gewährleisten, wurde eine Produktionsstrategie verfolgt, bei der die rekombinanten Proteinvarianten des RBP unter Koexpression der Disulfidisomerase *DsbC* im Periplasma von *E. coli* synthetisiert und anschließend in einem Einschritt-Verfahren mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt werden (Schmidt *et al.*, 1998). *DsbC* ist eine periplasmatische Thiol-Disulfid-Oxidoreductase und katalysiert die Isomerisierung falsch geknüpfter Disulfidbindungen. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für alle RBP-Varianten (Tabelle 1), die in der Arbeitsgruppe Prof. Skerra entwickelt wurden, angewandt. So konnten die rekombinanten Proteine in hoher Qualität mit Ausbeuten zwischen 300 und 700 $\mu\text{g/L}$ Medium gewonnen werden.

Nachweis einer protonierten Schiff'schen Base im RBP-Retinal-Komplex mittels UV/VIS-Spektroskopie

In der Netzhaut von Vertebraten gibt es verschiedene Klassen von Rhodopsinen (Cowing *et al.*, 2002). In den Stäbchen der Retina liegt nur ein Typ vor, dessen Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm liegt. Die Zapfen dagegen vermitteln das Farbsehen und enthalten deshalb Rhodopsine, die bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal absorbieren: für langwelliges Licht die L-Zapfen, (*Long-Wave Sensitive Class*, λ_{max} zwischen 530 nm und 570 nm), für mittlere Wellenlängen die M-Zapfen (*Middle-Wave Sensitive Class*, λ_{max} 480-520 nm). Von den für kurzwelliges Licht empfindlichen K-Zapfen (*Short-Wave Sensitive Class 1 und 2*) gibt es grundsätzlich zwei Typen, von denen jedoch nur SWS1 in Säugetieren vorkommt (λ_{max} 355–435 nm). Bei diesen Rhodopsinen, wie auch bei Bakteriorhodopsin ($\lambda_{\text{max}} = 570$ nm), liegt die Schiff'sche Base zwischen dem gebundenen Retinal und einer Lysinseitenkette im Grundzustand protoniert vor (Gerwert K, 1990).

Grundsätzlich ist bekannt, dass eine protonierte Schiff'sche Base in saurer Lösung bei 440 nm absorbiert (Collins, 1953). Die Absorptionsmaxima der Isomere des Retinals sind unterschiedlich und zudem vom Lösungsmittel abhängig (Liu R. S. H., 1982), beispielsweise liegt λ_{\max} von freiem 11-*cis*-Retinal bei 370 nm, bevor es an Opsin gebunden wird (Pepe, 1999); das Absorptionsmaximum des gebildeten Komplexes dagegen liegt dann bei 500 nm (Bowmaker JK, 1983)

Rosenberg und Krigas (1967) haben absorptionsspektroskopische Untersuchungen mit Anilinderivaten in Form der Schiff'schen Base mit Retinal, die sich in den Substituenten in meta- und para-Position unterschieden, durchgeführt. Bei zunehmend elektronenziehenden Substituenten ergab sich ein bathochromer Effekt. Daraus zogen sie die Schlussfolgerung, dass das λ_{\max} der Rhodopsine durch induktive bzw. Ladungseffekte der umliegenden Aminosäureseitenketten auf die positive Ladung des Stickstoffs gesteuert wird (Rosenberg & Krigas, 1967).

Bei Invertebraten gibt es jedoch auch Rhodopsine, bei denen die Schiff'sche Base nicht in protoniertem Zustand vorliegt. So liegt beispielsweise das Absorptionsmaximum des Tintenfisch-Rhodopsins bei 493 nm. Nach Lichtabsorption bildet sich durch Isomerisierung des 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal eine stabile Meta-Form, die bei neutralem pH bei 380 nm, in saurem Milieu dagegen bei etwa 500 nm maximal absorbiert. Eine Protonierung der Schiff'schen Base bewirkt demnach eine starke Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größeren Wellenlängen.

Das Absorptionsmaximum von freiem all-*trans*-Retinal in Ethanol liegt bei 385 nm. Bei der Komplexbildung mit RBP war zunächst eine Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 370 nm zu beobachten. Diese Erscheinung kann nicht auf die Bildung einer Schiff'schen Base zurückgeführt werden, da sie auch beim Wildtypprotein, in dem kein geeigneter Lysinrest vorhanden ist, auftritt. Da λ_{\max} lösungsmittelabhängig ist, muss die Ursache für die Verschiebung in der Wechselwirkung der Proteinumgebung mit dem delokalisierten π -Elektronensystem des Polyenmoleküls liegen. Die Proteinumgebung in der Bindungstasche ist äußerst hydrophob und hat deshalb eine weniger elektronenziehende Wirkung auf den Chromophor, so dass mehr Energie für die Anregung notwendig ist und diese bei einer kürzeren Wellenlänge erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Fall der lysintragenden RBP-Varianten beobachtet, dass sich das Absorptionsmaximum des gebundenen Retinals bei Absenken des pH-Werts von der Wellenlänge 370 nm zu 440 nm verschob. Dieser Effekt deutete auf die Ausbildung einer Schiff'schen Base hin, die im sauren Milieu protoniert ist, so dass die charakteristische Absorption der protonierten Form bei 440 nm erkennbar wird.

