

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Biologische Chemie

# Entwicklung, Evaluierung und Optimierung von Anticalinen gegen den tumorassoziierten VEGF-Rezeptor 3

Antonia Richter

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 (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. Angelika Schnieke

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra  
2. Prof. Dr. Markus Schwaiger  
3. Prof. Dr. Bernhard Küster

Die Dissertation wurde am 22.01.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.04.2018 angenommen.



*Think like a proton – always positive!*





# Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Arne Skerra für sein Vertrauen und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können. Ich bedanke mich bei ihm für seine kritischen Fragen und Diskussionen, seine Geduld und seine professionelle Unterstützung.

Dominik Hinz und Dr. Sabine Rauth danke ich herzlich für die wertvollen Tipps während meiner ersten Phage Display Versuche und die Einführung in die Anticalin-Technologie. Ich danke allen Kollegen vom Lehrstuhl für Biologische Chemie für ihre Hilfe und die kollegiale Zusammenarbeit im Laboralltag. Hierzu zählen auch die erfrischenden Kaffee- und Mittagspausen, die durch rege wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen zu der angenehmen Atmosphäre am Lehrstuhl beigetragen haben. Martina und Resi danke ich für die stets zuverlässige Bereitstellung von Kulturmedien und Pufferlösungen, Ina Theobald für die Sequenzierungen sowie Klaus Wachinger für die tatkräftige Hilfestellung bei der Fermenterernte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin und Laborpartnerin Evi, mit der ich sowohl in Hoch- als auch in Tiefphasen dieses Projekts immer neue Kraft und Inspiration gefunden habe.

Meinem ehemaligen Studenten Andreas Senftl möchte ich für den im Rahmen seiner Bachelor-Arbeit geleisteten Beitrag zur Verbesserung der Löslichkeit des Anticalins A5C3 danken.

Dr. Sarah Pfeiffer von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des LMU Klinikums der Universität München möchte ich herzlich für die Zusammenarbeit bei der Etablierung der Radiomarkierung von Anticalinen danken.

Bei Herrn Professor Dr. Rainer Glass, Dr. Valerie Albrecht, und Dr. Eugenie Gieser vom Tumorbioologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie möchte ich mich für die Bereitstellung der Zelllinien U-251 MG und U251-R3 sowie des Antikörpers MAB3491 bedanken. Dem SFB824 danke ich für die finanzielle Förderung meines Projekts. Speziell bei den Mitarbeitern des Sonderforschungsbereichs B2 bedanke ich mich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Zusammenarbeit. Des Weiteren möchte ich Herrn Professor Dr. Bernhard Küster für die Bereitstellung der Zelllinie MCF-7 danken.

Dr. Alexander Jarasch danke ich herzlich für seine Unterstützung bei der Strukturanalyse von Proteinen sowie bei der Anfertigung eines Strukturmodells des PASylierten CromoCalins eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinem Ehemann Sven, für die bedingungslose, stete und liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit bedanken.



**Teile der vorliegenden Arbeit (sowie weitere Teilprojekte) wurden bereits bzw. werden in Kürze veröffentlicht:**

- 1.) **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.
- 2.) Albrecht, V., **Richter, A.**, Pfeiffer, S., Gebauer, M., Lindner, S., Gieser, E., Schuller, U., Schichor, C., Gildehaus, F.J., Bartenstein, P., Tonn, J.C., Skerra, A. & Glass, R. (2016) Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. *Int J Cancer* 138, 1269-1280.
- 3.) Barinka, C., Ptacek, J., **Richter, A.**, Novakova, Z., Morath, V. & Skerra, A. (2016) Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel* 29, 105-115.
- 4.) Jarasch, A., Kopp, M., Eggenstein, E., **Richter, A.**, Gebauer, M. & Skerra, A. (2016) ANTICALIGN: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel* 29, 263-270.
- 5.) Skerra, A., **Richter, A.**, Morath, V., Barinka, C., Ptacek, J. (2017) Novel PSMA-specific binding proteins. *WO 2017/005799*.
- 6.) **Richter, A.** & Skerra, A. (2017) Anticalins directed against vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) with picomolar affinities show potential for medical therapy and in vivo imaging. *Biol Chem* 398, 39-55.
- 7.) Eggenstein E., **Richter A.**, Skerra A. (20xx) ChromoCalins – Anticalins fused to a fluorescent protein for applications in biomolecular imaging and detection. *In Vorbereitung*.



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das Prinzip der Theranostik für die personalisierte Medizin	1
1.2	Anticaline – alternative Bindeproteine für das molekulare Targeting auf Basis des humanen Lipocalin-2	3
1.3	Die Tumorvaskulatur als Angriffspunkt der Tumorthherapie	6
1.4	Die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFs)	8
1.5	VEGFR-3 als Target für das Imaging tumorassoziierter Gefäßstrukturen	10
1.6	Überblick über VEGFR-3/VEGF-C inhibierende Proteinwirkstoffe	12
1.7	Zielsetzung	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	Bakterienstämme, Bakteriophagen, humane Zelllinien, Vektoren und cDNA	17
2.2	Oligodesoxynukleotide	18
2.3	Proteinreagenzien	20
2.4	Chemikalien	21
2.5	Standards und Kits	23
2.6	Geräte	24
2.7	Verbrauchsmaterial	26
2.8	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	28
2.9	Molekularbiologische Methoden	32
2.9.1	Kultivierung und Transformation von E. coli-Stämmen	32
2.9.2	Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	33
2.9.3	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.10	<i>In vitro</i> Modifizierung von DNA	34
2.10.1	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.10.2	Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden und Dephosphorylierung	34
2.10.3	Ligierung von DNA-Fragmenten	34
2.10.4	Genamplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.10.5	QuikChange-Mutagenese	35
2.11	Phagemid-Präsentation und Selektion	36
2.11.1	Propagation von VCS-M13 Helferphagen	36
2.11.2	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	36
2.11.3	Amplifizierung von Phagemiden	38
2.11.4	Titerbestimmung	39
2.11.5	Konservierung von Phagemiden und Phasmid-DNA	39
2.12	Affinitätsmaturierung	40
2.12.1	Error-Prone PCR	40
2.12.2	Herstellung einer Phagemidbibliothek	40
2.12.3	Affinitätsanreicherung	41
2.13	Screening auf individuelle Bindungsaktivität im ELISA	42

## Inhalt

2.14	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	43
2.14.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben .....	43
2.14.2	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Laborfermenter .....	44
2.15	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in Zellkultur .....	44
2.15.1	Kultivierung der humanen Zelllinie 293T.....	44
2.15.2	Transfektion und transiente Expression in 293T-Zellen .....	45
2.16	Proteinchemische Methoden .....	46
2.16.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose.....	46
2.16.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	46
2.16.3	Ionenaustauschchromatographie (IEX) .....	47
2.16.4	Größenausschlusschromatographie.....	48
2.16.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
2.16.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
2.16.7	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	50
2.16.8	Chemische Biotinylierung von Proteinen .....	53
2.16.9	Radioaktive Markierung von Anticalinen mit <sup>123</sup> I .....	54
2.16.10	Analytische Deglycosylierung von Proteinen durch PNGase F .....	54
2.17	Biophysikalische Analysen .....	55
2.17.1	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie.....	55
2.17.2	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie .....	56
2.17.3	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	56
2.18	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien.....	57
2.18.1	Kultivierung der humanen Zelllinien U-251 MG, U251-R3 und MCF-7 .....	57
2.18.2	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie .....	57
2.18.3	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	57
2.18.4	Radioaktiver Zellassay .....	58
2.19	Strukturanalyse.....	59
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
3.1	Gentechnische Herstellung und funktionelle Charakterisierung von rekombinanten VEGFR-3 Domänen .....	61
3.1.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden und Produktion der VEGFR-3-Domänen D1, D2, D3 und D1-2 in <i>E. coli</i> .....	61
3.1.2	Konstruktion eines Expressionsvektors und transiente Expression von VEGFR-3(D1-7) in humanen Zellen .....	66
3.1.3	Funktionelle Analyse der gentechnisch hergestellten VEGFR-3-Fragmente D1-2 und D1-7 mittels ELISA und SPR-Spektroskopie.....	69
3.2	Selektion und Charakterisierung von Lcn2-Varianten gegen VEGFR-3 .....	71
3.2.1	Anreicherung von Lcn2-Varianten mittels Phage Display .....	71
3.2.2	Identifizierung von VEGFR-3 spezifischen Lcn2-Varianten im Screening ELISA.....	76
3.2.3	Analyse von DNA- und Proteinsequenzen selektierter Lcn2-Varianten .....	77
3.2.4	Biochemische Charakterisierung selektierter Anticalin-Kandidaten .....	79
3.3	Optimierung der biochemischen Eigenschaften von Anticalinen.....	86
3.3.1	Optimierung der Produktionsausbeute des Anticalins A5C3 durch rationales Engineering ..	86

## Inhalt

3.4	Affinitätsmaturierung des Anticalins U3D7 durch kombinatorisches Engineering .....	90
3.4.1	Generierung einer U3D7-Zufallsbibliothek durch Error-Prone PCR .....	90
3.4.2	Selektion von U3D7-Varianten mit verbesserter Affinität mittels Phage Display und ELISA-Screening.....	91
3.4.3	Produktion und biomolekulare Bindungsstudien der selektierten U3D7-Varianten .....	91
3.4.4	Verlängerung der Komplex-Dissoziationsrate $k_{off}$ durch kombinatorische und rationale Mutagenese .....	93
3.5	Funktionelle Charakterisierung von für VEGFR-3 spezifischen Anticalinen.....	96
3.5.1	Kompetition mit dem natürlichen VEGFR-3 Liganden VEGF-C im quantitativen ELISA.....	96
3.5.2	Bestimmung der Domänenspezifität gegenüber VEGFR-3.....	97
3.5.3	Kreuzreaktivität gegenüber dem nah verwandten VEGFR-2.....	98
3.5.4	Interaktion der Anticaline mit VEGFR-3 der Maus .....	99
3.6	Untersuchungen zur spezifischen Expression und zum Anticalin-vermittelten Nachweis von VEGFR-3 in Zellkultur.....	100
3.6.1	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von VEGFR-3 auf verschiedenen Zelllinien.....	100
3.6.2	Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR-3 exprimierenden Tumorzellen .....	101
3.7	Radioaktive Markierung von Anticalinen mit $^{125}I$ und quantitativer Radioliganden-Bindungstest.....	103
3.8	Untersuchung der thermischen Stabilität von VEGFR-3 bindenden Anticalinen .....	105
3.9	Bifunktionelle Anticaline .....	107
3.9.1	Fusion von Anticalinen mit einem fluoreszierenden Reporterprotein.....	107
3.9.2	Konstruktion eines PASylierten anti-VEGFR-3 Anticalins mit freiem Cystein-Rest zur Kopplung mit einem radioaktiven Metallchelat für das <i>in vivo</i> Imaging.....	112
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>117</b>
4.1	Expression und Charakterisierung von rekombinanten VEGFR-3 Domänen.....	117
4.1.1	Produktion von D1-2 in <i>E. coli</i> .....	117
4.1.2	Produktion von D1-7 in Zellkultur .....	119
4.2	Selektion, Charakterisierung und Optimierung von Anticalinen für das molekulare Targeting VEGFR-3 exprimierender Tumore .....	121
4.2.1	Selektion von VEGFR-3 bindenden Anticalinen.....	121
4.2.2	Verbesserung der Bindungseigenschaften von U3D7 durch <i>in vitro</i> Affinitätsmaturierung	124
4.2.3	Verbesserung der Löslichkeit des Anticalins A5C3 .....	125
4.3	Die Anticaline und deren VEGFR-3 Bindungsmodi .....	127
4.4	Bifunktionelle Anticaline für die molekulare Bildgebung solider Tumore.....	130
4.4.1	ChromoCaline.....	130
4.4.2	A5C3(QH)-PAS <sub>200</sub> -Cys für die Radio-Immundiagnostik.....	132
<b>5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>139</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>157</b>	





# Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AEX	Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
cpm	<i>Counts per Minute</i>
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
ID/g	Injizierte Dosis pro Gramm
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IDA	Iminodiessigsäure
IEX	Ionenaustauschchromatographie
OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei xxx nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p.i.	<i>post injectionem</i>
RT	Raumtemperatur
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> ; Größenausschlusschromatographie; Gelfiltration
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> ; Oberflächenplasmonresonanz
U	<i>Unit</i> , Einheit der enzymatischen Aktivität
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>Weight per Volume</i> (Masse pro Volumen)



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prinzip der Theranostik für die personalisierte Medizin

2012 wurden weltweit rund 14 Millionen neue Fälle von Krebserkrankungen registriert, bis 2025 wird mit einem Anstieg der Neuerkrankungen auf jährlich 20 Millionen gerechnet (Ferlay *et al.*, 2015). Grund für die stetig steigende Zahl an Neuerkrankungen ist vor allem die immer älter werdende Bevölkerung und das mit steigendem Alter einhergehende Erkrankungsrisiko. Mit mehr als 8 Millionen Todesfällen im Jahr 2012 steht Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen noch auf Platz zwei der Liste der häufigsten Todesursachen, bald könnte es allerdings zur häufigsten Todesursache weltweit werden. Der Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Krebstherapie ist demnach hoch. Eine Schwierigkeit bei der Behandlung von Krebserkrankungen ist deren heterogener Charakter. Krebspatienten zeigen je nach Art und Progressionsstadium ein unterschiedlich gutes Therapieansprechen, häufig kommt es seitens des Tumors zur Ausbildung von Resistenzmechanismen. Der individuelle Verlauf dieser Erkrankung erfordert eine ebenso individuelle Behandlung. Eine wirksame „One-Fits-It-All“-Lösung gibt es bislang nicht.

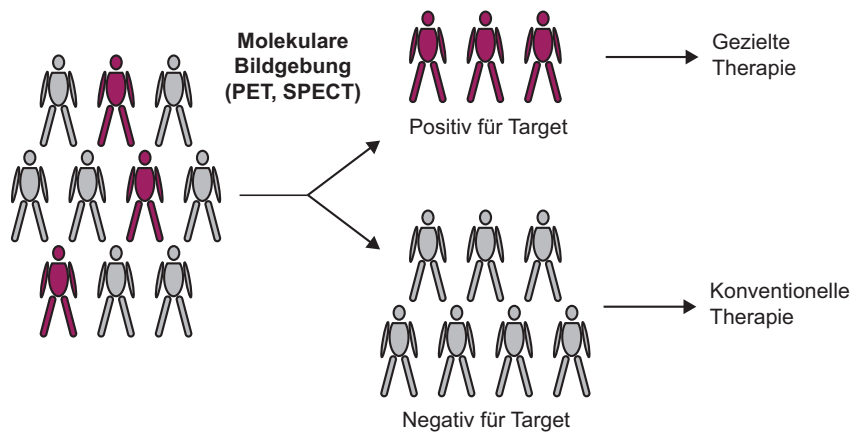
Das Prinzip der personalisierten Medizin berücksichtigt diese Unterschiede. Basierend auf den genetischen Besonderheiten und der molekularen Beschaffenheit eines Tumors können zugeschnittene Therapien für unterschiedliche Patientengruppen entwickelt werden. Durch moderne zielgerichtete Wirkstoffe erhoffen sich Forscher ein verbessertes Therapieansprechen, weniger unerwünschte Begleiterscheinungen sowie möglicherweise verkürzte Behandlungsdauern. Eine zunehmend wichtige Rolle spielen hierbei biopharmazeutische Wirkstoffe, die aufgrund ihrer hohen Spezifität und der gezielten Wirkmechanismen bereits breite Anwendung in verschiedenen medizinischen Bereichen finden, auch über die Onkologie hinaus.

Für die personalisierte Krebstherapie ist eine enge Verzahnung von Therapie und Diagnostik erforderlich. Das enge Zusammenwirken beider Disziplinen wird auch durch den Begriff „Theranostik“ zum Ausdruck gebracht. Ziel der Theranostik ist die detaillierte Charakterisierung eines Krankheitsphänotyps auf molekularer Ebene – beispielsweise anhand des Expressionsstatus eines tumorassoziierten Markerproteins auf der Oberfläche von malignen Zellen – um diesen als spezifischen Angriffspunkt in der Therapie zu nutzen (Abbildung 1).

Ein moderner Baustein der Theranostik ist die molekulare Bildgebung („*Imaging*“) mit Hilfe von hochauflösenden bildgebenden Verfahren, wie der Computertomographie (CT) und der Magnetresonanztomographie (MRT) (Histed *et al.*, 2012). Eine besondere Rolle bei der funktionellen Bildgebung spielt die Radio-Immundiagnostik (RID). Die Grundlage hierfür ist die spezifische Interaktion des auf der Oberfläche von entarteten Tumorzellen präsentierten Biomarkers mit einem markierten Wirkstoff, dem sogenannten „*Tracer*“, bestehend aus einem gegen den Biomarker gerichteten Bindeprotein, einem Peptid oder einer niedermolekularen Substanz, gekoppelt mit einem Radionuklid. Für die molekulare Bildgebung von Tumoren stehen abhängig von den Emissionseigenschaften des verwendeten Radionuklids verschiedene Imaging-Modalitäten zur Verfügung, darunter die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT). Im Zusammenhang mit der spezifischen Anreicherung des Tracers im

## Einleitung

Tumorgewebe können durch PET oder SPECT hochauflösende dreidimensionale Bilder des Tumors und gegebenenfalls seiner Metastasen generiert werden. Gleichzeitig mit der pathologischen Abnormalität in der Anatomie wird das Vorhandensein des zellulären Markerproteins, auf welchen der jeweilige Wirkstoff abzielt, auf molekularer Ebene detektiert.



**Abbildung 1| Prinzip der Theranostik zur personalisierten Behandlung von Krebserkrankungen.** PET: Positronen-Emissions-Tomographie; SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography. Zur näheren Erläuterung siehe Text. Abbildung modifiziert nach Lee & Li (2011).

Die Konstruktion von geeigneten Radio-Tracern kann auf der Grundlage gegen den Biomarker gerichteter Bindeproteine erfolgen. Monoklonale Antikörper (mAbs) sind aufgrund ihrer hohen Spezifität und Affinität gegenüber unterschiedlichen Antigenen die bisher am häufigsten für diagnostische und therapeutische Anwendungen eingesetzten biopharmazeutischen Wirkstoffe. Für die molekulare *in vivo* Bildgebung ist deren Anwendung als Tracer jedoch aufgrund der inhärent langen Zirkulation im Blut und der nur schlechten Gewebepenetration limitiert (Kaur *et al.*, 2012). Die Ursache für die lange Plasmahalbwertszeit von ein bis zwei Wochen liegt in dem großen Molekulargewicht von 150 kDa sowie dem durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) vermittelten endosomalen Recycling. Ein brauchbares Tumor-zu-Blut-Verhältnis kann dadurch erst nach einigen Tagen erreicht werden. Zudem wird das strahlungsempfindliche Knochenmark einer beträchtlichen Strahlendosis ausgesetzt. Ebenso sind der aus der komplexen Architektur monoklonaler Antikörper resultierende aufwendige Herstellungsprozess und die durch den Fc-Teil vermittelten immunologischen Effektorfunktionen für die klinische Bildgebung und bestimmte therapeutische Anwendungen von Nachteil.

Durch Protein-Engineering wurde die gezielte Manipulation von Antikörpern möglich, was vor allem zur Entwicklung von verschiedenen kleineren Antikörperformaten, wie den monovalenten Fab, Fv und scFv-Fragmenten sowie den aus dem Haifisch oder Kamel isolierten *Single Domain* Antikörpern (sdAb, Nanobodies) führte (Laffly & Sodoyer, 2005). Obgleich derlei Fragmente vorteilhaft für die Anwendung in der molekularen Bildgebung sind, leiden sie unter eigenen Besonderheiten, wie beispielsweise der nötigen Kettenpaarung im Fall von Fabs und der Oligomerisierungstendenz von

scFvs. Nanobodies weisen des Weiteren eine nur halbierte Antigenbindestelle auf, da diese im Gegensatz zu mAbs aus nur drei statt sechs hypervariablen Schleifen (*Complementarity Determining Region*, CDR) besteht (Überblick in (Richter *et al.*, 2014)).

Die gegebenen Beschränkungen von Antikörpern führten zur Entwicklung sogenannter „alternativer Scaffolds“, Bindeproteine auf der Grundlage von Gerüststrukturen außerhalb der Immunglobulinfamilie (Nygren & Skerra, 2004). Das grundsätzliche Prinzip der Scaffolds beruht auf der Kopplung einer gewünschten Bindungsaktivität mit den vorteilhaften Eigenschaften eines kleinen, robusten und leicht produzierbaren Proteingerüsts. Scaffold-basierte Bindeproteine können *in vitro* mit Hilfe von kombinatorischen Methoden, ähnlich der klonalen Selektion in der Immunantwort, gegen eine Vielzahl von medizinisch relevanten Antigenen (Biomarkern) generiert werden. Derlei neuartige Bindeproteine besitzen ein großes Potential für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik und Therapie. Zu den bekanntesten Vertretern der Scaffold-Familie gehören *Adnectins*, *Affibodies*, *Designed Ankyrin Repeat Proteins* (DARPs), *Kunitz Inhibitor Domains* und die Anticaline (Überblick in Gebauer & Skerra, 2009). Vertreter dieser Familien befinden sich derzeit bereits in der klinischen Prüfung, vor allem für die Anwendung in der Krebstherapie (Überblick in Gebauer & Skerra, 2015).

Wie man heute weiß, erfordert der heterogene Charakter von Krebserkrankungen eine ständige Weiterentwicklung präzise abgestimmter Behandlungskonzepte. Grundlage hierfür bilden die ständig wachsenden Erkenntnisse über die molekulare Beschaffenheit von Tumoren und die Evaluierung prognostischer Marker. Bindeproteine auf der Basis von Protein-Scaffolds, wie die Anticaline, dem Herzstück dieser Arbeit, stellen hierbei eine wertvolle Alternative zu Ig-basierten Wirkstoffen dar und lassen ein großes Anwendungspotential auf dem Gebiet der Theranostik erwarten.

## 1.2 Anticaline – alternative Bindeproteine für das molekulare *Targeting* auf Basis des humanen Lipocalin-2

Das Konzept der Scaffold-Proteine gründet auf der Idee, rational konstruierte Bindeproteine mit vorteilhaften Eigenschaften als Alternative zu konventionellen mAbs für medizinische Anwendungen zu generieren. Als Grundstein für die Anticalin-Technologie wurde ein von Natur aus robustes Proteingerüst gesucht, das sich zum einen durch eine konservierte Faltung auszeichnet und zum anderen für das Einführen von künstlichen Bindungsaktivitäten geeignete Bereiche aufweist. Die molekulare Erkennung einer vorgegebenen Zielstruktur („*Target*“) seitens des Bindeproteins kann grundsätzlich mit zwei strukturellen Mechanismen realisiert werden: 1.) Die Bindung des Targets über flexible Schleifenregionen, die von der starren Gerüststruktur gehalten werden. Hierbei wird die Paratop-Region von Antikörpern, die von insgesamt sechs hypervariablen Peptidschleifen und einem Gerüst aus zwei  $\beta$ -Sandwiches gebildet wird, imitiert. 2.) Alternativ bieten die oberflächen-exponierten Seitenketten von relativ starren Sekundärstrukturelementen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern eine Möglichkeit für die Generierung künstlicher Bindestellen.

Die Ligandenbindungseigenschaften der Anticaline nutzen das Prinzip der von Schleifen umgebenen Bindungstasche. Anticaline werden ausgehend von Lipocalinen generiert, einer diversen Familie von robusten, relativ kleinen extrazellulären Proteinen (ca. 20 kDa). Sie kommen in verschiedenen Spezies vor, wie Vertebraten, Insekten, Pflanzen und Bakterien (Åkerström *et al.*, 2006). Im



Anticaline werden durch kombinatorisches Engineering in einem Prozess generiert, der der humoralen Immunantwort gegen ein Antigen ähnelt (Skerra, 2003). Ausgewählte Positionen innerhalb der vier strukturell flexiblen Schleifen und benachbarter Bereiche der  $\beta$ -Stränge werden durch ortsgerichtete Mutagenese randomisiert und eine genetische Bibliothek konstruiert. Bei 20 ausgewählten Positionen und 20 möglichen Aminosäuren ergibt sich eine theoretische Komplexität von bis zu  $20^{20}$  verschiedenen Lipocalin-Varianten. Mit Hilfe von *in vitro* Selektionstechniken, wie dem *Phage Display* (Arap, 2005) oder dem *Bacterial Surface Display* (Binder *et al.*, 2010), wird die Bibliothek anschließend durchmustert und Lipocalin-Varianten mit Bindungsaktivität für ein vorgegebenes Target identifiziert (Gebauer & Skerra, 2012). Im nächsten Schritt werden die angereicherten bindungsaktiven Lipocalin-Varianten als lösliche Proteine im präparativen Maßstab in *Escherichia coli* produziert und nach chromatographischer Reinigung bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert. Durch kombinatorisches oder rationales Protein-Engineering können die erhaltenen Lipocalin-Varianten im Hinblick auf ihre proteinchemischen Eigenschaften in einem Prozess der Maturierung optimiert werden, zum Beispiel zur Erhöhung der Target-Affinität oder der thermischen Stabilität.

Im Rahmen der Entwicklung der Anticalin-Technologie wurden bisher eine Reihe von Lipocalin-Gerüststrukturen anhand ihrer biochemischen Eigenschaften und bekannter Kristallstrukturen ausgewählt: das Bilin-Bindungsprotein (BBP) aus dem Schmetterling *Pieris brassicae*, das humane Apolipoprotein D (ApoD), das humane Lipocalin 1 (Lcn1/Tlc, auch als Tränenlipocalin bekannt) und das humane Lipocalin 2 (Lcn2 oder Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin bzw. Siderocalin). BBP und ApoD spielten vor allem in den Anfängen der Anticalin-Technologie eine Rolle, wohingegen die erst später strukturell charakterisierten menschlichen Lipocaline Lcn1 und Lcn2 als Grundlage für das Design von Anticalinen mit therapeutischem Anwendungspotential von Vorteil erschienen (Überblick in (Richter *et al.*, 2014)).

Auf der Basis von Lcn2 wurden durch iterative Optimierung bisher drei Generationen von Zufallsbibliotheken konstruiert (Gebauer *et al.*, 2013), aus denen Anticaline gegen verschiedene krankheitsrelevante Molekülformate selektiert werden konnten. Für die Lcn2-Bibliothek der ersten Generation wurden ausschließlich Positionen in den exponierten Schleifen randomisiert. Diese speziell auf Protein-Targets abgestimmte Bibliothek lieferte ein hochaffines Anticalin gegen den krankheitsrelevanten T-Zell Korezeptor *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen* (CTLA-4, CD152) (Schönfeld *et al.*, 2009). Die zweite Generation zielte auf die Bindung von kleinen haptentartigen Liganden ab, wofür vorwiegend im Inneren der kelchartigen Bindetasche gelegene Seitenketten mutiert wurden. Ein Beispiel für ein aus dieser Zufallsbibliothek resultierendes Anticalin ist CL31, das ein für die Radioimmuntherapie (RIT) von Tumoren relevantes Radionuklid – das Lanthanid Yttrium(III) oder verwandte Metallionen – im Komplex mit dem Chelator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) erkennt (Kim *et al.*, 2009). Gegenstand der dritten Generation der Lcn2-Zufallsbibliothek war es schließlich, einen möglichst großen Bereich unterschiedlicher Targets (kleine Moleküle und Peptide bis hin zu großen Proteinen wie Zelloberflächenrezeptoren) zu adressieren. Hierzu wurden ausgehend von den Erkenntnissen aus den vorangegangenen Selektionsstudien sowie Röntgenstrukturanalysen der zuvor selektierten Anticaline eine Kombination von insgesamt 20 Seitenketten ausgewählt, die sowohl im Inneren der Bindetasche als auch an den äußeren exponierten Peptidschleifen positioniert waren (Gebauer *et al.*, 2013).

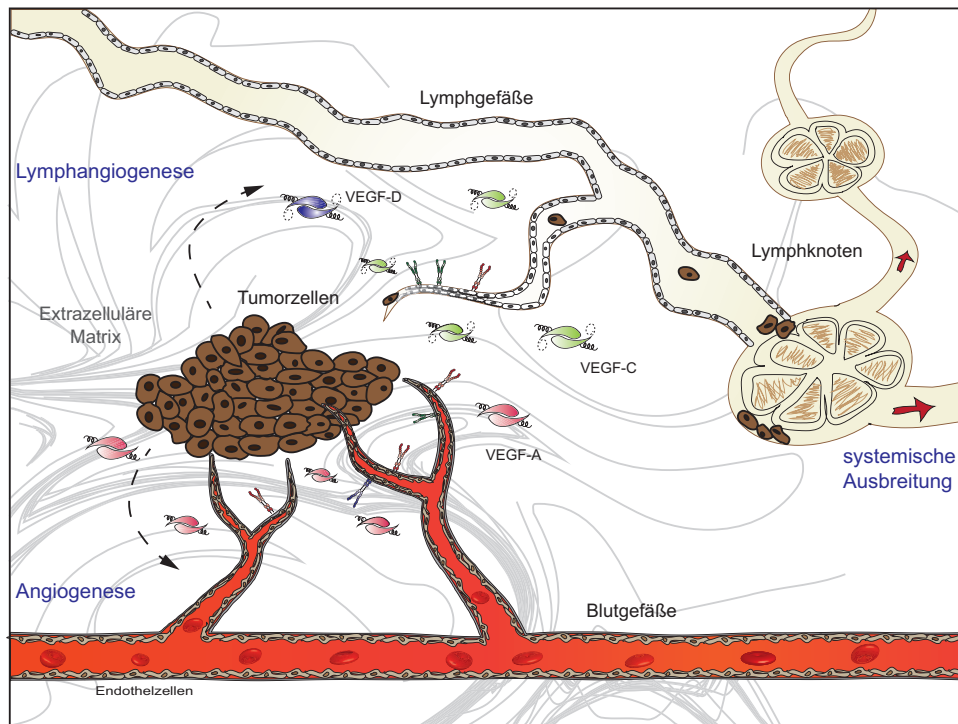
Diese neu entworfene Bibliothek wurde auch auf gentechnischer Ebene optimiert. Die Gensynthese der neuen Lcn2-Bibliothek erfolgte mit Hilfe der „*Slonomics*“-Technologie, bei welcher im Gegensatz zu klassischen Gensynthesemethoden das Gen aus einem Set von kurzen doppelsträngigen DNA-Bausteinen zusammengesetzt wird (Van den Brulle *et al.*, 2008). Jeder DNA-Baustein besteht aus einem chemisch synthetisierten kurzen Oligonukleotid, welches aufgrund intramolekular komplementärer Bereiche eine haarnadelförmige Sekundärstruktur mit einem Überhang von drei Basen ausbildet. Durch wiederholte Zyklen aus Ligierung und Verdau mit einer außerhalb der eigentlichen Erkennungssequenz schneidenden SII-Restriktionsendonuklease werden die einzelnen DNA-Bausteine konsekutiv aneinandergesetzt, so dass ein vollständiges Gensegment entsteht. An den randomisierten Positionen werden zufällig gemischte DNA-Bausteine eingesetzt. Durch 19 verschiedene Basentriplets werden hierbei alle Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein abgedeckt; Stoppcodons sind von der Synthese ausgeschlossen. Durch den Verzicht auf PCR-basierte Methoden konnte mit der Slonomics-Technologie eine funktionelle Lipocalin-Bibliothek mit sehr geringer Fehlerrate und ohne zusätzliche Cysteinreste oder Stoppcodons verwirklicht werden.

Aus dieser optimierten Bibliothek wurde bereits ein Spektrum von Anticalinen gegen verschiedene Targets generiert, darunter das für die Alzheimer-Krankheit verantwortliche Amyloid-Peptid A $\beta$ 40 (Rauth *et al.*, 2016), das auf Tumorzellen exprimierte Markerprotein Hsp70 (Friedrich *et al.*, 2017) sowie gegen die Extradomäne B (ED-B) des Fibronektins – einer mit der Tumorangio-genese assoziierten Speißvariante des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin (Gebauer *et al.*, 2013). Die für ED-B spezifischen Anticaline werden derzeit als diagnostische Reagenzien für die Detektion hochgradig maligner Glioblastome evaluiert, wobei eine gradabhängige Expression von ED-B an den Blutgefäßen hochvaskularisierter Gehirntumore festgestellt werden konnte (Albrecht *et al.*, 2016).

### **1.3 Die Tumervaskulatur als Angriffspunkt der Tumorthherapie**

Ein für das Tumorwachstum essentieller Prozess ist die Versorgung mit Nährstoffen, Hormonen und Sauerstoff sowie die Entfernung von toxischen Abbau- und Nebenprodukten. Die Versorgung erfolgt in Geweben bis zu einem Durchmesser von maximal 1 mm durch Diffusion, darüber hinaus gewährleistet ein komplexes Netzwerk aus Blutgefäßen den effizienten Stofftransport in alle Regionen des Körpers. Tumorzellen zeichnen sich durch eine ungewöhnlich hohe Teilungsrate und niedrigeren Grad der Differenzierung aus (National Cancer Institute, 2013). Aufgrund der schnell wachsenden Tumorzellmasse und der daraus resultierenden ständigen Unterversorgung des innenliegenden Bereiches (Hypoxie) beginnen Tumorzellen unter anderem durch Ausschüttung des proangiogenen Faktors VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) Endothelzellen so zu manipulieren, dass diese zur Aussprossung neuer nährstoffversorgender Blutgefäße aktiviert werden (Abbildung 3) (Hanahan & Folkman, 1996). Die Ausbildung neuer Blutgefäße aus präexistenten Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet und wird vor allen Dingen durch VEGF-A und seinen korrespondierenden Rezeptor VEGFR-2 vermittelt. Angiogenese tritt bereits in der frühen Phase des Tumorwachstums auf.





**Abbildung 3| Die tumorinduzierte Ausbildung eines komplexen Gefäßnetzwerkes.** Tumorzellen und tumorassoziierte Stromazellen wie Makrophagen sezernieren die angiogenen und lymphangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. Der durch die Unterversorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff (Hypoxie) induzierte Wachstumsfaktor VEGF-A bewirkt eine Aussprossung von intratumoralen Blutgefäßen, was das weitere Tumorstadium ermöglicht. Die durch VEGF-C und VEGF-D gesteuerte Aussprossung dünnwandiger lymphatischer Gefäße ermöglicht eine Infiltration von Tumorzellen zunächst in die benachbarten Lymphknoten, von wo aus sie sich in entfernte Organe ausbreiten können (Metastasierung).

Durch die fundamentale Rolle der Sauerstoffversorgung für das Tumorstadium stellt die Angiogenese heutzutage einen Hauptangriffspunkt der Krebstherapie dar. Sogenannte „*Vascular Targeting*“ Strategien zielen auf die Inhibition von Induktoren der Angiogenese ab, um somit die Versorgung des malignen Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff zu unterbinden und idealerweise ein Absterben der Tumorzellen zu bewirken. Tatsächlich führen Inhibitoren wie der von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene humanisierte monoklonale anti-VEGF-A-Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Genentech) in verschiedenen Tumorarten zu einer Blockade der Gefäßneubildung und in Kombinationstherapie mit Cytostatika zu einem Rückgang des Tumorstadiums (Ferrara & Adamis, 2016). Neben der Therapie bietet die molekulare Bildgebung tumorassoziierter neoangiogener Blutgefäße eine nicht-invasive Möglichkeit zur frühzeitigen Diagnose sowohl von Primärtumoren als auch von Metastasen.

Forschung und klinische Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte belegen auch eine wichtige Rolle des lymphatischen Systems für die Metastasierung von Krebsgeschwüren. Lymphangiogenese, also das Wachstum lymphatischer Gefäße, findet unter physiologischen Umständen im Erwachsenen nicht statt. Bei pathologischen Prozessen wie Entzündungen, Wundheilung und Krebs kann diese

jedoch erneut aktiviert werden (Alitalo & Detmar, 2012). Viele Krebsarten nutzen die lymphatische Vaskulatur zur Metastasierung in die Lymphknoten (Sleeman & Thiele, 2009).

Die physiologische Funktion der Lymphbahnen besteht als sekundäres Gefäßnetzwerk in der Aufrechterhaltung der körpereigenen Flüssigkeitsbalance. Speziell dienen sie dabei dem Rücktransport von Gewebsflüssigkeit in die Blutgefäße sowie als Eintrittsweg für extravasierte Leukozyten und aktivierte antigenpräsentierende Zellen und für deren Filterung in den Lymphknoten (Überblick in Alitalo *et al.* (2005)). Lymphatische Gefäße sind aufgrund ihrer speziellen Funktion im Vergleich zu Blutgefäßen besonders zugänglich für den Eintritt invasiver Tumorzellen. Beispielsweise sind die kleinen lymphatischen Kapillaren nur dünnwandige, relativ große Gefäße aus einer einzelnen Schicht von Endothelzellen mit relativ losen Zell-Zell-Kontakten. Des Weiteren werden die Kapillaren nicht von Perizyten oder glatten Muskelzellen umhüllt und besitzen keine bzw. nur eine geringfügig ausgebildete Basalmembran (Alitalo *et al.*, 2005). Klinische Studien belegen, dass verschiedene Krebsarten eine erhöhte Dichte lymphatischer Gefäße aufweisen und dies mit einer Metastasierung der Lymphknoten und einer schlechten Prognose einhergeht (Sleeman & Thiele, 2009). Die Induktion der Lymphangiogenese erfolgt dabei häufig durch Ausschüttung der Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D (Abbildung 3).

### 1.4 Die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFs)

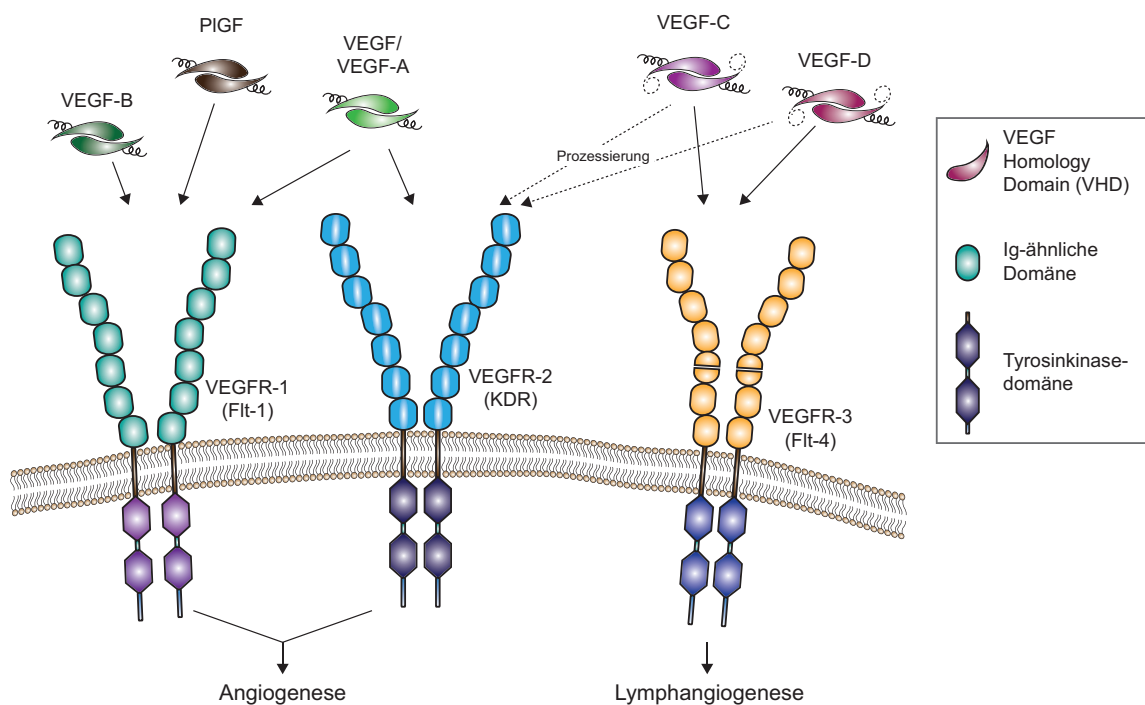
Angiogenese und Lymphangiogenese erfordern ein koordiniertes Zusammenwirken verschiedener Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmoleküle in Endothelzellen. Beide Prozesse werden durch Signalwege für die VEGFs gesteuert. Die VEGF-Familie umfasst mit VEGF/VEGF-A, PlGF (*Placental Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D im Menschen insgesamt fünf verschiedene Liganden, die ihre biologische Funktion durch Bindung an den extrazellulären Teil von transmembranen Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) vermitteln, darunter die strukturell verwandten VEGF-Rezeptoren (VEGFRs) VEGFR-1/Flt-1 (*Fms-Like Tyrosine Kinase 1*), VEGFR-2/KDR (*Human Kinase Insert Domain Receptor*) und VEGFR-3/Flt-4 (*Fms-Like Tyrosine Kinase 4*) (Abbildung 4).

Die Signalübertragung durch VEGF-A und seinen Hauptrezeptor VEGFR-2 ist der primäre Signalweg der Angiogenese und verantwortlich für die Induktion der Proliferation, Aussprossung, Migration, Permeabilität und dem Überleben von Endothelzellen (Lohela *et al.*, 2009). Die Expression von VEGF-A ist für die Entwicklung der Vaskulatur unabkömmlich (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). In der Tumorthherapie ist die Blockierung der VEGF-A/VEGFR-2-Achse deshalb der Hauptangriffspunkt zur Inhibition der tumorassoziierten Angiogenese (Ferrara, 2005).

VEGFR-1 dagegen fungiert während der Entwicklung als Negativ-Regulator, der durch die Sequestrierung des Liganden, vor allem VEGF-A, dessen Bindung an VEGFR-2 inhibiert und zwischen der Differenzierung aktivierter Endothelzellen zu migrierenden gefäßführenden (*Vessel-Leading*) „Tip“- oder proliferierenden „Stalk“-Zellen in den sich ausbildenden Gefäßtrieben beiträgt (Ferrara, 2004; Welti *et al.*, 2013).

VEGF-C und VEGF-D sind zusammen mit ihrem Rezeptor VEGFR-3 kritische Regulatoren der Lymphangiogenese. Während der embryonalen Entwicklung ist VEGFR-3 sowohl in den Blut- als auch den Lymphgefäßen exprimiert und trägt dort zur Ausbildung beider Gefäßstrukturen bei. In Erwachsenen ist die Expression des Rezeptors jedoch auf das lymphatische Gewebe beschränkt.

Alle VEGFRs besitzen eine ähnliche strukturelle Organisation mit einem extrazellulären ligandenbindenden Teil aus sieben immunoglobulinähnlichen Domänen (D1-7), einer Transmembran-Domäne, der Juxtamembran-Domäne, einer Tyrosinkinase-Domäne und einem C-terminalen Anhängsel (Koch *et al.*, 2011). Die Liganden der VEGF-Familie sind homodimere globuläre Proteine, die sich jeweils aus zwei antiparallel angeordneten und kovalent über zwei intermolekulare Disulfidbrücken verknüpften identischen Untereinheiten zusammensetzen. Das unter den VEGFs konservierte zentrale Faltungsmotiv wird als *VEGF Homology Domain* (VHD) bezeichnet und umfasst ein viersträngiges  $\beta$ -Faltblatt mit insgesamt acht Cystein-Resten, die eine charakteristische Cystein-Knoten-Struktur (*Cysteine Knot Motive*) ausbilden (Holmes & Zachary, 2005).



**Abbildung 4| Die Mitglieder der humanen VEGF-Familie.** Gezeigt ist der strukturelle Aufbau der drei VEGF-Rezeptoren und ihrer Liganden. Die Liganden binden mit unterschiedlichen Spezifitäten an die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. Dadurch wird jeweils die Dimerisierung des Rezeptors ausgelöst, gefolgt von der Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne und damit die Signalweiterleitung in den Zellkern. Neben der Bildung von homodimeren Rezeptorpaaren ist eine Heterodimerisierung von VEGFR-1/VEGFR-2 und VEGFR-2/VEGFR-3 möglich. VEGF-C und VEGF-D werden als Vorläuferproteine mit C- und N-terminalen Verlängerungen gebildet, die während der Reifung durch proteolytische Spaltung entfernt werden. In maturer Form binden VEGF-C und VEGF-D mit niedrigerer Affinität an VEGFR-2 (gestrichelter Pfeil). Abbildung übernommen und geändert aus Lohela *et al.* (2009).

Aus struktureller Sicht weisen der VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der VEGF-Familie einige Besonderheiten auf. VEGF-C und VEGF-D werden im Gegensatz zu den anderen VEGFs als große Vorläuferproteine mit Verlängerungen am C- und N-Terminus synthetisiert (Joukov *et al.*, 1997) und bilden aufgrund dessen eine eigene Unterfamilie. Die Propeptide werden während der Maturierung schrittweise proteolytisch prozessiert (McColl *et al.*,

2003), was schließlich in der lediglich die VHD umfassenden, maturen Form der Liganden resultiert. Die Affinität der Liganden gegenüber ihren Rezeptoren VEGFR-3 und VEGFR-2 wird durch die proteolytische Prozessierung reguliert, wobei die Affinität zum VEGFR-3 mit fortschreitender Verkürzung zunimmt (Joukov *et al.*, 1997). Lediglich die vollständig prozessierten Proteine sind in der Lage zur Bindung und Signalaktivierung des VEGFR-2.

Die Besonderheit des VEGFR-3 ist dessen Biosynthese in Form eines 195 kDa Vorläuferproteins, welches im Gegensatz zu den anderen VEGF-Rezeptoren in der fünften Domäne proteolytisch gespalten wird. Das dabei generierte N-terminale Polypeptid bleibt über eine Disulfidbrücke innerhalb D5 mit dem C-terminalen Rest verbunden (Pajusola *et al.*, 1993). Im Menschen wurden bisher zwei verschiedene Isoformen des VEGFR-3 identifiziert: die sogenannte lange und die kurze Isoform. Die kurze Isoform ist eine um 65 kDa am intrazellulären C-Terminus verkürzte, durch alternatives Spleißen generierte Version der langen Isoform. Hingegen überwiegt die lange Isoform unter physiologischen Bedingungen (Hughes, 2001).

Die Aktivierung der VEGFRs erfolgt durch die ligandeninduzierte Dimerisierung des extrazellulären Teils, was zu einer strukturellen Umordnung und der Autophosphorylierung der intrazellulären Kinasedomänen führt (Lemmon & Schlessinger, 2010). Die Interaktion aller VEGF-Liganden mit ihren Rezeptoren findet hauptsächlich an der zweiten Domäne (D2) statt (Wiesmann *et al.*, 1997; Fuh *et al.*, 1998; Leppänen *et al.*, 2010; Leppänen *et al.*, 2013). Hierdurch ausgelöste homotypische Interaktionen der membranproximalen Ig-Domänen 4/5 und 7 bewirken die Aktivierung der Kinase-Aktivität und eine Induktion pro-angiogener/lymphangiogener intrazellulärer Signalwege (Leppänen *et al.*, 2013). Die endozytische Internalisierung und Degradierung der VEGFRs führt schließlich zur Terminierung der Signalaktivierung (Koch *et al.*, 2011).

Die Komplexität der unterschiedlichen VEGFR-Liganden wird durch alternative Spliceformen von VEGF-A, VEGF-B und PlGF sowie der Prozessierung von VEGF-C und VEGF-D erweitert. Sowohl Spleißen als auch Prozessierung regulieren dabei die Fähigkeit der jeweiligen Liganden, an ihre Rezeptoren und Korezeptoren zu binden. Zu den VEGF-Korezeptoren gehören Glycosaminoglycane wie Heparin (H) und Heparansulfat (HS), die als Reservoir zum Aufbau von Wachstumsfaktorgradienten dienen, sowie die Transmembran-Proteine Neuophilin (Nrp) -1 und -2, die mit einem nur kurzen cytoplasmatischen Teil ohne katalytische Funktion die Ligandenbindung und Signalweiterleitung modulieren (Koch *et al.*, 2011).

### **1.5 VEGFR-3 als Target für das Imaging tumorassoziierter Gefäßstrukturen**

VEGFR-3 ist während der Entwicklung in allen Endothelien vorhanden, im Erwachsenen hingegen ist seine Expression auf das lymphatische Endothel beschränkt. VEGF-C ist wie VEGF-A für die Entwicklung von embryonalen Gefäßstrukturen essentiell, hingegen kann VEGF-D ohne offensichtlichen Phänotyp depletiert werden (Baldwin *et al.*, 2005; Karkkainen *et al.*, 2004). In der Mikrovaskulatur von Tumoren und Wunden wird die Expression des VEGFR-3 erneut hochreguliert (Valtola *et al.*, 1999; Paavonen *et al.*, 2000; Laakkonen *et al.*, 2007). Gerade in primären Hirntumoren wie Hämangioblastomen und hochgradigen Glioblastomen (GBM) konnte trotz der natürlichen Abwesenheit lymphatischer Gefäße eine Expression des VEGFR-3 wie auch seiner Liganden VEGF-C und VEGF-D nachgewiesen werden (Jenny *et al.*, 2006). Die Expression des Rezeptors ist dabei

vorwiegend an den Endothelzellen hoch vaskularisierter Tumorbereiche lokalisiert, während die Liganden auch in gefäßentfernten Bereichen detektiert wurden (Grau *et al.*, 2007).

Zahlreiche Studien belegen zudem die kritische Funktion des VEGFR-3 und VEGF-C bei der Metastasierung. In vielen Tumorarten erfolgt die Ausbreitung eines Primärtumors in erster Linie über das lymphatische System. Im Fall von Brustkrebs konnten Skobe *et al.* (2001) zeigen, dass humane Tumorzellen nach orthotoper Transplantation in Mäuse in der Lage waren, durch die Expression von VEGF-C das Wachstum lymphatischer Gefäße in den Tumor zu induzieren und dadurch ihre Ausbreitung über die Lymphbahnen in die örtlichen Lymphknoten und Lungen voranzutreiben (Skobe *et al.*, 2001). Einen Beweis für eine direkte Beteiligung von VEGF-C bei der Tumor-Lymphangiogenese in Pankreastumoren und der folgenden Metastasierung wurde parallel dazu von Mandriota *et al.* (2001) in transgenen Mäusen erbracht. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung über die Lymphbahnen durch eine Blockierung der VEGF-C/VEGFR-3-Achse inhibiert werden kann (Karpanen *et al.*, 2001). Auch in experimentellen Tiermodellen für Prostatakarzinom (Zeng *et al.*, 2004) und Hautkrebs (Hirakawa *et al.*, 2007) sowie in verschiedenen fortgeschrittenen humanen Tumorarten wie Zervix- und Kolorektalkarzinomen (Stacker *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2006) konnte eine Mitwirkung von VEGF-C/VEGFR-3 bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen gezeigt werden.

Neben seiner Schlüsselfunktion bei der Ausbildung von lymphatischen Gefäßen und der Metastasierung deuten weitere Befunde auf eine Mitwirkung des VEGFR-3 an dem Prozess der angiogenen Gefäßausprossung. In einem für die Angiogenese repräsentativen Mausmodell konnte eine Expression des VEGFR-3 in angiogenen Gefäßausprossungen nachgewiesen werden, wonach dessen Signalaktivierung eine signifikante Rolle für die Ausbildung des gesamten Gefäßnetzwerkes spielte (Tammela *et al.*, 2008). Eine Blockierung der VEGFR-3 Signalvermittlung mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bewirkte in diesem Modell eine verminderte Sprossung, Gefäßdichte und Verzweigung sowie eine reduzierte Proliferation der Endothelzellen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in verschiedenen humanen Tumor-Xenograft-Modellen in Mäusen demonstriert, bei welchen die signifikante Rolle des VEGFR-3 nicht nur während der Lymphangiogenese, sondern auch für die Ausbildung pathologischer Blutgefäße in Tumoren gezeigt werden konnte (Laakkonen *et al.*, 2007).

In den letzten Jahren entwickelte Angiogenese-Inhibitoren zielen vor allem auf das VEGF-A/VEGFR-2 System ab. Obgleich derlei Inhibitoren großen Erfolg bei der Behandlung von Tumoren sowie bei Augenerkrankungen wie der Makuladegeneration zeigten, ist deren Wirkung vor allem bei Tumor-erkrankungen durch Resistenzmechanismen limitiert (Bergers & Hanahan, 2008). Die Aktivierung der VEGF-C/VEGFR-3 Achse stellt unter diesem Gesichtspunkt möglicherweise einen ausgleichenden Mechanismus für die Aufrechterhaltung der tumorassoziierten Angiogenese dar. Wahrscheinlich ist, dass VEGF-C neben der Förderung der lymphatischen Metastasierung eine wichtige Funktion zur Erweiterung der Blut- und Nährstoffversorgung im Zusammenhang mit dem Tumorwachstum einnimmt (Tammela *et al.*, 2008).

Ein Vorteil VEGF/VEGFR-basierter *Vascular Targeting* Strategien liegt in der guten Zugänglichkeit der Target-Moleküle begründet. Ebenso wie VEGF-A zirkulieren VEGF-C und VEGF-D im Blut und wirken direkt an den VEGFR-3 exprimierenden Gefäßendothelzellen. Eine Penetration des Tumorgewebes durch den VEGF/VEGFR-spezifischen Wirkstoff ist somit nicht erforderlich. Speziell für die Bildgebung von hochgradigen Gehirntumoren wie dem GBM ist die Zugänglichkeit des in tumorassoziierten

Blutgefäßen exprimierten VEGFR-3 von großem Vorteil, da durch dessen Präsenz auf der vaskulären Seite der Gefäßwand die Überwindung der für große Proteine schwer passierbaren Blut-Hirnschranke (Wong *et al.*, 2013) nicht erforderlich ist. Mit Ausnahme von vaskulären Tumoren ist die Expression des VEGFR-3 vorwiegend auf die Blutgefäße und lymphatische Endothelzellen limitiert und in den Tumorzellen selbst wenig exprimiert (Petrova *et al.*, 2008). Die Gefäße sind deshalb das Hauptziel einer potentiellen anti-VEGFR-3 Therapie von Krebserkrankungen. Im Sinne der Theranostik stellt VEGFR-3 demnach ein vielversprechendes Target sowohl für die therapeutische Anwendung in Kombination mit vorhandenen Angiogenese-Inhibitoren als auch für die begleitende Radio-Immundiagnostik dar.

### 1.6 Überblick über VEGFR-3/VEGF-C inhibierende Proteinwirkstoffe

Für das molekulare Targeting des VEGFR-3 und seines Liganden VEGF-C sind bisher verschiedene proteinbasierte Reagenzien entwickelt worden, welche aufgrund ihres Wirkmechanismus eine potentielle Anwendung in der Tumorthherapie ermöglichen. Therapeutische Anwendungen zielen auf eine spezifische Blockierung der VEGFR-3/VEGF-C Achse, was durch verschiedene für die Rezeptoraktivierung essentielle Angriffspunkte erfolgen kann: (a) Neutralisierung des Liganden, (b) sterische Maskierung der Ligandenbindestelle auf dem Rezeptor, (c) Blockierung der Rezeptordimerisierung oder (d) Inhibierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Funktion. Bisher entwickelte proteinbasierte Reagenzien wirken über die in (a)-(c) genannten Mechanismen und umfassen verschiedene Rezeptor-Ig-Fusionen sowie Antikörper und Antikörperfragmente, die teilweise durch genetische Kopplung mit für VEGFR-2/VEGF-A spezifischen Proteinen zur Konstruktion bispezifischer Formate gedient haben (Tabelle 1).

**Rezeptor-Ig-Fusionen.** Einer der ersten Inhibitoren für die Neutralisierung von VEGF-C und VEGF-D wurde 2001 in Form eines chimären Proteins, bestehend aus den ligandenbindenden extrazellulären VEGFR-3 Domänen D1-3 verknüpft mit dem Fc-Teil eines Immunglobulins, entwickelt (Mäkinen *et al.*, 2001). Exprimiert als lösliches Rezeptorfragment in einem transgenen Mausmodell bewirkte das endogen produzierte „VEGFR-3-Ig“ eine Inhibition des dermalen Lymphgefäßwachstums. Erstmals wurde mit dieser Studie die Wirksamkeit eines Inhibitors für VEGFR-3 und dessen spezifischer Effekt auf die Entwicklung des Lymphgefäß-Netzwerks *in vivo* demonstriert. Der inhibierende Effekt von VEGFR-3-Ig auf das Wachstum tumorassoziiertes Lymphgefäße wurde anschließend in verschiedenen weiteren *in vivo* Modellen bestätigt (Karpanen *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002).

Ein weiteres Ig-ähnliches bispezifisches Fusionsprotein, welches die gleichzeitige Neutralisierung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF-A und des lymphangiogenen Wachstumsfaktors VEGF-C ermöglicht, wurde später basierend auf dem Prinzip des hoch potenten, bereits klinisch für die Behandlung der feuchten Makuladegeneration (Trichonas & Kaiser, 2013) und des metastasierenden Kolorektalkarzinoms (Macarulla *et al.*, 2014) eingesetzten Angiogenese-Inhibitors „VEGF-Trap“ (Aflibercept; Regeneron Pharmaceuticals) konstruiert. Die variable Domäne der schweren Kette ( $V_H$ ) eines Ig-Moleküls wurde hierfür durch die extrazellulären VEGF-C bindenden Domänen 1 und 2 des VEGFR-3 ersetzt. Für die VEGF-Bindungsaktivität wurde analog zu VEGF-Trap die variable Domäne der leichten Kette ( $V_L$ ) durch eine Chimäre aus VEGFR-1(D2) und VEGFR-2(D3) ersetzt, wodurch das dual wirksame Fusionsprotein „VEGFR31-Ig“ generiert wurde (Zhang *et al.*, 2010). Die




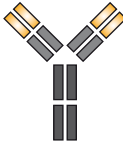
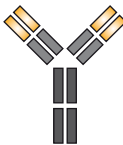

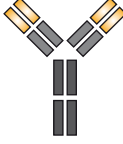
Verabreichung von VEGFR31-Ig in immundefizienten Mäusen mit hoch-metastasierenden hepatozellulären Karzinomen (HCCLM3) führte zur effektiven dualen Inhibition des primären Tumorwachstums und der Metastasierung von Lungen und Lymphknoten. VEGFR31-Ig kombiniert die VEGF-Bindungseigenschaften von VEGF-Trap mit der VEGF-C-Bindungsaktivität des löslichen Fusionsproteins VEGFR3-Ig in einem Molekül, was Vorteile hinsichtlich klinischer Anwendbarkeit, Dosierung, regulatorischer Erfordernisse sowie Kosten im Vergleich zu zwei separaten Wirkstoffen mit sich bringt.

**Antikörper und Antikörperfragmente.** Ein die Ligandenbindestelle des Rezeptors blockierender humaner Antikörper (hF4-3C5) wurde mittels Phage Display aus einer Antikörper-Bibliothek von Persaud et al. (2004) selektiert. hF4-3C5 (auch als „3C5“ bezeichnet) zeigte im kompetitiven ELISA stark antagonistische Wirkung mit  $IC_{50}$ -Werten unterhalb von 2 nM. hF4-3C5 wurde bereits unter dem Entwicklungsnamen IMC-3C5 als Rezeptorantagonist in einer klinischen Phase 1 untersucht (Saif et al., 2015).

Die variablen Domänen von hF4-3C5 bildeten anschließend die Grundlage für die Entwicklung eines bispezifischen Diabodies. Die zweite Spezifität steuerte der Fv-Teil eines gegen den VEGFR-2 gerichteten Antikörpers bei, welcher mit der Interaktion des Liganden VEGF-A interferiert. Der Einsatz dieses Diabodies in Zellkultur resultierte in einer dosisabhängigen dualen Blockade der durch VEGF-A und VEGF-C stimulierten Migration von Endothelzellen (Jimenez et al., 2005).

Vielversprechende Ergebnisse konnten jüngst auch durch die Blockierung der Rezeptordimerisierung erzielt werden (Tvorogov et al., 2010). Zu diesem Zweck wurde ein gegen die VEGFR-3 Domäne 5 gerichteter Antikörper (2E11) generiert, durch welchen sowohl die VEGFR-3 Homodimerisierung als auch die Heterodimerisierung mit VEGFR-2 inhibiert wird. Die Domänen 5 und 7 vermitteln durch homotypische Interaktionen die ligandenaktivierte Dimerisierung des VEGFR-3. Durch die sterische Blockierung der Dimerisierungsfläche in D5 bewirkt 2E11 eine Inhibierung der Signaltransduktion und damit die ligandeninduzierte Migration und Bildung von mikrovaskulären Endothelzellen. Die kombinierte Blockade der VEGFR-3 Ligandenbindestelle durch hF4-3C5 und der Rezeptordimerisierung durch 2E11 resultierte in einer noch stärkeren Inhibition der Endothelzell-Sprossung sowie der Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes *in vivo* (Tvorogov et al., 2010).

**Tabelle 1| Überblick über bisher entwickelte Proteinreagenzien zur Blockierung der durch VEGFR-3/VEGF-C vermittelten Signale.**

Name	Format	Wirkung	Entwicklungsstadium	Referenz
<b>VEGFR-3-Ig</b> 	Fusion der extrazellulären VEGFR-3 Domänen D1-3 mit dem Fc-Teil eines humanen Ig	(a) Neutralisierung des Liganden	Prälinik	(Mäkinen <i>et al.</i> , 2001) (Karpanen <i>et al.</i> , 2001) (He <i>et al.</i> , 2002)
<b>VEGFR31-Ig</b> 	Chimäre aus VEGFR-3 (D1-2), VEGFR-1(D2)/VEGFR-2(D3) und konstanten Ig-Fc Regionen		Prälinik	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
<b>VC2.2.2</b> 	Single-chain Fv-Fragment aus Phage Display Bibliothek		Prälinik	(Rinderknecht <i>et al.</i> , 2010)
<b>hF4-3C5</b> 	Kombinatorisch generiertes Fv-Fragment; als vollständig humane Fab- und IgG-Form entwickelt	(b) Blockierung der Ligandenbindestelle auf dem Rezeptor	Klinische Phase I	(Persaud <i>et al.</i> , 2004) (Saif <i>et al.</i> , 2015)
<b>mF4-31C1</b> 	Gegen den murinen VEGFR-3 gerichteter Ratten-Antikörper		Prälinik	(Pytowski <i>et al.</i> , 2005) (Roberts <i>et al.</i> , 2006)
<b>1121/3C5</b> 	Bispezifischer Diabody; Fusion aus den variablen Domänen der gegen VEGFR-2 bzw. VEGFR-3 gerichteten Antikörper 1121 und hF4-3C5		Prälinik	(Jimenez <i>et al.</i> , 2005)
<b>2E11</b> 	Monoklonaler Antikörper	(c) Inhibition der Rezeptordimersierung	Prälinik	(Tvorogov <i>et al.</i> , 2010)



## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Selektion, Charakterisierung und Optimierung von Anticalinen gegen den mit der Tumorangiogenese und Lymphangiogenese assoziierten Wachstumsrezeptor VEGFR-3.

Voraussetzung für die Generierung von für VEGFR-3 spezifischen Anticalinen war die Verfügbarkeit des Target-Proteins in löslicher Form. Ein erster Schritt sollte demnach in der Produktion und funktionellen Charakterisierung von extrazellulären VEGFR-3 Domänen bestehen. Unter Verwendung dieser rekombinanten Target-Proteine waren mit Hilfe des *in vitro* Phage Displays für VEGFR-3 spezifische Anticaline zu selektieren und durch geeignete Screening-Verfahren zu identifizieren.

Für die Anwendung in der diagnostischen Bildgebung sollten die aus dem Selektionsprozess gewonnenen Anticaline im Hinblick auf ihre proteinbiochemischen und biophysikalischen Eigenschaften sowie ihre Fähigkeit, das native Target auf Tumorzellen zu binden, untersucht und gegebenenfalls optimiert werden.

Zum Zweck der präklinischen Evaluierung war es schließlich geplant, auf der Basis der optimierten für VEGFR-3 spezifischen Anticaline verschiedene bifunktionelle Anticalinformate zu konstruieren und diese im Hinblick auf ihre Funktionalität zu analysieren.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, humane Zelllinien, Vektoren und cDNA

#### Escherichia coli-Stämme

BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
KS272	F <sup>-</sup> , $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> ( <i>strA</i> ), $\Delta$ <i>phoA</i> ( <i>pvull</i> ) (Meerman & Georgiou, 1994)
JM83	F <sup>-</sup> , <i>ara</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>rpsL</i> , $\phi$ 80 ( <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
Origami B	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>ahpC</i> , <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> ) (Prinz <i>et al.</i> , 1997)
TG1/F <sup>-</sup>	F <sup>-</sup> , <i>supE</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), $\Delta$ ( <i>mcrB-hsdSM</i> )5, (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) (Gibson, 1984; Kim <i>et al.</i> , 2009)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 [F <sup>+</sup> : <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> ( <i>tet</i> <sup>'</sup> )] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

#### Humane Zelllinien

293T	Aus embryonalem Nierengewebe, adhärent wachsend, epithelialer Ursprung (DuBridge <i>et al.</i> , 1987)
U-251 MG	Aus neuronalem Glioblastom (Astrocytom), adhärent wachsend, epithelialer Ursprung (Pontén & Macintyre, 1968)
U251-R3	Mit dem Plasmid EX-M0928-M61 stabil transfiziertes Derivat der Zelllinie U-251 MG (Gieser, 2014)
MCF-7	Adenokarzinom aus metastatischer Brustdrüse, adharend wachsend, epithelialer Ursprung (Soule <i>et al.</i> , 1973)

#### Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphage (Kan <sup>R</sup> ); Agilent, Santa Clara, CA
---------	---

#### Vektoren

pASK75-OmpA-His	tet <sup>p/o</sup> , OmpA, His <sub>6</sub> -tag, t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI, Amp <sup>R</sup> (Skerra, 1994)
pNGAL98	tet <sup>p/o</sup> , OmpA, Lcn2 (Q28H, C87S), <i>Strep</i> -tag II, t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI-ori, Amp <sup>R</sup>
pNGAL108	tet <sup>p/o</sup> , OmpA, Lcn2 (Q28H, C87S), <i>Strep</i> -tag, pIII, t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI-ori, Amp <sup>R</sup>
pTUM4	(Schlapschy <i>et al.</i> , 2006)
pASK75-T7RBS-eGFP-Lcn2	tet <sup>p/o</sup> , T7RBS, eGFP, Lcn2, <i>Strep</i> -tag II, t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI-ori, Amp <sup>R</sup>

## Material und Methoden

pASK75-T7RBS-eGFP- PAS#1(200)-Lcn2	tet <sup>p/o</sup> , T7RBS, eGFP, PAS#1(200), Lcn2, <i>Strep</i> -tag II, t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI-ori, Amp <sup>R</sup>
pASK75-Lcn2- PAS#1.2(200)-Cys-His	tet <sup>p/o</sup> , T7RBS, Lcn2, PAS#1.2(200), Cys, His <sub>6</sub> , t <sub>lpp</sub> , Tet <sup>R</sup> , ColEI-ori, Amp <sup>R</sup>
pReceiver-M61-VEGFR-3 (EX-M0928-M61)	CMV <sup>P</sup> , T7, VEGFR-3, IRES2, eGFP, polyA, Neo <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , ColEI-ori, SV40; GeneCopoeia, Rockville, MD
cDNA VEGFR-3	ORF Shuttle Clone, ORFeome OCABo5050G0623D; Source BioScience, Berlin

## 2.2 Oligodesoxynukleotide

### Für die Amplifizierung von VEGFR-3 Fragmenten

AR19_for	5' – CCT ACT CCA TGA CCC CCC CG –3'
AR20_rev	5' – GCT GTC AGG CTT GTT GAT GAA TG –3'
AR21_for	5' – CCG AGC AGC CAT TCA TCA AC –3'
AR22_for	5' – CCG ACA CGC TCT TGG TCA AC –3'
AR23_rev	5' – GCT TGT GAT GTG CAC CAG GAA G –3'
AR24_for	5' – CCA ACG AGC TCT ATG ACA TCC –3'
AR25_rev	5' – GCT CAC AAT GAC CTC GGT GCT C –3'

### Für die QuikChange Mutagenese

AR30_for	5' – CCG TAG CGC AGG CCA TGA CCC CCC CGA CC –3'
AR31_rev	5' – GGT CGG GGG GGT CAT GGC CTG CGC TAC GG –3'
AR46_for(G40Q)	5' – CAT GGC CGG AAA TCA ACT GCT GCG TGA G –3'
AR47_rev(G40Q)	5' – CTC ACG CAG CAG TTG ATT TCC GGC CAT G –3'
AR48_for(L42Q)	5' – GGA AAT GGA CTG CAG CGT GAG GAT AAG –3'
AR49_rev(L42Q)	5' – CTT ATC CTC ACG CTG CAG TCC ATT TCC –3'
AR50_for(F71H)	5' – GTC ACC TGG GTG CTG CAT TGG CGT AAG AAA TG –3'
AR51_rev(F71H)	5' – CAT TTC TTA CGC CAA TGC AGC ACC CAG GTG AC –3'
AR52_for(W72H)	5' – CCT GGG TGC TGT TTC ACC GTA AGA AAT GCT AC –3'
AR53_rev(W72H)	5' – GTA GCA TTT CTT ACG GTG AAA CAG CAC CCA GC –3'
AR54_for(Y77H)	5' – GCG TAA GAA ATG CCA CTA CAC CAT TCG –3'
AR55_rev(Y77H)	5' – CGA ATG GTG TAG TGG CAT TTC TTA CGC –3'
AR56_for(Y78H)	5' – GTA AGA AAT GCT ACC ACA CCA TTC GTA CC –3'
AR57_rev(Y78H)	5' – GGT ACG AAT GGT GTG GTA GCA TTT CTT AC –3'

AR58\_for(Y79R) 5' – AGA AAT GCT ACT ACC GCA TTC GTA CCT TTG –3'

AR59\_rev(Y79R) 5' – CAA AGG TAC GAA TGC GGT AGT AGC ATT TCT –3'

AR60\_for(P96A) 5' – GAG TTT ACT TTA GGC GCT ATT AAA AGT  
ATC CC –3'

AR61\_rev(P96A) 5' – GGG ATA CTT TTA ATA GCG CCT AAA GTA  
AAC TC –3'

AR62\_for(P106A) 5' – GGG CAA AAC ATC AGC TTT GGT CCG CGT –3'

AR63\_rev(P106A) 5' – ACG CGG ACC AAA GGT GAT GTT TTG CCC –3'

AR64\_for(W132H) 5' – GAA ACA GAA CCG CGA GCA TTT TAA AAT CAC  
ACT G –3'

AR65\_rev(W132H) 5' – CAG TGT GAT TTT AAA ATG CTC GCG GTT CTG  
TTT C –3'

AR66\_for(F71Q) 5' – GTC ACC TGG GTG CTG CAG TGG CGT AAG  
AAA TG –3'

AR67\_rev(F71Q) 5' – CAT TTC TTA CGC CAC TGC AGC ACC CAG  
GTG AC –3'

AR68\_for(Y77F) 5' – GCG TAA GAA ATG CTT CTA CAC CAT TCG T –3'

AR69\_rev(Y77F) 5' – ACG AAT GGT GTA GAA GCA TTT CTT ACG C –3'

AR70\_for(Y77L) 5' – GGC GTA AGA AAT GCC TCT ACA CCA TTC GTA C –3'

AR71\_rev(Y77L) 5' – GTA CGA ATG GTG TAG AGG CAT TTC TTA CGC C –3'

AR72\_for A4N10(W72R) 5' – CGT TGT GTG GTT TAG GAA AAG GAA ATG –3'

AR73\_rev A4N10(W72R) 5' – CAT TTC CTT TTC CTA AAC CAC ACA ACG –3'

AR74\_for A4N10(E100K) 5' – GCA GCA TTA AAA GTA AGC CGG GCC AAAC –3'

AR75\_rev A4N10(E100K) 5' – GTT TGG CCC GGC TTA CTT TTA ATG CTG C –3'

AR76\_for E4(M69V) 5' – TAA CGT CAC CGT TGT GTG GTT TAG GAA A –3'

AR77\_rev E4(M69V) 5' – TTT CCT AAA CCA CAC AAC GGT GAC GTT A –3'

AR78\_for F1(F56Y) 5' – GAG CGC GAC CAT TTA CGA GTT GAA AGA AG –3'

AR79\_rev F1(F56Y) 5' – CTT CTT TCA ACT CGT AAA TGG TCG CGC TC –3'

AR80\_for F1(K104T) 5' – GAG CCG GGC CAA ACA TCA ATC TTG GTC –3'

AR81\_rev F1(K104T) 5' – GAC CAA GAT TGA TGT TTG GCC CGG CTC –3'

AR82\_for F1(V135I) 5' – CGA GGC ATT TGC AAT CAC ACT GTA CGG –3'

AR83\_rev F1(V135I) 5' – CCG TAC AGT GTG ATT GCA AAT GCC TCG –3'

AR84\_for A4N10(E44K) 5' – CGT CGT CTG CGT AAG GAT AAG GAT CC –3'

AR85\_rev A4N10(E44K) 5' – GGA TCC TTA TCC TTA CGC AGA CGA CG –3'

Für die DNA-Sequenzierung

PR1 5' – CGC AGT AGC GGT AAA CG –3'

F83 5' – AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA –3'

## Material und Methoden

D20 5' – CCA CTC CCT ATC AGT GAT –3'

### Für die Error-Prone PCR

BstXI\_3004-2\_for 5' – CAG GAC AAC CAA TTC CAT GGG –3'

BstXI\_3004-2\_rev 5' – GGA GGC CCA GAG ATT TGG –3'

## 2.3 Proteinreagenzien

### Enzyme

Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Benzonase	E. Merck, Darmstadt
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> Ultra II DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Herculase</i> II Fusion DNA-Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
Restriktionsendonukleasen, diverse	Fermentas, St. Leon-Rot, New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym (Huhn)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

### Albumine

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

### Antikörper, Proteine & Proteinkonjugate

Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	IBA, Göttingen
Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	IBA, Göttingen
<i>Strep</i> Mab-Immo	IBA, Göttingen
Anti-Maus IgG (Fc-Spezifisch) Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Anti-Maus IgG (H&L), F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Alexa Fluor 488-Konjugat	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
Anti-Polyhistidin IgG-Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Streptavidin	Eigene Herstellung (Schmidt & Skerra, 1994)
Streptavidin Mutante 1	Eigene Herstellung (Voss & Skerra, 1997)

### VEGFR-3 Proteine und Antikörper

Human VEGFR-3/Flt-4 (Tyr25-Ile776, His-Tag)	SinoBiological, Beijing, China
Maus VEGFR-3/Flt-4 (Tyr25-Glu775, His-Tag)	SinoBiological, Beijing, China
Human VEGF-C (Thr107-Arg227, His-Tag)	SinoBiological, Beijing, China

Human VEGFR-2/Flk-1/CD309/KDR (Ala20-Glu764, His-Tag)	SinoBiological, Beijing, China
Anti-Human VEGFR-3 IgG (MAB3491)	R&D-Systems, Minneapolis, MN
Anti-Human VEGFR-3 Phycoerythrin IgG (FAB3492P)	R&D-Systems, Minneapolis, MN
Human VEGFR-2/Flk-1/KDR (Met1-Glu764, His-Tag)	SinoBiological, Beijing, China

#### Größenmarker zur Kalibrierung von Größenausschlusschromatographie-Säulen

Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Carboanhydrase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cytochrom c	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tyroglobulin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

## 2.4 Chemikalien

ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose für die Gelelektrophorese	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniak	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A-Stammlösung	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ATP (Adenosin-5'-triphosphat), 100 mM Stocklösung	Fermentas, St. Leon-Rot
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, MI
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI
Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D(+)-Biotin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
D-Biotinoyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure-N- hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- 4- toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau	Carl Roth, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
N-Ethyl-N'-(3-di-methylaminopropyl)- carbodiimid (EDC)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Eisen(III)-chlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	AppliChem, Darmstadt
Ethanolamin, 1 M Lösung	GE Healthcare Europe, Freiburg
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	AppliChem, Darmstadt
Formamid, deionisiert	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Glycerin 99 %	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	GE Healthcare Europe, Freiburg
NHS-PEG12-Biotin (EZ-Link)	Thermo Fisher Scientific, Ulm
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Carl Roth, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethan-sulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
L-Histidin	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Carl Roth, Karlsruhe
Kobaltchlorid Hexahydrat	E. Merck, Darmstadt
Kupferchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Magnesiumchlorid Hexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat Hydrat	E. Merck, Darmstadt
Maleimid-1,4,7-Triazacyclononan- N,N',N''-Triessigsäure (Maleimid-NOTA)	CheMatech, Dijon, Frankreich
Manganchlorid Tetrahydrat	E. Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt



Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Nickelsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Warrington, PA
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	AppliChem, Darmstadt
Polyethylenglycol (PEG), 8000 Da	Fluka über Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Puffer Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Trehalose Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Thiamin, Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Triethylamin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe
tRNA (from brewer's yeast)	Roche Diagnostics, Mannheim
Xylencyanol FF	Sigma Chemie, Deisenhofen
Zinkacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Zinksulfat	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.5 Standards und Kits

### DNA- und Protein-Größenstandard

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot

### Kits zur DNA-Isolierung

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

### Kits zur DNA-Sequenzierung

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	PerkinElmer LAS, Rodgau
SmartSeq Kit	Eurofins, Ebersberg



Schüttelapparate

Typ 3012 und Typ 3017  
 Thermomixer comfort  
 Mikrotiterplatten-Schüttler

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
 Eppendorf, Hamburg  
 VWR International, Darmstadt

Spektroskopie

Biacore 2000  
 CD-Spectropolarimeter Jasco J-810  
 FluoroMax-3 Spektralfluorimeter  
 MaXis Q-TOF Massenspektrometer  
 Photometer SpectraMax 250  
 Spektrophotometer Ultrospec 3000  
 NanoDrop 2000

GE Healthcare Europe, Freiburg  
 Jasco Deutschland, Gross-Umstadt  
 HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching  
 Bruker Daltonics, Bremen  
 Molecular Devices, Biberach a.d. Riss  
 GE Healthcare Europe, Freiburg  
 Thermo Fisher Scientific, Ulm

Zellkultur

Brutschrank Galaxy R  
 Brutschrank NU-5500  
 Gefrierbehälter Mr. Frosty  
 Laminar Flow Class II Silver Line  
 Rollerflaschen-System Cellroll  
 Zentrifuge Eppendorf 5430R

R S Biotech Lab. Equipment, Irvine, UK  
 Integra Bioscience, Fernwald  
 Thermo Fisher Scientific, Ulm  
 Kojair Tech, Vilppula, Finland  
 Integra Biosciences, Zizers, Schweiz  
 Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen

Eppendorf 5415R  
 Sigma 4-15K und 4-16K mit Rotoren  
 11118 und 13127  
 Sorvall Evolution RC und RC 6+ mit  
 Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000  
 und F10-4x1L Lex  
 Eppendorf MiniSpin

Eppendorf, Hamburg  
 Sigma, Osterode  
 Thermo Fisher Scientific, Ulm  
 Eppendorf, Hamburg

Sonstige Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer  
 Autoklav Varioklav Typ 500  
 FACSAria Cell-Sorting System  
 Labor-Homogenisator Panda  
 Laborpumpe 323  
 Metallblockthermostat Techne Dri-Block DB-2A  
 MicroPulser Elektroporator  
 MultiScreen<sub>HTS</sub> Stanzgriff mit Stanzenschieber  
 MultiScreen<sub>HTS</sub> Vakuum-Filtrationssystem  
 Mikrotiterplatten-Washer ELx405  
 Reinstwasseranlage Purelab ultra  
 Rotator Multi Bio RS

PerkinElmer LAS, Rodgau  
 H&P Labortechnik, Oberschleißheim  
 BD Biosciences, Heidelberg  
 GEA Niro Soavi Deutschland, Lübeck  
 Watson Marlow, Rommerskirchen/Anstel  
 Thermodux, Wertheim  
 Bio-Rad Laboratories, München  
 Merck Millipore, Schwalbach  
 Merck Millipore, Schwalbach  
 BioTek Germany, Bad Friedrichshall  
 ELGA LabWater Holding, Celle  
 Biosan, Riga, Lettland

## Material und Methoden

Sartocon Slice 200 Filterhalter für Crossflow	Satorius, Göttingen
Szintillationszähler miniGita	Raytest, Straubenhardt
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator TI 3 (254/365 nm)	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY
Wasserbad Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe

## 2.7 Verbrauchsmaterial

### Chromatographie-Säulen und Material

IDA-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Europe, Freiburg
Resource Q, 1 & 6 ml Bettvolumen	GE Healthcare Europe, Freiburg
<i>Strep</i> Tactin Superflow	IBA, Göttingen
Superdex 75 10/300 GL Tricorn	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 10/300 GL Tricorn	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg
HiLoad Superdex 26/60 200 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg
PD-10 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare Europe, Freiburg
NAP-5 Gelfiltrationssäule	GE Healthcare Europe, Freiburg

### Dialyseschläuche und Einheiten

Slide-A-Lyzer 0,5 ml Mini, MWCO 10 kDa	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL
Spectra/Por 1, MWCO 6-8 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Typ 27, MWCO 12-16 kDa	Biomol, Hamburg

### Kunststoffröhrchen

Kulturröhrchen mit Deckel, 13 ml	Sarstedt, Nürnberg
PP-Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### Petrischalen

Petrischalen, Ø 94 mm, PS	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Petrischalen, Ø 150 mm, PS	Sarstedt, Nürnberg

### Pipettenspitzen

Kristallklar (0,5 bis 10 µl)	Brand, Wertheim
Gelb (5 bis 200 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Blau (200 bis 1000 µl)	Gilson International, Limburg-Offheim

### Reaktionsgefäße

Reaktionsgefäß, dünnwandig, 0,2 ml	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäß 1,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg

Quarzküvetten

Typ 108.002 QS (Absorption)

Hellma, Müllheim, Baden

Typ 110 QS (CD)

Hellma, Müllheim, Baden

Sterilfilter

Filtropur (0,45 und 0,2 µm)

Sarstedt, Nürnberg

Membranfilter Microsart CN, 0,45 µm

Satorius, Göttingen

Membranfilter NC20, 0,2 µm

GE Healthcare Europe, Freiburg

Spin-X (0,45 µm)

Corning Life Science, Tewksbury, MA

Zellkultur

Kulturflaschen (25/75/150 cm<sup>2</sup>) mit  
Gasaustauschkappe

Biochrome, Berlin

MultiScreen<sub>HTS</sub>-BV Filterplatten, 96 Well,  
1,2 µm, PVDF

Merck Millipore, Schwalbach

Nunc Lab-Tek II Chamber Slides,  
8 Kammern (0,7 cm<sup>2</sup>/Kammer)

Zefa Laborservice, Harthausen

Rollerflasche, 2,5x, kurze Form,  
gewellte Oberfläche, 2125 cm<sup>2</sup>.

Greiner Bio-One, Frickenhausen

mit Gasaustauschkappe

Zellschaber

Sarstedt, Nürnberg

Sonstige Verbrauchsartikel

Dispenser-Tip 2,5 und 5 ml

Brand, Wertheim

Gene Pulser Elektroporationsküvetten,  
0,2 cm

Bio-Rad Laboratories, München

Halbmikro-Kunststoffküvetten

Sarstedt, Nürnberg

Mikrotiterplatte Nunc Maxisorp

Fisher Scientific, Schwerte

Mikrotiterplatte PS, 96-Well, V-Boden,  
steril verpackt

Sarstedt, Nürnberg

Millipore Amicon Ultra-4 bzw. -15,  
MWCO 5, 10 oder 30 kDa

Fisher Scientific, Schwerte

MultiScreen<sub>HTS</sub> Einweg-Stanzstempel

Merck Millipore, Schwalbach

Nitrocellulose Membran

Schleicher & Schuell BioScience, Dassel

Einwegspritzen „Injekt“, versch. Größen

B. Braun, Melsungen

Sensorchip CMD200I

XanTec bioanalytics, Düsseldorf

Sensorchip CM5

GE Healthcare Europe, Freiburg

Sartocon Slice Ultrafiltration Cassettes  
10 und 30 kDa

Satorius, Göttingen

NeutrAvidin-beschichtete paramagnetische  
Partikel (Sera-Mag SpeedBeads)

Thermo Fisher Scientific, Ulm

Streptavidin-beschichtete paramagnetische  
Partikel

Roche Diagnostics, Mannheim

Whatman-Filterpapier 3MM

VWR International, Darmstadt

Nalgene Zentrifugenbecher für Sorvall- Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000, F10-4 x 1000 Lex	Thermo Fisher Scientific, Ulm
--	-------------------------------

## 2.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

### Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in dest. Wasser (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan)	35 mg/ml in dest. Wasser (1: 500 zum Medium)

Wässrige Antibiotika-Stammlösungen wurden mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert. Die Aufbewahrung der Lösungen erfolgte bei -20 °C.