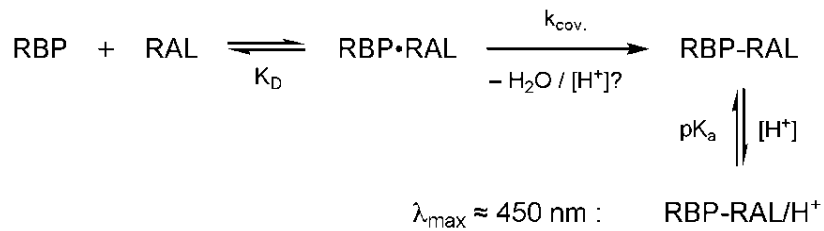


Abb. 32: Hypothetischer Mechanismus der Ausbildung der Schiff'schen Base im RBP/Retinal-Komplex (nach A. Skerra, TU München).

Für die Ausbildung der Schiff'schen Base in einem artifiziellen retinalbindenden RBP wurde ein Reaktionsschema postuliert (Abbildung 32):

Zunächst bilden die RBP-Variante und Retinal reversibel einen nicht kovalenten Protein/Ligand-Komplex, ähnlich dem des natürlichen RBP mit Retinol. Für das rekombinante Wildtypprotein und Retinol wurde die Komplexbildung bereits früher thermodynamisch und kinetisch charakterisiert (Schmidt *et al.*, 1998). Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur und äquimolarem Einsatz der beiden Reaktionspartner innerhalb weniger Minuten ab. Der Protein/Ligand-Komplex bildet anschließend in einer wesentlich langsamer verlaufenden chemischen Kondensationsreaktion eine kovalente Doppelbindung zwischen der Aldehydgruppe des Retinals und der eingeführten Lysinseitenkette aus. Die entstandene Schiff'sche Base kann reversibel protoniert werden und läßt sich in der protonierten Form bei 440 nm spektroskopisch nachweisen.

Die Kondensationsreaktion zwischen Aldehyd und ϵ -Aminogruppe des Lysins ist pH-abhängig und läuft vermutlich entweder säure- oder basenkatalysiert ab. Dabei findet ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe der Lysinseitenkette an den Carbonyl-Kohlenstoff des Retinals statt. Die Reaktivität der Carbonylgruppe kann im sauren Milieu durch Protonierung erhöht werden, wobei die positive Ladungsdichte am Carbonyl-Kohlenstoffatom steigt und dieses leichter nukleophil angegriffen werden kann. In basischer Umgebung ist die Aminogruppe dagegen deprotoniert, wodurch deren Nukleophilie steigt und diese besser am Carbonylkohlenstoffatom angreifen kann. Das Produkt der nukleophilen Addition reagiert beim säurekatalysierten Mechanismus unter Wasserabspaltung bzw. beim basenkatalysierten Mechanismus unter Abspaltung eines Hydroxyd-Ions weiter zur Schiff'schen Base (schematische Kondensationsreaktion siehe Abbildung 33).

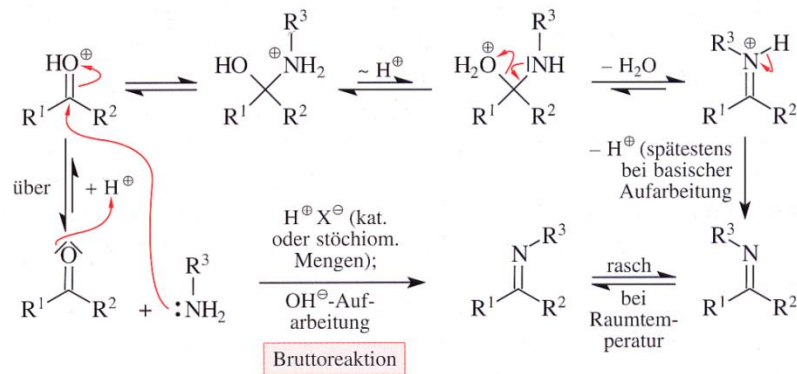


Abb. 33: Addition von Stickstoffnucleophilen an Carbonylverbindungen in Kombination mit nachfolgenden E1-Eliminierungen des Primärproduktes (Kondensationsreaktion). Aus: Reinhard Brückner, Reaktionsmechanismen, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, S. 388.