### Induktor-Stammlösungen

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in DMF für die Expression im Schüttelkolben (1:10000 zum Medium)
	5 mg/ml in DMF für die Fermentation (1:160000 zum Medium)
	Aufbewahrung bei -20 °C

### Medium und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
G418 Sulfat, 50 mg/ml	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS-Lösung ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS-Lösung mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA (1x) 0,05 %/0,2 % in DPBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Alle verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze wurden in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen eingesetzt.

### *LB-Medium (Sambrook et al., 1989)*

Bacto Tryptone	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit NaOH, Sterilisierung im Autoklav.

### *2xYT-Medium*

Bacto Tryptone	16 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l

NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten) 6 g/l (nur für Weichagar)

Einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit NaOH, Sterilisierung im Autoklav.

*TB-Medium (Sambrook et al., 1989)*

Bacto Tryptone	12 g/l
Bacto Yeast Extract	24 g/l
Glycerin	4 ml/l

Die Reagenzien werden in 9/10 Volumen destilliertem Wasser gelöst und im Autoklav sterilisiert. Zum Einstellen des pH-Werts werden anschließend 1/10 Volumen einer sterilfiltrierten (0,45 µm) 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Pufferlösung zum Medium gegeben.

<i>GYT-Medium</i>	<u>100 ml</u>
Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	125 mg
Glycerin	250 mg

Sterilisierung im Autoklav und Aufbewahrung bei 4 °C.

<i>SOC-Medium</i>	<u>100 ml</u>
Bacto Tryptone	2 g
Bacto Yeast Extract	0,5 g
NaCl	1 ml 1 M NaCl
KCl	250 µl 1 M KCl

Die Reagenzien werden zu 96 ml in destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und das Medium im Autoklav sterilisiert. Anschließend werden je 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> und 1 M MgCl<sub>2</sub> sowie 2 ml 1 M Glucose (jeweils 0,45 µm sterilfiltriert) zugegeben und das Medium bei 4 °C aufbewahrt.

Medien und Zusätze für die Fermentation

*Mineralsalzlösung*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	31 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19 mM
NH <sub>4</sub> Cl	25 mM
Na <sub>3</sub> -Citrat • 2 H <sub>2</sub> O	5 mM

*Glucose-Lösungen*

20 % (w/v) Glucose	separat autoklaviert
50 % (w/v) Glucose	separat autoklaviert

*MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung*

MgSO <sub>4</sub>	1 M; separat autoklaviert
-------------------	---------------------------

## Material und Methoden

### *Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung*

Thiamin•HCl 10 mg/ml; sterilfiltriert (0,45 µm)

### *FeCl<sub>3</sub>-Stammlösung*

FeCl<sub>3</sub> • 6 H<sub>2</sub>O 35,0 mg/ml

Mit HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert und sterilfiltriert (0,45 µm).

### *Zn(OAc)<sub>2</sub>-Stammlösung*

Zn(OAc)<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 8,0 mg/ml; sterilfiltriert (0,45 µm)

### *Spurenelement-Stammlösung*

MnCl<sub>2</sub> • 4 H<sub>2</sub>O 3,0 g/l

CuCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O 0,3 g/l

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,6 g/l

CoCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O 0,5 g/l

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> • 4 H<sub>2</sub>O 1,2 g/l

EDTA 4 mM; sterilfiltriert (0,45 µm)

### *Sonstige Lösungen*

12,5 % (w/v) NH<sub>3</sub> zur Regulierung des pH-Werts und gleichzeitig als Stickstoffquelle

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung der Schaumbildung

### Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

#### *TAE Puffer*

Tris 40 mM

Essigsäure 20 mM

EDTA 1 mM

#### *10x Auftragspuffer*

Bromphenolblau 1 mg/ml

Xylencyanol 1 mg/ml

Glycerin 50 % (v/v)

### Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

#### *Laufpuffer (Fling & Gregerson, 1986)*

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) (nur bei reduzierendem Auftragspuffer)

*Färbelösung*

Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)
Coomassie Brilliantblau R-250	0,25 % (w/v)

*Entfärbelösung I*

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

*Entfärbelösung II*

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

Puffer für die Proteinreinigung und Analyse

*AP-Puffer*

Tris/HCl pH 8,8	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

*BBS/E*

	<u>1x</u>	<u>4x</u>
Na-Borat pH 8,0	200 mM	800 mM
NaCl	160 mM	640 mM
EDTA	2 mM	8 mM

*Benzonase-Puffer*

Tris/HCl pH 8,8	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

*Biacore-Laufpuffer (PBS/T 0,05)*

PBS	
Tween 20	0,05 % (v/v)

*CD-Puffer*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,5	20 mM
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 mM

## Material und Methoden

### *Chromatographiepuffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mM
NaCl	0,5 M
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

### *PBS*

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

### *Periplasma-Aufschlusspuffer*

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

### *SA-Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie*

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

### *Waschpuffer für ELISA und Phage Display (PBS/T 0,1)*

PBS	
Tween 20	0,1 % (v/v)

## 2.9 Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1 Kultivierung und Transformation von *E. coli*-Stämmen

*E. coli* BL21, TG1/F<sup>-</sup>, JM83, KS272, Origami B und XL1-Blue wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h kultiviert. Ausgehend von einer Einzelkolonie des jeweiligen Stamms wurden je nach Verwendung Flüssigkulturen in 13 ml Kulturröhrchen oder 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft.

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden die Zellen mit der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) durch kurzzeitige selektive Permeabilisierung der bakteriellen Zellmembran in einen für die Aufnahme von Fremd-DNA empfänglichen Zustand überführt. Ausgehend von einer stationären 2 ml Übernachtskultur (37 °C, 200 rpm, 2 ml LB-Medium) wurde 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und die Kultur für weitere 2-3 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Sobald eine optische Dichte von OD<sub>550</sub> = 0,5 erreicht wurde, wurden die Zellen in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, durch Zentrifugation (4000 rpm, 13 min, 4 °C) vom Kulturmedium befreit und in 40 ml kaltem 0,1 M MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml vorgekühlter 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und zur Permeabilisierung 30 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden schließlich erneut zentrifugiert, auf Eis in 2 ml vorgekühltem 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation mit der Plasmid-DNA wurden 200 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* Zellen mit 1 µl Plasmidlösung bzw. 5 µl eines Ligierungsansatzes (siehe Abschnitt 2.10.3) vermischt und nach 30 minütiger Inkubation auf Eis für 5 min bei 37 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Der Transformationsansatz wurde anschließend in 2 ml LB-Medium in ein 13 ml Kulturröhrchen gegeben und zur Regeneration der Zellen für 45 min bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (versetzt mit einem dem plasmidkodierten Resistenzgen entsprechenden Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.9.2 Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer mit dem entsprechenden Plasmid transformierten stationären Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des *QIAgen Plasmid Kits* (Qiagen, Hilden). Je nach Präparationsmaßstab (20, 100 oder 500 µg Plasmid-DNA) wurden ausgehend von einer frisch mit dem Plasmid-Vektor transformierten *E. coli* Einzelkolonie 4, 50 oder 100 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Die stationäre *E. coli*-Kultur wurde zentrifugiert, der Medienüberstand verworfen und die Plasmid-DNA mit Hilfe des *QIAgen Plasmid Mini-, Midi- oder Maxi-Kits* gemäß Herstellerangaben extrahiert. Die Zellen wurden hierbei zunächst durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA aus dem geklärten Überstand über ein Anionenaustausch-Trägermaterial und durch anschließende Isopropanolfällung gereinigt. Die Konzentration der Plasmidlösungen wurde anschließend im NanoDrop-Photometer durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt und die Lösungen bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.9.3 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte, Plasmid-DNA und Restriktionsansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetrennt und analysiert. Je nach Größe der erwarteten Fragmente wurde ein 0,8 oder 1 %iges (w/v) Agarosegel angefertigt. Hierzu wurde 50 ml Agaroselösung in TAE-Puffer durch Erwärmen im Mikrowellen-Ofen hergestellt und nach dem Abkühlen der Lösung auf mittlere Temperatur mit 50 µl Ethidiumbromid (1 % (w/v); Verhältnis 1:10000) versetzt. Die Lösung wurde in den horizontalen Gelschritten gegossen, nach dem Einsetzen der Geltaschenformer für ca. 1 h erstarren gelassen und das Gel in die mit TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt.

Zur Vorbereitung der DNA-Proben wurden diese mit 10x Auftragspuffer vermischt und je 10 bis 50 µl in die Taschen des Gels pipettiert, wobei eine 100 bp bzw. 1 kb DNA-Leiter als Längenstandard diente. Die Auftrennung der Proben im elektrischen Feld erfolgte bei 90 V für 45-60 min. Die DNA wurde anschließend auf einem Leuchttisch unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm visualisiert und mit Hilfe einer PC-gekoppelten CCD-Kamera und der Software BioCaptMW Version 10.04 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) digitalisiert.

Sollten im Anschluss an die Elektrophorese DNA-Fragmente aus dem Agarosegel isoliert werden, so wurden diese mit einem Skalpell aus dem Gel unter mildem UV-Licht (365 nm) ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. PCR- und Restriktionsansätze wurden zur Abtrennung von Oligonukleotiden < 70 bp ohne vorherige Auftrennung im Agarosegel mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* gereinigt. Die isolierte DNA wurde im letzten Extraktionsschritt in EB-Puffer aufgenommen und die Konzentration durch Absorptionsmessung bei 260 nm im NanoDrop-Photometer ermittelt.

## 2.10 *In vitro* Modifizierung von DNA

### 2.10.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

PCR-Fragmente und Plasmid-DNA wurden für die Klonierung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei gemäß den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung des entsprechenden Reaktionspuffers auf das jeweilige Restriktionsenzym angepasst. Für analytische Spaltungen wurde üblicherweise 1-2 µg DNA mit 2-10 U einer oder zweier Restriktionsendonukleasen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Reaktionen, wie beispielsweise zur Klonierung von Bibliotheken (Abschnitt 2.12.2), erfolgten in einem Volumen von 50 oder 100 µl, wobei bis zu 20 µg DNA mit 30 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert wurde.

### 2.10.2 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden und Dephosphorylierung

Für die „*Blunt End*“-Klonierung von PCR-Produkten wurden diese vor der Ligierung an den 5'-Enden phosphoryliert. Zu diesem Zweck wurde 200 fmol PCR-Primer mit 30 nmol ATP, 10x Reaktionspuffer und 5 U T4 Polynukleotidkinase in einem 30 µl Reaktionsansatz vermischt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die phosphorylierten Primer wurden anschließend direkt für die PCR-Reaktion eingesetzt, wobei für einen 50 µl PCR-Ansatz 25 fmol des phosphorylierten Primers verwendet wurde.

Durch Restriktionsverdau erhaltene Plasmid-DNA mit glatten Enden wurde zur Vermeidung der Rezirkularisierung an den 5'-Termini dephosphoryliert. Hierzu wurde 1 U Alkalische Phosphatase aus *Arctic Shrimp* zu dem präparativen Restriktionsansatz pipettiert und dieser für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde schließlich durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.9.3) gereinigt.

### 2.10.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen erhaltenen kohäsiven Enden verschiedener DNA-Fragmente wurden zur Generierung zirkulärer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurde hierfür 100 µg gereinigtes Plasmidfragment mit der fünffachen molaren Menge des Inserts, 10x Reaktionspuffer, sowie 1 U T4 DNA-Ligase vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend direkt für die Transformation von *E. coli* XL1-Blue gemäß Abschnitt 2.9.1 verwendet.

### 2.10.4 Genamplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von Strukturgenen erfolgte ausgehend von dem plasmidkodierten oder als cDNA vorliegenden Genabschnitt durch Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) entweder mit Hilfe der thermostabilen *Taq* oder *Pfu* DNA-Polymerase bzw., im Fall von Genabschnitten < 2 kb, durch die *Herculase* II Fusion DNA-Polymerase. Oligodesoxynukleotid-Primer wurden unter Berücksichtigung einer Schmelztemperatur von optimalerweise 55-60 °C (bestimmt nach der Wallace-Regel, (Sambrook *et al.*, 1989)) dabei so gewählt, dass sie am 3'-Ende eine Mindestlänge von 18 zum Matrizenstrang komplementären Basen aufwiesen. Zusätzlich enthielten die in Kombination mit der *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzten Oligodesoxynukleotide an ihrem 3'-Terminus eine Phosphothioat-Bindung (Skerra, 1992), um so einen durch die intrinsische 3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase resultierenden partiellen Abbau der Primer zu unterbinden.

Für einen typischen 50 µl PCR-Ansatz wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer (*Pfu*: 200 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1 mg/ml (w/v) BSA, 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM MgSO<sub>4</sub>; *Taq*: 750 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) Tween 20) mit 40 nmol dNTP-Mix, je 25 pmol Primer, 10-100 ng Template-DNA und 1-2,5 U DNA-Polymerase in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und die DNA unter den in **Tabelle 2** angegebenen Reaktionsbedingungen im Thermocycler amplifiziert. Erfolgte die Amplifizierung durch die *Herculase II* Fusion DNA-Polymerase, so wurden in einem 50 µl Ansatz 1-30 ng Template-DNA, 50 nmol dNTP-Mix, je 50 pmol Primer, 10 µl 5x Reaktionspuffer und 2,5 U Polymerase gemischt und die Reaktion gemäß **Tabelle 2** durchgeführt. Das jeweilige PCR-Produkt wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.9.3) analysiert und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* gereinigt.

**Tabelle 2 | Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung von Genabschnitten durch PCR.**

	<i>Taq</i>			<i>Pfu</i>			<i>Herculase II</i>		
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min		95 °C	1 min		95 °C	2 min	
1. Denaturierung	94 °C	30 s		95 °C	1 min		95 °C	20 s	
2. Hybridisierung	*	30 s	30x	*	1 min	25x	*	20 s	30x
3. Elongation	72 °C	**		72 °C	**		72 °C	**	
Vervollständigung der Syntheseprodukte	72 °C	5 min		72 °C	5 min		72 °C	3 min	

\* *Annealing*-Temperatur je nach Primerpaar zwischen 50-65 °C

\*\* Elongation für 1 min pro kb

### 2.10.5 QuikChange-Mutagenese

Das gezielte Einführen von Basen-Substitutionen in einen bestimmten Genabschnitt erfolgte durch ortsgerichtete *in vitro* Mutagenese nach dem *QuikChange*-Verfahren (Papworth *et al.*, 1996). In einer PCR-Reaktion werden dabei unter Verwendung eines die gewünschte Substitution enthaltenden komplementären Primerpaares beide Stränge des Ausgangsplasmids vollständig amplifiziert. Durch den anschließenden Verdau mit der gegenüber *dam*-Methylierung sensitiven Restriktionsendonuklease *DpnI* wird das parentale Ausgangsplasmid anschließend abgebaut, so dass schließlich die neu synthetisierten und die entsprechende Mutation tragenden Plasmidstränge in hybridisierter Form zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt werden können.

Geeignete mutagene Primerpaare mit einer Länge von üblicherweise 28-34 bp wurden dabei in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent) anhand der Templatessequenz gewählt. Ein 50 µl Reaktionsansatz bestand typischerweise aus 10-100 ng des aus einem *dam*<sup>+</sup> *E. coli*-Stamms isolierten Ausgangsplasmids, je 10 pmol Primer, 40 nmol dNTP-Mix, 5 µl 10x Reaktionspuffer und 2,5 U *PfuUltra* HF DNA-Polymerase. Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 30 s wurde das Plasmid in 18 Zyklen aus (1.) Denaturierung für 30 s bei 95 °C, (2.) Primer-Hybridisierung für 1 min bei 55 °C, gefolgt von (3.) der Neustrangsynthese für 4 min bei 68 °C, unter Einführung der entsprechenden Basensubstitution(en) amplifiziert. Der Abbau des Parentalstrangs erfolgte anschließend durch Zugabe von 10 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C. 4 µl des Reaktionsansatzes wurde schließlich direkt zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen (Abschnitt

2.9.1) verwendet. Die Plasmid-DNA von 1-3 Transformanten wurde präpariert (Abschnitt 2.9.2) und die gewünschte Mutation durch Sequenzierung verifiziert.

### 2.11 Phagemid-Präsentation und Selektion

#### 2.11.1 Propagation von VCS-M13 Helferphagen

Für die Anzucht des durch VCS-M13 infizierbaren F<sup>+</sup> *E. coli* Stamms XL1-Blue wurde zunächst eine 4 ml 2xYT Vorkultur mit einer Einzelkolonie eines frischen Ausstrichs angeimpft und diese über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die stationäre Übernachtskultur wurde zur Inokulation von 50 ml 2xYT im Verhältnis 1:100 verwendet und die Zellen bis zu OD<sub>550</sub> = 0,3 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. 10 ml der exponentiell wachsenden Kultur wurde in ein vorgewärmtes, steriles 50 ml-Erlenmeyerkölbchen überführt und entsprechend einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von etwa 10 mit 2 x 10<sup>10</sup> pfu (*Plaque Forming Units*) VCS-M13 Helferphagen infiziert. Die Kultur wurde weitere 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend mit Kanamycin zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml versetzt. Biosynthese und Assembly der Helferphagenpartikel erfolgten für 8 Stunden bei 37 °C und 200 rpm.

Zur Gewinnung der Phagenpartikel wurde die Bakterienkultur im Wasserbad zunächst für 10 min bei 65 °C inaktiviert, kurz auf Eis abgekühlt und in ein autoklaviertes SS-34 Zentrifugenröhrchen transferiert. Zellbestandteile wurden bei 12100 g und 4 °C für 15 min sedimentiert. Der phagenhaltige Überstand wurde über einen Sterilfilter (0,45 µm) in ein steriles 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Die Bestimmung des Phagemidtiters erfolgte durch erneute Infektion von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit einer Helferphagen-Verdünnungsreihe anhand der Plaquebildung im Weichagar-Bakterienrasen. Hierzu wurde eine frische 50 ml 2xYT Kultur 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu OD<sub>550</sub> = 0,5 inkubiert. Währenddessen wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen der Helferphagen in PBS bis zu einer maximalen Verdünnung von 10<sup>-10</sup> vorbereitet, wobei für die Infektion lediglich die Verdünnungsstufen 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-10</sup> verwendet wurden. Pro Verdünnung wurde 3 ml flüssiger Weichagar in ein 13 ml Kulturröhrchen vorgelegt und bei 48 °C im Wasserbad temperiert. Je 100 µl der exponentiell wachsenden *E. coli* Kultur wurde zusammen mit 100 µl der jeweiligen Helferphagen-Verdünnung in den Weichagar pipettiert, vermischt und zügig auf 2xYT/Tet-Platten gleichmäßig ausgegossen. Die Kulturplatten wurden nach dem Erstarren des Weichagars bei Raumtemperatur für 8 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 14 h bei Raumtemperatur wurden die Plaques für die einzelnen Verdünnungen gezählt und der Phagemidtitel ermittelt.

#### 2.11.2 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

Die Anreicherung von VEGFR-3 bindenden Phagemiden aus einer naiven Lcn2-Bibliothek erfolgte mit Hilfe des in *E. coli* produzierten und durch NHS-Kopplung mit Biotin chemisch derivatisierten Target-Proteins VEGFR-3(D1-2) (vgl. Abschnitt 2.16.8). Dieses Protein wurde im sogenannten *Solution Phase Panning* in löslicher Form mit der Phagemidbibliothek inkubiert. Target-Phagemid-Komplexe wurden anschließend durch mit Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel aus der Lösung

abgetrennt (zusammen mit überschüssigem biotinylierten Protein) und für einen weiteren Anreicherungszyklus in *E. coli* amplifiziert.

*Erster Anreicherungszyklus.* Die Phagemidbibliothek der Lipocalin-Varianten wurde freundlicherweise von der Pieris AG zur Verfügung gestellt und lag schockgefroren in BBS/E, 50 mM Benzamidin, 1 µg/ml Pefabloc, 5 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl vor. Zur Vorbereitung der Phagemide wurde 1 ml der Phagemidbibliothek auf Eis aufgetaut und zunächst für 20 min bei 4 °C und 13 000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierten Phagemide in 304 µl eiskaltem PBS/50 mM Benzamidin resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4 °C und 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. 298 µl des Phagemid-haltigen Überstands wurden mit 100 µl PBS, 0,4 % (v/v) Tween 20, 8% (w/v) BSA vermischt und für 1 h im Überkopffrotator geblockt. Für die Bestimmung des Phagemidtiters wurden zuvor 2x 2 µl der Phagemidlösung entnommen und zwei unabhängige Verdünnungsreihen in PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10<sup>-10</sup> angefertigt.

In der Zwischenzeit erfolgte die Präparation der paramagnetischen Partikel. Hierzu wurde 1 mg der mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikel 3x durch Vortexen in je 400 ml PBS, 0,1 % (v/v) Tween 20 (PBS/T 0,1) gewaschen, wobei die Partikel nach jedem Schritt mit Hilfe eines Magnetseparators am Rand des Reaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand vorsichtig entfernt wurde. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend in 1 ml PBS, 0,2 % (v/v) Tween 20, 2 % (w/v) BSA für mindestens 1 h geblockt.

Die geblockte Phagemidlösung wurde mit 2 µl 20 µM biotinyliertem VEGFR-3(D1-2) (vgl. Abschnitt 2.16.8) gemischt, so dass sich ein Volumen von 400 µl ergab und eine Targetkonzentration von 100 nM einstellte. Die Assoziation von Phagemid-Target-Komplexen erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur, wobei die Lösung im Überkopffrotator kontinuierlich durchmischt wurde. Target-gebundene Phagemide wurden daraufhin mit Hilfe der geblockten paramagnetischen Partikel aus der Bibliothek isoliert. Hierzu wurden die Partikel zunächst mit dem Magnetseparator an der Gefäßwand gesammelt, die Blocking-Lösung abgenommen und die Partikel in der Target-Phagemid-Lösung (400 µl) resuspendiert. Durch 30 minütige Inkubation im Überkopffrotator wurden das biotinylierte Target und daran gebundene Phagemide an die Streptavidin-Partikel adsorbiert und anschließend über den Magnetseparator aus der Lösung abgetrennt. Zur Entfernung von schwach oder unspezifisch gebundenen Phagemiden wurden die Partikel 10x mit 1 ml PBS/T 0,1 für jeweils 1 min bei ständiger Rotation gewaschen, wobei die Partikel nach jedem Schritt für 2 min mit dem Magneten gesammelt und der Überstand abgezogen wurde.

Die Elution der Phagemide erfolgte in zwei aufeinander folgenden Desorptionsschritten. Die gewaschenen Partikel wurden hierzu für 30 min in 400 µl 4 M Harnstoff in PBS resuspendiert. Nach Separation der magnetischen Partikel wurde der Überstand mit den noch infektiösen Phagemidpartikeln abgezogen, mit 1 ml PBS gemischt und bis zur Amplifizierung auf Eis aufbewahrt. Für den zweiten Desorptionsschritt wurden die Partikel in 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,2 resuspendiert und für 10 min rotiert. Die Partikel wurden mit Hilfe des Magneten separiert und der erhaltene Überstand sofort mit 55 µl 0,5 M Tris-Base neutralisiert. Zur Amplifizierung der in den beiden Elutionsfraktionen enthaltenen Phagemide wurden diese zu jeweils 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur *E. coli* XL1-Blue gegeben und gemäß Abschnitt 2.11.3 weiterbehandelt.

*Zweiter bis sechster Anreicherungszyklus.* Die zwei aus dem ersten Anreicherungszyklus erhaltenen Sub-Bibliotheken wurden nach der Ampifikation und Präzipitation (Abschnitt 2.15.3) in zwei parallelen Ansätzen jeweils einem zweiten Anreicherungszyklus unterzogen. Die geblockten Phagemidbibliotheken wurden dazu analog zum ersten Zyklus mit 100 nM des biotinylierten Targets inkubiert. Für die Immobilisierung der Target-gebundenen Phagemide wurden allerdings anstelle der Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikel mit NeutrAvidin beladene Partikel eingesetzt, um so eine Anreicherung von Streptavidin-bindenden Lipocalin-Varianten zu vermeiden. Nach 10-maligem Waschen mit je 1 ml PBS/T 0,1 wurden die Target-gebundenen Phagemide von den Partikeln desorbiert, wobei die jeweilige Elutionsmethode des ersten Anreicherungszyklus beibehalten wurde. Die beiden Phagemid-Eluate wurden zur Infektion von zwei exponentiell wachsenden *E. coli* Kulturen eingesetzt und separat amplifiziert (Abschnitt 2.11.3.).

Mit Streptavidin und NeutrAvidin beschichtete paramagnetische Partikel wurden in den folgenden Zyklen (drei bis sechs) alternierend eingesetzt. In den Runden fünf und sechs wurde zudem die Targetkonzentration während der Inkubation mit der Phagemid-Bibliothek von 100 auf 10 nM gesenkt. Alle weiteren Prozessschritte erfolgten analog zum zweiten Zyklus, wobei auch die Elution entweder mit 4 M Harnstoff oder mit Glycin/HCl pH 2,2 fortgeführt wurde.

### 2.11.3 Amplifizierung von Phagemiden

Die aus den einzelnen Anreicherungszyklen erhaltenen Phagemideluate wurden vor jedem neuen Zyklus amplifiziert. Hierfür wurde die eluierte Phagemidkollektion zunächst auf 37 °C vorgewärmt, zu 4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue ( $OD_{550} = 0,5$ ) in 2xYT Medium gegeben und zur Infektion für 30 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden anschließend für 5 min bei 4000 rpm sedimentiert und das Pellet in 800 µl 2xYT Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde verteilt auf insgesamt vier LB/Amp Agarplatten (Ø 14 cm) ausplattiert und für 14 – 16 h bei 32 °C inkubiert.

*Anzucht und Superinfektion mit Helferphagen.* Der entstandene Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers und je 10 ml 2xYT/Amp vorsichtig von den Agarplatten abgeschabt, mit einer 10 ml Einmalpipette resuspendiert und in ein steriles 50-ml Erlenmeyerkölbchen überführt. Um eine homogene Bakteriensuspension zu erhalten, wurde die Kultur für 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Nach Bestimmung der  $OD_{550}$  wurde 50 ml vorgewärmtes 2xYT/Amp Medium mit bis zu 500 µl der resuspendierten Bakteriensuspension auf  $OD_{550} = 0,08$  inokuliert. Nach Erreichen von  $OD_{550} = 0,5$  wurden die Zellen mit  $1,5 \cdot 10^{11}$  VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer MOI von 10 infiziert, für 30 min kultiviert und mit Kanamycin auf eine Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt. Nach weiteren 10 min wurde die Genexpression der Lipocalin-Varianten durch Zugabe von 5 µl einer 0,25 mg/ml Anhydrotetracyclin-Lösung (Endkonzentration = 25 µg/l) induziert, und die Biosynthese der Phagemide erfolgte für 7 h bei 26 °C und 140 rpm. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension auf zwei sterile SS-34 Zentrifugenröhrchen verteilt, für 20 min bei 12100 g sedimentiert und der Phagemid-haltige Überstand abgetrennt und sterilfiltriert (0,45 µm).

*Präzipitation der Phagemide.* Zur Abtrennung der Phagemide vom Kulturmedium wurde der filtrierte Phagemid-haltige Kulturüberstand in zwei neue sterile SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt und mit ¼ Volumen einer frisch hergestellten eiskalten Lösung von 20 % (w/v) PEG8000, 15 % (w/v) NaCl über Nacht präzipitiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation (18000 g, 4 °C) wurde der Überstand vollständig



entfernt und das Phagemid-Präzipitat in jeweils 1 ml sterilem kaltem BBS/E, 50 mM Benzamidin resuspendiert. Die Phagemid-Lösungen aus beiden SS-34 Röhrchen wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt, für 30 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C erneut zentrifugiert. Je 1 ml des Überstands wurden auf 2 frische 1 ml Reaktionsgefäße verteilt. Durch Zugabe von ¼ Volumen (250 µl) eiskaltem 20 % (w/v) PEG8000, 15 % (w/v) NaCl wurden die Phagemide ein zweites Mal für 30 min auf Eis gefällt und anschließend für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm sedimentiert. Die präzipitierten Phagemide wurden schließlich in 304 µl PBS, 50 mM Benzamidin resuspendiert und der Überstand nach abschließender Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 13000 rpm einer neuen Anreicherungsrunde zugeführt.

#### 2.11.4 Titerbestimmung

Zur Dokumentation des Selektionsverlaufs wurden nach jedem Anreicherungszyklus die Phagemid-Titer der eingesetzten Bibliothek, der Eluatfraktionen sowie ausgewählter Waschfraktionen bestimmt. Ausgehend von der jeweiligen Phagemid-Fraktion wurden in einer sterilen 96-Well Mikrotiterplatte (Vertiefungen mit V-Boden; Sarstedt) zwei unabhängige Verdünnungsreihen in PBS hergestellt und diese auf 37 °C vorgewärmt. Je 20 µl der Phagemid-Verdünnungen wurden in eine frische Mikrotiterplatte überführt und mit 180 µl exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Blue Zellen ( $OD_{550} = 0,5 - 0,7$ ) vermischt. Zur Kontrolle der Bakterienkultur auf Kontaminationen wurde zudem eine Probe der Bakteriensuspension mit 20 µl PBS versetzt. Die Infektion der *E. coli* Zellen erfolgte anschließend für 30 min bei 37 °C. Ausgewählte Verdünnungsstufen wurden auf vorgewärmten LB/Amp-Agarplatten ausplattiert (Dreifachbestimmung), wobei entweder 100 µl Bakterien-suspension direkt auf der gesamten Kulturplatte ausgestrichen oder lediglich 10 µl Suspension auf einem achtel der Kulturplatte aufgespottet wurde. Nach Inkubation bei 37 °C für 12 – 16 h wurden zur Titerbestimmung die resultierenden Kolonien schließlich ausgezählt und nach Korrektur um den entsprechenden Verdünnungsfaktor in CFU/ml angegeben.

#### 2.11.5 Konservierung von Phagemiden und Phasmid-DNA

Die Konservierung von Phagemid-(Sub)Bibliotheken erfolgte zum einen in Form von Glycerinkulturen, zum anderen durch Präparation des genetischen Materials (Phasmid-DNA). Ausgangspunkt dafür stellte nach jedem Anreicherungszyklus die während des Pannings mit dem Phagemid-Eluat infizierte und zur Amplifizierung der Phagemide von den Kulturplatten abgeschabte *E. coli*-Kultur dar (Abschnitt 2.11.3). Für die Anfertigung einer Glycerinkultur wurde 5 ml der resuspendierten Bakteriensuspension in einem 13-ml Kulturröhrchen für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml LB mit 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die erhaltene Glycerinkultur wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Isolierung des genetischen Materials wurde ausgehend von der Bakteriensuspension eine frische 50 ml 2xYT/Amp Kultur zu  $OD_{550} = 1$  angeimpft. Die Kultur wurde für 8 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (200 rpm) bis zur stationären Phase kultiviert und die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, Sigma 4K12) sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde schließlich eingefroren und bis zur Präparation des Phasmids (Abschnitt 2.9.2) bei -20 °C aufbewahrt.

## 2.12 Affinitätsmaturierung

### 2.12.1 Error-Prone PCR

Die Diversifizierung von Anticalinen zum Zweck der Affinitätsmaturierung erfolgte durch Error-Prone PCR (Martineau, 2002), mit Hilfe derer ausgehend von einem gegebenen Anticalin zufällige Punktmutationen in den amplifizierten Genabschnitt eingeführt wurden. Als Template diente die auf dem Expressionsplasmid pNGAL98 vorliegende Gensequenz eines Anticalins, welche zunächst in einer initialen PCR mit den Primern F83 und PR1 unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase gemäß Abschnitt 2.10.4 amplifiziert wurde. Das nur das Anticalin-Gen umfassende Reaktionsprodukt wurde anschließend als Template für die Error-Prone PCR eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte dabei durch die hinsichtlich der *Proof-Reading* Funktion degenerierte Mutazyme II DNA-Polymerase (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit). Als Primer dienten zwei Oligodesoxynukleotide (*Bst*XI\_3004-2\_for und *Bst*XI\_3004-2\_rev), die im Bereich der die Ligandenbindestelle flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen hybridisieren. Um eine durchschnittliche Mutationsrate von 3-4 Aminosäuren pro Klon zu erhalten, wurde 0,2 fmol des amplifizierten Fragments, 2,5 U Mutazyme II DNA-Polymerase, je 9 pmol Primer, 1 µl 40 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x Mutazyme II Reaktionspuffer und 41,5 µl ddH<sub>2</sub>O in einem PCR-Tube vermischt. Die Reaktion erfolgte nach der initialen Denaturierung für 2 min bei 95 °C in 30 Zyklen aus (1.) 30 s 95 °C, (2.) 30 s 57 °C und (3.) 1 min 72 °C, gefolgt von einem abschließenden Elongationsschritt für 1 min bei 72 °C.

### 2.12.2 Herstellung einer Phagemidbibliothek

*Bst*XI-Verdau und Ligierung. Das aus der Error-Prone PCR resultierende randomisierte DNA-Fragment wurde mit Hilfe des *QIAGEN Gel Extraktion Kit* von den anderen Komponenten der PCR-Reaktion befreit und gemäß Abschnitt 2.10.1 mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI verdaut. In gleicher Weise wurde der Phage Display Vektor pNGAL108 geschnitten und das Plasmid-Rückgrat sowie das PCR Amplifikat durch präparative Gelelektrophorese gereinigt. Für die Ligierung wurde 8 – 37 µg des pNGAL108 Vektor-Rückgrats mit einer äquimolaren Menge des Inserts und der T4 DNA-Ligase (5 U/µl), 10x Ligase Puffer und ddH<sub>2</sub>O vermischt, so dass sich eine finale DNA-Konzentration von 10 ng/µl bzw. eine Ligase-Konzentration von 0,1 U/µl einstellte. Die Ligierung erfolgte anschließend für 16 – 24 h bei 16 °C im Wasserbad.

*Transformation von E. coli durch Elektroporation.* Zur Vorbereitung der DNA für die Elektroporation wurde der Ligierungsansatz zunächst durch Ethanol-fällung gereinigt. Der Ligierungsansatz wurde dazu mit 1 Volumen 5 M NH<sub>4</sub>OAc, 1/40 Volumen 10 mg/ml tRNA in TE sowie dem vierfachen Volumen Ethanol (p.a.) versetzt. Die Fällung erfolgte für 1 h bei RT. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C wurde der Überstand entfernt, das DNA-Pellet mit 2 ml 70 % (v/v) Ethanol (p.a.) gewaschen und erneut für 30 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde für 30 min an der Luft getrocknet und die DNA schließlich zu 0,1 µg/µl in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

*E. coli* XL1-Blue Zellen wurden in 1 L LB-Medium im Schüttelkolben zu exponentiellem Wachstum herangezogen und wie beschrieben (Gebauer & Skerra, 2012) durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin von Mediumresten befreit und in 1 ml eiskaltem GYT-Medium aufgenommen. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines Micro Pulser Elektroporators (Bio-Rad), wobei jeweils 100 µl Zellsuspension mit 10 µl DNA in einer Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm, Bio-Rad) vermischt, für 1 min auf Eis inkubiert und für 5 ms bei einer Feldstärke von

12,5 kV/cm elektroporiert wurden. Die Zellen wurden anschließend sofort in 2 ml eiskaltem SOC-Medium aufgenommen und in einem sterilen Erlenmeyerkölbchen bei 37 °C und 180 rpm für 1 h geschüttelt. Zur Bestimmung der Komplexität der Bibliothek wurde eine Probe der Bakterien-suspension entnommen, eine Verdünnungsreihe auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und die erhaltenen Kolonien ausgezählt. Die so erhaltenen Bibliotheken wiesen üblicherweise  $3 - 7,5 \times 10^9$  individuelle Varianten auf.

*Präparation von Phagemidbibliotheken.* Die Herstellung einer Phagemidbibliothek erfolgte ausgehend von der frisch durch Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue Zellen gewonnenen Kultur. Die erhaltene Bakterien-suspension wurde mit 1 L 2xYT/Amp in einem 5 L Erlenmeyerkolben zu  $OD_{550} = 0,1 - 0,2$  verdünnt und bis zu einem Wiedererreichen einer  $OD_{550}$  von 0,6 bei 37 °C geschüttelt. 200 ml der Kultur wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und die Zellen mit VCS-M13 Helferphagen (Abschnitt 2.11.1) entsprechend einer MOI von 10 superinfiziert. Die Produktion und Präparation der Phagemide wurde schließlich wie in Abschnitt 2.11.3 beschrieben fortgeführt.

### 2.12.3 Affinitätsanreicherung

Die Affinitätsanreicherung von Anticalin-Varianten mit verbesserten Target-Bindungseigenschaften erfolgte analog dem in Abschnitt 2.11 beschriebenen Verfahren zur Selektion von Lcn2-Varianten aus einer naiven Phagemidbibliothek, allerdings unter stringenteren Bedingungen. Insgesamt wurden zwei Maturierungsrunden durchgeführt, wobei in der ersten Runde eine auf dem Anticalin U3D7 basierende bzw. in der zweiten Runde eine aus dessen Tochterklon A4N10 generierte Phagemidbibliothek durchmustert wurde. In beiden Fällen diente das in Säugerzellen produzierte VEGFR-3 Fragment D1-7 als Target-Molekül und wurde in biotinylierter Form in Lösung mit der Phagemidbibliothek inkubiert.

Die Selektion von Varianten mit verbesserter Affinität erfolgt in der ersten Maturierungsrunde (U3D7) in vier aufeinanderfolgenden Anreicherungszyklen. Eine Endkonzentration von 10 nM D1-7-Bio wurde in den ersten zwei Zyklen eingesetzt und zur Erhöhung des Selektionsdrucks in den folgenden zwei Zyklen auf 1 nM reduziert. Target-gebundene Phagemide wurden durch mit Streptavidin bzw. NeutrAvidin beschichtete paramagnetische Partikel gebunden und unter sauren Bedingungen (Glycin/HCl pH 2,2) eluiert.

In der zweiten Maturierungsrunde wurden ausgehend von A4N10 gezielt die kinetischen Bindungskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  beeinflusst. Zur Selektion von Varianten mit einer hohen Komplexassoziationsrate ( $k_{on}$ ) wurde die Inkubation der Phagemidbibliothek mit dem Targetmolekül von 60 auf 5 min verkürzt. Nach der Adsorption von Target-Phagemid-Komplexen an die paramagnetischen Partikel wurden schwach gebundene Phagemide in 10 aufeinanderfolgenden Waschschritten mit PBS/T 0,1 entfernt. Für die gezielte Anreicherung von Varianten mit einer langsameren Dissoziationsrate ( $k_{off}$ ) wurde dabei im ersten Waschschriff ein 100-fach molarer Überschuss des nicht-biotinylierten Targets zugesetzt und dieser auf 60 min verlängert; die folgenden neun Waschschriffe erfolgten wie zuvor für jeweils 1 min.

### 2.13 Screening auf individuelle Bindungsaktivität im ELISA

Die in dem nach vier bzw. sechs Anreicherungszyklen (Abschnitt 2.11) durch Phage Display selektierten Lipocalin-Varianten wurden in einem Screening-ELISA Verfahren auf individuelle Target-Bindungsaktivität untersucht, um so einzelne Klone zu identifizieren. Die Lipocalin-Varianten wurden hierzu in löslicher Form im Mini-Expressionsmaßstab in *E. coli* produziert und deren Bindungsaktivität direkt im Rohextrakt durch ELISA nachgewiesen.

*Subklonierung.* Als Expressionsplasmid diente hierzu der generische Vektor pNGAL98, welcher die wesentlichen Elemente des in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen pASK75-Plasmids enthält und die Produktion von Lcn2 bzw. Lcn2-Varianten als periplasmatische Proteine mit einer N-terminalen OmpA-Signalsequenz sowie einem C-terminalen *Strep*-tag II unter Kontrolle des *tet*-Promotors ermöglicht. Die Plasmid-DNA des angereicherten Phagemid-Pools aus dem letzten Selektionszyklus wurde präpariert (Abschnitt 2.11.5) und die Genkassette mit der randomisierten Ligandenbindestelle durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI gemäß Abschnitt 2.10.1 ausgeschnitten. Die Genkassette wurde daraufhin mit dem Rückgrat des zuvor analog geschnittenen Vektors pNGAL98 ligiert (Abschnitt 2.10.3), und chemisch kompetente *E. coli* TG1/F<sup>-</sup>-Zellen wurden mit dem Ligierungsansatz transformiert.

*Anzucht und Expression im 96-Well Maßstab.* 100 µl TB/Amp-Medium wurden in den Vertiefungen einer sterilen 96-Well Kulturplatte mit rundem Boden vorgelegt und mit Einzelkolonien – darunter auch das Wildtyp-Lcn2 als Kontrolle – angeimpft. Die Minikulturen wurden über Nacht bei Raumtemperatur und 180 rpm angezogen. Eine neue Kulturplatte wurde mit 100 µl frischem TB/Amp-Medium befüllt und die Hauptkultur durch dreimaliges Überimpfen der Vorkultur mit einem 96-Well-Replikator inokuliert. Die Kulturplatte wurde für 2 h bei 37 °C und daraufhin für 1 – 1,5 h bei 22 °C im Schüttelinkubator (Infors Multitron) bei 180 rpm und einer anfänglichen Luftfeuchte von 70 % bis OD<sub>550</sub> = 0,3 – 0,5 (gemessen im 96-Well Format; SpectraMax 250) inkubiert. Die Biosynthese der rekombinanten Lipocalin-Varianten wurde durch Zugabe von 20 µl 1,2 µg/ml Anhydrotetracyclin in TB/Amp-Medium für 16 h bei 20 °C und 180 rpm induziert.

*Präparation des Rohextraktes.* Zur Extraktion der Lipocalin-Varianten aus der Expressionskultur wurden die Zellen mit 40 µl 4x BBS/E und 1 mg/ml Lysozym versetzt und für 1 h bei 4 °C der enzymatischen Lyse unterworfen. Der Rohextrakt wurde mit 40 µl 10 % (w/v) BSA in PBS/ 0,5 % (v/v) Tween 20 für eine weitere Stunde geblockt und durch Zentrifugation (Sigma 4-16K, 5000 rpm, 15 min, 4 °C) geklärt.

*ELISA.* Maxisorp-Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl pro Vertiefung einer 0,5 µM Targetlösung (D1-2, D1-7) oder Ovalbumin als Kontrollprotein in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet und für 2 h mit 3 % BSA (w/v) in PBS/T 0,1 abgesättigt. Nach 5-maligem Waschen der ELISA-Platte mit PBS/T 0,1 (Mikrotiterplatten-Washer) wurde 120 µl des präparierten *E. coli*-Extrakts in die Vertiefungen pipettiert und die Platte für 1,5 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Die ELISA-Platte wurde erneut 5x mit PBS/T 0,1 gewaschen und 50 µl *Strep*-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1500 in PBS/T 0,1) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die chromogene Reaktion wurde schließlich nach 5-maligem Waschen durch Zugabe von 100 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer gestartet und die Absorption bei 405 nm in den einzelnen Vertiefungen durch Endpunktmessung im ELISA-Reader (SpectraMax 250) bestimmt.