Wie oben erwähnt, hängen die spektroskopischen Eigenschaften des Chromophors im Komplex entscheidend vom Protonierungszustand der Schiff'schen Base ab (Huber *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde der pK_S -Wert der Schiff'schen Base des künstlichen Retinal-Proteins RBP-B ermittelt. Anhand des pK_S -Wertes kann über die Henderson-Hasselbalch Beziehung (Gleichungen 7, 15) das jeweilige Verhältnis der beiden Zustände ermittelt werden. Es ergab sich ein pK_S -Wert von $6,00 \pm 0,04$; dieser Wert liegt für biophysikalische Untersuchungen in einem günstigen Bereich, da die spektroskopischen Eigenschaften der Schiff'schen Base sowohl im deprotonierten als auch im protonierten Zustand untersucht werden können, ohne dass das Protein durch einen extremen pH-Wert denaturiert. Somit liegt die Schiff'schen Base bei pH 4 zu 99 % protoniert und bei pH 8 zu 99 % deprotoniert vor. Demgegenüber liegt der pK_S für protonierte Schiff'sche Basen mit Retinal in 1:1 Methanol/Wasser etwa bei 7,2 (Baasov *et al.*, 1987). Bei Bakteriorhodopsin ist der pK_S der Schiff'schen Base mit all-*trans*-Retinal durch den Einfluss der Proteinumgebung dagegen auf einen Wert von 13,3 verschoben (Tajkhorshid *et al.*, 2000).

Künstliche Retinalproteine bieten sich als Hilfsmittel für biophysikalische Studien zu lichtinduzierten Prozessen in natürlichen Protein/Retinal-Komplexen an. Im Vordergrund steht hierbei die Frage, ob der Chromophor ähnlich wie im Bakteriorhodopsin eine lichtinduzierte 13-*trans/cis*-Isomerisierung durchläuft (Lanyi, 2004) und ob diese in der engen und geometrisch fast perfekt komplementären Bindungstasche des RBP zu einer reversiblen Konformationsänderung oder zu einer irreversiblen Denaturierung des Proteins führt. Besonders geeignet für derartige Untersuchungen erscheint die Variante RBP-B.

5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit waren Protein-Engineering-Studien an natürlichen Lipocalinen wie auch künstlichen Varianten mit neuartigen Liganden-Bindungseigenschaften, den sogenannten Anticalinen. Im ersten Teilprojekt wurden anhand der Kristallstruktur des Anticalins FluA(R95K), eines für Fluorescein spezifischen Anticalins auf der Grundlage des Bilin-Bindungsproteins (BBP), durch Computer-Modelling systematisch Aminosäure-Substitutionen in der Bindungstasche geplant, welche zu einer Steigerung der Affinität für Fluorescein führten sollten. Insgesamt zwölf Seitenkettenaustausche wurden durch Mutagenese nach Kunkel in den Expressionsvektor pBBP21FluA(R95K) eingeführt und durch Sequenzierung bestätigt. Der Vektor wurde anschließend zur Expression der Gene in *E. coli JM83* eingesetzt. Die Proteine wurden in Schüttelkolbenkultur produziert und mit Hilfe des *Strep*-tag II direkt aus dem Periplasmaextrakt durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die erhaltenen Proteinproben waren so homogen, dass sie ohne weitere Reinigungsschritte direkt für die Messung der Ligandenaffinität eingesetzt werden konnten.

Die Dissoziationskonstante wurde mittels Protein-Fluoreszenztitration bestimmt; dabei wurde die Komplexbildung anhand der Abnahme der Trp- und Tyr-Fluoreszenz unter Anregung bei 280 nm bei einer Emissionswellenlänge von 340 nm verfolgt. Zusätzlich wurden bei den Varianten, die sich in den Proteinfluoreszenztitrationen als vielversprechend erwiesen, die aufwendigeren Liganden-Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dabei wurde die Ausbildung des Protein/Ligand-Komplexes anhand des Quenching der Eigenfluoreszenz des Liganden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 512 nm gemessen. Auf diese Weise konnten schließlich zwei Doppelmutanten identifiziert werden, FluA(R95K/A45I/S114R) und FluA(R95K/A45I/S114T), die sehr niedrige Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 nM aufwiesen, was einer ca. 30-fachen Steigerung der Affinität im Vergleich zum FluA(R95K) entspricht. Zusätzlich zeigten beide Varianten überraschenderweise ein nahezu vollständiges Quenching der Liganden-Fluoreszenz. Das hier durchgeführte rationale Protein-Design auf Grundlage der hochaufgelösten Kristallstruktur in Verbindung mit dem vorangegangenen kombinatorischen Ansatz, der ursprünglich zur Selektion von FluA verfolgt worden war, stellt eine effektive Methode dar, um Lipocaline als sogenannte Anticaline hinsichtlich neuer Ligandenspezifitäten zu verändern. Dementsprechend wurden Versuche durchgeführt, um, ausgehend von dem natürlichen Bilin-Bindungsprotein, ein neues Anticalin mit Bindungsaktivität für den synthetisch hergestellten Fluorophor des golden fluoreszierenden Proteins (GdFP) zu entwickeln. Dazu wurde eine kombinatorische Zufallsbibliothek, bei der 16 für die Interaktion mit dem natürlichen Liganden Biliverdin verantwortliche Aminosäuren randomisiert waren, für eine Selektion mittels *Phage Display* gegen den mit einer Biotingruppe funktionalisierten Fluorophorliganden eingesetzt. Die nach einem anschließenden Kolonie-Filterstapeltest ausgewählten BBP-Varianten wurden einzeln in *E. coli* produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach der biophysikalischen Analyse durch Protein- wie auch

Liganden-Fluoreszenzmessung wurde die Variante GdFP-P7.11 mit einer Dissoziationskonstante von ca. 1 μM erhalten.