## 2.14 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

### 2.14.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben

Wildtyp-Lcn2, Lcn2-Varianten und die VEGFR-3-Fragmente D1, D2.1, D2.2, D3 wurden als periplasmatische Proteine in *E. coli*-Kulturen in 2 L LB-Medium im 5 L Schüttelkolben exprimiert. Die hierfür verwendeten Plasmide kodierten am N-Terminus des Proteins für die Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA), welches die Translokation des Proteins in das bakterielle Periplasma bewirkt. CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen der *E. coli*-Stämme BL21 (wtLcn2), TG1/F<sup>-</sup> (Lcn2-Varianten) bzw. JM83 (VEGFR-3 Fragmente) wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und eine Einzelkolonie in 50 ml LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, angeimpft. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte über Nacht bei 30 °C im Schüttelinkubator bei 200 rpm. Für die Hauptkultur wurde 2 L antibiotikumhaltiges LB-Medium mit 1/100 Volumen der stationären Vorkultur inokuliert und die Kultur bis zu OD<sub>550</sub> = 0,5 bei 22 °C und 180 rpm kultiviert. Die Genexpression wurde durch Zugabe von 200 µl 2 mg/ml Anhydrotetracyclin induziert und die *E. coli*-Kultur für weitere drei Stunden kultiviert. Wurden größere Proteinmengen benötigt, erfolgte die Expression bei höheren Zelldichten. Eine 2 ml Vorkultur wurde hierfür für 6 h bei 37 °C angezogen und die Hauptkultur mit 800 µl der Vorkultur inokuliert. Nach 14 – 16 stündiger Inkubation bei 22 °C und 180 rpm wies die Kultur üblicherweise OD<sub>550</sub> ≈ 2 auf, woraufhin die Genexpression für 5 h induziert wurde.

Anticaline fusioniert mit dem Reporterprotein eGFP (ChromoCaline) wurden als lösliche Proteine im bakteriellen Cytoplasma des *E. coli*-Stamms Origami B exprimiert, wobei die Kultivierung der Zellen in 2xYT Medium erfolgte. Die Vorkultur wurde in diesem Fall bei 37 °C angezogen, die Proteinexpression erfolgte nach der Induktion bei OD<sub>550</sub> = 0,5 für 5 h bei 30 °C.

Die Bakterien aus der jeweiligen Expressionskultur wurden schließlich durch Zentrifugation (5000 rpm, 13 min, SLA-3000 oder F10 4x 1L LEX) geerntet und der Medienüberstand verworfen.

*Präparation des Periplasmaextrakts.* Nach Ernte der Expressionskultur wurden die Bakterien in 1/100 Kulturvolumen eiskaltem Periplasmaaufschlusspuffer zügig resuspendiert und die Suspension in einem 50 ml Greiner-Röhrchen für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Sedimentation der Sphäroplasten wurden diese für 15 min bei 5000 rpm (Sigma 4K15) und 4 °C zentrifugiert und die periplasmatische Fraktion als Überstand abgenommen. Der Extrakt wurde schließlich durch einen erneuten Zentrifugationsschritt (SS-34, 13000 rpm, 4 °C, 15 min) geklärt und über Nacht gegen ein 100-faches Volumen eines für die entsprechende Proteinreinigung geeigneten Chromatographiepuffers dialysiert sowie sterilfiltriert (0,45 µm).

*Präparation des Gesamtzellextrakts.* Zur Präparation eines Gesamtzellextraktes, wie im Fall der ChromoCaline, wurden die Zellen nach der Ernte in 1/40 Kulturvolumen SA-Puffer resuspendiert und im Panda-Homogenisator in vier Passagen bei einem maximalem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Der erhaltene Gesamtzellaufschluss wurde erneut zentrifugiert (SS-34, 15 000 rpm, 20 min, 4 °C) und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Der Extrakt wurde schließlich sterilfiltriert (0,45 µm) und die ChromoCaline gemäß Abschnitt 2.16.1 gereinigt.

*Präparation von Gesamtzellextrakten für die SDS-PAGE.* Zur Analyse der Proteinproduktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Induktion der Genexpression je 1 ml Probe der Expressions-

kultur genommen und diese für 3 min bei 13000 rpm (Eppendorf MiniSpin) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 80 µl kaltem Benzonase-Puffer mit 2 U/ml Benzonase sowie 20 µl reduzierendem 5x Auftragspuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Das Zelllysate wurde anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 95 °C hitzedenaturiert und die Proben für SDS-PAGE verwendet.

### 2.14.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Laborfermenter

Für den Einsatz des VEGFR-3(D1-2) Fragments als Target-Protein für das Phage Display wurde dieses nach einem publizierten Verfahren (Schiweck & Skerra, 1995) durch *E. coli* Fermentation im 8 L Maßstab produziert. Die Produktion erfolgte dabei im sogenannten *Fed Batch*-Prozess, bei welchem kontinuierlich mit Glucose gefüttert wird. Gleichzeitig wird sowohl der pH-Wert als auch der Gehalt an gelöstem Sauerstoff (pO<sub>2</sub>) durch entsprechende Messelektroden erfasst und durch den Eintrag von Ammoniak bzw. Sauerstoff reguliert.

*E. coli* KS272 diente hierfür als Expressionsstamm und wurde mit den Plasmiden pASK75-Flt4-D1-2ΔYS-His und pTUM4 kotransformiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte entsprechend der auf den beiden Plasmiden kodierten Resistenzgene in Amp/Cam-haltigen Selektivmedium. Das Fermentationsverfahren erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll (Schiweck & Skerra, 1995) in 8 L glucosehaltigem Mineralsalzmedium, wobei die Expression des rekombinanten Proteins bei OD<sub>550</sub> ≈ 20 durch Zugabe des Induktors Anhydrotetracyclin (80 µl 5 mg/ml in DMF) für 2,5 h bei 25 °C induziert wurde. Die externe Zuführung von Glucose und Sauerstoff erfolgte mit Beginn der exponentiellen Wachstumsphase ab OD<sub>550</sub> ≈ 7,5. Der pH-Wert wurde bereits nach Inokulation der Hauptkultur durch die schrittweise Zugabe von 12,5 % (w/v) NH<sub>3</sub> auf 6,9 eingestellt. Die Kultur wies 2,5 h nach Induktion der Genexpression üblicherweise eine OD<sub>550</sub> von ca. 30 auf, woraufhin die Bakterien durch Zentrifugation (F10-4x1L Lex, 5000 rpm, 30 min, 4 °C) geerntet und in ca. 500 ml Periplasmaaufschlusspuffer (entsprechend V [mL] = OD<sub>550</sub> x Kulturvolumen [L] x 2), versetzt mit 250 µg/ml Lysozym und 15 mM EDTA, resuspendiert wurden. Die Zellsuspension wurde 20 min bei 4 °C gerührt und die Sphäroplasten durch erneute Zentrifugation (SLA-1500, 21500 g, 40 min, 4 °C) sedimentiert. Der so gewonnene Periplasmaextrakt wurde durch erneute Zentrifugation (gleiche Bedingungen) von verbleibenden Zellen und Trümmern befreit und zur Vorbereitung auf die Metallchelate-Affinitätschromatographie 4x gegen 5 L Chromatographiepuffer dialysiert und sterilfiltriert (0,45 µm).

## 2.15 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in Zellkultur

### 2.15.1 Kultivierung der humanen Zelllinie 293T

Die adhärenz wachsende *Human Embryonic Kidney* Zelllinie 293T (HEK-293T) wurde freundlicherweise von der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des LMU Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; supplementiert mit 4,5 g/L Glucose, L-Glutamin) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Passagierung wurden die Zellen typischerweise in einer T75-Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche für 3 bis 4 Tage bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert und anschließend gesplittet. Dazu wurde das Medium von dem einschichtigen Zellrasen durch Absaugen entfernt, die Zellen vorsichtig mit 20 ml

PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,2 % in DPBS) für 5 min bei 37 °C von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst. Durch Zugabe von 9,5 ml Vollmedium wurde Trypsin inaktiviert, und 1/20 der resultierenden Zellsuspension (0,5 ml) wurde in eine neue, mit 24,5 ml frischem Medium befüllte T75-Kulturflasche transferiert.

Für die Kryokonservierung wurde die Zellsuspension (10 ml) nach Trypsin-Inaktivierung in ein steriles 10 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen bei 300 g für 5 min sedimentiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen entsprechend einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  pro ml (bestimmt mit Hilfe der Neubauer Zählkammer) in Kryomedium (50 % DMEM, 40 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und zu jeweils 1 ml auf Kryoröhrchen mit Außengewinde verteilt. Mit Hilfe des Kryo- Gefrierbehälters Mr. Frosty wurden die Aliquots schonend und stetig 1 °C/min auf -80 °C abgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte im Flüssigstickstofftank.

#### 2.15.2 Transfektion und transiente Expression in 293T-Zellen

Das 97 kDa große VEGFR-3(D1-7) Fragment wurde aufgrund seines komplexen (mehrfach disulfid-verbrückten und glycosylierten) Aufbaus in der humanen Zelllinie 293T produziert. Das zu diesem Zweck konstruierte Expressionplasmid pM61-Flt4-D1-7-His (Abschnitt 3.1.2) trug die Gensequenzen für die extrazellulären VEGFR-3 Domänen 1-7 unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors sowie das Strukturgen mit einer zweiten internen Ribosomenbindestelle für das Reporterprotein eGFP. VEGFR-3(D1-7) wird aufgrund seiner terminalen Signalsequenz durch die Zellmembran geschleust und in das Medium sekretiert, aus welchem es mit Hilfe des C-terminalen His-Tags anschließend isoliert werden kann.

Die Transfektion und Proteinexpression im präparativen Maßstab erfolgte in sterilen Polyesterol-Rollerflaschen (2,5x, kurze Form, mit Gasaustauschkappe; Greiner Bio-One) mit einer durch eine wellenförmige Gefäßwand vergrößerten Wachstumsfläche von 2125 cm<sup>2</sup>. Um eine entsprechend hohe Zellzahl zu erreichen, mussten die Zellen zunächst expandiert werden. Die geschah, indem die Zellen aus einer 90 % konfluenten T75-Kulturflasche mit Trypsin/EDTA abgelöst, in eine T150-Flasche überführt und für 2 Tage kultiviert wurden. Nach dem Wiedererreichen der 90 %igen Konfluenz nach 2 Tagen wurden die Zellen aus der T150-Flasche (typischerweise ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen) in eine Polyesterol-Rollerflasche mit 250 ml DMEM, 10 % (v/v) FKS ausgesät und für 2 weitere Tage unter Rollen bei 1 rpm expandiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium vorsichtig abgezogen und gegen 225 ml DMEM, versetzt mit 2 % (v/v) FKS und 1x nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA), ausgetauscht.

Für die Transfektion wurde 500 µg lineares Polyethylenimin (PEI; 25 kDa) mit 250 µg des Expressionplasmids pM61-Flt4-D1-7-His in 25 ml serumfreien DMEM durch Vortexen gründlich gemischt und zur Komplexbildung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde im Anschluss zu den Zellen in die mit 225 ml DMEM, 2 % (v/v) FKS, NEAA befüllten Rollerflaschen gegeben, so dass sich eine finale DNA-Konzentration von 1 µg/ml einstellte. Um eine effiziente Anlagerung und Aufnahme der PEI:DNA-Komplexe in die Zellen zu ermöglichen, wurde die Drehzahl des Rollers innerhalb der ersten 6 Stunden auf 0,3 rpm reduziert. Die Expression von VEGFR-3(D1-7) erfolgte für insgesamt 4 Tage bei 1 rpm. Für eine bessere Versorgung der Zellen und höhere Proteinausbeute wurde der proteinhaltige Medienüberstand bereits am Tag 2 abgenommen und gegen 250 ml frisches DMEM, 2 % (v/v) FKS, NEAA ausgetauscht. Nach zwei weiteren Tagen wurde die Expression

durch erneutes vorsichtiges Abziehen des Überstandes beendet und VEGFR-3(D1-7) aus den so gewonnenen Überständen isoliert. Die Effizienz des Gentransfers wurde anhand der Expression des eGFP-Reporterproteins im Fluoreszenzmikroskop (Bandpassfilter BP450-490) überprüft.

Die proteinhaltigen Medienüberstände wurden vereinigt und durch Filtration (0,45 µm) von verbleibenden Zellen und Trümmern befreit, und der geklärte Extrakt wurde bis zur Aufarbeitung bei 4 °C gelagert. Die Expression erfolgte typischerweise in 4 Rollerflaschen gleichzeitig, so dass insgesamt 2 L proteinhaltiger Kulturüberstand für die Präparation des Proteins zur Verfügung standen. Für die IMAC (siehe Abschnitt 2.16.2) wurde der Kulturüberstand durch Cross-Flow-Filtration über eine Sartocoon PVDF-Membran (MWCO: 30 kDa, Satorius) eingeeengt in einen geeigneten Puffer überführt.

## 2.16 Proteinchemische Methoden

### 2.16.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus einem periplasmatischen oder Gesamtzellextrakt erfolgte unter Anwendung der Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) (Schmidt & Skerra, 1994) basierend auf dem hierfür mit dem C-Terminus des Proteins fusionierten *Strep*-tag II. Zur Durchführung der Chromatographie wurde eine peristaltische Pumpenanlage in Kombination mit einem nachgeschalteten UV-Detektor eingesetzt, was einen konstanten Pufferfluss sowie die gleichzeitige Detektion der Absorption bei 280 nm ermöglichte. Je nach erwarteter Proteinausbeute wurde für die Chromatographie eine mit *Strep*Tactin-Sepharose gepackte Säule mit einem Bettvolumen von 4 oder 25 ml verwendet. Alle SAC-Reinigungen wurden grundsätzlich bei 4 °C durchgeführt. Die Chromatographie-Säule wurde bei einer Flussrate zwischen 0,5 und 3 ml/min mit 10 Säulenvolumina SA-Puffer äquilibriert und der filtrierte (0,45 µm) und gegen SA-Puffer dialysierte Extrakt auf die Säule aufgetragen.

Im Fall von Gesamtzellextrakten, wie z.B. bei der Produktion von eGFP-Fusionsproteinen, wurde dieser zunächst mit 1 nmol Streptavidin (aus Eigenproduktion) pro L Kulturvolumen versetzt, um freies Biotin oder biotinylierte Proteine zu komplexieren. Ungebundene Proteine wurden mit SA-Puffer von der Säule gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht wurde. Spezifisch über das *Strep*-tag II gebundenes Protein wurde schließlich mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Proben des gereinigten Proteineluats wurden durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.16.5) auf Proteingehalt und Reinheit überprüft. Die Regenerierung des Säulenmaterials erfolgte durch langsames Spülen mit 10 Säulenvolumina HABA bis zu einer starken Orangefärbung des Säulenmaterials. Zur Vorbereitung der Säule für einen weiteren Chromatographie-Lauf wurde gebundenes HABA zunächst mit 2 Säulenvolumina 0,1 M Tris-Base entfernt und die Säule schließlich bis zum Erreichen der Basislinie mit SA-Puffer gespült.

### 2.16.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Proteinreinigung mit Hilfe der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Affinität von Proteinen zu einer mit einem partiell chelatisierten Übergangsmetallion beladenen Chromatographiesäule. Proteine binden das immobilisierte Metallion durch oberflächenexponierte His- und Cys-Reste über dessen freie Koordinationsstellen und können



anschließend durch Elution mit einem imidazolhaltigen Puffer eluiert werden. Die Fusion eines aus sechs Histidinresten bestehenden Affinitätsanhängsels mit dem C- oder N-Terminus des Proteins bewirkt eine verstärkte Bindung an die Chromatographiesäule, so dass das Zielprotein durch Anlegen eines linearen Imidazolgradienten wirksam von einigen schwächer gebundenen Wirtzellproteinen abgetrennt werden kann.

Die Reinigung der in *E. coli* oder Zellkultur produzierten Proteine erfolgte stets an einer mit  $Zn^{2+}$  beladenen und mit Iminodiessigsäure (IDA) derivatisierten Sepharose-Säule, die über eine peristaltische Pumpenanlage mit einer Flussrate zwischen 0,5 und 3 ml/min betrieben wurde. Der Verlauf der Reinigung wurde mit Hilfe eines UV-Detektors bei 280 nm photometrisch verfolgt. Zur Vorbereitung der Chromatographiesäule wurde diese mit 10 Säulenvolumina 10 mM  $ZnSO_4$  beladen, mit 5 Säulenvolumina Wasser gespült und schließlich mit 10 Säulenvolumina IMAC-Laufpuffer (40 mM  $NaH_2PO_4$ , 0,5 M NaCl, pH 7,5) äquilibriert. Anschließend wurde der zuvor gegen IMAC-Laufpuffer dialysierte oder durch Querstromfiltration (MWCO: 30 kDa) umgepufferte und sterilfiltrierte (0,45  $\mu m$ ) Proteinextrakt auf die Chromatographie-Säule aufgetragen, und nicht gebundene Proteine wurden bis zum Erreichen der Basislinie von der Säule gespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch das Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 20 Säulenvolumina einer imidazolhaltigen Laufpufferlösung von 0 – 125 mM, pH 7,5. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt, gleich mit EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM versetzt und durch SDS-PAGE im Hinblick auf Reinheit und Proteingehalt analysiert. Für die Reinigung von Proteinen aus einer *E. coli* Fermentation wurde üblicherweise eine Chromatographiesäule mit einem Bettvolumen von 25 ml verwendet und der Extrakt vor dem Auftragen mit 10 mM Imidazol (Endkonzentration) versetzt. Extrakte aus einer 2 L Schüttelkolbenkultur wurden typischerweise auf eine 2 ml Säule aufgetragen. Das aus insgesamt vier Rollerflaschen Säugerzellkultur gewonnene VEGFR-3(D1-7) wurde über eine Säule mit 4 ml Bettvolumen gereinigt. Alle IMAC-Reinigungen wurden bei 4 °C durchgeführt.

### 2.16.3 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Die Auftrennung von Proteingemischen durch Ionenaustauschchromatographie beruht auf den unterschiedlichen Ladungseigenschaften (Gesamtladung, Ladungsverteilung und -dichte) von Proteinen. In Abhängigkeit von der Nettoladung der Proteinoberfläche können Proteine in verschiedenem Ausmaß mit einem geladenen Chromatographie-Medium interagieren. Die Ladung eines Proteins ist dabei individuell stark vom umgebenden pH-Wert abhängig, wobei der pI-Wert nur als grobe Richtlinie gilt.

Die IEX wurde an einer Äkta FPLC-Anlage unter Messung der Proteinabsorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit des Puffers bei einer Flussrate von 2 ml/min betrieben. Für die Reinigung der verschiedenen VEGFR-3 Fragmente im Anschluss an die IMAC wurde aufgrund ihres negativen Ladungscharakters ( $pI > 6$ ) eine mit quartären Ammoniumgruppen derivatisierte Resource Q-Säule (Anionenaustauschchromatographie, AEX) mit 1 ml Bettvolumen in Kombination mit 40 mM  $NaP_i$ , pH 7,5 als Laufpuffer (Puffer A) verwendet. Für die eGFP-Fusionsproteine erwies sich aufgrund der negativen Ladung des eGFP-Proteins bei pH 8,0 ebenfalls ein Anionentauscher als geeignet, wobei 20 mM Tris/HCl, pH 8,0 als Laufpuffer (Puffer A) diente. Die Proteinlösungen wurden durch Dialyse in den jeweiligen IEX-Puffer überführt und dabei gleichzeitig schonend entsalzt. Nach Sterilfiltration (0,2  $\mu m$ ) der dialysierten Proteinlösung wurde diese auf die mit Puffer A äquilibrierte Resource Q-Säule

aufgetragen, und Verunreinigungen und Proteinaggregate wurden bis zum Erreichen der Basislinie von der Säule gewaschen. Gebundene Proteine wurden anschließend durch kontinuierliche Steigerung der Ionenkonzentration (Ionenstärke) eluiert. Üblicherweise wurde ein linearer Konzentrationsgradient von 0 – 30 % Puffer B über 40 Säulenvolumina angelegt, wobei Puffer B dem mit 1 M NaCl versetzten Puffer A entsprach. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden anschließend im Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abschnitt 2.16.5) analysiert. Zur Regenerierung der Säule wurde diese mit jeweils 10 Säulenvolumina 2 M NaCl, 1 M NaOH, 2 M NaCl und schließlich 20 Säulenvolumina bidest. Wasser gespült. Alle verwendeten Pufferlösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µm) und autoklaviert.

### 2.16.4 Größenausschlusschromatographie

Zur Feinreinigung, Überprüfung des Oligomerisierungsstatus oder zum Austausch der Pufferlösung wurden die rekombinanten Proteine der Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatographie*, SEC) unterzogen. Die SEC wurde an einem ÄKTA Flüssigchromatographie-System (GE Healthcare) bei konstanter Flussrate und unter Messung des UV-Signals ( $\lambda = 280$ ) durchgeführt. Für Proteine mit einem Molekulargewicht < 70 kDa erfolgte die Auftrennung an einer Superdex 75 Matrix, wobei je nach Produktionsmaßstab eine analytische Superdex 75 10/300 GL Tricorn (24 ml Säulenvolumen) oder eine für größere Proteinmengen geeignete HiLoad Superdex 16/60 75 µg Säule (120 ml Säulenvolumen; alle Säulen von GE Healthcare) verwendet wurde. PASylierte Proteine sowie das in Zellkultur produzierte VEGFR-3(D1-7) wurden gemäß ihres apparenten Molekulargewichts von über 70 kDa mit einer entsprechend geeigneten Superdex 200 Matrix aufgetrennt, für den analytischen Maßstab mit einer Superdex 200 10/300 GL Tricorn (24 ml Säulenvolumen), für den präparativen Maßstab mit einer HiLoad Superdex 26/60 200 µg Säule (300 ml Säulenvolumen). Alle für die SEC verwendeten Pufferlösungen wurden kurz vor der Chromatographie frisch hergestellt, sterilfiltriert (0,45 µm), autoklaviert und gleichzeitig entgast.

Zur Vorbereitung der Proteinlösungen wurden diese in einem Amicon Konzentrador (MWCO: 3, 10 oder 30 kDa) auf ein Volumen von 1 % der jeweiligen Chromatographiesäule eingengt. Die Chromatographiesäule wurde vor dem Lauf mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert, so dass sich eine konstante Basislinie einstellte. Die Auftrennung der Proteine in der SEC erfolgte nach Injektion der Probe durch isokratische Elution über ein Säulenvolumen. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden schließlich mittels SDS-PAGE (Abschnitt 2.16.5) auf Reinheit analysiert und die Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm (Abschnitt 2.16.6) bestimmt. Zur Regenerierung der Säule wurde diese mit jeweils 1 Säulenvolumen dest. H<sub>2</sub>O, 0,5 M NaOH und schließlich 2 Säulenvolumina dest. H<sub>2</sub>O, 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub>, 1 mM EDTA gespült und darin gelagert.

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

Die analytische Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Fling & Gregerson Puffersystems (Fling & Gregerson, 1986). Die Polyacrylamidgele mit einer Geldicke von 1 mm wurden mit Hilfe eines geeigneten Glasplatten-Sets hergestellt. Für die Auftrennung kleinerer Proteine, wie Anticaline und VEGFR-3 Domänen, wurden Gele mit einem Polyacrylamid-Gehalt von 15 % w/v verwendet, PASylierte Proteine und VEGFR-3(D1-7) wurden in 12 %igen Gelen analysiert. Die Trenn- und Sammelgel-Lösungen wurden stets frisch und erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

<u>Trenngel (10 ml):</u>	<u>12 %</u>	<u>15 %</u>	<u>Sammelgel (6 ml):</u>	
Rotiphorese Gel 30	4,0 ml	5,0 ml	Rotiphorese Gel 30	1,0 ml
4x Lower-Tris	2,5 ml	2,5 ml	4x Upper-Tris	1,5 ml
H <sub>2</sub> O	3,5 ml	2,5 ml	H <sub>2</sub> O	3,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	5 µl
APS 10 % w/v	80 µl	80 µl	APS 10 % w/v	50 µl

Nach dem Zusammenbau des Glasplatten-Sandwich wurde 4,5 ml der frisch angesetzten Trenngel-Lösung zwischen die Glasplatten pipettiert und die polymerisierende Lösung sofort vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das überschichtete Wasser entfernt, ca. 2,5 ml der Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Kamm in das Gel eingesetzt. Nach weiteren ca. 30 min war das Gel vollständig auspolymerisiert und wurde in die mit 1x SDS Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden für die SDS-PAGE vorbereitet, indem sie mit 5x Auftragspuffer für SDS-PAGE versetzt und für 5 min bei 95 °C bis zur vollständigen Denaturierung erhitzt wurden. Die Gelproben sowie 8 µl des Proteinstandards (*Protein Molecular Weight Marker*, Thermo Scientific) wurden in die einzelnen Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Das maximale Probenvolumen betrug dabei 20 µl pro Tasche. Nachdem der im Auftragspuffer enthaltene Bromphenolblau-Marker aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel aus dem Glasplatten-Sandwich entfernt und zum Anfärben der Proteinbanden für 20 min in Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung geschwenkt. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das Gel für weitere 20 min in Entfärbelösung 1 und schließlich bis zum vollständigen Entfärben des Hintergrunds in Entfärbelösung 2 geschwenkt. Zum Zweck der Dokumentation wurden die Gele auf einem Leuchttisch platziert und mit Hilfe einer PC-gekoppelten CCD-Kamera und der Software BioCaptMW Version 10.04 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) digitalisiert.

#### 2.16.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer Proteinlösung wurde anhand der spezifischen UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. 300 µl Proteinlösung wurden hierzu in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke pipettiert und die Absorption im Spektrophotometer unter Korrektur des Puffers gemessen. Erfolgte die Absorptionsmessung im NanoDrop-Photometer, so wurde der Absorptionswert als Mittelwert einer Dreifachmessung bestimmt, wobei jeweils 2 µl Proteinlösung direkt auf die Messoberfläche pipettiert wurden. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $A_{280} = \epsilon \times c \times d$ ) ist die gemessene Absorption  $A_{280}$  direkt proportional zur Konzentration  $c$  ( $d$  = Schichtdicke). Zur Berechnung der individuellen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  wurde das „ProtParam“ Proteomics Tool (Gasteiger *et al.*, 2005) verwendet, welches basierend auf den theoretischen Absorptionswerten der aromatischen Aminosäuren Trp und Tyr sowie Disulfidbrücken den kalkulatorischen  $\epsilon$ -Wert (Gill & von Hippel, 1989) für eine gegebene Aminosäuresequenz berechnet (Tabelle 3).

**Tabelle 3 | Überblick über verschiedene im Rahmen dieser Arbeit produzierte Proteine mit ihrem Molekulargewicht (MW) in oxidiert Form sowie den berechneten molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  bei 280 nm.**

Protein	MW [Da]	$\epsilon_{280}$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ]
Flt4-D1-2 $\Delta$ YS-His <sub>6</sub>	25297,5	43805
Flt4-D1-7-His <sub>6</sub>	ca. 97,4 <sup>a</sup>	144490
Lcn2	21738,7	31525
U3D7	21519,3	31065
A4N10	21546,3	31065
A4N10(E44K/E100K)	21542,4	31065
S3A9	21682,7	27055
A5C3	21702,9	38055
A5C3(F71Q/Y77H)	21655,7	36565
A5C3(QH)-PAS200-Cys	38392,4	31065
eGFP-PAS#1(200)-A5C3 <sup>b</sup>	65298,7	60070
eGFP-PAS#1(200)-Lcn2 <sup>b</sup>	65334,6	53540

<sup>a</sup> Berechnetes Molekulargewicht D1-7 (85426,5 Da) + 12 N-Glycosylierungen (12x 1000 Da)

<sup>b</sup> Molarer Extinktionskoeffizient eGFP bei 488 nm  $\epsilon_{488} = 55000 M^{-1} cm^{-1}$

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

Mit Hilfe des ELISA wurden die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit produzierten Proteine hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens gegenüber einem gegebenen Bindungspartner untersucht. Je nach Fragestellung kamen dabei drei verschiedene ELISA-Formate zum Einsatz: (1.) der direkte ELISA, bei welchem das Antigen direkt auf der Oberfläche der ELISA-Platte adsorbiert wird; (2.) der Sandwich-ELISA, unter indirekter Immobilisierung des Antigens auf der ELISA-Platte über einen zuvor adsorbierten Fangantikörper, oder (3.) die Methode des kompetitiven ELISAs zur Untersuchung eines konkurrierenden Bindungsverhaltens zweier verschiedener Liganden für eine Rezeptorbindestelle. Die Bindungsstärke des analysierten Liganden wurde in den verschiedenen ELISA-Formaten anhand der Aktivität eines gekoppelten Reporterenzym (Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase) bestimmt. Der spezifische Nachweis bzw. die indirekte Immobilisierung von Lcn2-Varianten erfolgte üblicherweise anhand des mit dem flexiblen C-Terminus fusionierten *Strep*-tag II durch den hochaffinen Antikörper *Strep*Mab-Immo (IBA) oder Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (GE Healthcare). Für die Detektion der VEGF-Rezeptorfragmente D1-2 und D1-7 stand zudem der gegen das C-terminale His<sub>6</sub>-Tag gerichtete Antikörper Anti-Polyhistidin IgG-Peroxidase-Konjugat (Sigma-Aldrich) bzw. im Fall von D1-7 der für VEGFR-3 spezifische Antikörper MAB3491 (R&D Systems) zur Verfügung. Alle rekombinanten Proteine wurden zuvor durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie zur Homogenität gereinigt und lagen in PBS vor.

*Nachweis der Bindungsaktivität von Antikörpern gegenüber rekombinanten VEGFR-3-Fragmenten im direkten ELISA.* Die Vertiefungen einer Reihe in einer Mikrotiterplatte wurden mit je 50 µl Proteinlösung (10 µg/ml D1-2 bzw. D1-7 in PBS) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach Ausklopfen der Lösungen wurden verbleibende freie Bindungsstellen mit je 200 µl 3 % (w/v) BSA in PBS/0,1 % (v/v) Tween 20 (PBS/T 0,1) für zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen und je 50 µl PBS in die zweite bis letzte Vertiefung vorgelegt. Die jeweils erste Vertiefung einer Verdünnungsreihe wurde mit je 100 µl einer 64 nM Lösung des Antikörpers (MAB3491 bzw. FAB3492P; beide von R&D Systems) beschickt. Für die Herstellung einer Verdünnungsreihe wurde je 50 µl aus der ersten Vertiefung in die zweite pipettiert, gemischt und auf diese Weise fortlaufend eine 1:2 Verdünnungsreihe in der Reihe der Mikrotiterplatte hergestellt. Eine nur mit Puffer befüllte Reihe diente als Kontrolle. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte nach dreimaligen Waschen mit PBS/T 0,1 durch einstündige Inkubation mit je 50 µl eines 1:2000 verdünnten Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Fc-spezifischen anti-Maus Sekundär-Antikörpers (Sigma) in PBS. Die Mikrotiterplatte wurde erneut zweimal mit PBS/T 0,1 und einmal mit PBS gewaschen, bevor die durch das Reporterenzym katalysierte chromogene Reaktion durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer) gestartet wurde. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C wurde die mit der Hydrolyse zu p-Nitrophenolat bei 37 °C einhergehende Zunahme der Absorption bei 405 nm für insgesamt 30 min alle 60 Sekunden im SpectraMax 250 ELISA-Photometer gemessen.

*Untersuchung der Bindungsaktivität selektierter Lcn2-Varianten im direkten ELISA.* Die Analyse von Lcn2-Varianten folgte grundsätzlich dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Ablauf, wobei zunächst die rekombinanten VEGFR-3 Fragmente D1-2 oder D1-7 in den Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte adsorbiert und freie Bindungsstellen mit BSA abgesättigt wurden. Nach dreimaligem Waschen der Vertiefungen wurde in analoger Weise eine Verdünnungsreihe der verschiedenen Lcn2-Varianten hergestellt und diese für 2 Stunden mit dem immobilisierten „Antigen“ bei RT inkubiert. Die Detektion gebundener Lcn2-Varianten erfolgte nach dreimaligen Waschen mit PBS/T 0,1 anhand des mit dem C-Terminus fusionierten *Strep*-tag II. Dazu wurde je 50 µl des 1:1000 in PBS/T 0,1 verdünnten Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats in die Vertiefungen pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Als Substrat für die chromogene Reaktion diente wiederum p-Nitrophenylphosphat.

*Untersuchung der Bindungsaktivität selektierter Lcn2-Varianten im Sandwich-ELISA.* Alternativ zum direkten ELISA wurden die Gleichgewichtskonstanten ausgewählter Lcn2-Varianten in einem Sandwich-ELISA untersucht, wobei die Lcn2-Varianten in funktioneller Form über einen Fangantikörper indirekt immobilisiert und mit den in Lösung vorliegenden Rezeptorfragmenten titriert wurden. Hierfür wurde zunächst eine ELISA-Platte mit dem Antikörper *Strep*Mab-Immo beschichtet (über Nacht, 4 °C), wobei je 50 µl einer 20 µg/ml Lösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert wurde. Die ELISA-Platte wurde anschließend ausgeklopft und freie Bindungsstellen für 2 h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in PBS/T 0,1 blockiert. Nach dreimaligem Waschen wurde der adsorbierte Fangantikörper mit 50 µl der jeweiligen Lcn2-Variante (400 nM in PBS) bzw. dem Wildtyp-Lcn2 für eine Stunde bei RT beladen. Nachdem die Platte erneut dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen worden war, wurde je 50 µl einer zuvor präparierten Verdünnungsreihe der VEGFR-3 Fragmente D1-2 oder D1-7 in die mit der jeweiligen Lcn2-Variante beladenen Vertiefungen gegeben und diese für eine Stunde bei RT inkubiert. Der nach dreimaligen Waschen gebundene Anteil der Rezeptorfragmente wurde durch Zugabe eines gegen das His<sub>6</sub>-Tag gerichteten und mit Meerrettichperoxidase konjugierten

## Material und Methoden

Antikörpers (1:2000 in PBS, Sigma) detektiert. Für die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte chromogene Reaktion wurde die Platte schließlich erneut zweimal mit PBS/T 0,1 und zweimal mit PBS gewaschen und 100  $\mu$ l der ABTS-Substratlösung (1 mg/ml in ABTS-Puffer, Roche) zugegeben. Die ELISA-Platte wurde bei 37 °C für 5 min äquilibriert und schließlich der Anstieg des Absorptionssignals bei 405 nm für 20 min gemessen.

*Bestimmung der Bindungsaktivität von VEGF-C gegenüber VEGFR-3(D1-7).* Die Bindungsaktivität des in Zellkultur produzierten D1-7 Fragments gegenüber dem VEGFR-3 Liganden VEGF-C wurde in einem direkten ELISA bestimmt. Hierzu wurde je 200 ng des in PBS gelösten VEGF-C (SinoBiological) über Nacht in den Vertiefungen einer Reihe der ELISA-Platte adsorbiert und die verbleibenden Bindungsstellen für 1,5 h bei RT mit je 200  $\mu$ l 3 % (w/v) BSA in PBS/T 0,1 blockiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen, und in der zweiten bis letzten Vertiefung wurde je 50  $\mu$ l PBS vorgelegt. In die erste Vertiefung wurde daraufhin 100  $\mu$ l D1-7 in PBS pipettiert. Eine Verdünnungsreihe wurde hergestellt, indem 50  $\mu$ l Proteinlösung der ersten Vertiefung in die zweite pipettiert und nach dem Mischen fortlaufend 50  $\mu$ l in die jeweils nächste Vertiefung transferiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Vertiefungen wiederum dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen. Der Nachweis des gebundenen Anteils an D-7 erfolgte mit Hilfe des hochaffinen für VEGFR-3 spezifischen Antikörpers MAB3491 (5  $\mu$ g/ml in PBS, je 50  $\mu$ l) sowie einem im Anschluss applizierten Alkalische-Phosphatase-gekoppelten IgG Fc-spezifischen Sekundär-Antikörper (1:1000 in PBS; Sigma) für jeweils eine Stunde. Die Signalentwicklung erfolgte schließlich analog den zuvor beschriebenen ELISAs mit p-Nitrophenylphosphat.

*Quantitative Untersuchung des kompetitiven Bindungsverhaltens verschiedener Anticaline gegenüber VEGF-C/VEGFR-3 im ELISA.* Das konkurrierende Bindungsverhalten zwischen den gegen die VEGFR-3 Domänen 1-2 selektierten Anticalinen und dem natürlichen Liganden VEGF-C wurde in einem kompetitiven ELISA untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst je 200 ng VEGF-C in PBS in einer ELISA-Platte adsorbiert, und die verbleibenden freien Bindestellen der Oberfläche wurden für 2 h bei RT mit je 200  $\mu$ l 3 % (w/v) BSA in PBS/T 0,1 abgesättigt. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen. Dann wurde zunächst je 50  $\mu$ l einer zuvor präparierten Verdünnungsreihe der verschiedenen Anticaline zu pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Mehrkanalpipette je 50  $\mu$ l einer 5 nM Lösung des Rezeptorfragments D1-7 (in PBS) in die Vertiefungen gegeben, so dass sich eine Konzentration von 2,5 nM für D1-7 einstellte. Für das Erreichen des Bindungsgleichgewichts wurde die ELISA-Platte unter leichtem Schütteln (300 rpm) für eine Stunde bei RT inkubiert. Bei überlappenden Epitopen zwischen Anticalin und VEGF-C blockiert das in einer Verdünnungsreihe zugegebene Anticalin die Rezeptorbindestelle von VEGF-C, so dass mit steigender Konzentration des Anticalins das gemessene Bindungssignal für D1-7 abnimmt. Die Detektion des an VEGF-C gebundenen Anteils von D1-7 erfolgte schließlich analog der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Bestimmung der Bindungsaktivität von VEGFR-3(D1-7) mit Hilfe des für VEGFR-3 spezifischen Antikörpers MAB3491 und einem Alkalische-Phosphatase-gekoppelten IgG Fc-spezifischen Sekundär-Antikörper.

*Bestimmung der Gleichgewichtskonstante  $K_D$ .* Die aus den kinetisch gemessenen Absorptionswerten ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit  $\Delta A_{405}/\Delta t$  des Reporterenzym wurde gegen die Konzentration des in einer Verdünnungsreihe zugegebenen Proteins aufgetragen. Ausgehend von einer monovalenten Gleichgewichtsreaktion zwischen dem immobilisierten Liganden [L] und dem Protein

$[P]$  wurde die Gleichgewichtskonstante  $K_D$  durch nicht-lineare Regressionsanalyse gemäß der Gleichung

$$[P \cdot L] = \frac{[L]_t \times [P]_t}{[P]_t + K_D}$$

bestimmt (Voss & Skerra, 1997). Der  $K_D$ -Wert ergibt sich dabei aus der für jede Verdünnungsstufe bekannten Proteinkonzentration  $[P]_t$  sowie der indirekt anhand der Aktivität des Reporterenzym gemessenen Konzentration des Protein/Ligand-Komplexes  $[P \cdot L]$  – und der konstanten Konzentration des immobilisierten Liganden  $[L]_t$  entsprechend dem asymptotischen Maximalwert von  $\Delta A_{405}/\Delta t$ . Für die iterative Kurvenanpassung wurde die Software „Kaleidagraph“ Version 4.1.3 (Synergy Software, PA) verwendet.

*Bestimmung der Inhibitionskonstante  $K_i$ .* Im Fall kompetitiven Bindungsverhaltens zweier gegebener Liganden – hier eines Anticalins und VEGF-C – wurde die inhibitorische Konstante  $K_i$  des in der Verdünnungsreihe eingesetzten Antagonisten (Anticalin) ausgehend von der halbmaximalen Signalinhibition bestimmt. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ( $\Delta A_{405}/\Delta t$ ) wurde für die Kurvenanpassung gegen die jeweilige Konzentration des titrierten Antagonisten  $[L]_t$  aufgetragen und zunächst mit Hilfe der „Kaleidagraph“ Software durch nicht-lineare Regression gemäß der sigmoidalen Gleichung

$$\dot{A} = \frac{\dot{A}_{max} - \dot{A}_{min}}{1 + \left(\frac{[L]_t}{IC_{50}}\right)^p} + \dot{A}_{min}$$

die inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$  bestimmt (Kim *et al.*, 2009).  $\dot{A}$  entspricht der bei verschiedenen Konzentrationen des Antagonisten gemessenen Reporterenzymaktivität ( $\Delta A_{405}/\Delta t$ ), mit  $\dot{A}_{max}$  und  $\dot{A}_{min}$  als den in Abwesenheit bzw. bei asymptotisch höchster Konzentration des Antagonisten ermittelten Absorptionswerten. Der Hill-Koeffizient  $p$  dient als Parameter für die Kooperativität der Bindung eines Inhibitors und damit als Maß für die Steilheit der Kurve. Für die Bindung des Anticalins an das Rezeptorfragment wurde in diesem Fall jedoch von einem nicht kooperativen Bindungsverhalten ausgegangen ( $p = 1$ ). Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration des Antagonisten an, bei der 50 % der spezifischen Bindungsaktivität inhibiert wird, steht allerdings in Abhängigkeit von der experimentell eingesetzten Konzentration des Rezeptorfragments. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstante des Antagonisten  $K_i$  erfolgte nach der Korrektur von Cheng und Prusoff (1973) gemäß der Gleichung

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[R]}{K_D}},$$

wobei  $[R]$  die eingesetzte Konzentration des Rezeptorfragments und  $K_D$  die Gleichgewichtskonstante des verdrängten Liganden (hier VEGF-C) zum Rezeptorfragment beschreibt.

#### 2.16.8 Chemische Biotinylierung von Proteinen

Die rekombinanten VEGFR-3 Fragmente sollten zum Zweck der Selektion von für VEGFR-3 spezifischen Lcn2-Varianten durch Phage Display als Target-Protein eingesetzt werden. Hierzu

musste das Protein in biotinylierter Form vorliegen. Die chemische Modifizierung der Proteine erfolgte mit einem reaktiven Biotin-N-Hydroxysuccinimid-Derivat, welches bei physiologischem pH durch die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten durch Ausbildung einer stabilen Amidbindung kovalent gebunden wird. Die Markierung der Proteine wurde mit Hilfe des auf der Interaktion zwischen 4'-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure (HABA) und Streptavidin basierenden photometrischen Assays (Green, 1970) oder massenspektrometrisch durch ESI-MS überprüft und so optimiert, dass im statistischen Mittel ein Biotin-Molekül je Protein konjugiert war. Für einen typischen Reaktionsansatz wurde bis zu 1 mg frisch gereinigtes VEGFR-3(D1-2) (3-4 mg/ml in PBS) mit einer fünffachen molaren Menge D-Biotinoyl- $\epsilon$ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (15 mg/ml in DMF) versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Die Abtrennung des freien Biotins erfolgte anschließend durch Dialyse gegen 2x 2 L PBS bei 4 °C oder durch Gelfiltration an einer Superdex 75 10/300 GL Tricorn Säule, wobei gleichzeitig der Oligomerisierungszustand des Proteins überprüft wurde. VEGFR-3(D1-7) wurde in gleicher Weise mit NHS-PEG12-Biotin (EZ-Link) derivatisiert.

### 2.16.9 Radioaktive Markierung von Anticalinen mit $^{123}\text{I}$

Iod-123 ( $^{123}\text{I}$ ) ist ein radioaktives Isotop des Iods welches überwiegend unter Emission von  $\gamma$ -Strahlung zu stabilem Tellur-123 zerfällt. Die physikalische Halbwertszeit beträgt 13,2 Stunden. Die Markierung von Anticalinen mit  $^{123}\text{I}$  erfolgte mit Hilfe des Oxidationsmittels Iodogen (1,3,4,6-tetrachlor-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril; 0,4 mg/ml in Chloroform), welches durch Evaporation des Lösungsmittels als Feststoff an die Borosilikat-Glasoberfläche des Reaktionsgefäßes immobilisiert wurde. Für die Reaktion wurde typischerweise 20  $\mu\text{g}$  Anticalin in PBS in einem Iodogen-beschichteten Glasreaktionsgefäß mit 222 MBq  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (in 0,05 M NaOH) für 5 Minuten inkubiert (Reaktionsvolumen: 500  $\mu\text{l}$ ). Zur Abtrennung des überschüssigen Iods wurde der Reaktionsansatz anschließend auf eine mit 50 mM Histidin/HCl pH 7,5, 2 % (w/v) Trehalose, 0,002 % (v/v) Tween 20, 0,9 % (w/v) NaCl äquilibrierte Sephadex G-25 Chromatographie-Säule (NAP-5) aufgetragen und durch geeignete Fraktionierung das gereinigte Reaktionsprodukt aufgefangen. Zur Überprüfung der Kopplungs- und Reinigungseffizienz wurden während der Prozedur Proben von je 2  $\mu\text{l}$  des Rohprodukts sowie des Chromatographie-Eluats entnommen und diese auf einem mit Kieselgel beschichteten Dünnschichtchromatographie-Streifen in 85 % Methanol aufgetrennt. Die Aktivität der aufgetrennten Komponenten in den jeweiligen Fraktionen wurde anschließend mit Hilfe eines Dünnschichtscanners (miniGita; Raytest, Straubenhardt) bestimmt. Die Kopplungseffizienz lag typischerweise zwischen 70 und 80 %, wobei die radiochemische Reinheit des Reaktionsprodukts – definiert als das in Prozent ausgedrückte Verhältnis zwischen der anticalin gebundenen Radioaktivität des Radionuklids und der Gesamtradioaktivität des Radionuklids in der Produktlösung (Europäisches Arzneibuch, 2016) – bis zu 98 % betrug.

### 2.16.10 Analytische Deglycosylierung von Proteinen durch PNGase F

Die analytische Deglycosylierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der Endoglycosidase Peptid-N-Glycosidase F (PNGaseF; New England Biolabs), welche die N-glycosidische Bindung zwischen dem innersten N-Acetylglucosamin-Molekül des Oligosaccharids und dem Asparaginrest des Glycoproteins hydrolysiert. Die enzymatische Reaktion erfolgte generell gemäß den Angaben des Herstellers. Üblicherweise wurden 3,6  $\mu\text{g}$  Protein für 10 min bei 100 °C denaturiert und für 1 h bei 37 °C mit 1000



units PNGase F inkubiert. Die Analyse des deglycosylierten Proteins erfolgte anschließend durch SDS-PAGE (Abschnitt 2.16.5).

## 2.17 Biophysikalische Analysen

### 2.17.1 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie

Für die markierungsfreie kinetische Echtzeitanalyse des Bindungsverhaltens verschiedener Bindungspartner wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) angewandt. Einer der Interaktionspartner (Ligand) wird hierzu auf der Oberfläche eines goldbeschichteten Mikrosensorchips immobilisiert, während der andere (Analyt) in flüssiger Phase mit bekannter Konzentration über die Oberfläche geleitet wird. Eine Interaktion des Analyten mit dem Liganden bewirkt durch die massenabhängige Änderung des Brechungsindex an der Chipoberfläche eine Änderung des Plasmonresonanz-Signals. Assoziation und Dissoziation von Bindungspartnern können somit mit hoher Empfindlichkeit in Echtzeit detektiert und die kinetischen Bindungskonstanten  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  bestimmt werden.

Für die Messungen wurde ein Biacore 2000 Instrument in Kombination mit carboxymethylierten polydextranbeschichteten CMD200I oder CM5 Sensorchips verwendet, wobei PBS/0,05 % Tween 20 (PBS/T 0,05) als Laufpuffer diente. Alle Messungen erfolgten, falls nicht anders angegeben, bei einer konstanten Flussrate von 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei 25 °C. Protein- und Pufferlösungen wurden vor der Messung frisch hergestellt und durch 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Puffer wurden zudem für mindestens 30 min im Ultraschallbad entgast.

*Immobilisierung von Liganden.* Die kovalente Immobilisierung von Proteinen auf der Chipoberfläche erfolgte mit Hilfe der Aminkopplungschemie. Die Carboxylgruppen der Chipoberfläche wurden zunächst mit 35  $\mu\text{l}$  0,2 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und 0,05 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu reaktiven Succinimidestern aktiviert. Anschließend wurden 10 bis 50  $\mu\text{l}$  einer 10 bis 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Proteinelösung in 10 mM Natriumacetat pH 4,0 – 5,5 über die aktivierte Oberfläche geleitet, wobei eine kovalente Bindung des Liganden an die aktivierte Carboxydextranmatrix erfolgte. Zur effizienten Anreicherung des Liganden an der bei pH > 3,5 negativ geladenen Oberfläche durch elektrostatische Adsorption wurde zuvor für jedes Protein der optimale pH-Wert empirisch ermittelt und der Kopplungspuffer entsprechend angepasst. Die Immobilisierung der rekombinanten VEGFR-3 Domänen D1-2 und D1-7 ( $pI = 5,2$ ) erfolgte bei pH 4,5, für die verwandten Rezeptorfragmente VEGFR-2(D1-7) und mVEGFR-3(D1-7) wurde die höchste Präadsorption bei pH 5,0 bzw. 4,0 festgestellt. Verbleibende freie reaktive Gruppen wurden schließlich mit 30  $\mu\text{l}$  1 M Ethanolamin/HCl, pH 8,5 blockiert und die Chipoberfläche über Nacht mit PBS/T 0,05 äquilibriert. Üblicherweise wurden zwischen 1000 und 2000 RU des jeweiligen VEGFR-Fragments auf dem Chip immobilisiert. Zur Immobilisierung wurde die Flussrate auf 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  verringert.

*Kinetische Bindungsstudien.* Für die Bestimmung der Bindungskonstanten  $k_{on}$  und  $k_{off}$  wurde eine Verdünnungsreihe des Analyten beginnend mit der niedrigsten Konzentration über die mit dem Liganden derivatisierte Chipoberfläche geleitet und der Anstieg des Resonanzsignals als Funktion der Zeit gemessen. Dabei wurden typischerweise zwischen 50 und 95  $\mu\text{l}$  Probenlösung injiziert. Die Dissoziation des Komplexes wurde anschließend bei konstantem Pufferfluss für mindestens 15 min

beobachtet. Durch den gleichzeitigen Fluss des Analyten über einen in Reihe geschalteten Referenzkanal mit unbeladener Oberfläche wurden unspezifische Wechselwirkungen und Puffersprünge von den Messdaten gleichzeitig subtrahiert. Nach jeder Messung wurde der gebundene Analyt durch mehrfache Injektion von 5-10  $\mu\text{l}$  10 mM Glycin/HCl, pH 2,2 schonend von der Chipoberfläche dissoziiert und der Chip so regeneriert.

*Datenanalyse und Kurvenanpassung.* Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte nach Subtraktion eines Mittelwerts aus drei gemessenen Puffer-Injektionen von den Messkurven (Myszka, 1999). Die so korrigierten Messkurven wurden anschließend mit Hilfe der BIAevaluation Software v4.1 (GE Healthcare, Freiburg) unter Annahme monovalenter Komplexbildung nach Langmuir global angepasst und so die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziations- ( $k_{\text{on}}$ ) und Dissoziationsphase ( $k_{\text{off}}$ ) ermittelt.

### 2.17.2 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Eine spezielle Eigenschaft chiraler Moleküle ist deren Fähigkeit, zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Absorptionsdifferenz zwischen rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht  $\Delta A = A_L - A_R$  wird als Elliptizität  $\Theta$  [mdeg] ausgedrückt und kann im CD-Spektrometer gemessen werden. Hieraus lassen sich im Fall von Proteinen Aussagen über den Gehalt an Sekundärstrukturen ableiten und Faltungs- bzw. Entfaltungsübergänge beobachten.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität von Anticalinen wurden diese zunächst auf ihren Sekundärstrukturgehalt durch Aufnahme eines CD-Spektrums (Jasco J-810 Spektropolarimeter mit der dazugehörigen Software Spectra Manager v1.53.05) untersucht und daraufhin durch konstantes Erhitzen thermisch denaturiert. Die frisch produzierten Anticaline wurden durch SA-Chromatographie gereinigt und durch Gelfiltration in CD-Puffer (50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,5) überführt. Eine Quarzküvette mit Stopfen (1 mm Schichtdicke) wurde mit 400  $\mu\text{l}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Proteinlösung beschickt und ein CD-Spektrum im Fern-UV von 190-260 nm durch Akkumulation von 10 Einzelspektren aufgenommen (Data Pitch 0,1 nm, Scan Speed 100 nm/min, Response 4 sec, Band Width 1 nm).

Für die anschließende Stabilitätsmessung wurde das Anticalin für 5 min bei 95 °C vollständig denaturiert und die charakteristische Bande ermittelt, bei der die gemessenen Elliptizitätswerte des denaturierten und des nativen Proteins die größte Differenz aufwiesen (typischerweise zwischen 208 und 213 nm). Die thermische Entfaltung erfolgte anschließend ausgehend von einer frischen Proteinlösung durch kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 95 °C (1 °C/min) bei gleichzeitiger Aufnahme des CD-Signals. Ausgehend von einem Zwei-Zustands-Modell lässt sich aus der so erhaltenen sigmoidalen Denaturierungskurve anhand der Änderung der freien Enthalpie  $\Delta H_m$  beim Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand die thermodynamische Stabilität  $\Delta G$  des gefalteten Zustandes sowie die Schmelztemperatur  $T_m$  des Anticalins berechnen (Schlehuber, 2001). Lineare Signaländerungen im prä- und posttransitionellen Bereich wurden dabei korrigiert.

### 2.17.3 Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Analyse der Molekülmasse erfolgte in einem Bruker Daltonics maXis Q-TOF (Quadrupol-Time of Flight) Massenspektrometer ausgestattet mit einer Electrospray Ionization (ESI)-Quelle. Zur Vorbereitung der Probe wurde das frisch präparierten Protein (0,1 – 0,5 mg/ml) durch dreimalige

Dialyse gegen das 10000-fache Volumen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,7 umgepuffert bzw. entsalzt und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm). Die Probe wurden kurz vor der Messung mit 20 % (v/v) Acetonitril (LC-MS grade) und 0,1 % (v/v) Ameisensäure (LC-MS grade) versetzt und mit Ammoniumacetat-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im positiven Ionisierungsmodus unter Einstellung folgender Parameter: Capillary Voltage: 4,5 kV, End Plate Offset: -500 V, Nebulizer Pressure: 0,4 bar, Dry Gas Flow: 4,0 l/min, Dry Temperature: 180 °C, Flow Rate: 180 µl/h. Die Dekonvolution der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der geräteeigenen Software Compass Data Analysis v4.0 (Bruker Daltonics, Bremen).

## 2.18 *In vitro*-Bindungsstudien

### 2.18.1 Kultivierung der humanen Zelllinien U-251 MG, U251-R3 und MCF-7

Bei den Zelllinien U-251 MG (Pontén & Macintyre, 1968), U251-R3 (Gieser, 2014) und MCF-7 (Soule *et al.*, 1973) handelte es sich um adhärent wachsende humane Tumorzelllinien, die unter aseptischen Bedingungen in einer befeuchteten Umgebung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Die Kultivierung und Passagierung der Zellen erfolgte prinzipiell wie bereits in Abschnitt 2.15.1 beschrieben, wobei analog den 293T-Zellen DMEM versetzt mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum als Vollmedium verwendet wurde. U251-R3 wurden durch stabile Transfektion mit dem VEGFR-3 kodierenden Vektor EX-M0928-M61 als Derivat der U-251 MG Zellen generiert (Gieser, 2014). Der Vektor EX-M0928-M61 trägt zur Selektion von stabil transfizierten Klonen das Neomycin-Resistenzgen, weshalb U251-R3 Zellen in Vollmedium mit 0,5 mg/ml G418 kultiviert wurden. Die Kryokonservierung der verschiedenen Zelllinien erfolgte wie in Abschnitt 2.15.1 beschrieben.

### 2.18.2 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie

Für den Nachweis von VEGFR-3 auf der Oberfläche von U-251 MG und MCF-7 Zellen wurden diese zu 70-80 % Konfluenz kultiviert und unter milden Bedingungen mit 0,46 mM EDTA in PBS für 15-20 min bei 37 °C von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in DMEM, 1 % (w/v) BSA aufgenommen und 2-5 x 10<sup>5</sup> Zellen in die Vertiefungen einer 96-Well Mikrotiterplatte mit V-Boden vorgelegt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (6 min, 300 g, 5 min) wurden diese in 150 µl der Primär-Antikörperlösung (5 µg/ml MAB3491 bzw. 50 µg/ml *StrepMab*-Imm) in DMEM, 1 % BSA (w/v) resuspendiert, für 1 h bei 4 °C inkubiert und mit 200 µl DMEM, 1 % (w/v) BSA gewaschen. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation in 50 µl Anti-Mouse IgG F(ab')<sub>2</sub>-Alexa Fluor 488 (1:250 in DMEM, 1 % (w/v) BSA) und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen schließlich in je 300 µl PBS, 10 mM Propidiumiodid (PI) aufgenommen. Die fluoreszenzzytometrische Analyse erfolgte unter Anregung der Fluoreszenz mit blauem Laser (488 nm) in einem FACSAria System unter Verwendung der für PI und FITC geeigneten Filter-Sets, wobei jeweils 10000 lebende (PI-negative) Zellen analysiert wurden. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Programms FlowJo v. 8.8.6 (Tree Star, Ashland, OR).

### 2.18.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

U-251 MG und MCF-7 Zellen wurden auf der Oberfläche eines Glas-Objektträgers mit acht aufgesetzten Kammern (Nunc Lab-Tek II Chamber Slides) zu einem einlagigen Rasen von ca. 60-75 % Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde vorsichtig entfernt, und die Zellen wurden mit 3,5 %

(w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT chemisch fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde je 150 µl der frisch präparierten Anticalin-Lösung bzw. Wildtyp-Lcn2 mit dem fixierten Zellrasen für eine Stunde inkubiert. Gebundenes Anticalin wurde nach erneutem dreimaligen Waschen mit dem gegen das C-terminale *Strep*-tag II gerichteten Antikörper *Strep*Mab-Immo (5 µg/ml in PBS) für 1 h inkubiert. Als Sekundär-Antikörper diente das 1:250 verdünnte, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markierte Anti-Maus F(ab')<sub>2</sub>, welches nach dem Waschen der Zellen für eine Stunde mit diesen im Dunkeln inkubiert wurde. Die Kammern wurden anschließend 1x mit PBS und 2x mit destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen mit 150 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; 5 µg/ml) in eiskaltem Ethanol:Aceton (1:1) für 5 min bei -20 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser und PBS wurden die Zellen schließlich mit 500 µl PBS überschichtet und die Fluoreszenz im Axiovert 40 CFL Mikroskop in Kombination mit den Bandpass-Anregungsfiltern BP450-490 (Alexa Fluor 488) und BP365/12 (DAPI) nachgewiesen. Die Anfertigung digitaler Aufnahmen der Präparate erfolgte bei den unterschiedlichen Wellenlängen und gleichbleibender Belichtungszeit mit Hilfe der monochromen Digitalkamera AxioCam MRm in Kombination mit der Software AxioVision v4.8 (Carl Zeiss Microscopy, Jena).

Wurden für die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Reporterprotein eGFP fusionierte Anticaline (ChromoCaline) verwendet, wurde die entsprechende Lösung nach der Paraformaldehyd-Fixierung direkt auf den Zellrasen pipettiert und nach Inkubation und Waschen mit der DAPI-Färbung der Zellkerne fortgefahren.

### 2.18.4 Radioaktiver Zellassay

Die adhärent wachsenden U251-R3 Zellen wurden wie in Abschnitt 2.18.1 beschrieben bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Zur Vorbereitung der Zellen für den Zellassay wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) wurden 2,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 % Trypsin, 0,01 % EDTA in DPBS) auf den Zellrasen gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Vollmedium aufgenommen, für 5 min bei 300 g zentrifugiert, und nach Abziehen des Überstandes in DMEM, 1 % (w/v) BSA zu 5 x 10<sup>6</sup>/ml resuspendiert. Um nach der Trypsinierung die Expression des VEGFR-3 auf der Zelloberfläche zu ermöglichen, wurden die Zellen in 50 ml Greiner-Röhrchen für 2 Stunden bei 180 rpm inkubiert.

Für den Assay wurden je 50 µl der Zellsuspension (entspricht 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen) in die Vertiefungen einer an der Unterseite mit einer 1,2 µm PVDF-Membran versehenen 96-Well MultiScreen Filterplatte verteilt. Zur Absättigung der Filterplatte waren die Vertiefungen zuvor mit 200 µl PBS, 1 % (w/v) BSA für 2 h bei RT geblockt. Für die Präparation des zu analysierenden Liganden wurde das zuvor mit <sup>125</sup>I-derivatisierte Anticalin (in DMEM, 1 % (w/v) BSA; 25 µl; Abschnitt 2.16.9) mit einer Verdünnungsreihe des unmarkierten Anticalins (in DMEM, 1 % (w/v) BSA; 25 µl) gemischt und die Proteinlösung zu den Zellen gegeben, wobei sich ein Volumen von 100 µl mit einer Endkonzentration des <sup>125</sup>I-markierten Anticalins von 5 nM einstellte. Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurde das Medium über eine Vakuumfiltrationsvorrichtung abgesaugt, und die Zellen wurden 1x mit 100 µl und 4x mit 300 µl PBS unter Anlegen von Vakuum gewaschen. Die PVDF-Membranen der einzelnen Vertiefungen wurden zusammen mit den daran adsorbierten Zellen mit Hilfe des Multiscreen Stanzkits (Stanze und Einweg-Stanzstempel) aus der 96-Well-Platte herausgelöst und gleichzeitig in

Röhrchen für die Szintillationszählung transferiert. Die zellgebundene Aktivität wurde schließlich im  $\gamma$ -Szintillationszähler gemessen.

Zur Berechnung der inhibitorischen Konzentration  $IC_{50}$  wurden die aus vier Messungen gemittelten Aktivitätswerte des gebundenen  $^{123}I$ -markierten Anticalins als Funktion der Kompetitor-Konzentrationen (unmarkiertes Anticalin) aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression gemäß der in Abschnitt 2.16.7 beschriebenen Gleichung zur sigmoidalen Kurvenanpassung wurde schließlich der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt.

## 2.19 Strukturanalyse

Für die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurden die Koordinatensätze von der *Protein Data Bank* (PDB; [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb); Bermann *et al.*, 2000) heruntergeladen und mit Hilfe des Programms UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) dargestellt. Proteinmodelle wurden durch manuelle Substitution einzelner Aminosäuren auf der Basis einer vorhandener Kristallstruktur *in silico* erstellt. Moleküldynamik-Simulationen zur Darstellung von *Random Coil* Strukturen erfolgten mit Hilfe der *Visual Molecular Dynamics* (VMD) Software (Humphrey *et al.*, 1996) unter Verwendung des *Interactive Molecular Dynamics Simulation* (IMD) Zusatzprogramms. Das elektrostatische Oberflächenpotential eines Proteins wurde auf der Grundlage der Kristall-Struktur mit Hilfe des *Adaptive Poisson Boltzmann Solvers* (APBS; Baker *et al.*, 2001) berechnet.



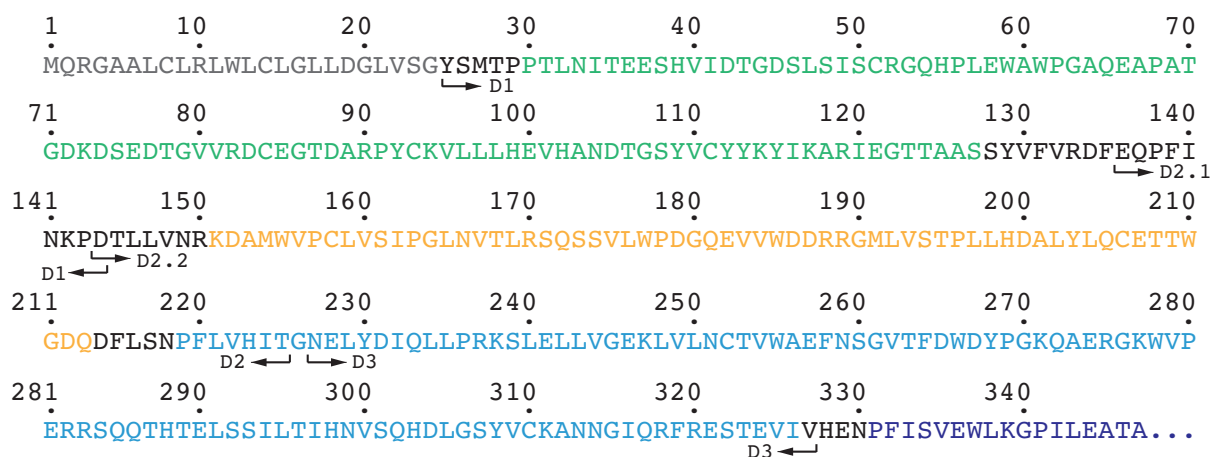
# 3 Ergebnisse

## 3.1 Gentechnische Herstellung und funktionelle Charakterisierung von rekombinanten VEGFR-3 Domänen

Voraussetzung für die Selektion VEGFR-3-spezifischer Lcn2-Varianten war die Präparation des Target-Proteins in löslicher Form. Der extrazelluläre Teil des VEGFR-3 setzt sich aus sieben Ig-ähnlichen C2-Domänen zusammen, deren  $\beta$ -Faltblätter (abgesehen von der Cystein-freien Domäne 4) über jeweils eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die einzelnen Domänen weisen bis zu drei N-Glycosylierungsstellen auf. Die VEGFR-3 Domänen 1 und 2 bilden das VEGF-C bindende Fragment des Rezeptors (Jeltsch, 2006). Diese wurden aufgrund ihrer offenbar guten Zugänglichkeit auf der Zelloberfläche als Zielstruktur für die Anticalin-Selektion ausgewählt und in *E. coli* produziert. Zusätzlich wurde das gesamte extrazelluläre Rezeptorfragment (D1-7) aufgrund der posttranslationalen Modifizierungen in 293T-Säugerzellen exprimiert und zur funktionalen Charakterisierung und Maturierung der selektierten Lcn2-Varianten eingesetzt.

### 3.1.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden und Produktion der VEGFR-3-Domänen D1, D2, D3 und D1-2 in *E. coli*

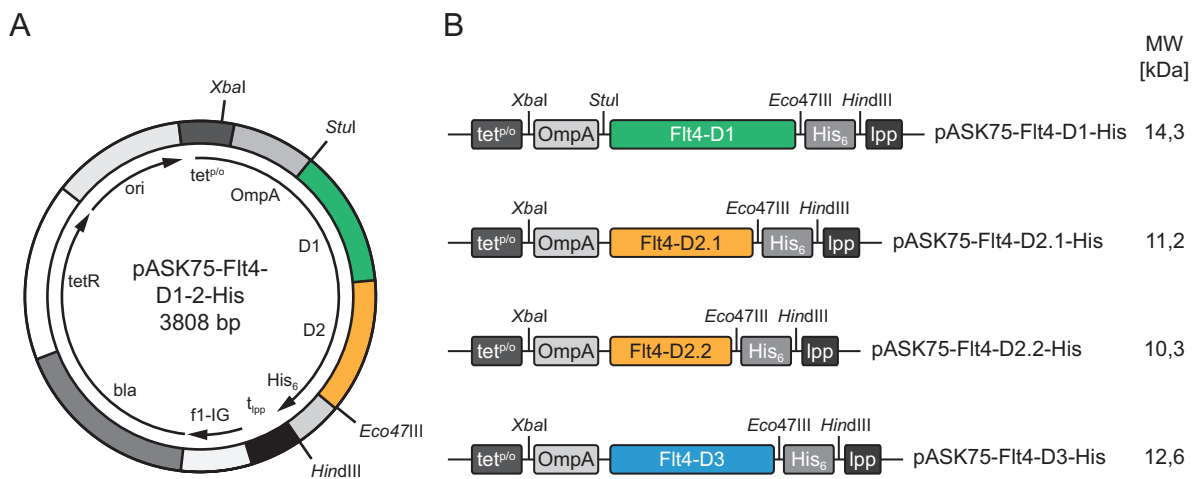
Für die initialen Expressionsexperimente wurden zunächst die einzelnen Domänen D1, D2 und D3, sowie später das VEGF-C-bindende Rezeptorfragment D1-2, gentechnisch in *E. coli* hergestellt und analysiert. Die Abgrenzung der Domänen 1, 2 und 3 erfolgte in Anlehnung an die Annotation der *UniProt Knowledgebase* (UniProt Consortium, 2014) sowie anhand der bekannten Kristallstruktur des verwandten VEGFR-2 im Komplex mit VEGF-C (Leppänen *et al.*, 2010). Aufgrund der relativ langen flexiblen Linker-Region zwischen den Domänen 1 und 2 wurden zwei verschiedene D2-Fragmente (D2.1 und D2.2), die sich in einer Länge von acht Aminosäuren am N-Terminus unterscheiden, geplant (Abbildung 5).



**Abbildung 5| Primärstruktur der VEGFR-3 Domänen 1 bis 3.** Gezeigt sind die Sequenzabschnitte der Signalsequenz (M1-G24, grau), D1 (P30-S127, grün), D2 (K151-Q213, orange), D3 (P219-I326, hellblau) und D4 (P331-E415, dunkelblau) gemäß Annotation in dem UniProt-Eintrag P35916. Für die Klonierung der einzelnen VEGFR-3-Domänen wurden vier Konstrukte, die die folgenden Aminosäuren umfassen, von einem humanen cDNA-Klon amplifiziert: D1: Y25-D144, D2.1: E136-T225, D2.2: D144-T225 sowie D3: N227-V327 (Pfeile).

## Ergebnisse

Zur Konstruktion der entsprechenden Expressionsvektoren wurden die Genabschnitte der jeweiligen Domäne ausgehend von einem kommerziell verfügbaren humanen VEGFR-3 ORF cDNA-Klon (ORFeome OCABo5050G0623D; Source BioScience) amplifiziert und auf dem universellen Expressionsplasmid pASK75 (Skerra, 1994) kloniert. pASK75 ermöglicht die N-terminale Fusion mit dem OmpA-Signalpeptid (Movva *et al.*, 1980), welches die Translokation der naszierenden Polypeptidkette in das oxidierende Periplasma des Gram-negativen Bakteriums richtet. Für die spätere Proteinreinigung wurden alle Rezeptorfragmente am C-Terminus über einen Ser-Ala-Linker mit einem His<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsel fusioniert (Abbildung 6). Neben den Plasmiden für die VEGFR-3-Einzeldomänen wurde das Plasmid pASK75-Flt4-(D1-2)-His konstruiert, welches den 200 Aminosäuren umfassenden Genabschnitt von Y25 bis T225 kodiert und die Expression der Domäne 1 zusammen mit ihrer benachbarten Domäne 2 ermöglicht. Die Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Abbildung A1 im Anhang wiedergegeben.

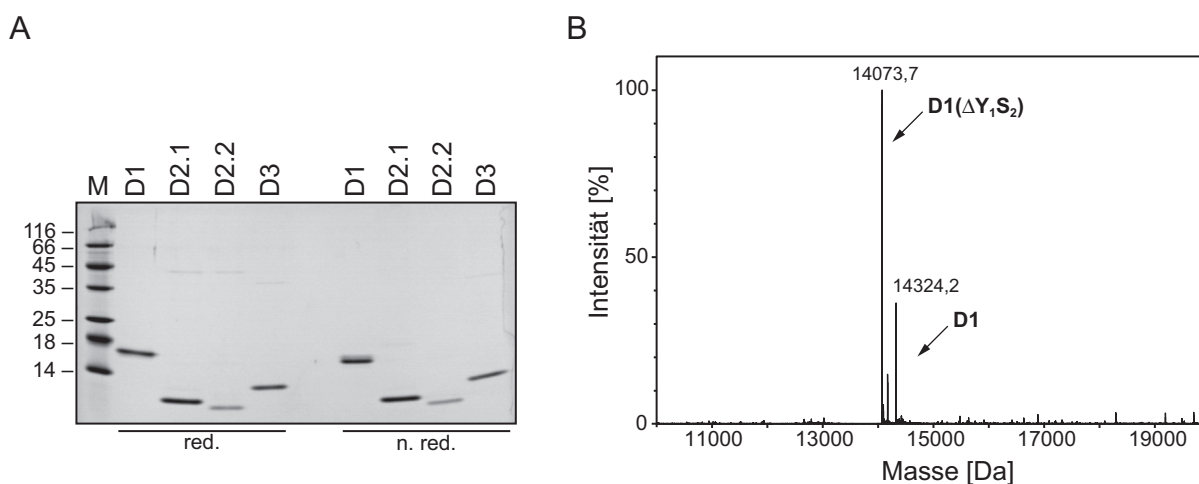


**Abbildung 6] Konstruktion von Plasmiden für die bakterielle Produktion von VEGFR-3 Domänen.** (A) Schematische Darstellung des pASK75-Expressionsvektors für die Expression von VEGFR-3(D1-2). Das Gen für die jeweilige VEGFR-3-Domäne(n) steht unter der transkriptionellen Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin induzierbaren Tetracyclin-Promotor/Operators ( $tet^{p/o}$ ) und wird durch die Terminatorsequenz des Lipoproteins ( $t_{lpp}$ ) terminiert. Das Plasmid trägt die kodierenden Sequenzen für die N-terminale Fusion des *Outer Membrane Protein A* Signalpeptids (OmpA), welches die Translokation des Proteins in das bakterielle Periplasma bewirkt, sowie für ein His<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsel am C-Terminus (His<sub>6</sub>). Der tet-Repressor (tetR) wird zusammen mit der  $\beta$ -Lactamase (bla), als Resistenzmarker, konstitutiv exprimiert und dient so der dichten Repression des Promotors. Die Replikation des Plasmids wird durch den Replikationsursprung (ori) der pUC-Plasmidfamilie gewährleistet; f1-IG kennzeichnet die intergene Region des filamentösen Phagen f1. (B) Expressionskassetten der verschiedenen konstruierten pASK75-Plasmide zur bakteriellen Produktion der VEGFR-3-Domänen 1 bis 3.

Aus der Literatur waren zur gegebenen Zeit keinerlei Informationen über die Produktion von VEGFR-3-Fragmenten in *E. coli* veröffentlicht. Für eine explorative Expressionsanalyse wurden deshalb zunächst die vier Einzeldomänen D1, D2.1, D2.2 und D3 gemäß Abschnitt 2.14.1 als periplasmatische Proteine in *E. coli* im 2 L Maßstab im Schüttelkolben produziert. Nach Ernte und Präparation des periplasmatischen Zellextrakts wurde eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC; Porath *et al.*, 1975) an Zn<sup>2+</sup>-beladener IDA-Sepharose durchgeführt (Abschnitt 2.16.2), wobei alle Domänen in hoher Reinheit isoliert werden konnten.



Domäne 1 zeigte deutlich höhere Ausbeute als D2.1, D2.2 und D3; das kürzere D2-Fragment D2.2 ließ sich am schlechtesten exprimieren. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel zeigten alle vier Einzeldomänen bereits nach der IMAC eine hohe Reinheit von > 90 % (Abbildung 7). D1 wies unter nicht reduzierenden Bedingungen eine schwache Doppelbande sowie ein retardiertes Migrationsverhalten auf und lief im SDS-Gel bei etwa 16 statt 14,3 kDa. Im Gegensatz zu D2 und D3 kann die Domäne 1 neben der für die Ig-Faltung typischen Disulfidbrücke (Cys51-Cys111), welche die beiden Faltblätter als Sandwich verknüpft, eine zweite Disulfidbrücke mit zwei zusätzlich vorhandenen Cysteinresten an den Positionen 84 und 93 ausbilden, was das Auftreten von Disulfidisomeren im SDS-Gel nahelegt. Die zweite Disulfidbrücke ist allerdings nicht als solche in der UniProt Knowledgebase annotiert und interessanterweise auch in der im späteren Verlauf dieser Arbeit veröffentlichten Kristallstruktur von D1-2 im Komplex mit VEGF-C (Leppänen *et al.*, 2013) nicht aufgelöst.



**Abbildung 7 | Produktion und Reinigung der VEGFR-3 Einzeldomänen D1, D2.1, D2.2 und D3.** (A) SDS-PAGE-Analyse der periplasmatisch in *E. coli* produzierten Einzeldomänen nach der IMAC unter reduzierenden (red.) und nicht reduzierenden (n. red.) Bedingungen. (B) ESI-MS-Spektrum von VEGFR-3(D1). Für das mature Protein wurde nach korrekter Abspaltung der OmpA-Signalsequenz und Ausbildung von zwei Disulfidbrücken eine Masse von 14323,7 Da erwartet (Gasteiger *et al.*, 2005). Der größere Peak mit einer Masse von 14073,7 Da kann einem um die zwei N-terminalen Aminosäuren  $Y_1 S_2$  verkürzten Proteinfragment zugeordnet werden.

Aufgrund des insgesamt zu langsamen Migrationsverhaltens von D1 in der SDS-PAGE lag der Verdacht nahe, dass die OmpA-Signalsequenz nicht korrekt prozessiert wurde. D1 wurde daher einer Elektrospray-Massenspektrometrie-Analyse unterzogen und die gemessene apparente Proteinmasse mit dem aus der Primärsequenz berechneten Molekulargewicht (Gasteiger *et al.*, 2005) verglichen. Die Abspaltung des OmpA-Signalpeptids mit etwa 2 kDa konnte hierbei allerdings bestätigt und das korrekt prozessierte Protein mit zwei ausgebildeten Disulfidbrücken im Rahmen der Messgenauigkeit nachgewiesen werden (**Abbildung 7**). Jedoch wurde zudem eine zweite, kleinere Proteinspezies von 14073,7 Da mit noch höherer Intensität detektiert. Die ermittelte Massendifferenz von  $\Delta = -250$  Da entspricht den ersten beiden N-terminalen Aminosäuren Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub> des nativen Proteins und deutet auf eine heterogene, überschießende Prozessierung des Signalpeptids hin.

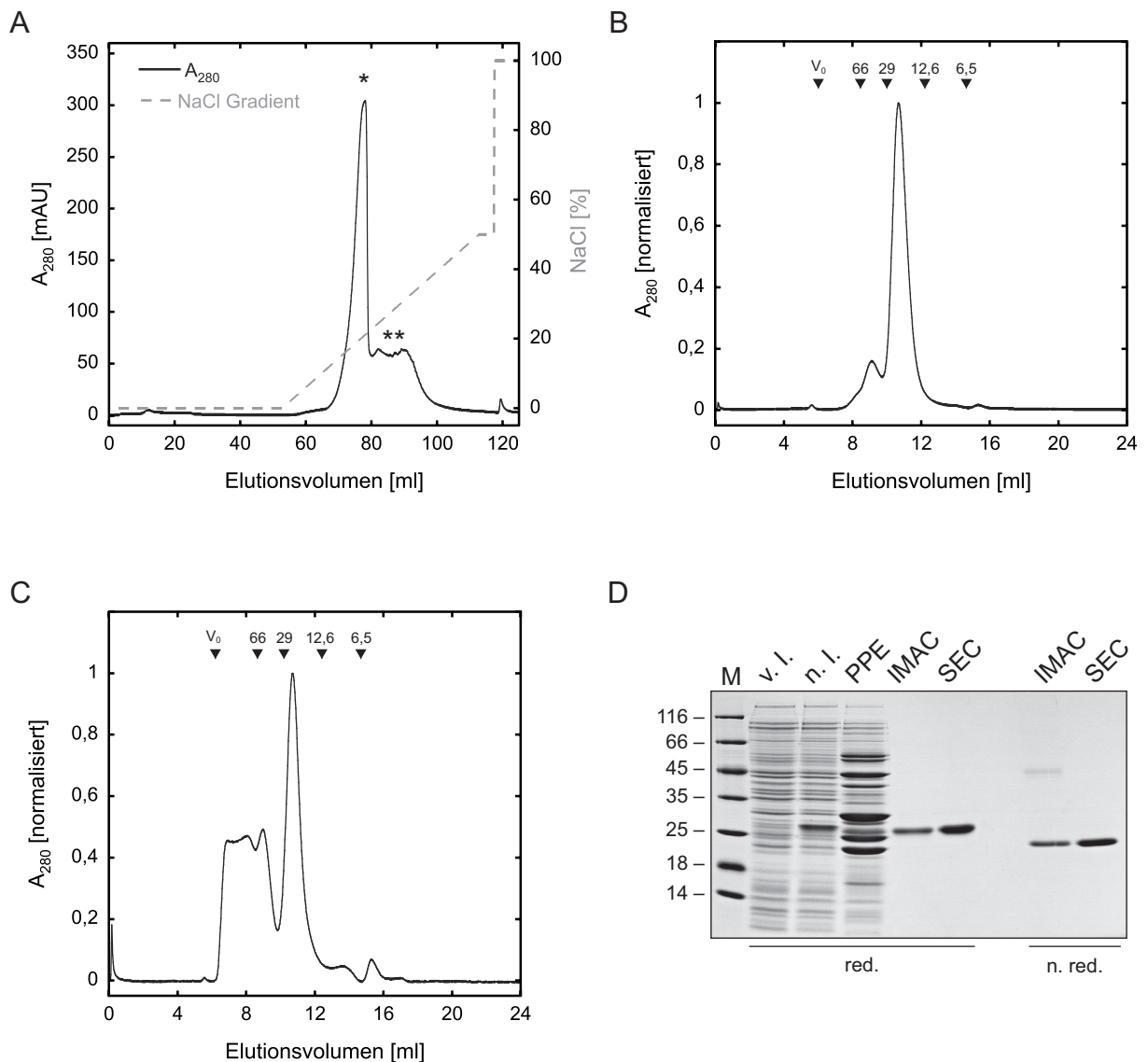
Die Abspaltung der OmpA-Signalsequenz nach oder während der Translokation über die innere Bakterienmembran erfolgt durch die Signalpeptidase I (Auclair *et al.*, 2012), deren Substratspezifität

## Ergebnisse

durch die Verteilung von hydrophoben großen bzw. kleinen Aminosäuren im Bereich der Schnittstelle entsprechend der „(-1, -3)-Regel“ (von Heijne, 1983) bestimmt wird. Die Kriterien der (-1, -3)-Regel werden ebenfalls im Kontext der ersten Aminosäuren der VEGFR-3 Domäne 1 erfüllt (Ala-Tyr-Ser). Es entsteht somit eine um zwei Aminosäuren versetzte potentielle Schnittstelle, was offensichtlich zu einer heterogenen Prozessierung des Signalpeptids und dem Auftreten einer am N-Terminus um  $Y_1S_2$  verkürzten Proteinspezies im Massenspektrum von D1 führt.

Basierend auf den Ergebnissen für die Einzeldomänen erfolgte die Produktion des 200 Aminosäuren umfassenden D1-2-Fragments in *E. coli*. Zur Begünstigung der physiologischen Disulfidbrücken wurde D1-2 mit den durch pTUM4 kodierten periplasmatischen Thiol-/Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC, die die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren, sowie den Prolylcis/trans-Isomerasen FkpA und SurA (Schlapschy *et al.*, 2006) koexprimiert. Ein Expressionsversuch im 2 L Schüttelkolben ergab im Vergleich zu den Einzeldomänen eine deutlich niedrigere Proteinausbeute. Da für die geplante Selektion und Charakterisierung VEGFR-3(D1-2)-spezifischer Lcn2-Varianten größere Proteinmengen benötigt wurden, erfolgte die Produktion von D1-2 bei hoher Zelldichte in einem 8 L Laborfermenter im *Fed Batch*-Verfahren. Das rekombinante Protein wurde anschließend durch IMAC und AEX von Wirtszellproteinen sowie Oligomeren und Aggregaten befreit (Abbildung 8). Verbleibende dimere Proteinkomplexe wurden schließlich durch Größenausschlusschromatographie (SEC) entfernt und so eine monodisperse Proteinpräparation erhalten. Das monomere D1-2 wies mit einem Elutionsvolumen von 10,7 ml ein um den Faktor 1,2 erhöhtes hydrodynamisches Volumen im Vergleich zum Erwartungswert auf, was auf die stark asymmetrische Form im Vergleich zu den für die Kalibrierung der Gelfiltrationssäule verwendeten globulären Standardproteinen zurückgeführt werden kann. Die Reinheit des Proteins wurde während der einzelnen Chromatographieschritte durch SDS-PAGE verfolgt und betrug schließlich > 95 %, wobei durchschnittlich 6 mg monomeres D1-2 aus einer 8 L Fermentation erhalten wurden.

In einer anschließenden ESI-MS-Analyse des so isolierten Proteins wurde wie schon bei D1 eine heterogene Abspaltung des Signalpeptids festgestellt (nicht gezeigt). Infolgedessen wurden die ersten zwei Aminosäuren ( $Y_1S_2$ ) der Domäne 1 durch ortsgerichtete Mutagenese deletiert und das Expressionsplasmid pASK75-Flt4-(D1-2 $\Delta$ YS)-His konstruiert. Das damit produzierte Protein zeigte in der MS-Analyse eine einheitliche Abspaltung der OmpA-Signalsequenz, so dass eine homogene Proteinpräparation erhalten wurde. Das so gewonnene VEGFR-3 Fragment D1-2 wurde im Rahmen dieser Arbeit vielfältig eingesetzt, insbesondere zur Selektion und Charakterisierung von VEGFR-3 bindenden Lcn2-Varianten.