Schließlich wurde eine rationale Protein-Engineering-Studie mit dem menschlichen Retinol-Bindungsprotein (RBP), welches den Vitamin A Alkohol nicht-kovalent komplexiert, durchgeführt. Das Ziel bestand darin, ein künstliches Retinal-Protein als Modellsystem für spektroskopische/physikalische Studien von photoaktiven Pigmentproteinen herzustellen. Aus Vorarbeiten in unserem Labor stand eine Mutante des RBP zur Verfügung, welche an Position 35 einen künstlich eingeführten Lysinrest trägt, der über seine Aminogruppe in der Seitenkette mit Retinal eine Schiff'sche Base bilden kann. Bei zwei weiteren Varianten wurde zusätzlich an Position 71 ein Histidin bzw. ein Aspartat eingeführt, da diese Seitenketten die Bildung der kovalenten Bindung durch basische oder saure Katalyse potentiell beschleunigen konnten. In der vorliegenden Arbeit wurden die beschriebenen RBP-Varianten sowie das Wildtyp-Protein im Periplasma von *E. coli* unter Koexpression der Disulphid-Isomerase DsbC produziert – zwecks effizienterer Ausbildung der insgesamt drei Disulphidbrücken bei der Proteinfaltung des RBP – und im Einschritt-Verfahren mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Ausbildung der (protonierten) Schiff'schen Base in dem Protein/Ligand-Komplex wurde spektroskopisch charakterisiert. Tatsächlich wurde die Entstehung einer kovalenten Bindung zwischen Retinal und dem Protein nach Inkubation der RBP-Varianten mit dem Liganden bei pH 9 durch Nachweis der für protonierte Schiff'schen Basen typischen Absorption bei 450 nm nach Erniedrigung des pH erstmals nachgewiesen. Sowohl bei RBP(L35K/H154Q), RBP(L35K/A71H/H154Q), wie auch bei RBP(L35K/A71E/H154Q) bildete sich diese kovalente Bindung in dem Protein/Ligand-Komplex auf autokatalytische Weise, allerdings bei den beiden letztgenannten Varianten in wesentlich schwächerem Maße. Abschließend wurde der pK_S -Wert der Schiff'schen Base im Komplex aus RBP(L35K/H154Q) und Retinal durch pH-Titration ermittelt ($pK_S = 6,00 \pm 0,04$). Die hier charakterisierten künstlichen Retinal-Proteine bieten ein neuartiges Hilfsmittel für das Studium lichtinduzierter Prozesse in biologisch relevanten Pigmentproteinen; durch gezieltes Protein-Design sollte es möglich sein, ihre Eigenschaften weiter zu optimieren.

6 Literatur

- Akerstrom, B., Nielsen, E. & Bjorck, L. (1987) Definition of IgG- and albumin-binding regions of streptococcal protein G. *J Biol Chem* 262, 13388-13391.
- Baasov, T., Friedman, N. & Sheves, M. (1987) Factors affecting the C = N stretching in protonated retinal Schiff base: a model study for bacteriorhodopsin and visual pigments. *Biochemistry* 26, 3210-3217.
- Bae, J.H., Rubini, M., Jung, G., Wiegand, G., Seifert, M.H., Azim, M.K., Kim, J.S., Zumbusch, A., Holak, T.A., Moroder, L., Huber, R. & Budisa, N. (2003) Expansion of the genetic code enables design of a novel "gold" class of green fluorescent proteins. *J Mol Biol* 328, 1071-1081.
- Bar-Noy, S., Darmon, A., Ginsburg, H. & Cabantchik, Z.I. (1984) Orientation of transmembrane polypeptides as revealed by antibody quenching of fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 778, 612.
- Barbas, C.F., 3rd, Bain, J.D., Hoekstra, D.M. & Lerner, R.A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4457-4461.
- Barondeau, D.P., Kassmann, C.J., Tainer, J.A. & Getzoff, E.D. (2005) Understanding GFP chromophore biosynthesis: controlling backbone cyclization and modifying post-translational chemistry. *Biochemistry* 44, 1960-1970.
- Bennett, N. & Sitaramayya, A. (1988) Inactivation of photoexcited rhodopsin in retinal rods: the roles of rhodopsin kinase and 48-kDa protein (arrestin). *Biochemistry* 27 (5), 1710-1715.
- Beste, G. (1998) Evolutes Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β -Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität 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 U S A* 96, 1898-1903.