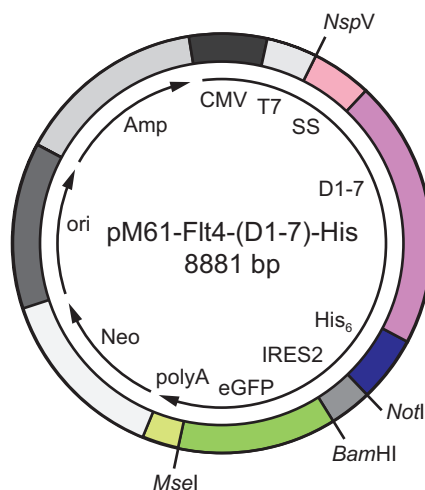


**Abbildung 8 | Bakterielle Produktion des rekombinanten VEGFR-3(D1-2) im 8 L Bioreaktor und chromatographische Reinigung.** (A) AEX von D1-2 an einer Resource Q-Säule bei pH 7,5. IMAC-gereinigtes D1-2 wurde in Gegenwart von 40 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,5 an die quartäre Ammonium-Matrix adsorbiert und monomeres D1-2 (\*) von disulfidverbrückten Dimeren, Multimeren und Aggregat (\*\*) durch Anlegen eines flachen NaCl-Gradienten getrennt. (B, C) Analytische Gelfiltration von AEX-Eluatfraktionen an einer S75 HR 10/30 Säule. Der in (B) gezeigte Elutionspeak bei 10,7 ml entspricht dem monomeren VEGFR-3(D1-2) mit 23,5 kDa aus dem Hauptpeak der AEX. In (C) wurde eine Fraktion der bei höheren NaCl-Konzentrationen in der AEX eluierten Proteinfraction aufgetragen und zeigt erwartungsgemäß einen hohen Anteil an multimerem und aggregiertem Protein. Die mit Pfeilen angegebenen Größenstandards entsprechen dem mit Dextranblau (2000 kDa) bestimmten Totvolumen  $V_0$  bei 6,45 ml sowie den Elutionsvolumina verschiedener globulärer Proteine in kDa. (D) SDS-PAGE zur Dokumentation der Expression und Reinigung von D1-2. Das 12 %ige Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt eine Probe des Gesamtzellaufschlusses vor (v.l.) und nach Induktion der Genexpression (n.l.), eine Probe des Periplasmaextrakts (PPE) sowie eine Fraktion der IMAC und Gelfiltration (SEC) mit (red.) und ohne (n. red.) vorherige Reduktion durch  $\beta$ -Mercaptoethanol. M entspricht dem Größenmaker in kDa.

### 3.1.2 Konstruktion eines Expressionsvektors und transiente Expression von VEGFR-3(D1-7) in humanen Zellen

Die VEGF-C bindenden Domänen 1-2 werden C-terminal von den Domänen 3 bis 7 gefolgt und liegen auf der Zelloberfläche glycosyliert vor. Um diesen natürlichen Kontext bei der Selektion und Charakterisierung von Anticalinen zu erhalten, wurde der gesamte extrazelluläre Teil des Rezeptors in einem humanen Zellkultursystem gentechnisch hergestellt. D1-7 wurde hierzu als lösliches sekretiertes Protein exprimiert und aus dem Kulturüberstand gereinigt.

Ein für die Transfektion von humanen Zellen geeignetes Expressionsplasmid wurde konstruiert, indem der D1-7 umfassende Genabschnitt der cDNA von VEGFR-3 amplifiziert und auf dem Plasmid pReceiver-M61-VEGFR-3 (ursprünglich als EX-M0928-M61 bezeichnet; GeneCopoeia) kloniert wurde. Das resultierende Expressionsplasmid pM61-Flt4-D1-7-His kodiert zudem für ein zusätzlich eingefügtes His<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsel am C-Terminus des Rezeptorfragments, um analog zu den in *E. coli* produzierten Rezeptordomänen die Reinigung des Proteins mit Hilfe der IMAC zu ermöglichen (Abbildung 9). Die Planung der für die Klonierung eingesetzten Oligodesoxynukleotide ist im Anhang dieser Arbeit gezeigt (Abbildung A2).



**Abbildung 9 | Das Expressionsplasmid pM61-Flt4-(D1-7)-His zur transienten Expression des VEGFR-3 Fragments mit den Domänen 1-7 in Säugerzellen.** pM61-Flt4-(D1-7)-His trägt das Gen zur konstitutiven Expression von D1-7 unter Kontrolle des effizienten Cytomegalovirus-Promoters (CMV). Die translatierte Polypeptidkette entspricht den Aminosäuren M1-I776 sowie einem zum Zweck der Proteinreinigung carboxyterminal fusionierten Ala-His<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsel (His<sub>6</sub>). Die Abschätzung der Transfektionseffizienz erfolgte anhand der Expression des Reporterproteins eGFP, welches als zweites Element in einem dicistronischen Operon hinter einer internen Ribosomenbindestelle (IRES2) angeordnet ist. Des Weiteren verfügt das Plasmid über den Replikationsursprung des Simian Virus 40 (SV40), was eine effiziente Replikation des transfizierten Plasmids in SV40-permissiven Zelllinien erlaubt. Für die Replikation in Bakterien steht der ColE1-Replikationsursprung zur Verfügung. Weitere Elemente des Plasmids sind die Resistenzgene für Neomycin (Neo) und Ampicillin (Amp).

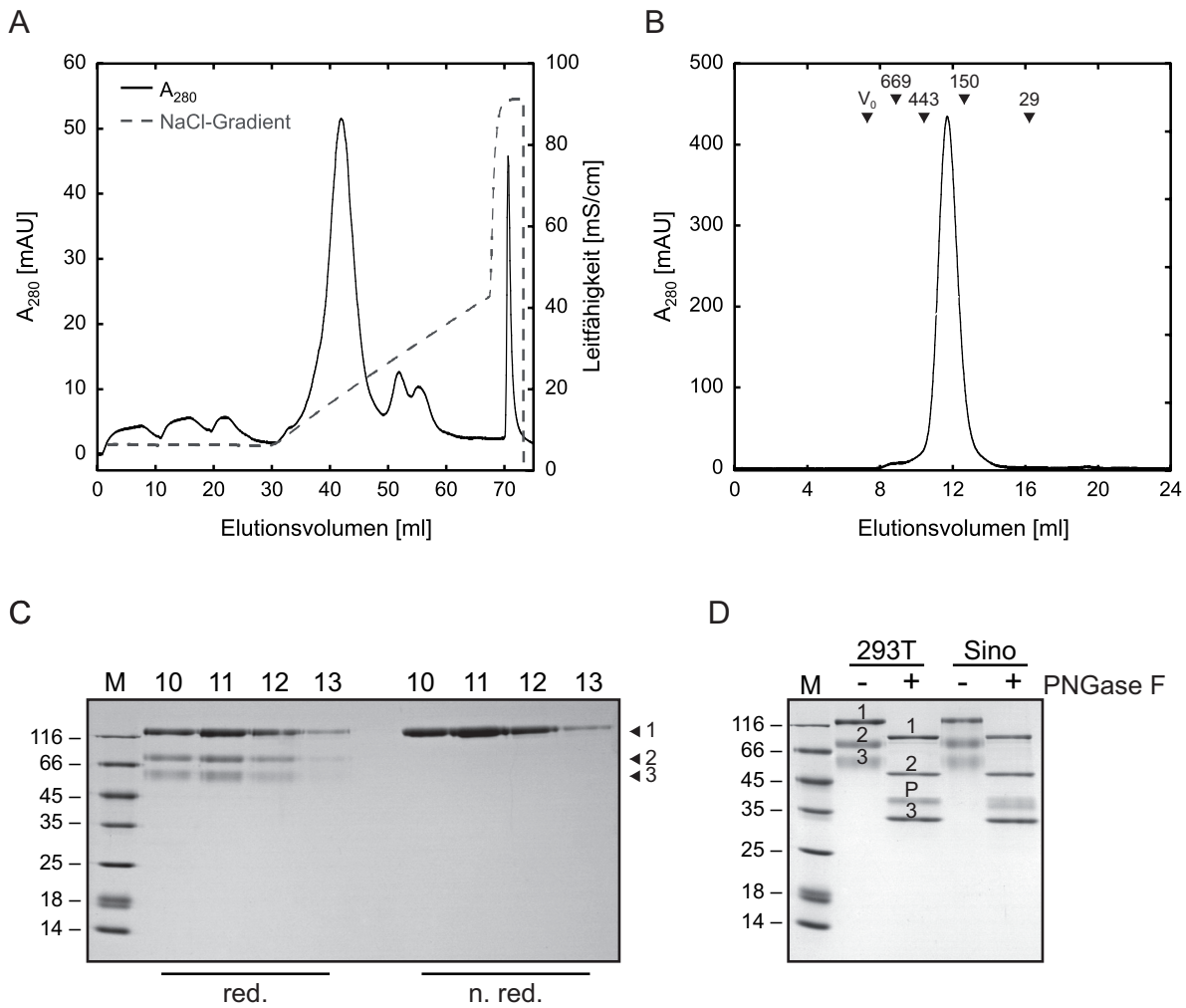
Die Produktion der extrazellulären VEGFR-3 Domäne erfolgte in der Zelllinie 293T (DuBridg *et al.*, 1987), einem das große T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) exprimierenden Derivat der 293 Zellen (Graham *et al.*, 1977). Als Transfektionsreagenz diente das lineare Polykation Polyethylenimin (PEI),

welches aufgrund seiner stark positiven Ladung die negative Ladung der DNA abschirmt (Boussif *et al.*, 1995) und die endozytotische Aufnahme der insgesamt positiv geladenen PEI:DNA-Komplexe an der anionischen Zelloberfläche ermöglicht. Die initialen Transfektionsexperimente erfolgten im analytischen 2 ml Maßstab in einer 6-Well Zellkultur-Platte. Pro Well wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und diese für 24 h kultiviert. Zur Evaluierung der Komplexbildung und des Gentransfers wurde die Konzentration des PEI-Polymers (1 – 4  $\mu\text{g/ml}$ ) bei gleichbleibender DNA-Menge (1  $\mu\text{g/ml}$ ) titriert und die Transfektionseffizienz anhand des Reporterproteins eGFP fluoreszenzmikroskopisch abgeschätzt. Zudem wurde die D1-7-Expression auf dem Western-Blot detektiert (nicht gezeigt).

Die höchste Transfektionseffizienz wurde bei einem zweifachen PEI-Überschuss ermittelt und daraufhin die transiente Expression des D1-7 Proteins bei optimalem DNA:PEI-Verhältnis im 1 L Maßstab umgesetzt. 293T-Zellen wurden hierfür in Polystyren-Rollerflaschen ausgelegt (4x 250 ml), unter konstantem Rollen für 48 h angezogen und gemäß Abschnitt 2.15.2 mit dem Plasmid pM61-Flt4-D1-7-His transfiziert. Die Genexpression erfolgte anschließend für insgesamt 4 Tage, wobei das rekombinante Protein kontinuierlich in das Kulturmedium sezerniert wurde. Daraus wurde D1-7 anschließend mit Hilfe der IMAC isoliert. Nach diesem Chromatographieschritt wies die Proteinlösung noch eine hohe Verunreinigung durch das im Zellkulturmedium enthaltene Rinder-serumalbumin (BSA) auf, weshalb D1-7 einer anschließenden AEX, analog dem D1-2 Fragment, unterworfen wurde (Abbildung 10A).

In der abschließenden Gelfiltration an einer kalibrierten Säule eluierte D1-7 in Anwesenheit von PBS als monodisperser Proteinpeak bei 11,7 ml, was einem apparenten Molekulargewicht von 200 kDa entspricht (Abbildung 10B). Die berechnete Molekularmasse von D1-7 beträgt 97,4 kDa, wovon 85,4 kDa auf die Polypeptidkette und ca. 12 kDa auf die N-Glycosylierung an insgesamt 12 Positionen entfallen. Das in 293T-Zellen produzierte D1-7 weist demzufolge einen dimeren Oligomerisierungsstatus auf. Aus der Literatur ist bekannt (Leppänen *et al.*, 2013), dass die membranproximalen Domänen 4-7 in die Rezeptordimerisierung involviert sind, wobei speziell die Domänen 5 und 7 durch homotypische Interaktion die durch VEGF-C induzierte Dimerisierung strukturell vermitteln. Die also in der Gelfiltration beobachtete nicht-kovalente Dimerbildung (in Abwesenheit von VEGF-C) kann möglicherweise auf die relativ niedrige Ionenstärke des verwendeten PBS-Puffers zurückgeführt werden.

Eine Besonderheit des VEGFR-3 im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der VEGFR-Familie ist, dass dessen Polypeptidkette während der Biosynthese in der Domäne 5 zwischen den Aminosäuren R472 und S473 teilweise proteolytisch gespalten wird (Lee *et al.*, 1996). Die resultierenden Fragmente bleiben allerdings über zwei Disulfidbrücken (C445-C534 und C466-C486) in D5 kovalent miteinander verknüpft. Die Funktion dieser ungewöhnlichen posttranslationalen Prozessierung ist bisher ungeklärt. Eine partielle Prozessierung des Proteins konnte ebenfalls bei dem hier in 293T-Zellen produzierten D1-7 beobachtet werden (Abbildung 10C). Die drei im reduzierenden SDS-Gel sichtbaren Proteinbanden entsprechen den beiden durch die Proteolyse resultierenden Rezeptorfragmenten (58 und 39 kDa) sowie dem ungeschnittenen Protein (97 kDa), wohingegen in Abwesenheit von  $\beta$ -Mercaptoethanol lediglich eine scheinbar homogene, disulfidverbrückte Proteinbande sichtbar ist. Alle drei Proteinbanden migrierten im 12 %igen SDS-Gel im Vergleich zu ihren berechneten Werten bei höheren apparenten Molekulargewichten (120 vs. 97 kDa, 70 vs. 58 kDa und 50 vs. 39 kDa), was auf den hohen Grad an N-Glycosylierung zurückzuführen ist.



**Abbildung 10| Chromatographische Reinigung und biochemische Charakterisierung des in 293T-Zellen produzierten VEGFR-3(D1-7).** (A) AEX von D1-7 nach IMAC an einer Resource Q-Säule bei pH 7,5. (B) SEC an einer mit PBS äquilibrierten S200 Tricorn 10/300 GL Säule. D1-7 eluiert als monodisperser Peak bei 11,7 ml, was dem apparenten Molekulargewicht des Dimers von 200 kDa entspricht. Die Pfeile zeigen die Elutionsvolumina verschiedener globulärer Standardproteine (angegeben in kDa). (C) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Analyse von D1-7 aus der SEC. Die aus der Gelfiltration resultierenden Proteinfractionen 10-13 wurden unter reduzierenden (red.) und nicht reduzierenden (n. red.) Bedingungen in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Pfeile kennzeichnen die drei erwarteten Proteinfragmente mit einer Größe von (1) 97, (2) 58 und (3) 39 kDa. M entspricht dem Größenmarker in kDa. (D) Analytische Deglycosylierung von D1-7 durch die Endoglycosidase PNGase F. Das 12 %ige SDS-Gel zeigt eine Probe des nativen (-) bzw. des deglycosylierten (+) Proteins unter reduzierenden Bedingungen. Das kommerziell verfügbare D1-7 (Sino Biological) diente als Referenzprotein und zeigt ein mit dem in dieser Arbeit aus transfizierten 293T-Zellen gewonnenen Protein identisches Migrationsverhalten. Die oberste Bande (1) entspricht dem nativen glycosylierten D1-7 mit 97 kDa. Nach der enzymatischen Hydrolyse migriert die Bande entsprechend ihrer berechneten Molekularmasse bei 85 kDa. Die beiden darunterliegenden Banden sind die während der Biosynthese durch proteolytische Spaltung entstandenen Fragmente bei nativ 58 (2) und 39 kDa (3) bzw. deglycosyliert 50 (2) und 35 kDa (3). Ebenfalls sichtbar ist die 36 kDa große PNGase F in dem Reaktionsansatz (P). M entspricht dem Größenmarker in kDa.

Zur genaueren Analyse der apparenten Molekulargewichte im SDS-Gel wurde D1-7 durch die Endoglycosidase PNGase F (Maley *et al.*, 1989) deglycosyliert. PNGase F hydrolysiert die glycosidische Bindung komplexer Oligosaccharide zwischen dem Asparagin-Rest der Polypeptidkette und dem innersten Kernzucker N-Acetylglucosamin (GlcNac), wobei das jeweils vollständige Oligosaccharid von dem intakten Polypeptid freigesetzt wird. Die deglycosylierten Proteine wiesen im SDS-Gel eine höhere elektrophoretische Mobilität auf und migrierten entsprechend ihrer berechneten Massen (Abbildung 10D).

Zur weiteren Evaluierung des in dieser Arbeit produzierten D1-7 wurde ein kommerziell verfügbares VEGFR-3 Protein, welches ebenso die Domänen 1-7 von Tyr25 bis Ile776 sowie ein carboxyterminales His-Tag umfasst und in einem humanen Zellkultursystem produziert wurde, von Sino Biological erworben und parallel die Deglycosylierung mit diesem als Referenzprotein durchgeführt. Beide Proteinpräparationen wiesen sowohl vor als auch nach der Deglycosylierung ein identisches Migrationsverhalten im SDS-Gel auf, was die korrekte Biosynthese des hier in 293T-Zellen produzierten D1-7 belegt. Aus vier Rollerflaschen mit insgesamt 1 L Kulturvolumen wurden auf diese Weise bis zu 500 µg D1-7 erhalten und dieses im Rahmen dieser Arbeit vielfältig, insbesondere für die Charakterisierung und Maturierung selektierter Lcn2-Varianten eingesetzt.

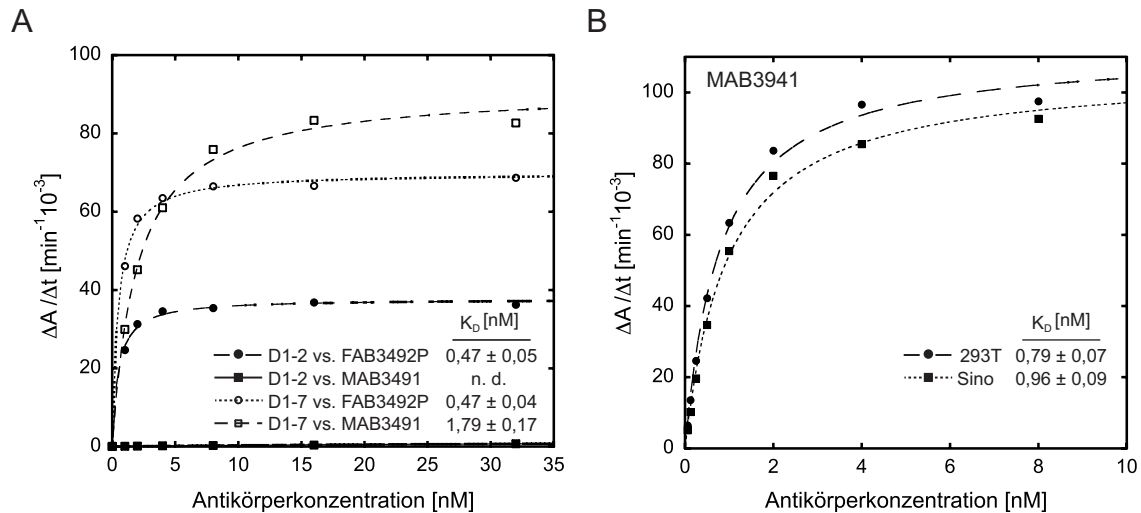
### 3.1.3 Funktionelle Analyse der gentechnisch hergestellten VEGFR-3-Fragmente D1-2 und D1-7 mittels ELISA und SPR-Spektroskopie

Die Funktionalität des bakteriell produzierten D1-2 und des aus 293T-Zellen gewonnenen D1-7 wurde im ELISA anhand der Bindungswechselwirkung zweier kommerziell verfügbarer monoklonaler IgG1-Antikörper, MAB3491 (Su *et al.*, 2008) und FAB3492P (Shawber *et al.*, 2007), untersucht. Von beiden Antikörpern war bekannt, dass sie ein Epitop innerhalb des extrazellulären Bereichs des VEGFR-3 erkennen. Über die Spezifität hinsichtlich der einzelnen Domänen lagen jedoch keine Informationen vor. FAB3492P ist zur fluorimetrischen Detektion mit Phycoerythrin konjugiert, dem jedoch in diesem Assay keine Verwendung zukam. Als Referenzprotein diente das bereits zuvor verwendete kommerziell verfügbare D1-7 Protein von Sino Biological. Für die Untersuchung der Bindungswechselwirkung in einem direkten ELISA wurden frisch gereinigtes D1-2 (*E. coli*) sowie zunächst das Referenzprotein D1-7 (Sino) auf die Oberfläche einzelner Vertiefungen einer 96-Well ELISA-Platte adsorbiert und anschließend die Bindung des jeweiligen Antikörpers bei verschiedenen Konzentrationen detektiert.

Für das D1-7 Referenzprotein (Sino) zeigten beide Antikörper eine konzentrationsabhängige Bindung (Abbildung 11A) mit Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) im nanomolaren bis subnanomolaren Bereich (FAB3492P  $K_D = 0,47 \pm 0,04$  nM; MAB3491  $K_D = 1,79 \pm 0,17$  nM). Für das in *E. coli* produzierte Rezeptorfragment D1-2 konnte Bindung des FAB3492P mit  $K_D = 0,47 \pm 0,05$  nM beobachtet werden; eine Bindung von MAB3491 war jedoch nicht nachweisbar. Dieser Befund spricht im Fall von MAB3491 für eine innerhalb der Domänen 3-7 lokalisierte Bindestelle. Die Bindungseigenschaften von FAB3492P deuten insgesamt auf ein innerhalb der Domänen 1 und 2 gelegenes Epitop des Rezeptors und belegen damit auch die Funktionalität des in *E. coli* produzierten Rezeptorfragments D1-2.

Die Bindungswechselwirkung von MAB3491 gegenüber dem aus 293T gewonnenen D1-7 wurde in einem analogen immunochemischen Nachweis mit dem Referenzprotein D1-7 (Sino) verglichen

(Abbildung 11B). Die erhaltenen konzentrationsabhängigen Sättigungskurven wiesen keine signifikanten Unterschiede auf, was die korrekte Konstitution des hier produzierten D1-7 bestätigt.



**Abbildung 11 | Untersuchung der Funktionalität der produzierten VEGFR-3 Fragmente im ELISA.** (A) Detektion von D1-2 und D1-7 mit den VEGFR-3 spezifischen Antikörpern MAB3491 und FAB3492P. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit dem in *E. coli* produzierten D1-2 bzw. dem Referenzprotein D1-7 (Sino) beschichtet und nach Absättigung der Oberfläche mit BSA eine Verdünnungsreihe von MAB3491 bzw. FAB3492P appliziert. (B) Detektion von D1-7 aus 293T durch MAB3491 im Vergleich zum Referenzprotein. Eine Verdünnungsreihe des Antikörpers MAB3491 wurde in die mit D1-7 aus 293T Zellen oder von Sino Biological beschichteten Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und die jeweilige Bindung in einer chromogenen Reaktion detektiert.

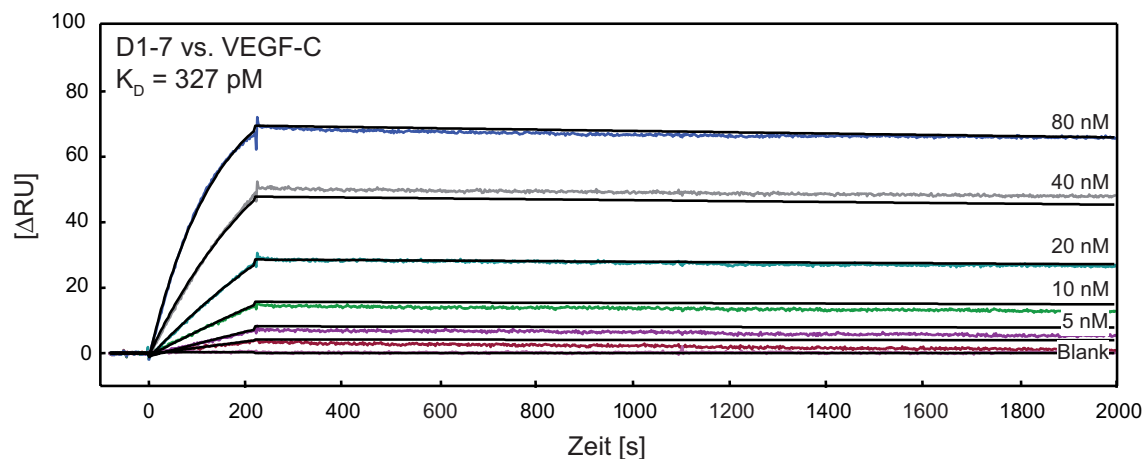
Neben dem Nachweis der Funktionalität der in dieser Arbeit produzierten VEGFR-3 Proteine bieten die Ergebnisse der durchgeführten ELISA-Studien Rückschlüsse auf die Epitopspezifitäten der beiden verwendeten Antikörper. MAB3491 erwies sich aufgrund seines in den Domänen 3-7 gelegenen Epitops als geeignet für die im späteren Verlauf der Arbeit durchgeführten Experimente zur Wechselwirkung von VEGFR-3 bindenden Anticalinen mit dem natürlichen Liganden VEGF-C, in denen eine Interaktion des Antikörpers mit der in D1-2 gelegenen VEGF-C Bindestelle unerwünscht ist (Abschnitt 3.5.1).

Zur weiteren Untersuchung der Funktionalität der beiden produzierten VEGFR-3 Fragmente wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) angewandt, um die Interaktion des natürlichen Liganden VEGF-C markierungsfrei und mit hoher Empfindlichkeit in Echtzeit zu analysieren. Das jeweilige Rezeptorfragment wurde hierzu auf der Oberfläche eines Mikrosensorchips immobilisiert und der Ligand in flüssiger Phase kontinuierlich zudosiert. Die Interaktion der beiden Bindungspartner wurde anhand der an der Sensorchip-Oberfläche detektierten Massenzunahme als Resonanzeinheiten (*Resonance Units*, RU) gemessen (Schuck, 1997).

D1-2 oder D1-7 wurde kovalent an die Oberfläche eines Carboxymethyl-Dextran-Sensorchips gekoppelt. Verschiedene Konzentrationen des kommerziell verfügbaren VEGF-C (Sino Biological) wurden injiziert und die Komplexbildung über den Anstieg des Resonanzsignals als Funktion der Zeit gemessen. Die erhaltenen Messkurven wurden anschließend durch doppelte Referenzsubtraktion



(Abschnitt 2.17.1) korrigiert und unter Annahme einer monovalenten Komplexbildung entsprechend dem bimolekularen Bindungsmodell nach Langmuir die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziations- ( $k_{on}$ ) und Dissoziationsphase ( $k_{off}$ ) ermittelt.



**Abbildung 12 | Untersuchung der Bindungsaktivität von D1-7 gegenüber VEGF-C durch SPR.** Die Oberfläche eines CMD200I Sensorchips wurde mit 1150 RU des rekombinanten D1-7 durch Aminkopplung derivatisiert. Eine VEGF-C Verdünnungsreihe wurde bei konstantem Fluss von 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit PBS/T 0,05 als Laufpuffer injiziert und die Dissoziation anschließend für 30 min gemessen. Gezeigt sind die bezüglich des internen Referenzkanals und des Mittelwerts aus drei Pufferinjektionen korrigierten Sensorgramme (farbig) sowie die nach dem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell angepassten Kurven (schwarze Linien).

Die kinetische Analyse von D1-7 und VEGF-C ergab für  $k_{on}$  einen Wert von  $9,03 \pm 0,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und für  $k_{off}$  von  $2,95 \pm 0,08 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (Abbildung 12). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  kann aus dem Quotienten aus  $k_{off}/k_{on}$  errechnet werden und ergab für D1-7 einen Wert von 327 pM. Die Messung des kleineren D1-2 Fragments zeigte eine im Vergleich zu D1-7 deutlich niedrigere Affinität mit  $K_D = 40 \text{ nM}$  (nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Bindungskonstanten erscheinen insofern plausibel, als D1-7 aufgrund seiner dimeren Konstitution und der zusätzlichen Domänen 3-7 eine deutlich größere Interaktionsfläche für die Bindung des dimeren Liganden besitzt als das monomere D1-2. Eine deutlich höhere Affinität von VEGF-C gegenüber D1-7 als für D1-2 wurde bereits von Leppänen (2013) beobachtet, wobei insgesamt höhere Dissoziationskonstanten von  $K_D^{\text{D1-7}} = 5,6 \text{ nM}$  und  $K_D^{\text{D1-2}} = 250 \text{ nM}$  berichtet wurden.

Die Funktionalität der beiden rekombinanten Rezeptorfragmente wurde somit anhand zweier verschiedener Bindungstests nachgewiesen. Sowohl D1-2 als auch D1-7 erschienen also geeignet für die Verwendung als Targets für die *in vitro* Selektion von Lcn2-Varianten gegen VEGFR-3.

## 3.2 Selektion und Charakterisierung von Lcn2-Varianten gegen VEGFR-3

### 3.2.1 Anreicherung von Lcn2-Varianten mittels Phage Display

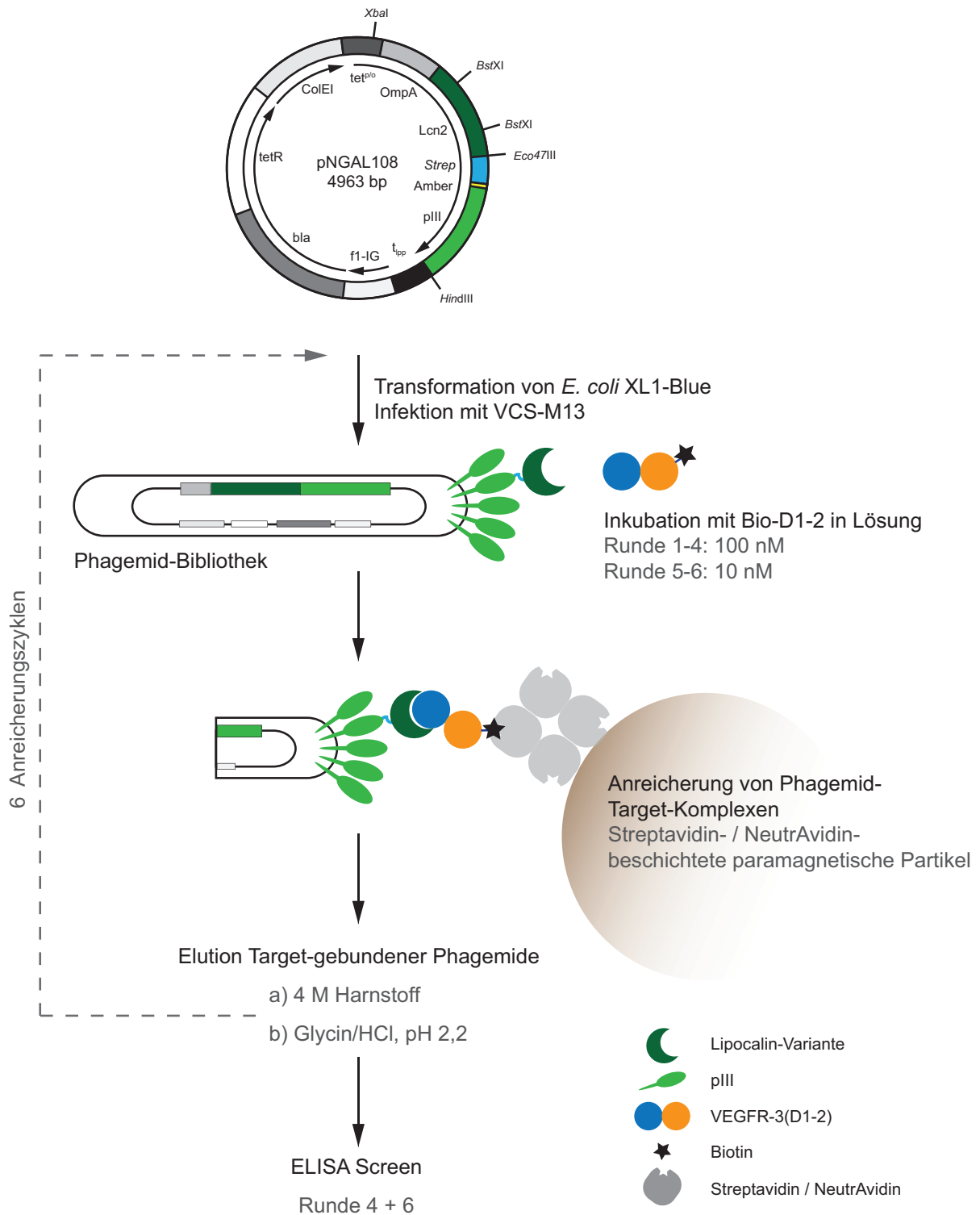
Zur Selektion von für VEGFR-3 spezifischen Lcn2-Varianten wurde die Methode des filamentösen Phage Display, welche die Präsentation von großen rekombinanten Peptid- oder Proteinbibliotheken

in funktioneller Form auf der Oberfläche von Bakteriophagen erlaubt, angewandt (McCafferty *et al.*, 1990). Ein wesentlicher Aspekt dieser Methode ist die physische Kopplung des Phänotyps eines präsentierten Peptids oder Proteins mit seiner kodierenden DNA. Die DNA liegt in diesem Fall einzelsträngig verpackt in ein und demselben Partikel vor, was die Isolierung eines bestimmten Protein-Phänotypen und dessen Reproduktion und Charakterisierung ermöglicht.

Filamentöse Bakteriophagen der F1-Familie sind in der Lage, Gram-negative Bakterien über die F-Pili zu infizieren (Model & Russel, 1988). Die Infektion von *E. coli* mit einem M13-Phagen erfolgt durch Adsorption des an der Spitze des Phagenpartikels lokalisierten pIII-Proteins an den F-Pilus einer männlichen *E. coli* Zelle. Die Capsidoberfläche weist typischerweise 5 Kopien des pIII-Proteins auf (Webster, 2001). Für das Phage Display wird der den F-Pilus bindende N-Terminus des pIII mit dem rekombinanten Protein fusioniert und die so an der Oberfläche der Phagemide präsentierten Lipocalin-Varianten als Bibliothek einer Durchmusterung zugänglich gemacht (Skerra, 2001). Das zentrale genetische Element hierbei ist das sogenannte Phasmid, ein Hybrid aus Phagen- und Plasmid-Vektor. Phasmide sind so konstruiert, dass sie neben dem pIII-Gen – mit verschiedenen singulären Restriktionsendonuklease-Schnittstellen – sowie einer Antibiotika-Resistenz, die Replikationsursprünge sowohl für ein *E. coli*-Plasmid (ColEI), als auch für den M13-Phagen (Intergen-Region, f1-IG) enthalten und zudem die Verpackung in einzelsträngiger Form in das Phagemidpartikel vermitteln.

Genprodukte, die für die Generierung eines vollständigen Phagen notwendig sind, fehlen dagegen. Die Produktion von rekombinanten M13-Phagen für das Phage Display erfolgt mit der Hilfe von Helfer-Phagen, wie zum Beispiel VCS-M13, welche einen Replikationsursprung mit verminderter Aktivität aufweisen und *in trans* alle strukturellen Proteine, die für den kompletten Phagen notwendig sind, zur Verfügung stellen. Die resultierenden Phagemide inkorporieren sowohl das pIII des Helferphagen als auch das Phasmid-codierte pIII-Fusionsprotein. Die Präsentation von im Überschuss vorhandenen Kopien des Wildtyp-pIII-Proteins und durchschnittlich einem rekombinanten pIII-Fusionsprotein an der Phagenoberfläche wird als monovalentes Phage Display bezeichnet, was zudem die Infektiosität des Partikels sicherstellt (Barbas *et al.*, 2001).

Die hier verwendete Lipocalin-Bibliothek basiert auf dem Phasmid pNGAL108 (Gebauer & Skerra, 2012), einem Derivat des generischen Plasmids pASK75 (Skerra, 1994), welches das Lcn2-Gen als Fusion mit dem kompletten pIII-Protein unter der transkriptionellen Kontrolle des stringent regulierten tet-Promotor/Operator-Systems trägt (Abbildung 13). Zwischen dem C-Terminus des Lipocalins und dem N-Terminus des pIII Proteins ist das *Strep*-tag (Schmidt & Skerra, 2007) gefolgt von einem supprimierbaren *Amber*-Stoppcodon inseriert. Der Transport des Proteins über die Zellmembran zur nicht lytischen Assemblierung der Phagenpartikel an der *E. coli*-Membran ist durch das dem N-Terminus vorangestellte OmpA-Signalpeptid gewährleistet. Weitere Vektor-Elemente sind die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (mit dem f1 Replikationsursprung) sowie das für die  $\beta$ -Lactamase kodierende Ampicillin-Gen als Resistenzmarker.

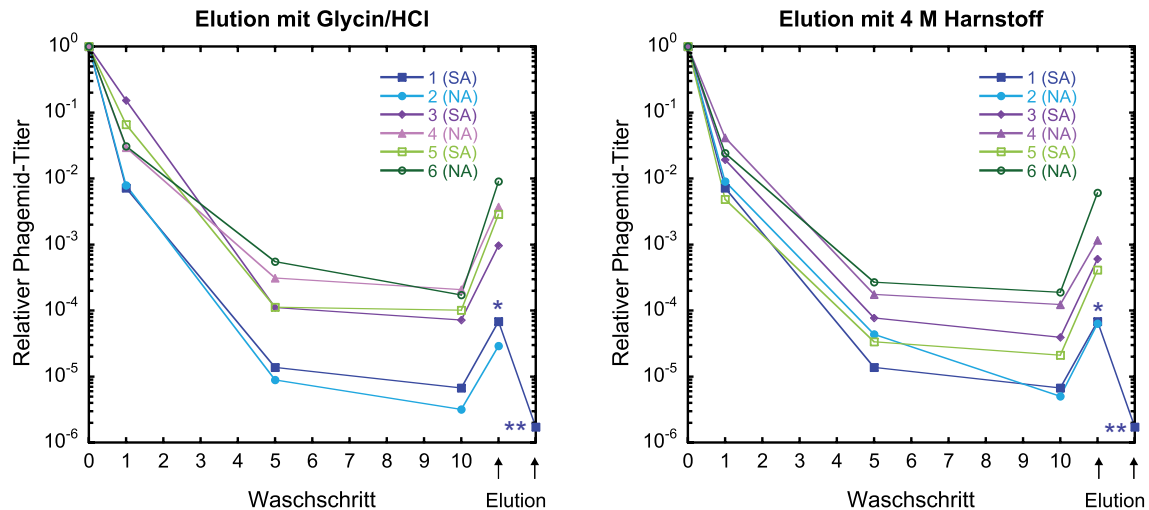


Die synthetisch hergestellte zentrale Genkassette für die Lipocalin-Zufallsbibliothek mit den 20 randomisierten Positionen kann über die zwei flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen auf pNGAL108 kloniert werden. Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen mit dem Ligierungsansatz und Superinfektion mit VCS-M13 Helferphagen werden die neu produzierten Hüllproteine an der inneren Bakterienmembran assembliert (Rakonjac *et al.*, 2011) und die das pIII-Fusionsprotein präsentierenden Phagemide in das Kulturmedium ausgeschleust. Nach Ernte und Präzipitation der Phagemid-Bibliothek mit PEG/NaCl kann diese für das Phage Display verwendet werden. Die bereits präparierte Phagemid-Bibliothek wurde freundlicherweise von der Pieris AG zur Verfügung gestellt.

Ein Anreicherungs- und Selektionszyklus des Phage Displays umfasst üblicherweise die Inkubation der Lipocalin-präsentierenden Phagemide mit dem isolierten Antigen („*Panning*“), gefolgt von extensiven Waschschritten zur Entfernung von unspezifisch oder schwach gebundenen Varianten sowie der selektiven Elution bindungsaktiver Phagemide und deren Amplifizierung durch Infektion und Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur. Für die Selektion von VEGFR-3 spezifischen Lipocalin-Varianten wurde die Strategie des *Solution-Phase Pannings* angewandt, bei welchem das zuvor biotinylierte Target-Molekül (Antigen) während der Inkubation mit der Phagemid-Bibliothek in Lösung vorliegt. Konformationelle Änderungen bzw. Denaturierungseffekte durch vorherige Immobilisierung des Antigens werden hierdurch weitgehend vermieden. Die Verwendung des Targets in Lösung ermöglicht zudem eine akkurate Einstellung seiner Konzentration bzw. deren stufenweise Erniedrigung, um die Selektion von hoch-affinen Bindern in späteren Anreicherungszyklen zu begünstigen. In der ersten Panning-Runde wurde die naive Phagemid-Bibliothek mit 100 nM des biotinylierten D1-2 (Bio-D1-2) inkubiert. Die gebildeten Phagemid-Target-Komplexe wurden nach der Adsorption an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel durch 10 Waschschriffe von unspezifischen und schwach bindenden Phagemiden befreit und in zwei sequenziellen Schritten eluiert: 1. durch das Chaotrop Harnstoff und 2. durch sauren pH-Wert (Glycin/HCl, pH 2,2), gefolgt von schneller Neutralisierung. Die zwei neutralisierten Elutionsfraktionen wurden getrennt voneinander zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue verwendet und amplifiziert (Abschnitt 2.11.3). Die resultierenden Sub-Bibliotheken wurden in zwei parallelen Panning-Ansätzen insgesamt fünf weiteren Anreicherungsrounden unterzogen, wobei die jeweilige Elutionsmethode beibehalten wurde (Abbildung 13).

Um die Anreicherung von potentiell Streptavidin bindenden Phagemiden zu unterbinden, wurden nach Runde 1 alternierend Streptavidin (SA) und NeutrAvidin (NA) beschichtete paramagnetische Partikel verwendet. NeutrAvidin ist die deglycosylierte Form von Avidin (A) aus dem Hühnereiweiß (Hiller *et al.*, 1987). Durch chemische Modifizierung geladener Gruppen an der Proteinoberfläche weist NeutrAvidin zudem einen annähernd neutralen isoelektrischen Punkt auf ( $pI_A = 10,5$  vs.  $pI_{NA} = 6,3$ ), ähnlich dem bakteriellen Streptavidin ( $pI_{SA} = 6,8 - 7,5$ ), und zeigt aufgrund dessen deutlich geringere unspezifische Bindungseigenschaften (Diamandis & Christopoulos, 1991).