- Bischoff, N. (2003) Implementation eines neuen Bindungsmechanismus im Retinol-Bindungsprotein. Bachelorarbeit. Technische Universität München.
- Bishop, R.E. (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1482, 73-83.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136, 175-179.
- Bowmaker JK, M.J. (1983) Human rods and cones. *Colour and Vision Research Labs*.
- Breustedt, D.A. (2008) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie. Dissertation. Technische Universität München.
- Breustedt, D.A., Schonfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- Brumano, M.H., Rogana, E. & Swaisgood, H.E. (2000) Thermodynamics of unfolding of beta-trypsin at pH 2.8. *Arch Biochem Biophys* 382, 57-62.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Butler, J.E. (2000) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods* 22, 4-23.
- Chen, P., Hao, W., Rife, L., Wang, X.P., Shen, D., Chen, J., Ogden, T., Van Boemel, G.B., Wu, L., Yang, M. & Fong, H.K. (2001) A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on Rgr. *Nat Genet* 28, 256-260.
- Choi, J.H. & Lee, S.Y. (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 625-635.
- Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S. & Shinitzky, M. (1976) Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur J Biochem* 65, 71-78.
- Cohen, D.S., Pielak, G. J. (1994) Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. *Protein Science* 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 U S A* 69, 2110-2114.
- Collins, F.D. (1953) Rhodopsin and indicator yellow. *Nature* 171, 469 - 471.
- Cowan, S.W., Newcomer, M.E. & Jones, T.A. (1990) Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2Å resolution. *Proteins* 8, 44-61.
- Cowing, J.A., Poopalasundaram, S., Wilkie, S.E., Robinson, P.R., Bowmaker, J.K. & Hunt, D.M. (2002) The molecular mechanism for the spectral shifts between vertebrate ultraviolet- and violet-sensitive cone visual pigments. *The Biochemical journal* 367, 129-135.
- Darmon, A., Bar-Noy, S., Ginsburg, H. & Cabantchik, Z.I. (1985) Oriented reconstitution of red cell membrane proteins and assessment of their transmembrane disposition by immunoquenching of fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 817, 238-248.
- David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S. & Lewit-Bentley, A. (2003) YodA from *Escherichia coli* is a metal-binding, lipocalin-like protein. *J Biol Chem* 278, 43728-43735.
- Denzin, L.K., Whitlow, M. & Voss, E.W., Jr. (1991) Single-chain site-specific mutations of fluorescein-amino acid contact residues in high affinity monoclonal antibody 4-4-20. *J Biol Chem* 266, 14095-14103.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Dirks, R.W., van Gijlswijk, R.P., Tullis, R.H., Smit, A.B., van Minnen, J., van der Ploeg, M. & Raap, A.K. (1990) Simultaneous detection of different mRNA sequences coding for neuropeptide hormones by double in situ hybridization using FITC- and biotin-labeled oligonucleotides. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 38, 467-473.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16, 6127-6145.

- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- Fechner, P. (2005) Spektroskopische Charakterisierung der Ligandenbindung künstlicher Retinal-Bindungs-Proteine. Bachelorarbeit. Technische Universität München.
- Filipek, S., Stenkamp, R.E., Teller, D.C. & Palczewski, K. (2003) G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu Rev Physiol* 65, 851-879.
- Firth, A.E. & Patrick, W.M. (2005) Statistics of protein library construction. *Bioinformatics* 21, 3314-3315.
- 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.
- Flower, D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318, 1-14.
- Frenette Charron, J.B., Breton, G., Badawi, M. & Sarhan, F. (2002) Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. *FEBS Lett* 517, 129-132.
- Gaj, T., Meyer, S.C. & Ghosh, I. (2007) The AviD-tag, a NeutrAvidin/avidin specific peptide affinity tag for the immobilization and purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 56, 54-61.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P. (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *Biotechniques* 5, 786-791.
- Gerwert K, S.G., Hess B. (1990) Simultaneous monitoring of light-induced changes in protein side-group protonation, chromophore isomerization, and backbone motion of bacteriorhodopsin by time-resolved Fourier-transform infrared spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24), 9774-9778.
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y. & Inouye, M. (1984) Secretion cloning vectors in Escherichia coli. *Embo J* 3, 2437-2442.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.