Während des Anreicherungsprozesses wurden Proben der eingesetzten Phagemid-Bibliothek sowie ausgewählter Wasch- und Elutionsfraktionen entnommen und jeweils der Phagemid-Titer bestimmt (Abbildung 14). In der ersten Runde wurden von den eingesetzten  $2,0 \times 10^{13}$  Phagemiden der naiven Bibliothek  $1,39 \times 10^9$  (0,0069 %) durch chaotrophe und  $3,52 \times 10^7$  (0,0002 %) durch die anschließende saure Elution freigesetzt. In den folgenden drei Anreicherungszyklen erhöhte sich der Phagemid-Titer des Eluats schließlich in Runde 4 auf 0,116 % im Fall der Elution mit Harnstoff, bzw. 0,373 % bei Elution unter sauren Bedingungen.



**Abbildung 14 | Bestimmung der Phagemid-Titer ausgewählter Fraktionen während der Anreicherungszyklen 1 bis 6.** Im ersten Zyklus wurden  $2,0 \times 10^{13}$  Phagemide der naiven Bibliothek mit 100 nM biotinyliertem D1-2 in Lösung inkubiert. Schwach gebundene und unspezifische Varianten wurden in 10 Waschschriffen mit PBS/T 0,1 entfernt und anschließend die gebundenen Phagemide in zwei sequenziellen Schritten mit 4 M Harnstoff (\*) und 10 mM Glycin/HCl, pH 2,2 (\*\*) eluiert. Der Phagemid-Titer der eingesetzten Bibliothek, ausgewählter Waschfraktionen sowie der Eluat-Fraktionen wurde anhand der Zahl infektiöser Partikel (CFU) ermittelt und zur übersichtlichen Darstellung auf die Menge der im jeweiligen Selektionszyklus eingesetzten Phagemide als Anteil berechnet. *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden mit den Eluaten reinfiziert und die amplifizierten Phagemide in zwei parallelen Ansätzen für die nächste Runde eingesetzt, wobei die jeweilige Elutionsmethode aus der ersten Runde beibehalten wurde. Die Anreicherung der Target-gebundenen Phagemide erfolgte alternierend mit Hilfe von Streptavidin (SA) oder Neutravidin (NA)-beschichteten paramagnetischen Partikeln. Insgesamt sechs Anreicherungszyklen wurden durchgeführt, wobei in den Runden 5 und 6 die Stringenz der Selektion durch Erniedrigung der Target-Konzentration von 100 auf 10 nM erhöht wurde.

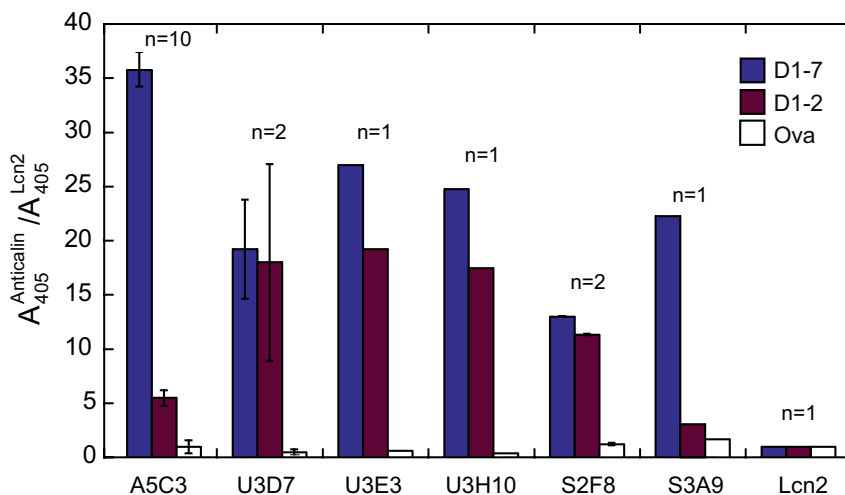
Nach dem 4. Panning-Zyklus wurde eine erste Auswahl an bindungsaktiven Phagemiden analysiert. Die zentrale *BstXI*-Genkassette des eluierten Phagemid-Pools wurde dazu auf dem Expressionplasmid pNGAL98 subkloniert und die entsprechenden Lipocalin-Varianten in *E. coli* produziert (Abschnitt 3.2.2). Die analysierten Varianten wiesen sowohl im ELISA als auch im SPR gegenüber immobilisiertem D1-2 und D1-7 Affinitäten im lediglich mittleren nanomolaren Bereich auf (nicht gezeigt), so dass zwei weitere Panning-Runden durchgeführt wurden.

Um dabei auf Binder mit höherer Affinität zu selektieren, wurde in den Zyklen fünf und sechs die Konzentration des Targets von 100 auf 10 nM verringert und damit die Stringenz der Selektion erhöht. In beiden Ansätzen (saure Elution & Elution mit Harnstoff) bewirkte dies zunächst einen leichten Abfall des Phagemid-Titers in den Elutionsfraktionen von Zyklus 5. Im letzten Selektionszyklus konnte in den Elutionsfraktionen dagegen wieder ein deutlicher Anstieg des Phagemid-Titers gegenüber dem fünften Zyklus um den Faktor 3 bei saurer Elution bzw. Faktor 15 bei der Elution mit Harnstoff festgestellt werden. Im Vergleich zur ersten Runde wurde damit der Phagemidgehalt in den Elutionsfraktionen durch die sechs Anreicherungszyklen auf 0,898 % bei saurer bzw. 0,606 % bei Harnstoff-Elution erhöht, was auf eine erfolgreiche Anreicherung bindungsaktiver Lipocalin-Varianten hindeutete.

### 3.2.2 Identifizierung von VEGFR-3 spezifischen Lcn2-Varianten im Screening ELISA

Aus dem im Phage Display angereicherten Pool von Lipocalin-Varianten sollten nun jene Kandidaten identifiziert werden, die eine spezifische und hohe Bindungsaktivität gegenüber VEGFR-3 aufweisen. Zur Durchmusterung wurden die Lipocalin-Varianten nach Subklonierung auf pNGAL98 in einem Hochdurchsatz-Screening im 96-Maßstab in löslicher Form in *E. coli* produziert und deren individuelle Bindungsaffinität im bakteriellen Rohextrakt in einem direkten ELISA untersucht. Um die Identifizierung jener Lipocalin-Varianten, die ein glycosylierungsunabhängiges Epitop erkennen, zu begünstigen, wurde neben dem während des Phage Display verwendeten D1-2 aus *E. coli* auch das glycosylierte, in Säugerzellen produzierte D1-7 als immobilisiertes Target im ELISA eingesetzt. Ovalbumin diente als nicht verwandtes Kontrollprotein und wurde in einem parallelen Negativ-Screening als *Dummy Target* verwendet. Das Wildtyp-Lcn2 zeigte als Negativkontrolle in den Screening-Ansätzen nur vernachlässigbare Signale und wurde als Referenz zur Auswertung der Signalintensitäten herangezogen.

Aus den beiden in Runde 6 erhaltenen Sub-Bibliotheken wurden jeweils 94 Lipocalin-Varianten analysiert. Darunter zeigten 35 % ein mehr als 10-fach höheres Signal für D1-2 und 20 % für D1-7, gegenüber dem Wildtyp-Lcn2. Innerhalb dieser Populationen wiesen 24 Klone (13 %) Kreuzreaktivität zwischen D1-2 und D1-7, nicht jedoch gegenüber Ovalbumin auf. Interessanterweise wurden für die saure Elution deutlich weniger doppelt-positive Signale detektiert als für den durch Harnstoff-Elution generierten Pool (7 bzw. 17). Weiterhin zeigte sich in dem durch Harnstoff-Elution angereicherten Pool der sechsten Runde eine dominierende Population von insgesamt zehn Klonen mit einer deutlich höheren Bindungsaktivität gegenüber D1-7 ( $A_{405}^{\text{Anticalin}}/A_{405}^{\text{Lcn2}} > 30$ ; siehe „A5C3“ in Abbildung 15).



**Abbildung 15| Signalintensitäten ausgewählter bindungsaktiver Lcn2-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Lcn2 im ELISA-Screen.** Durch Phage Display angereicherte Lipocalin-Varianten wurden im 96-Well Mini-Expressionsmaßstab als lösliche Proteine in *E. coli* produziert. Der zentrifugierte Zellextrakt wurde in die Wells einer mit D1-2, D1-7 oder Ovalbumin, als nicht-verwandtem Kontrollprotein, immobilisierten ELISA-Platte überführt und nach ausgiebigem Waschen die gebundenen Lipocalin-Varianten anhand ihres C-terminal fusionierten *Strep*-tag II mit Hilfe von *Strep*Tactin-Alkaline Phosphatase-Konjugat detektiert. Die gezeigten Signalintensitäten  $A_{405}^{\text{Anticalin}}/A_{405}^{\text{Lcn2}}$  entsprechen den individuell gemessenen Absorptionswerten bei 405 nm bezogen auf das Wildtyp-Lcn2.

Ausgehend von diesen Befunden wurden insgesamt elf Klone des sechsten Anreicherungszyklus für weitere Untersuchungen ausgewählt, welche entweder beide Targetproteine D1-2 und D1-7 erkannten oder hohe Bindungsaktivität für D1-7 allein zeigten. Die elf Klone kodierten für insgesamt sechs unterschiedliche Lipocalin-Varianten, U3D7, S3A9, A5C3, U3H10, S2F8 und U3E3, deren individuelle Bindungssignale in Abbildung 15 gegenübergestellt sind. Auffällig hierbei sind die von A5C3 und S3A9 deutlich bevorzugten Bindungsaktivitäten gegenüber D1-7. Grund hierfür könnte zum einen eine ähnliche Epitopspezifität dieser beiden Varianten, zum anderen aber auch ein durch die Immobilisierung des kleinen D1-2-Rezeptorfragments auf der ELISA-Platte denaturierungsempfindliches Epitop sein. U3D7 und S2F8 hingegen wiesen eine ausgeglichene Bindungsaktivität für D1-2 und D1-7 auf. Zwei weitere Klone (B1G5 und B1H5) wurden in einem zusätzlichen ELISA-Screen nachträglich aus 46 Klonen identifiziert und zeigten sowohl für D1-2 als auch für D1-7 hohe Bindungssignale (nicht gezeigt). Ein Vergleich der individuellen Aminosäuresequenzen ist in Abschnitt 3.2.3 gezeigt.

### 3.2.3 Analyse von DNA- und Proteinsequenzen selektierter Lcn2-Varianten

Zur genaueren Analyse der einzelnen Varianten wurde anhand der jeweiligen DNA-Sequenz die Aminosäuresequenz abgeleitet und diese mit Hilfe der „*ANTICALign*“-Software (Jarasch *et al.*, 2016) hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit, insbesondere der Häufung bestimmter Substitutionen und dem Auftreten zusätzlicher Mutationen außerhalb der randomisierten Positionen, untersucht. Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der aus dem sechsten Panning-Zyklus resultierenden Kandidaten U3D7, S3A9, A5C3, U3H10, S2F8, U3E3, B1H5 und B1G5, sowie des aus dem 4. Zyklus resultierenden Kandidaten H2B1 (Abbildung 16).

Die Sequenzen wiesen allesamt einen funktionellen Leserahmen innerhalb des Lipocalins sowie keinerlei Deletionen oder zusätzliche Mutationen außerhalb der 20 randomisierten Positionen auf (Abbildung 16). Der Einbau von Cysteinresten oder Stoppcodons, was beides aufgrund der Konstruktion der verwendeten Lcn2-Bibliothek nicht zugelassen war, wurde in keinem der analysierten Klone gefunden.

Keine der neuen Aminosäure-Substitutionen war in den Varianten konserviert. Insgesamt wiesen die einzelnen Lcn2-Varianten auf Ebene der Primärstruktur nur wenige Gemeinsamkeiten auf. Auffällig bei allen Varianten war eine Präferenz für vorwiegend aliphatische Seitenketten, vor allem an den Positionen 41, 49, 52 (Schleifenregion Nr. 2), sowie an Position 106 (Schleifenregion Nr. 3). Eine Anreicherung von geladenen Seitenketten war an den Positionen 41, 100 und 127 sichtbar, wobei in der Schleifenregion Nr. 4 das hydrophile Ser127 in den drei Varianten A5C3, S3A9 und S2F8 jeweils gegen das positiv geladene Lysin ausgetauscht war. Des Weiteren waren in der Schleifenregion Nr. 2 an zwei Positionen eine Anreicherung von aromatischen Aminosäuren sowie gehäuft hydrophile Reste in der Schleifenregion Nr. 4 erkennbar. Auffällige Gemeinsamkeiten wiesen die zwei Varianten A5C3 und S3A9 auf, da sie zum einen an den beiden randomisierten Positionen 70 und 81 die ursprünglichen Aminosäurereste des Wildtyp-Lcn2, nämlich Leu und Arg, zum anderen identische Substitutionen an den Positionen 127 und 132 aufwiesen.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Lcn2	Q	D	S	T	S	D	L	I	P	A
Bib	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
H2B1	R	F	R	F	R	R	F	R	F	R
S2F8	F	W	L	F	W	L	F	W	L	F
A5C3	M	G	L	M	G	L	M	G	L	M
S3A9	R	L	R	R	L	R	R	L	R	R
U3D7	T	R	R	T	R	R	T	R	R	T
U3E3	M	Y	W	M	Y	W	M	Y	W	M
U3H10	F	I	V	F	I	V	F	I	V	F
B1H5	H	R	R	H	R	R	H	R	R	H
B1G5	I	T	V	I	T	V	I	T	V	I
	====A=====B=====C=====D=====									
	#1-----#2-----#3-----#4-----#5-----#6-----#7-----#8-----#9-----#10-----									
Lcn2	E	F	T	L	G	N	I	K	S	P
Bib	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H2B1	A	G	D	F	Q	I	W	W	W	W
S2F8	E	H	M	F	K	A	F	A	F	A
A5C3	P	I	K	P	T	K	W	W	W	W
S3A9	T	P	S	L	S	K	W	S	W	S
U3D7	S	E	Q	I	T	D	A	A	A	A
U3E3	W	N	M	T	I	M	R	M	R	M
U3H10	K	D	N	F	S	L	H	Y	H	Y
B1H5	H	D	G	N	A	E	R	S	R	S
B1G5	P	P	F	M	T	T	W	T	W	T
	==E==F==G==H==I==J==K==L==M==N==O==P==Q==R==S==T==U==V==W==X==Y==Z==									

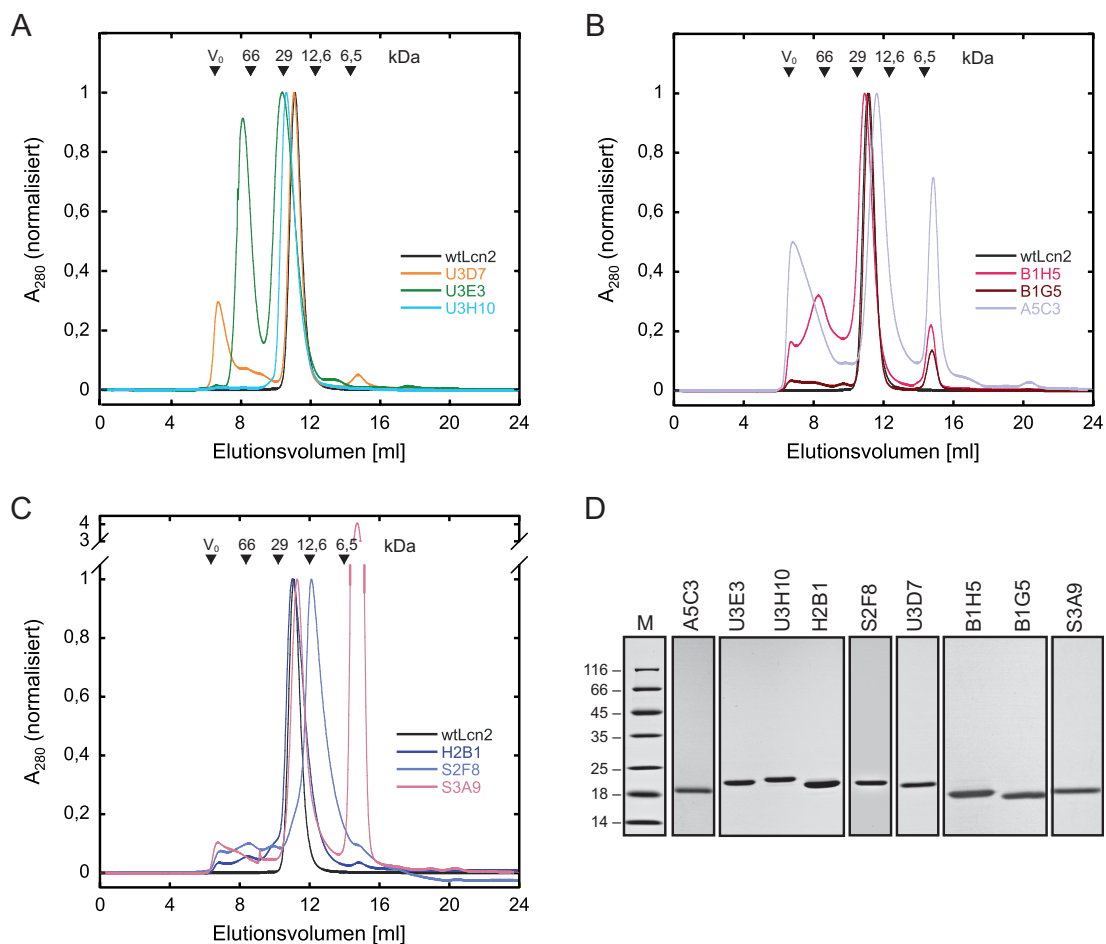
**Abbildung 16 | Aminosäuresequenzen von neu durch Phage Display angereicherten Lcn2-Varianten.** Gezeigt ist der das jeweilige mature Lipocalin umfassende translatierte Genabschnitt der selektierten Lcn2-Varianten aus den entsprechenden pNGAL98-Expressionsplasmiden. Die Positionen der zwanzig randomisierten Aminosäuren sind oben mit „x“ gekennzeichnet. Des Weiteren sind die Sequenzbereiche der acht antiparallelen  $\beta$ -Stränge A-H (=) sowie der vier flexiblen Schleifenregionen #1-4 (-) angezeigt. Identische Aminosäuren zum wtLcn2 sind in dem Alignment durch einen Punkt dargestellt. Hervorgehoben sind häufig auftretende Substitutionen zu hydrophilen (hellgrün), aliphatischen (hellblau), positiv (dunkelblau) oder negativ (rot) geladenen bzw. aromatischen (dunkelgrün) Aminosäuren. Die Einführung einer zweiten *BstXI*-Schnittstelle sowie die Substitution eines freien Cysteinrests im Verlauf des Bibliothek-Designs war mit den in kleinen Buchstaben gekennzeichneten Mutationen Q28H und C86S verbunden (Gebauer & Skerra, 2012).



## 3.2.4 Biochemische Charakterisierung selektierter Anticalin-Kandidaten

*Produktion und Reinigung in E. coli*

Die aus dem Screening-ELISA und der Sequenzanalyse resultierenden Lcn2-Varianten wurden zur genaueren Charakterisierung in 2 L Kultur in Schüttelkolben produziert. Als Expressionsstamm diente hierzu der *E. coli*-Stamm TG1/F<sup>-</sup> (Kim *et al.*, 2009), in welchem die auf dem Expressionsplasmid pNGAL98 kodierte Lcn2-Varianten in das periplasmatische Kompartiment sekretiert werden. pNGAL98 enthält hierzu eine mit dem N-Terminus des Proteins fusionierte OmpA-Signalsequenz, was im Anschluss an die Translokation die Ausbildung der strukturell essentiellen Disulfidbrücke zwischen Cys76 und Cys175 ermöglicht. Die Lcn2-Varianten wurden anhand ihres mit dem C-Terminus fusionierten *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels aus dem Periplasmaextrakt isoliert und zur Untersuchung der Quartärstruktur bzw. des Oligomerisierungsverhaltens auf eine analytische Superdex S75 10/30 HR Gelfiltrationssäule in Gegenwart von PBS aufgetragen (Abbildung 17).



**Abbildung 17 | Biochemische Charakterisierung der in *E. coli* exprimierten Lcn2-Varianten mit Spezifität für VEGFR-3.** (A-C) SEC-Elutionsprofile des wtLcn2 und der VEGFR-3 bindenden Varianten. Die durch Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden zur Untersuchung des jeweiligen Oligomerisierungsverhaltens auf eine mit PBS äquilibrierte Superdex S75 10/30 HR Säule aufgetragen. Die Elutionsprofile von je drei Lcn2-Varianten (farbig) wurden mit dem Elutionsprofil des wtLcn2 (schwarz) überlagert und die bei 280 nm gemessenen Absorptionen auf den Maximalwert normalisiert. (D) SDS-PAGE der VEGFR-3 bindenden Lcn2-Varianten. Eine Probe der aus der Gelfiltration resultierenden monomeren Proteinfraction wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. Spur M zeigt den Größenstandard (in kDa).

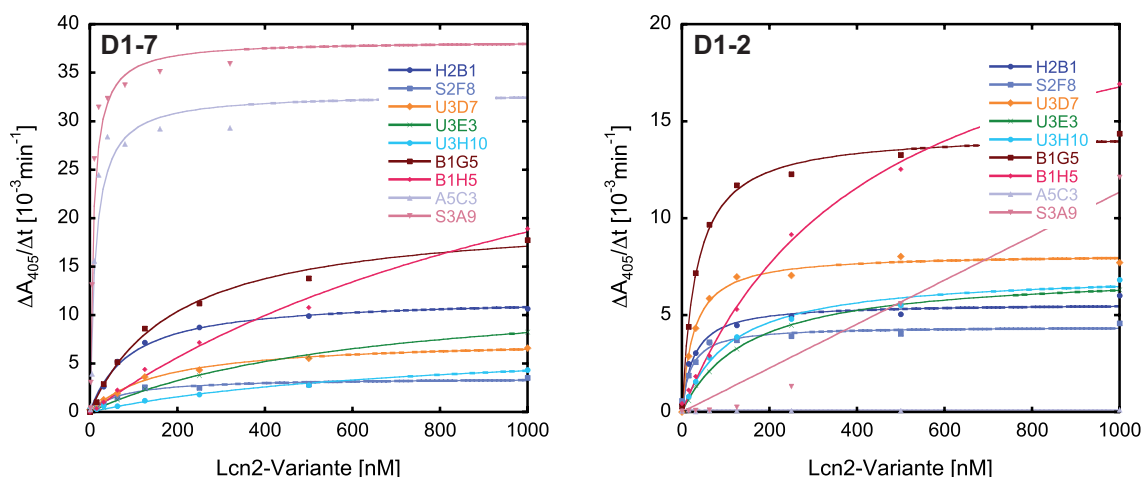
## Ergebnisse

Hierbei zeigte sich für sechs der neun Varianten ein ähnlich dem wtLcn2 klar abgegrenzter Monomerpeak mit Elutionsvolumen zwischen 11 und 11,5 ml. Die Lcn2-Varianten U3E3, U3H10 und S2F8 wiesen dagegen auffällige Elutionsprofile auf, da ihr Elutionspeak – der im Fall von S2F8 breit und asymmetrisch war – deutlich zu einem höheren bzw. niedrigeren apparenten Molekulargewicht verschoben war. Eine weitere Besonderheit zeigte sich bei der Lcn2-Variante A5C3, da diese zu einer verstärkten Aggregatbildung neigte und mit niedriger Ausbeute produziert wurde. Die zusätzlichen Peaks bei 14,7 ml in den Profilen von B1H5, B1G5, S3A9 und A5C3 sind auf niedermolekulare Verunreinigungen zurückzuführen. Die Ausbeute lag für die meisten Varianten bei > 0,5 mg pro 2 L Schüttelkultur.

Die hohe Reinheit der monomeren Proteinfractionen wurde durch SDS-PAGE bestätigt (Abbildung 17D). Für alle Varianten war eine höhere elektrophoretische Mobilität unter nicht reduzierenden Bedingungen im Vergleich zur vorherigen Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol sichtbar (nicht gezeigt), was auf die erfolgreiche Ausbildung der für das Lipocalin typischen Disulfidbrücke schließen lässt.

### Quantifizierung der Bindungseigenschaften im ELISA

Die Bindungseigenschaften der selektierten Lcn2-Varianten wurden zunächst in einem direkten ELISA, bei welchem die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit dem Target-Protein beladen wurde, untersucht. Verschiedene Konzentrationen der isolierten monomeren Lcn2-Varianten wurden mit den immobilisierten Antigenen D1-2 oder D1-7 inkubiert und, nach Einstellung des Gleichgewichts, der gebundene Anteil mit Hilfe des für das *Strep*-tag II spezifischen Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats in einer chromogenen Reaktion nachgewiesen. Unter Annahme eines einfachen bimolekularen Bindungsgleichgewichtes wurde aus den erhaltenen Bindungskurven entsprechend der halbmaximalen Sättigung die jeweilige Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Lcn2-Variante ermittelt.



**Abbildung 18 | Quantitative Bindungsanalyse von Lcn2-Varianten im direkten ELISA.** Eine mit D1-2 oder D1-7 beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit den gereinigten Lcn2-Varianten in steigender Verdünnung inkubiert und anschließend der Target-gebundene Anteil der Lcn2-Varianten anhand des C-terminalen *Strep*-tag II detektiert. S3A9 und A5C3 zeigten gegenüber D1-2 nur minimale Bindungssignale im Bereich der Basislinie.

Für die neun untersuchten Varianten konnten im Fall des immobilisierten D1-7 konzentrationsabhängige Sättigungskurven (Abbildung 18) mit einstellig nanomolaren bis hin zu mikromolaren  $K_D$ -Werten bestimmt werden (Tabelle 4). A5C3 und S3A9 wiesen hierbei besonders hohe Affinität von 13 bzw. 8 nM auf. Gegenüber dem D1-2-Fragment zeigten A5C3 und S3A9 im direkten ELISA keine bzw. nur schwache Bindung. Möglicherweise unterliegt das kleinere D1-2-Fragment einer partiellen Denaturierung bei Adsorption an der Oberfläche der Mikrotiterplatte, wobei das von S3A9 und A5C3 erkannte Epitop verändert wird. Für die anderen untersuchten Varianten wurde für D1-2 interessanterweise eine im Vergleich zu D1-7 höhere Affinität nachgewiesen, was auf unterschiedliche Epitop-Spezifitäten deutet.

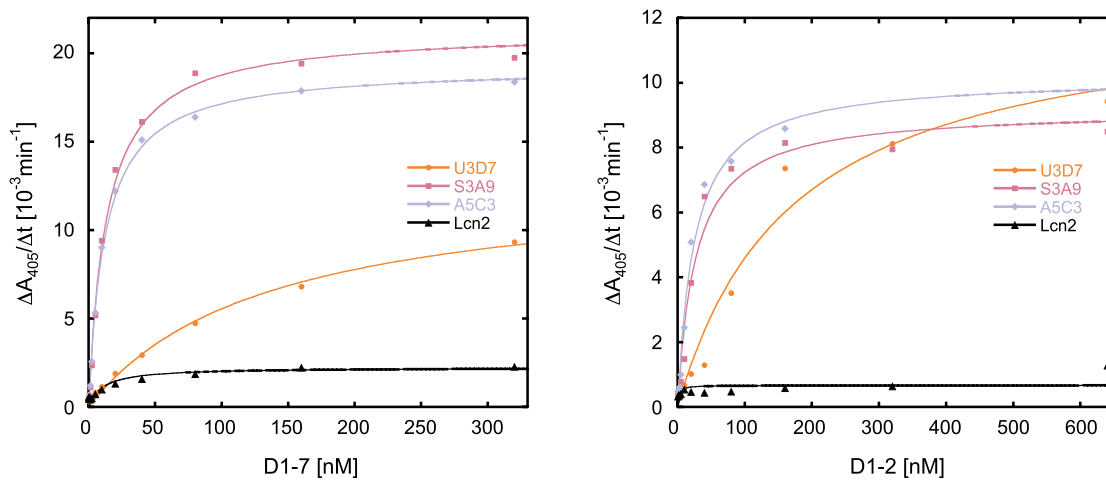
**Tabelle 4 | Dissoziationskonstanten von Lcn2-Varianten gegenüber D1-2 und D1-7 im direkten und indirekten ELISA.**

Lcn2-Variante	$K_D$ [nM]	
	D1-7	D1-2
<b>direkter ELISA</b>		
H2B1	91 ± 12	26,4 ± 5,7
S2F8	73 ± 16	20,3 ± 4,7
U3D7	164 ± 21	26,7 ± 2,5
U3E3	620 ± 60	151 ± 12
U3H10	751 ± 207	111 ± 16
B1G5	194 ± 23	32,5 ± 2,5
B1H5	1364 ± 317	427 ± 37
S3A9	8,0 ± 2,3	n.d.
A5C3	13 ± 4,4	n.d.
<b>indirekter ELISA</b>		
U3D7	134 ± 18	171 ± 42
S3A9	13,4 ± 1,1	26,8 ± 5,2
A5C3	12,3 ± 0,7	24,8 ± 4,6

Basierend auf den Ergebnissen des zunächst durchgeführten direkten ELISA und der in der SEC ermittelten Elutionsprofile wurden die Lcn2-Varianten U3D7, S3A9 und A5C3 wegen ihrer hohen Affinitäten und ihres strikt monomeren Verhaltens ähnlich dem wtLcn2 ausgewählt, um deren Target-Affinitäten in einem sekundären ELISA näher zu untersuchen.

Hierfür wurden die Lcn2-Varianten über einen auf der Mikrotiterplatte immobilisierten, gegen das *Strep*-tag II gerichteten Fangantikörper (*Strep*MAB-Immo) in gerichteter Weise auf der Oberfläche präsentiert und eine Verdünnungsreihe des funktionellen D1-2 oder D1-7 als lösliche Ektodomäne hinzu pipettiert (Abbildung 19). Als Ergebnis wurde für A5C3 und S3A9 gegenüber D1-7 jeweils eine

apparente  $K_D$  ähnlich dem im direkten ELISA ermittelten Wert bestimmt (Tabelle 4). Für beide Anticaline konnte im Gegensatz zum direkten ELISA zudem eine hohe Bindungsaffinität gegenüber dem rekombinanten D1-2 ermittelt werden, mit  $K_D$ -Werten von 25 bzw. 27 nM. A5C3 und S3A9 erkennen daher offenbar ein besonders denaturierungsempfindliches Epitop, so dass die Art der Target-Präsentation im ELISA einen wesentlichen Einfluss auf die gemessene Wechselwirkung mit dem Target-Protein hat. Für U3D7 ergaben sich sowohl für D1-2 als auch für D1-7 ähnliche Affinitäten von 171 bzw. 134 nM. Das als Kontrolle mitgeführte wtLcn2 zeigte keine nennenswerte Wechselwirkung mit D1-2 oder D1-7.



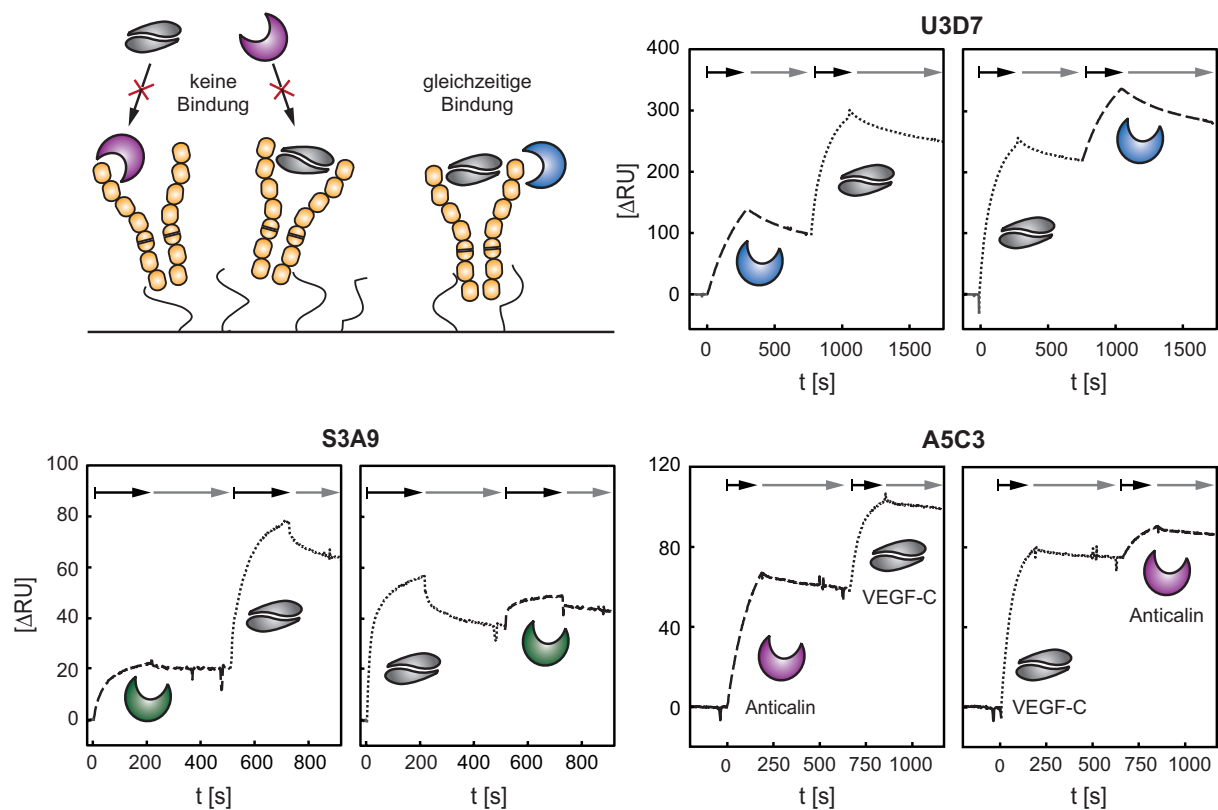
**Abbildung 19| Sandwich-ELISA zur Untersuchung der Target-Bindungsaffinität ausgewählter Lcn2-Varianten.** Für eine gerichtete Präsentation der Lcn2-Varianten wurde der gegen das *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel gerichtete Fangantikörper *Strep*MAB-Imm in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der jeweiligen Lcn2-Variante beladen. Gereinigtes D1-2 oder D1-7 wurde daraufhin in absteigender Konzentration mit den verschiedenen Lcn2-Varianten inkubiert und gebundenes Target-Protein anschließend mit Hilfe eines für das C-terminale His-Tag spezifischen Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen. Die ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ( $K_D$ ) sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

#### Rezeptor-Bindung von Lcn2-Varianten in Gegenwart des natürlichen VEGFR-3 Liganden VEGF-C

Zur weiteren Charakterisierung der selektierten Lcn2-Varianten wurden diese hinsichtlich ihres kompetitiven Bindungsverhaltens in Gegenwart des natürlichen VEGFR-3 Liganden VEGF-C untersucht. Da für die Selektion der Anticaline die VEGF-C bindenden Domänen D1-2 verwendet worden waren, lag eine Konkurrenz mit VEGF-C nahe. Eine qualitative Analyse erfolgte zunächst mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie, wobei die simultane Bindung von Lipocalin-Varianten und VEGF-C an den auf der Sensorchip-Oberfläche immobilisierten extrazellulären Teil des Rezeptors gemessen wurde.

Die jeweilige Lipocalin-Variante und VEGF-C wurden nacheinander auf die Sensorchip-Oberfläche appliziert und der Anstieg des Resonanzsignals für das jeweilige Protein gemessen. Nach der Regenerierung des Sensorchips wurden in einer zweiten Messung die beiden Analyten erneut appliziert, jedoch in umgekehrter Reihenfolge. Durch einen Vergleich der Resonanzsignale beider Messungen können Rückschlüsse auf gleichzeitiges oder kompetitives Bindungsverhalten beider Bindungspartner gezogen werden.

Von den untersuchten Anticalinen U3D7, S3A9, A5C3, H2B1, S2F8, U3E3 und U3H10 offenbarten die Sensorgramme von S3A9 und A5C3 eine im Vergleich zur Referenzmessung deutliche Signalreduktion nach vorheriger Bindung von VEGF-C (Abbildung 20). Ebenso war die Bindung von VEGF-C nach vorheriger Applizierung von S3A9 oder A5C3 deutlich reduziert. Alle anderen untersuchten Lcn2-Varianten wiesen ein von VEGF-C unabhängiges Bindungsverhalten auf.



**Abbildung 20 | Qualitativer Nachweis der VEGFR-3 Bindungsaktivität von Lcn2-Varianten in Gegenwart von VEGF-C mit dem Biacore-Instrument.** Zur Untersuchung einer möglichen Konkurrenz der selektierten Anticaline mit dem natürlichen D1-2 bindenden Liganden VEGF-C wurden die jeweiligen Anticaline (gestrichelte Linie) und VEGF-C (gepunktet) nacheinander auf einen mit D1-7 derivatisierten CM5-Sensorchip appliziert und die Änderung des Resonanzsignals im Biacore-Gerät verfolgt (Referenzmessung). Nach Regenerierung der Chip-Oberfläche wurden anschließend die beiden Interaktionspartner in umgekehrter Reihenfolge eingesetzt. Ein im Vergleich zur Referenzmessung reduziertes Resonanzsignal nach vorheriger Bindung von VEGF-C deutet auf einen kompetitiven Bindungsmodus hin, wie im Fall von S3A9 und A5C3 sichtbar. Die schwarzen Pfeile markieren die jeweilige Injektion des Proteins, graue Pfeilabschnitte entsprechen der Dissoziationsphase.

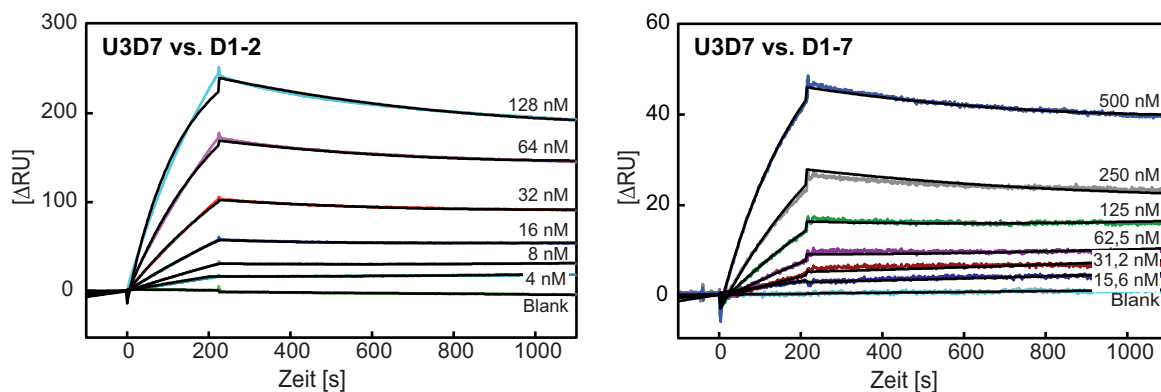
#### Kinetische Echtzeit-Analyse der Ligandenaffinität mittels SPR

Um detaillierte Informationen über die kinetischen Bindungseigenschaften der Anticalin-Kandidaten zu erhalten, wurde deren biomolekulare Interaktion mit dem Target-Protein markierungsfrei im Biacore-Instrument analysiert. Das rekombinante D1-2 oder D1-7 wurde hierzu, wie in Abschnitt 2.17.1 beschrieben, mit Hilfe der EDC/NHS-Chemie kovalent auf der Chip-Oberfläche immobilisiert, und die bereits im Sandwich-ELISA untersuchten Lcn2-Varianten wurden in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe injiziert. Die resultierenden Messkurven wurden unter Annahme einer

## Ergebnisse

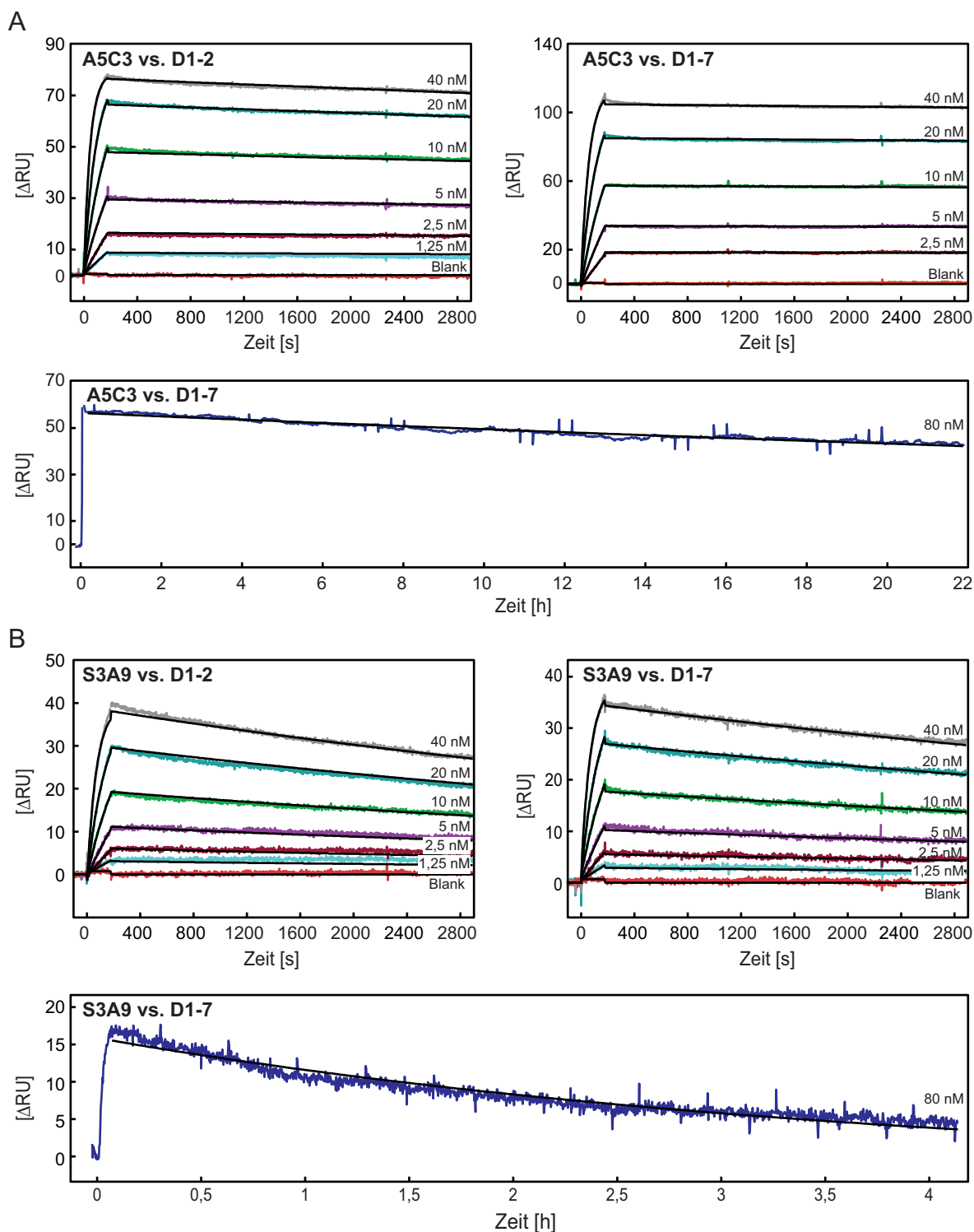
monovalenten Komplexbildung entsprechend dem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell angepasst (Karlsson *et al.*, 1991).