- Götz, M., Hess, S., Beste, G., Skerra, A. & Michel-Beyerle, M.E. (2002) Ultrafast electron transfer in the complex between fluorescein and a cognate engineered lipocalin protein, a so-called anticalin. *Biochemistry* 41, 4156-4164.
- Gregory, L.M., Costas, D.M. (2004) Computational challenges in combinatorial library design for protein engineering. *AIChE Journal* 50, 262-272.
- Gurzadyan, G.G., Kompa, C.K., Vopel, S., Skerra, A. & Michel-Beyerle, M.E. (in prep.) Exploring Fluorescein and 4-Aminofluorescein in Complex with Variants of an Engineered Cognate Lipocalin by Steady-State and Femtosecond Spectroscopy.
- Gurzadyan, G.G., Meissner, B., Essen, L.-O., Michel-Beyerle, M. E. (in prep.) Ultrafast electron transfer in the flavoprotein dodecin. .
- Harmer, I.J. & Samuel, D. (1989) The FITC-anti-FITC system is a sensitive alternative to biotin-streptavidin in ELISA. *J Immunol Methods* 122, 115-121.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H. & Horiuchi, T. (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* 2.
- Hengen, P.N. (1996) Methods and reagents. preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 21, 75-76.
- Herbst, J., Heyne, K. & Diller, R. (2002) Femtosecond infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin chromophore isomerization. *Science* 297, 822-825.
- Hoess, R.H. (2001) Protein design and phage display. 101, 3205-3218.
- Huber, R., Kohler, T., Lenz, M.O., Bamberg, E., Kalmbach, R., Engelhard, M. & Wachtveitl, J. (2005) pH-dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin. *Biochemistry* 44, 1800-1806.
- 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.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography* 24, 409-411.
- Jimenez, R., Salazar, G., Baldrige, K.K. & Romesberg, F.E. (2003) Flexibility and molecular recognition in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 92-97.
- Johnson, W.C., Jr. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17, 145-166.
- Kawaguchi, R., Zhong, M. & Sun, H. (2013) Real-time analyses of retinol transport by the membrane receptor of plasma retinol binding protein. *J Vis Exp*, e50169.
- Kawamura, A., Nakanishi, K. & Berova, N. (2000) Use of circular dichroism for assigning stereochemistry of sphingosine and other long-chain bases. *Methods Enzymol* 312, 217-227.
- Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *Journal of the American Chemical Society* 131, 3565-3576.
- Kobayashi, T., Saito, T. & Ohtani, H. (2001) Real-time spectroscopy of transition states in bacteriorhodopsin during retinal isomerization. *Nature* 414, 531-534.
- Kojima, S., Ohkawa, H., Hirano, T., Maki, S., Niwa, H., Ohashi, M., Inouye, S., Tsuji, F. I. (1998) Fluorescent properties of model chromophores of tyrosin-66 substituted mutants of aequorea Green Fluorescent Protein (GFP). *Tetrahedron Lett.* 39, 5239-5242.
- Konig, T. & Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods* 218, 73-83.
- Korndörfer, I.P., Beste, G. & Skerra, A. (2003) Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins* 53, 121-129.
- Kranz, D.M., Herron, J.N. & Voss, E.W., Jr. (1982) Mechanisms of ligand binding by monoclonal anti-fluorescyl antibodies. *J Biol Chem* 257, 6987-6995.

- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* 154, 367-382.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanyi, J.K. (2004) Bacteriorhodopsin. *Annu Rev Physiol* 66, 665-688.
- Lanyi, J.K. & Luecke, H. (2001) Bacteriorhodopsin. *Curr Opin Struct Biol* 11, 415-419.
- Levitan, B. (1998) Stochastic modeling and optimization of phage display. *J Mol Biol* 277, 893-916.
- Lindahl, P., Raub-Segall, E., Olson, S.T. & Bjork, I. (1991) Papain labelled with fluorescent thiol-specific reagents as a probe for characterization of interactions between cysteine proteinases and their protein inhibitors by competitive titrations. *Biochem J* 276 (Pt 2), 387-394.
- Liu R. S. H., Asato, A. E. (1982) Synthesis and photochemistry of stereoisomers of retinal. *Methods Enzymol.* 88, 506-515.
- Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J.F. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J.F. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers*, 917-944.
- Luna, E.J., Wang, Y.L., Voss, E.W., Jr., Branton, D. & Taylor, D.L. (1982) A stable, high capacity, F-actin affinity column. *J Biol Chem* 257, 13095-13100.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
- Mataga, N., Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Tanaka, F., Kido, N., Kitamura, M. (2002) Femtosecond fluorescence dynamics of flavoproteins: Comparative studies on flavodoxin, its site-directed mutants, and riboflavin binding protein regarding ultrafast electron transfer in protein nanospaces. *J. Phys. Chem. B.* 106, 8917-8920.

- McPherson, A. (1999) Crystallization of biological macromolecules. *Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Mergulhao, F.J., Summers, D.K. & Monteiro, G.A. (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 23, 177-202.
- Midelfort, K.S., Hernandez, H.H., Lippow, S.M., Tidor, B., Drennan, C.L. & Wittrup, K.D. (2004) Substantial energetic improvement with minimal structural perturbation in a high affinity mutant antibody. *J Mol Biol* 343, 685-701.
- Mitra, K., Steitz, T.A. & Engelman, D.M. (2002) Rational design of 'water-soluble' bacteriorhodopsin variants. *Protein Eng* 15, 485-492.
- Movva, N.R., Nakamura, K. & Inouye, M. (1980) Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 255, 27-29.
- Mühlbach, H. (2003) Mutagenesestudie an einem Fluorescein-bindenden künstlichen Lipocalin (Anticalin). Bachelorarbeit. Technische Universität München.
- Newcomer, M.E., Jones, T.A., Aqvist, J., Sundelin, J., Eriksson, U., Rask, L. & Peterson, P.A. (1984) The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J* 3, 1451-1454.
- Olson, S.T., Bock, P.E., Kvassman, J., Shore, J.D., Lawrence, D.A., Ginsburg, D. & Bjork, I. (1995) Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes. *J Biol Chem* 270, 30007-30017.
- Omelyanenko, V.G., Jiskoot, W. & Herron, J.N. (1993) Role of electrostatic interactions in the binding of fluorescein by anti-fluorescein antibody 4-4-20. *Biochemistry* 32, 10423-10429.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Pavlov, Y.I., Minnick, D.T., Izuta, S. & Kunkel, T.A. (1994) DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate. *Biochemistry* 33, 4695-4701.

- Pepe, I.M. (1999) Rhodopsin and phototransduction. *J Photochem Photobiol B* 48, 1-10.
- Persson, H., Lantto, J. & Ohlin, M. (2006) A Focused Antibody Library for Improved Hapten Recognition. *Journal of Molecular Biology* 357, 607-620.
- Pervaiz, S. & Brew, K. (1985) Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein, and protein HC. *Science* 228, 335-337.
- Pervaiz, S. & Brew, K. (1987) Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J* 1, 209-214.
- Peters, J.E., Thate, T.E. & Craig, N.L. (2003) Definition of the Escherichia coli MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* 185, 2017-2021.
- Pini, A., Ricci, C. & Bracci, L. (2002) Phage display and colony filter screening for high-throughput selection of antibody libraries. *Comb Chem High Throughput Screen* 5, 503-510.
- Ponder, J.W. & Richards, F.M. (1987) Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J Mol Biol* 193, 775-791.
- Prüger, B., Bach, T. (2007) Synthesis of model chromophores related to the gold fluorescent protein (GdFP). *Synthesis* 1103-1106.
- Prüger, B., Schüttrigkeit, T. A., Gurzadyan, G. G. , Bach. T., Skerra, A., Voityuk, A. A. , Michel-Beyerle, M. E. The Goldie chromophore: a novel label for probing pH, polarity, and rigidity of the nano-environment, *in preparation*.
- Purmal, A.A., Kow, Y.W. & Wallace, S.S. (1994) 5-Hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res* 22, 3930-3935.
- Reetz, M.T. & Carballeira, J.D. (2007) Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature protocols* 2, 891-903.

- Richter, A., Eggenstein, E. & Skerra, A. (2014) Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.* 588, 213-218.
- Rosenberg, B. & Krigas, T.M. (1967) Spectral shifts in retinal Schiff base complexes. *Photochemistry and photobiology* 6, 769-773.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. & Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25, 4500-4504.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006) Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, pdb.prot4020-.
- Samworth, C.M., Esposti, M.D. & Lenaz, G. (1988) Quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of mitochondrial ubiquinol#x2014;cytochrome-c reductase by the binding of ubiquinone. *European Journal of Biochemistry* 171, 81-86.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schiweck, W. & Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* 23, 561-565.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A. (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* 19, 385-390.
- Schlehuber, S. (2001) Evolutes Protein-Design eines "Anticalins" mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Lehrstuhl für Biologische Chemie. Freising/Weihenstephan, Technische Universität München.
- 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. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant - a so-called 'anticalin' - using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.

- Schmid, F.X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. *Protein protein structure, a practical approach* (Creighton, T.E., ed.) TRL Press, Oxford, chapter 11, 251-286.
- Schmidt, A.M., Bloss, I. & Skerra, A. (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of Escherichia coli: positive influences of dsbC 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 Proteinarchitektur als Grundlage für die evolutive Generierung von Rezeptormolekülen mit neuen Bindungseigenschaften. Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie, Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Schmidt, T.G., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255, 753-766.
- 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.
- Schutz, C.N. & Warshel, A. (2001) What are the dielectric "constants" of proteins and how to validate electrostatic models? *Proteins* 44, 400-417.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239.
- Sjöback, R., et al. (1995) Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim. Acta. A* 51, 7.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482, 337-350.
- Skerra, A. (2001) 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J Biotechnol* 74, 257-275.

- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS Journal* 275, 2677-2683.
- Skerra, A., Dreher, M.L. & Winter, G. (1991) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal Biochem* 196, 151-155.
- 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.
- Sklar, L.A., Finney, D.A., Oades, Z.G., Jesaitis, A.J., Painter, R.G. & Cochrane, C.G. (1984) The dynamics of ligand-receptor interactions. Real-time analyses of association, dissociation, and internalization of an N-formyl peptide and its receptors on the human neutrophil. *J Biol Chem* 259, 5661-5669.
- Stootman, F.H., Fisher, D.M., Rodger, A. & Aldrich-Wright, J.R. (2006) Improved curve fitting procedures to determine equilibrium binding constants. *The Analyst* 131, 1145-1151.
- Stuyver, L.J., Whitaker, T., McBrayer, T.R., Hernandez-Santiago, B.I., Lostia, S., Tharnish, P.M., Ramesh, M., Chu, C.K., Jordan, R., Shi, J., Rachakonda, S., Watanabe, K.A., Otto, M.J. & Schinazi, R.F. (2003) Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhoea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 244-254.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6339-6343.
- Tajkhorshid, E., Baudry, J., Schulten, K. & Suhai, S. (2000) Molecular dynamics study of the nature and origin of retinal's twisted structure in bacteriorhodopsin. *Biophysical journal* 78, 683-693.
- Terzyan, S., Ramsland, P.A., Voss, E.W., Jr., Herron, J.N. & Edmundson, A.B. (2004) Three-dimensional structures of idiotypically related Fabs with intermediate and high affinity for fluorescein. *J Mol Biol* 339, 1141-1151.

- Tong, L., Lin, Q., Wong, W.K.R., Ali, A., Lim, D., Sung, W.L., Hew, C.L. & Yang, D.S.C. (2000) Extracellular Expression, Purification, and Characterization of a Winter Flounder Antifreeze Polypeptide from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 18, 175-181.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.
- Tuck Seng, W., Danilo, R. & Ulrich, S. (2007) Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environmental Microbiology* 9, 2645-2659.
- Tung, W.L. & Chow, K.C. (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* 11, 128-129.
- Van der Loos, C.M., Das, P.K., Van den Oord, J.J. & Houthoff, H.J. (1989) Multiple immunoenzyme staining techniques. Use of fluoresceinated, biotinylated and unlabelled monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 117, 45-52.
- van Mierlo, C.P. & Steensma, E. (2000) Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *J Biotechnol* 79, 281-298.
- 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.
- Voss, E.W., Jr. (1984a) *Fluorescein Hapten: An Immunological Probe*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Voss, E.W., Jr. (1984b) *Fluorescein Hapten: An Immunological Probe*. CRC Press, Boca Raton.
- 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, H., Saxena, C., Quan, D., Sancar, A. & Zhong, D. (2005) Femtosecond dynamics of flavin cofactor in DNA photolyase: radical reduction, local solvation, and charge recombination. *J Phys Chem B* 109, 1329-1333.

- Wang, Z.-X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Letters* 360, 111-114.
- Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112, 531-552.
- Willats, W.G. (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-854.
- Yang, X.F., Wang, L., Xu, H. & Zhao, M. (2009) A fluorescein-based fluorogenic and chromogenic chemodosimeter for the sensitive detection of sulfide anion in aqueous solution. *Anal Chim Acta* 631, 91-95.
- 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.
- 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.

7 Abkürzungsverzeichnis

A_x	Absorption bei x nm
ANS	8-Anilino-1-naphtalinsulfonsäure
BBP	Bilin-Bindungsprotein
bp	Basenpaar
C	Konzentration
CD	Circulardichroismus
ϵ_x	Molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
F	Fluoreszenz
GFP	greent fluorescent protein
kDa	Kilodalton
KD	Komplex-Dissoziationskonstante
MRW	<i>Mean Residue Weight</i>
MW	Molmasse
OD_x	Optische Dichte bei x nm
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RBP	Retinol-Bindungsprotein
RFE	Relative Fluoreszenz-Einheit
R.M.S.	<i>Root Mean Square</i>
Rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	<i>Volume per Volume</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Vopel, S., Mühlbach, H. & Skerra, A. (2005) Rational engineering of a fluorescein-binding anticalin for improved ligand affinity. *Biol Chem.* 386, 1097-1104.

G. G. Gurzadyan, C. K. Kompa, **S. Vopel**, A. Skerra, and M. E. Michel-Beyerle; Exploring Fluorescein and 4-Aminofluorescein in Complex with Variants of an Engineered Cognate Lipocalin by Steady-State and Femtosecond Spectroscopy (in preparation).

Poster:

Sven Vopel, Hermine Mühlbach, Christian Kirchner and Arne Skerra
Protein engineering of anticalins for the complexation of chromophore/fluorophore systems (TP A15), Symposium of the SFB 533 “Dynamics of Proteins”, Freising, 2004.

G. Gurzadyan, C. Kompa, M. E. Michel-Beyerle, **S. Vopel**, A. Skerra.
Excited State Dynamics of Fluorescein Bound to the Cognate Engineered Lipocalin Protein FluA. Symposium of the SFB 533 “Dynamics of Proteins”, Freising, 2004.

S. Vopel, C. Kirchner, A. Skerra; SFB 533 (TP a15/B2): Lichtinduzierte Dynamik von Protein und Chromophor in der Bindungstasche gezielt veränderter Lipocalinproteine („Anticaline“), Symposium of the SFB 533, Freising, 2007.

J. Wiedersich, S. Köhler, **S. Vopel**, C. Kirchner, B. Prüger, T. Bach, G. Gurzadyan, Ch. Kompa, M. E. Michel-Beyerle, J. Friedrich, A. Skerra. Lipocalins with engineered fluorophore-binding properties as tools to study protein structure, function, and dynamics. Symposium of the SFB 533 “Light-induced Dynamics of Proteins”, Freising, 2007.