Für die Varianten U3D7, S3A9 und A5C3 ergaben sich dabei im Vergleich zum ELISA höhere Affinitäten. Ein Vorteil der SPR-Messung liegt in der vergleichsweise schonenden Immobilisierung begründet, da die Chip-Oberfläche mit einer dreidimensionalen Matrix aus flexiblen Polydextran-ketten (Hydrogel) ausgestattet ist, so dass der Ligand in quasi nativer Form kovalent gekoppelt werden kann (Johnsson *et al.*, 1995). Für U3D7 wurde ähnlich wie bereits im direkten ELISA eine 10-fach höhere Affinität für D1-2 gegenüber D1-7 bestimmt (Abbildung 21), was vor allem auf eine langsamere Assoziationsrate im Vergleich zu D1-7 zurückzuführen war (Tabelle 5). D1-7 ist im Gegensatz zu dem in *E. coli* produzierten D1-2 mehrfach glycosyliert, wodurch das von U3D7 erkannte Epitop möglicherweise sterisch schlechter zugänglich ist.



**Abbildung 21| Bindungsverhalten der Lcn2-Variante U3D7 gegenüber D1-2 und D1-7 gemessen durch SPR-Spektroskopie.** D1-2 und D1-7 wurden mittels Amin-Kopplungschemie auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert, und bei einem konstanten Fluss von 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurde eine Verdünnungsreihe des Anticalins U3D7 in ein Biacore-Instrument injiziert. Die Dissoziation des Target-Anticalin-Komplexes auf der Chipoberfläche wurde für insgesamt 900 s unter Pufferfluss gemessen. Nach Abzug des Referenzsignals eines unbeladenen Flusskanals und dem aus drei Messungen gemittelten Puffer-Signals wurden die erhaltenen Sensorgramme (farbig) mit Hilfe der BiaEvaluation Software entsprechend dem 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir angepasst (schwarz). Die resultierenden Bindungsparameter  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Im Gegensatz zu U3D7 zeigten die SPR-Messungen von A5C3 und S3A9 gegenüber D1-7 während der Dissoziationsphase einen nur langsamen Abfall des Resonanzsignals, was die exakte Bestimmung der  $k_{off}$ -Konstante erschwerte. Die kinetische Analyse von A5C3 und S3A9 erfolgte deshalb unter speziellen Bedingungen für niedrige Dissoziationsraten. Eine Verdünnungsreihe von 80 – 2,5 nM der frisch präparierten Lcn2-Varianten wurde dazu auf einen mit einer niedrigen D1-7-Oberflächendichte beschichteten CM5-Sensorchip ( $\sim 2000$  RU) appliziert und die Dissoziation des Analyt/Liganden-Komplexes durch kontinuierliches Waschen mit dem Laufpuffer für 45 statt 15 min gemessen. Im Fall von A5C3 wurde zwecks noch exakterer Bestimmung der Dissoziationsrate nach Injektion der höchsten Proteinkonzentration die Messzeit für die Dissoziationsphase auf 24 h verlängert, womit eine Reduktion des Resonanzsignals um mindestens 10 % erreicht wurde (Abbildung 22).



**Abbildung 22 | Bindungsstudien der Anticaline A5C3 und S3A9 mittels SPR.** Gezeigt sind die in Gegenwart von immobilisiertem VEGFR-3(D1-2) oder D1-7 gemessenen Sensorgramme (farbig) verschiedener Verdünnungsstufen der Anticaline A5C3 und S3A9. Die gemäß dem bimolekularen Langmuir-Bindungsmodell angepassten Kurven sind in schwarz dargestellt. Für eine exakte Bestimmung des  $k_{off}$ -Werts wurde im Falle von A5C3 die Dissoziation der höchsten Konzentration (80 nM) über einen Zeitraum von 24 h gemessen ( $k_{off}^{\infty}$ ), während für S3A9 eine Dissoziationsmessung über 4 h ausreichend war. In diesen Fällen wurden die Affinitäten gegenüber D1-7 aus dem Quotienten von  $k_{off}^{\infty}$  und der aus der Konzentrationsreihe ermittelten  $k_{on}$ -Konstante bestimmt. Die resultierenden Bindungsparameter  $k_{on}$ ,  $k_{off}^{\infty}$  und  $K_D$  sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Für A5C3 ergab sich gegenüber D1-7 für die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $k_{on}$  ein Wert von  $0,42 \pm 0,01 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .  $k_{off}$  wurde aus dem über 24 Stunden aufgenommenen Dissoziationsprofil berechnet und ergab unter Annahme des exponentiellen Komplexzerfalls erster Ordnung ein Wert von  $3,46 \pm 0,01 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , was nach  $\tau_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$  einer Halbwertszeit von 56 Stunden entspricht. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  wurde aus dem Quotienten aus  $k_{off}^{\infty}/k_{on}$  und zu  $8,29 \pm 0,02 \text{ pM}$  errechnet (Tabelle 5).

**Tabelle 5 | Zusammenstellung der im BIAcore-Instrument ermittelten Bindungskonstanten der Anticalin-Kandidaten U3D7, A5C3 und S3A9 für die rekombinanten VEGFR-3-Fragmente D1-2 und D1-7.**

Variante	D1-2			D1-7		
	$k_{on}$ [ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $10^{-9} \text{ M}$ ]	$k_{on}$ [ $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}^{\infty}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $10^{-10} \text{ M}$ ]
U3D7	$62,3 \pm 0,1$	$490 \pm 7,0$	$7,87 \pm 0,11$	$8,82 \pm 0,05$	$663 \pm 11$	$752 \pm 0,14$
A5C3	$536 \pm 0,2$	$27,9 \pm 0,13$	$0,05 \pm 0,01$	$417 \pm 0,12$	$3,46 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
S3A9	$356 \pm 0,4$	$127 \pm 0,33$	$0,36 \pm 0,01$	$369 \pm 0,29$	$93,3 \pm 0,22$	$2,53 \pm 0,01$

### 3.3 Optimierung der biochemischen Eigenschaften von Anticalinen

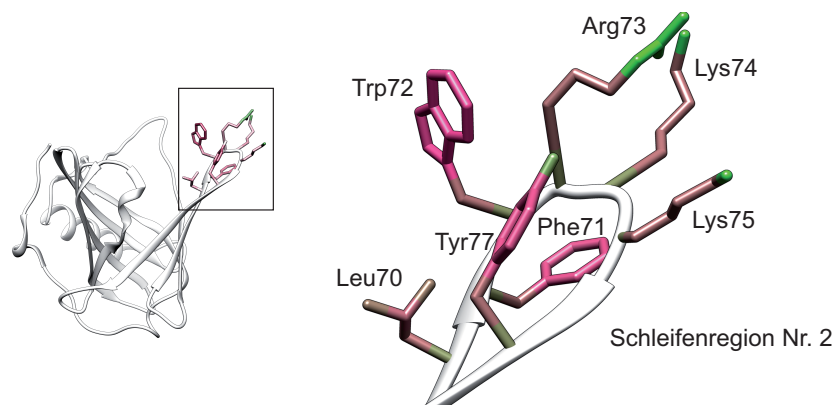
#### 3.3.1 Optimierung der Produktionsausbeute des Anticalins A5C3 durch rationales Engineering

##### Identifizierung von hydrophoben Bereichen für die rationale Mutagenese

Obwohl die Lcn2-Variante A5C3 eine herausragende Ligandenaffinität aufwies ( $K_D^{\text{D1-7}} = 8,29 \text{ pM}$ ), zeigte sie nur niedrige Löslichkeit bei der Produktion in *E. coli*, was sich durch einen hohen Anteil an Aggregat in der Gelfiltrationsanalyse sowie einer Ausbeute an monomerem Protein von lediglich  $32,5 \mu\text{g}$  pro L Kulturvolumen widerspiegelte. Es ergab sich daher die Fragestellung, die monomere Proteinausbeute von A5C3 durch rationale Mutagenese zu erhöhen, ohne dabei die Affinität des Anticalins gegenüber VEGFR-3 zu beeinträchtigen.

Hierfür wurde zunächst ein dreidimensionales Modell von A5C3 durch *in silico* Mutagenese der siebzehn A5C3-spezifischen Substitutionen (siehe Abbildung 16) anhand der Kristallstruktur des Wildtyp-Lcn2 (Goetz *et al.*, 2002) generiert und dieses hinsichtlich stark hydrophober Bereiche an der Proteinoberfläche untersucht. Cluster von hydrophoben oberflächenexponierten Aminosäureresten können die Tendenz des Proteins zu unspezifischen Bindungen, und insbesondere Aggregation erhöhen (Dobson, 2003). Insgesamt wurden sieben exponierte Aminosäurepositionen identifiziert, die für die rationale Mutagenese in Frage kamen: L42, F71, W72, Y77, Y78, Y79 und W132. Besonders die strukturell variable Schleifenregion Nr. 2 trug einen Cluster von in der Primärstruktur aufeinanderfolgenden hydrophoben Seitenketten (Abbildung 23) und erschien deshalb besonders erfolgversprechend für das Engineering.



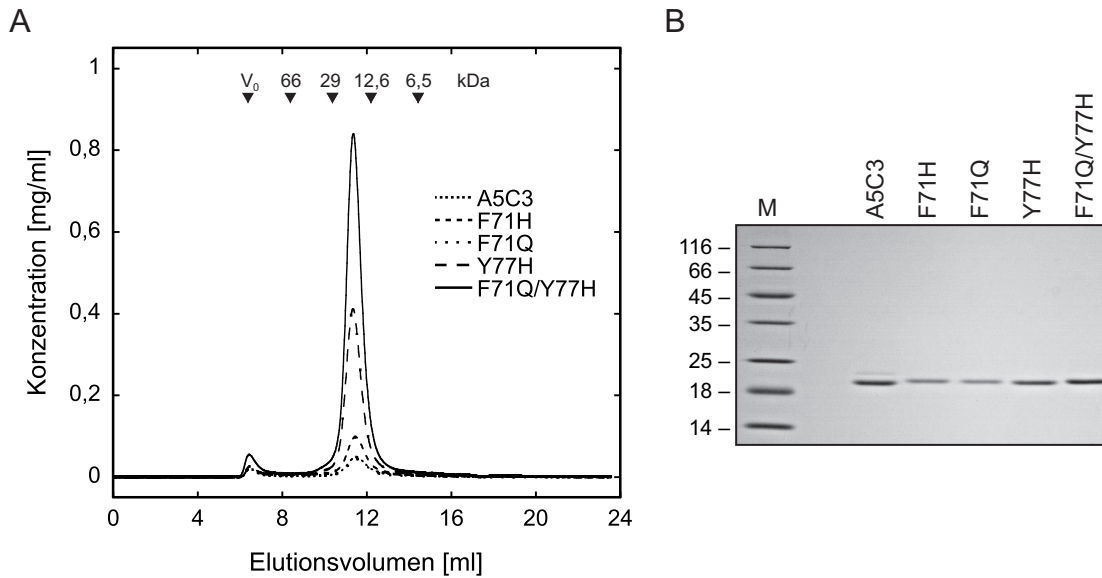


**Abbildung 23 | Dreidimensionales Strukturmodell des Anticalins A5C3.** Die siebzehn für A5C3 charakteristischen Aminosäure-Substitutionen wurden mit Hilfe des Programms UCFS Chimera auf die Kristallstruktur des Wildtyp-Lcn2 (PDB-ID 1L6M) übertragen. Die Schleifenregion Nr. 2 exponiert einen Cluster von Aminosäureresten mit vorwiegend hydrophobem Charakter, welche entsprechend der Hydrophobie der einzelnen Atomgruppen pink (hydrophob) bzw. grün (hydrophil) eingefärbt sind.

In einer ersten Mutagenese-Runde wurden die aromatischen Reste an den Positionen 71, 72, 77, 78, 79 und 132 gegen das hydrophilere Histidin ausgetauscht. Leucin 42 wurde durch Glutamin, welches ähnliche Raumauffüllung aber deutlich hydrophileren Charakter aufweist, ersetzt. Zusätzlich zu diesen Substitutionen wurden zwei weitere Mutationen, G40Q und T79R, deren positiver Effekt auf die Proteinausbeute bereits in einer Mutationsstudie des DTPA-bindenden Anticalins CL31 nachgewiesen wurde (Eggenstein *et al.*, 2014), auf A5C3 übertragen.

#### *Untersuchung der Produktionsausbeute und Affinität von A5C3-Mutanten*

Ausgehend von der auf dem Expressionsplasmid pNGAL98-A5C3 vorliegenden Gensequenz wurden die ausgewählten Aminosäure-Substitutionen durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt und die resultierenden Mutanten in *E. coli* TG1/F<sup>-</sup> in 2 L Schüttelkolbenkultur produziert. Zur Analyse der Ausbeute an monomerem Protein wurden die durch *StrepTactin*-Affinitätschromatographie gereinigten Lcn2-Varianten auf ein Volumen von jeweils 250 µl eingeeengt und auf eine analytische Superdex S75 HR 10/30 Säule aufgetragen. Von den neun Varianten zeigten zwei Seitenketten-Mutationen, F71H und Y77H, eine um den Faktor zwei bzw. sieben erhöhte Ausbeute an monomerem Protein und einem im Fall von Y77H deutlich verringerten Anteil an Aggregat (Abbildung 24 & Tabelle 6). Durch die anderen eingeführten Mutationen konnte dagegen kein positiver Effekt auf die Löslichkeit erzielt werden, so dass diese nicht weiter analysiert wurden.



**Abbildung 24| Gelfiltration und SDS-PAGE von A5C3-Mutanten.** A5C3 und dessen Mutanten F71H, F71Q, Y77H und F71Q/Y77H wurden im Periplasma von *E. coli* TG1/F<sup>-</sup> produziert und durch *StrepTactin*-Affinitätschromatographie gereinigt. (A) Die auf 250  $\mu$ l konzentrierte Anticalinlösung wurde auf eine mit PBS äquilibrierte analytische Superdex S75 10/30 HR Gelfiltrationssäule mit einem Bettvolumen von 24 ml aufgetragen. Gezeigt sind die bei 280 nm gemessenen Elutionsprofile der einzelnen A5C3-Mutanten, welche mit Hilfe ihres spezifischen Extinktionskoeffizienten auf die Proteinkonzentration normiert wurden. (B) Coomassie-gefärbtes 12 %iges SDS-Gel mit den gelfiltrierte A5C3-Mutanten unter nicht reduzierenden Bedingungen (M entspricht dem Größenstandard in kDa).

Um den Einfluss der Aminosäure-Substitutionen an den Positionen 71 und 77 genauer zu untersuchen, wurden die Ligandenaffinitäten der A5C3-Varianten durch SPR wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben gemessen, wobei die Messzeit für die Dissoziationsphase der höchsten injizierten Konzentration je nach Mutante auf 8 bzw. 24 Stunden verlängert wurde. Für die Mutante F71H wurde eine der parentalen Lcn2-Variante A5C3 ähnliche Affinität ermittelt (Tabelle 6). Der Austausch von Y77H offenbarte eine für die Ligandenbindung sensible Position, da für diese Mutante eine um den Faktor drei erhöhte  $K_D$  beobachtet wurde, die sich vor allem aus einem schnelleren Zerfall des Komplexes ergibt.

**Tabelle 6| Übersicht über die durch SPR-Spektroskopie gemessenen Bindungskonstanten gegenüber immobilisiertem D1-7 sowie die Produktionsausbeuten von A5C3-Mutanten.**

Mutante	$k_{on}$ [ $10^6 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}^{\infty}$ [ $10^{-6} s^{-1}$ ]	$K_D^b$ [ $10^{-12} M$ ]	$\tau_{1/2}^c$ [h]	Ausbeute <sup>d</sup> [ $\mu g/2 L$ Kultur]	Aggregat <sup>e</sup> [%]
A5C3	0,42 ± 0,01	3,46 ± 0,01	8,29 ± 0,02	56	64,9	16
A5C3(F71H)	0,43 ± 0,02	6,04 ± 0,01	13,9 ± 0,02	32	118	14
A5C3(F71Q)	0,29 ± 0,02	6,04 ± 0,01	21,1 ± 0,03	32	56,9	25
A5C3(Y77H)	0,71 ± 0,05	19,3 <sup>a</sup> ± 0,03	27,3 ± 0,04	10	441	4
A5C3(F71Q/Y77H)	1,30 ± 0,01	18,4 <sup>a</sup> ± 0,05	14,2 ± 0,04	11	885	5

<sup>∞</sup> Berechnete Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation gemessen über 24 Stunden Dissoziationszeit der Probe mit der höchsten Konzentration

<sup>a</sup> Berechnete Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation gemessen über 8 Stunden Dissoziationszeit der Probe mit der höchsten Konzentration

<sup>b</sup> Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  gemäß  $k_{off}/k_{on}$

<sup>c</sup> Berechnete Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  gemäß  $\ln(2)/k_{off}$

<sup>d</sup> Gesamtproteinausbeute aus 2 L Expressionskultur nach Gelfiltration gemessen anhand der Absorption bei 280 nm

<sup>e</sup> Anteil an Aggregat berechnet aus den Elutionsprofilen der Gelfiltration; die Summe aus monomerem Protein und Aggregat wurde als 100 % angenommen

In einem zweiten Mutagenese-Zyklus wurden zum Zweck der weiteren Erhöhung der Proteinausbeute, bzw. um die Affinität der besser löslichen Y77H-Mutante wieder herzustellen, drei weitere Mutationen mit alternativen Aminosäureresten generiert und analysiert. An Position 77 wurde anstelle des Histidins entweder Leucin oder Phenylalanin eingefügt, während F71 durch die kleinere Glutamin-Seitenkette ersetzt wurde. Alle drei Varianten führten bezogen auf die Ausgangsvariante A5C3 zu keiner sichtbaren Verbesserung der Ausbeute. Überraschenderweise konnte jedoch in einem dritten Mutagenese-Zyklus durch die Kombination der Y77H- und F71Q-Mutationen eine deutliche Erhöhung der Proteinausbeute um den Faktor 13 auf 885  $\mu g$  pro 2 L Expressionskultur mit lediglich 5 % Aggregat erreicht werden. Die Proteinausbeute wurde darüber hinaus durch eine optimierte Expressionstrategie weiter verbessert, unter anderem durch Induktion der Genexpression bei höherer Zelldichte ( $OD_{550} = 2$ ).

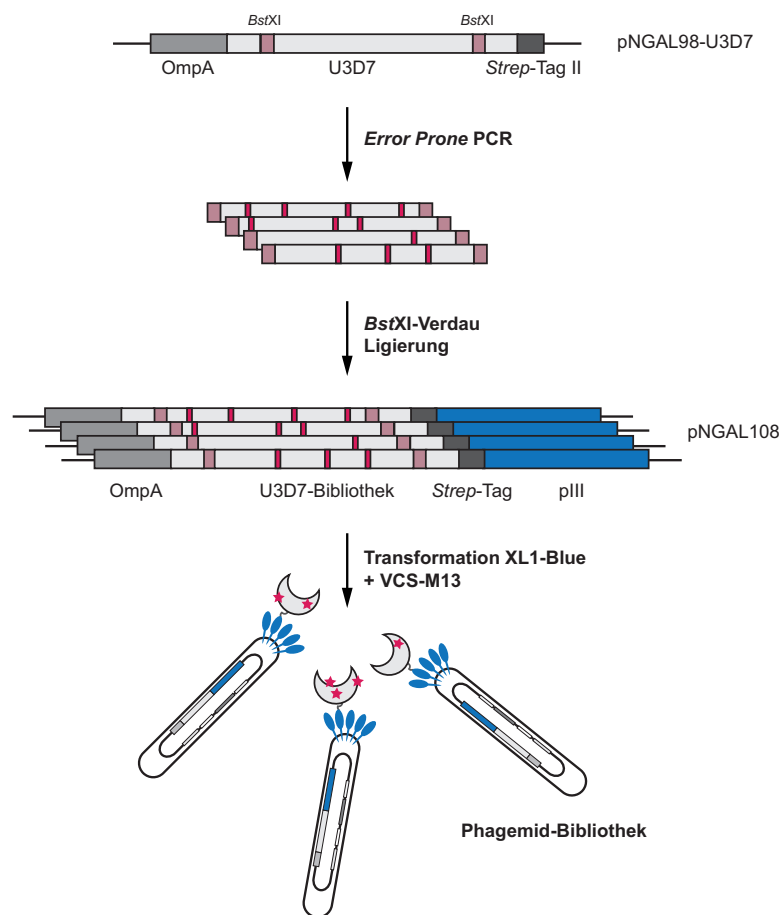
Die kinetische Echtzeit-Analyse der Doppelmutante mittels SPR ergab eine – bezogen auf A5C3 – minimal reduzierte Affinität von 14 pM, allerdings mit 5-fach schnellerer Assoziation und einer auf 10,5 Stunden verkürzten Halbwertszeit. Das optimierte Anticalin A5C3(F71Q/Y77H) wird im folgenden auch A5C3(QH) genannt.

### 3.4 Affinitätsmaturierung des Anticalins U3D7 durch kombinatorisches Engineering

Im Gegensatz zu den pikomolaren Affinitäten von A5C3 und S3A9 wies U3D7 eine moderate Dissoziationskonstante von 75 nM gegenüber D1-7 auf. Aufgrund der zu A5C3 und S3A9 verschiedenen Bindungseigenschaft, das heißt einem von VEGF-C unabhängigen Epitop, sowie strikt monodisperses Verhalten in der Gelfiltration, wurde U3D7 aus den selektierten und als vielversprechend eingestuften Lipocalin-Varianten (vgl. Abschnitt 3.2.4) für das weitere Engineering ausgewählt.

#### 3.4.1 Generierung einer U3D7-Zufallsbibliothek durch Error-Prone PCR

Zur Verbesserung der Bindungskinetik wurde U3D7 einer *in vitro* Affinitätsreifung nach dem Vorbild der somatischen Hypermutation von Antikörpern im Rahmen der adaptiven Immunantwort unterzogen (Thie *et al.*, 2009). Durch das Einführen von zufälligen Punktmutationen wurde die zentrale Ligandenbindungsregion der Lipocalin-Variante U3D7 partiell diversifiziert und mit Hilfe von Phage Display unter erhöhter Stringenz Varianten mit verbesserter Bindungskinetik selektiert. U3D7 wurde insgesamt zwei Maturierungs-Zyklen unterworfen, wobei für jede Runde eine neue Bibliothek mit durchschnittlich drei zufallsbasierten Aminosäure-Substitutionen generiert wurde.



**Abbildung 25| Schematischer Ablauf der Konstruktion einer Zufallsbibliothek zur Affinitätsreifung des Anticalins U3D7.** Zur näheren Erläuterung siehe Text.

Die Generierung der ersten Bibliothek erfolgte auf der Basis des für U3D7 kodierenden Genabschnitts durch Error-Prone PCR (Martineau, 2002). Die randomisierte *Bst*XI-Kassette wurde anschließend auf dem Phage Display Vektor pNGAL108 kloniert und, nach Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue und Superinfektion mit VCS-M13 Helferphagen, die U3D7-Mutanten präsentierende Phagemid-Bibliothek gemäß Abschnitt 2.12.2 für das Phage Display präpariert (Abbildung 25). Die Analyse der DNA-Sequenzen von zehn unabhängigen Klonen ergab eine durchschnittliche Mutationsrate von 3-4 ausgetauschten Aminosäuren pro Variante, wobei die Bibliothek eine Komplexität von insgesamt  $7,5 \times 10^9$  Varianten umfasste.

### 3.4.2 Selektion von U3D7-Varianten mit verbesserter Affinität mittels Phage Display und ELISA-Screening

Die Ergebnisse der vorangegangenen Bindungsstudien ergaben für U3D7 sowohl im ELISA als auch in der SPR-Spektroskopie eine schlechtere Affinität für das aus 293T-Zellen gewonnene D1-7 als für das bakteriell produzierte D1-2. Um die Selektion von U3D7-Varianten mit einer verbesserten Affinität gegenüber dem Rezeptorabschnitt D1-2 im natürlichen Kontext der benachbarten Domänen 3 bis 7 zu begünstigen, wurde für das Phage Display diesmal das gesamte extrazelluläre Fragment D1-7 aus 293T-Zellen als biotinyliertes Target-Molekül eingesetzt. Vier aufeinanderfolgende Anreicherungszyklen wurden analog Abschnitt 3.2.1 durchgeführt, wobei die Elution der Target-gebundenen Phagemide unter sauren Bedingungen stattfand. Zur Anreicherung von Varianten mit verbesserter Affinität wurde die eingesetzte Target-Konzentration auf ein Niveau unterhalb der angestrebten Dissoziationskonstante verringert, nämlich 10 nM in den Runden 1 und 2, und durch Reduktion von 10 auf 1 nM in den Runden drei und vier der Selektionsdruck weiter verstärkt.

Nach dem vierten Selektionszyklus wurde die Plasmid-DNA des angereicherten Phagemid-Pools isoliert und, nach Verdau mit *Bst*XI, die Genkassette auf dem Expressionsplasmid pNGAL98 kloniert. Eine Kollektion von insgesamt 186 Klonen wurde im Anschluss im Mini-Expressionsmaßstab als lösliches Protein produziert und die in dem Rohextrakt enthaltenen Varianten im Hochdurchsatz-ELISA-Screening wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben auf spezifische Bindungsaktivität durchmustert. Acht Kandidaten zeigten deutliche Bindungssignale sowohl für D1-2 als auch für D1-7 und ergaben in einer anschließenden Sequenzanalyse acht unterschiedliche Varianten, die sich in 1-2 Aminosäuren von dem parentalen U3D7 unterschieden (Tabelle 7). Die jeweiligen Varianten wurden entsprechend ihrer Position in der Mikrotiterplatte benannt: A4E4, A4E7, A4H2, A4K7, A4M12, A4N5, A4N10, A4P11.

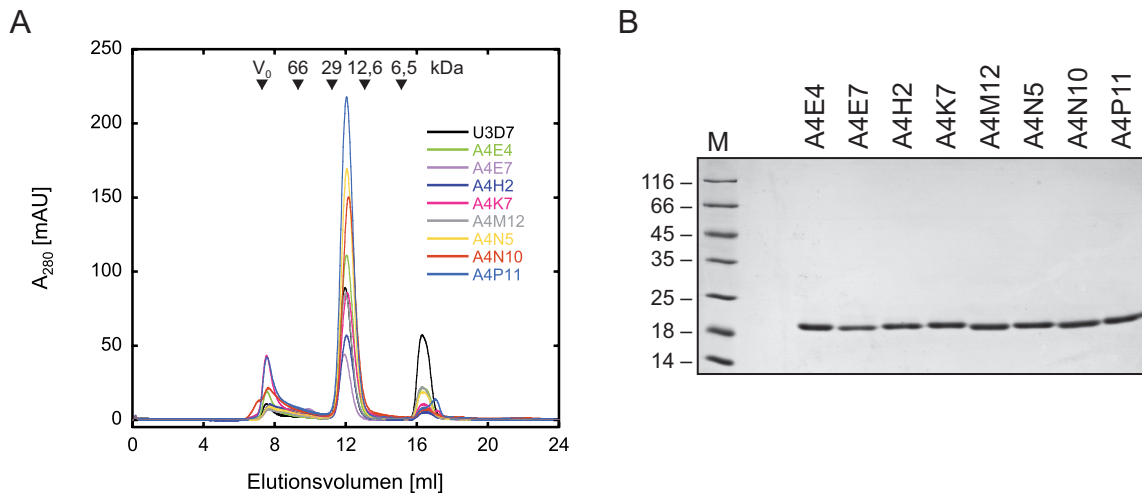
Die Aminosäure-Substitutionen der U3D7-Varianten befanden sich ausschließlich innerhalb der vier exponierten Schleifenregionen; die häufigsten Mutationen wurden dabei in der Schleifenregion Nr. 1 identifiziert. In fünf Varianten wurde eine Präferenz für Aminosäure-Substitutionen an den Positionen E44 und D45 festgestellt, wobei die Mutation D45G zwei mal auftrat (Tabelle 7).

### 3.4.3 Produktion und biomolekulare Bindungsstudien der selektierten U3D7-Varianten

Zur näheren Untersuchung der U3D7-Varianten wurden diese in 2 L Schüttelkultur in *E. coli* TG1/F<sup>-</sup> exprimiert und nach selektiver Permeabilisierung der äußeren bakteriellen Zellmembran die periplasmatische Proteinfraction gewonnen. Die Lipocalin-Varianten wurden anhand des *Strep*-tag II am C-Terminus aus dem Periplasmaextrakt gereinigt und das Oligomerisierungsverhalten durch Gelfiltration an einer Superdex S75 Tricorn 10/300 Säulenmatrix analysiert. Die Überlagerung der

## Ergebnisse

erhaltenen Elutionsprofile zeigte ein nahezu identisches Elutionsverhalten von U3D7 und seinen Mutanten. Lediglich A4E7 und A4H2 wiesen eine im Verhältnis zum monomeren Anteil erhöhte Neigung zu Aggregation auf (Abbildung 26). Im SDS-Gel konnten unter nicht reduzierenden Bedingungen keine Unterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 26 | Produktion, Reinigung und biochemische Charakterisierung von in *E. coli* exprimierten U3D7-Varianten.** (A) Elutionsverhalten in der Gelfiltration. Die Varianten wurden auf einer Superdex S75 Tricorn 10/300 Gelfiltrationssäule (24 ml Bettvolumen) hinsichtlich ihres Oligomerisierungsverhaltens analysiert. (B) Untersuchung der Reinheit der gelfiltrierten Varianten im mit Coomassie-Brilliantblau gefärbten SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen (M entspricht dem Größenstandard in kDa).

Die quantitative Analyse der Affinität der gelfiltrierten Varianten gegenüber D1-7 erfolgte daraufhin wiederum mit Hilfe der SPR-Spektroskopie im BIAcore-Instrument. Hierzu wurden analog zu den vorangegangenen Bindungsstudien die Assoziations- und Dissoziationsrate der jeweiligen Variante an einer mit dem rekombinanten D1-7 beschichteten CM5 Sensorchip-Oberfläche bei verschiedenen Konzentrationen gemessen.

Die gemessenen Sensorgramme ergaben für die acht Varianten  $K_D$ -Werte im Bereich zwischen 10 und 53 nM (Tabelle 7). Die aus diesem Pool beste Variante A4N10 wies eine  $K_D$  von 10,2 nM und eine von 17 auf 30 Minuten verlängerte Halbwertszeit sowie eine um den Faktor vier verbesserte Assoziationsrate auf. Im Vergleich zu U3D7 trägt A4N10 zwei zusätzliche Mutationen, K74R und D127N, wobei letztere einer der 20 randomisierten Positionen im Wildtyp-Lcn2 entspricht.

**Tabelle 7| Im BIAcore-Instrument ermittelte Bindungskonstanten affinitätsmaturierter U3D7-Varianten gegenüber D1-7.**

Variante	$k_{on}$ [ $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $10^{-9} \text{ M}$ ]	$\tau_{1/2}^a$ [min]	Mutationen <sup>b</sup>
U3D7	0,88	6,58	74,4	17	–
A4E4	2,73	4,04	14,8	29	E44A
A4E7	1,54	4,21	27,8	27	K74E
A4H2	2,41	3,89	16,1	30	N129S
A4K7	3,17	4,06	12,8	28	E44K
A4M12	2,19	6,66	30,1	17	D45G
A4N5	1,09	5,82	53,6	20	D45G/G102S
A4N10	3,85	3,92	10,2	30	K74R/D127N
A4P11	2,12	6,79	32,1	17	E44D/D45N

<sup>a</sup> Berechnete Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  gemäß  $\ln(2)/k_{off}$

<sup>b</sup> Aminosäure-Substitutionen im Vergleich zu U3D7

#### 3.4.4 Verlängerung der Komplex-Dissoziationsrate $k_{off}$ durch kombinatorische und rationale Mutagenese

Ausgangspunkt der nächsten Maturierungsrunde bildete der beste Kandidat (A4N10) des vorangegangenen Selektionszyklus. Analog zum Abschnitt 3.4.1 wurde basierend auf der A4N10-Genkassette eine neue Bibliothek mit durchschnittlich 2-3 Aminosäure-Substitutionen durch Error-Prone PCR generiert und diese für die erneute Phage Display Selektion präpariert. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Panning-Prozeduren wurde diesmal die Inkubationszeit für die Phagemid-Target-Komplexbildung gezielt auf nur 5 min (statt 1 h) reduziert, um so die Anreicherung von Varianten mit schneller Assoziationskinetik zu begünstigen. Um von den gebundenen Varianten diejenigen mit einer besonders niedrigen Dissoziationsrate herauszufiltern, wurden schnell dissoziierende Phagemide in einem 2-Stündigen Waschschrift (vorher nur 1 min) unter gleichzeitiger Konkurrenz mit dem im 100fachen Überschuss eingesetzten unmarkierten Target-Protein D1-7 separiert.

Nach dem vierten Anreicherungszyklus wurde zur Analyse des angereicherten Phagemid-Pools die Plasmid-DNA von zwölf zufällig ausgewählten Klonen isoliert und sequenziert. Auf Ebene der Proteinsequenz konnte – neben weiteren Mutationen – eine Anhäufung von basischen Aminosäure-Substitutionen innerhalb der Schleifenregionen 1, 2 und 3 festgestellt werden. Folgende Substitutionen traten gehäuft auf, wobei die in Klammern angegebenen Zahlen der Häufigkeit einer Mutation innerhalb der zwölf analysierten Klone entsprechen: E44K (5/12), D47G (4/12), W70R (5/12), W72R (5/12), E77K (4/12) und E100K (4/12).

Fünf repräsentative Klone (B4, E4, F1, KL4/6 und KL10; s. Tabelle 8) wurden daraufhin in *E. coli* produziert und nach Reinigung deren Bindungseigenschaften analog zu den vorangegangenen Bindungsstudien im BIAcore-Instrument gemessen. Die ermittelten Affinitäten der fünf Mutanten lagen im Bereich zwischen 0,264 nM (E4) und 12,4 nM (KL10).

**Tabelle 8 | Überblick über die in der zweiten Maturierungsrunde durch Phage Display angereicherten A4N10-Varianten zusammen mit den durch rationale Mutagenese generierten Mutanten bezüglich D1-7-Bindung und Produktionseigenschaften in *E. coli*.**

Variante	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]	$\tau_{1/2}^c$ [h]	Ausbeute [ $\mu\text{g}/2\text{L}$ ]	Aggregat [%]
A4N10	0,039	392	10,2	0,5	216	9,06
W72R/E100K/L103R/ F122L/N129K (B4) <sup>a</sup>	0,189	69,9	0,370	2,75	68	38,4
E44K/D47V/V69M/W72R/ E100K (E4) <sup>a</sup>	0,221	58,5	0,264	3,3	77	21,1
E44K/D47V/Y56F/W72R/ T104K/I135V (F1) <sup>a</sup>	0,048	76,6	1,6	2,5	446	11,2
E44K/D47G/P48S/E60G/ W70R (KL4/6) <sup>a</sup>	0,081	309	3,81	0,62	116	25,1
N39I/E44K/W70R/R74K/ E77K/E100K/V111M (KL10) <sup>a</sup>	0,024	297	12,2	0,65	54	46,1
E44K <sup>b</sup>	0,067	42,9	0,634	4,5	151	9,1
W72R <sup>b</sup>	0,039	127	3,26	1,5	712	5,46
E100K <sup>b</sup>	0,075	52,1	0,691	3,7	242	14,2
W72R/E100K <sup>b</sup>	0,063	99,6	1,57	1,9	276	12,5
E44K/E100K <sup>b</sup>	0,127	41,8	0,329	4,6	62,9	33,2

<sup>a</sup> Durch Phage Display selektierte A4N10-Variante

<sup>b</sup> Durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführte Mutation(en) in A4N10

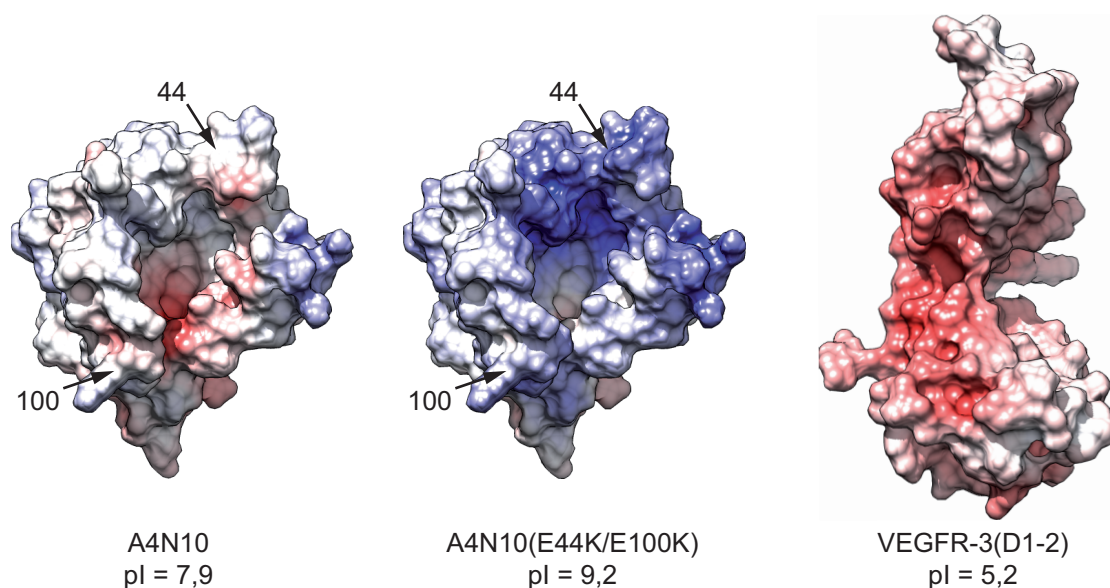
<sup>c</sup> Berechnete Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  gemäß  $\ln(2)/k_{off}$

Alle fünf Varianten wiesen neben den gehäufteten Mutationen E44K, W70R, W72R und E100K weitere Substitutionen auf (bis zu 7 Aminosäure-Substitutionen bei KL10), von denen anzunehmen war, dass sie für die Affinität weniger relevant waren. Um daher aus den vier genannten Aminosäureaustauschen diejenigen zu identifizieren, welche zur Verbesserung der Bindungseigenschaften beitragen, wurden E44K, W72R und E100K durch ortsgerichtete Mutagenese einzeln auf A4N10 übertragen. Die in den Klonen KL4/6 und KL10 enthaltene Mutation W70R wurde aufgrund der gegenüber den Varianten B4, E4 und F1 schlechteren Affinitäten von der rationalen Mutagenese ausgeschlossen.

Alle drei Einzelmutationen führten zu einer Verbesserung der Target-Affinität (Tabelle 8), wobei der Austausch von Glutamat zu Lysin an den Positionen 44 und 100 in den Schleifenregionen Nr. 1 bzw. 3 in beiden Varianten ähnliche Verbesserung der Affinität von 10 auf jeweils 0,6 nM, mit einer Halbwertszeit von > 3,5 Stunden, bewirkte. Die Kombination dieser beiden Mutationen führte zu einer nahezu additiv beschleunigten Assoziationsrate, was schließlich in einem  $K_D$ -Wert von 329 pM resultiert.



Der beobachtete Effekt erscheint insofern plausibel, als der Austausch der beiden Glutaminsäurereste den isoelektrischen Punkt (pI) des Proteins verändert. Zur näheren Untersuchung der durch die Mutationen hervorgerufenen Ladungsänderung wurde mit Hilfe des *Adaptive Poisson-Boltzmann Solvers* (APBS; Baker *et al.*, 2001) das elektrostatische Oberflächenpotential von A4N10, A4N10(E44K/E100K) und VEGFR-3(D1-2) berechnet (Abbildung 27). Hierbei zeigte sich für die Doppelmutante eine verstärkt positive Ladung an den gegenüberliegenden oberflächenexponierten Schleifen 1 und 3 mit den Positionen 44 bzw. 100, was die elektrostatische Anziehung zu dem vorwiegend negativ geladenen D1-2 im Vergleich zu A4N10 begünstigt.



**Abbildung 27 | Elektrostatische Oberflächenanalyse von A4N10 gegenüber VEGFR-3(D1-2).** Basierend auf der Kristallstruktur des Wildtyp-Lcn2 (PDB-ID 1L6M) wurde durch die *in situ* eingeführten Aminosäuresubstitutionen L36T, A40R, I41R, Q49P, Y52S, S68V, L70W, R72W, D77E, W79N, R81D, N96S, Y100E, L103Q, Y106I, K125T, S127D, Y133A und K135A ein Modell von A4N10 generiert und die Oberflächenladung mit Hilfe der *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* Software berechnet. Der isoelektrische Punkt der Proteine wurde anhand der Primärsequenz mit Hilfe des *ProtParam* Tools ermittelt. PDB code für VEGFR-3(D1-2): 4BSK.

Interessanterweise war eine Anreicherung von Mutationen an der Position E44 bereits im ersten Maturierungszyklus aufgetreten (Tabelle 7) und führte schon in den Varianten A4E4 und A4K7 zu einer Erhöhung der Affinität gegenüber U3D7. Die schließlich resultierende Lipocalin-Variante A4N10(E44K/E100K) wies im Vergleich zu U3D7 eine 226-fach verbesserte Ligandenaffinität mit einer deutlich verlängerten Halbwertszeit von 4,6 h auf (gegenüber 17 min). In den zwei Maturierungsrunden konnten somit mit Hilfe des Phage Displays durch eine angemessen stringente Selektionsstrategie die Bindungskinetik von U3D7 mit vier zusätzlichen Mutationen gezielt beeinflusst und verbessert werden.

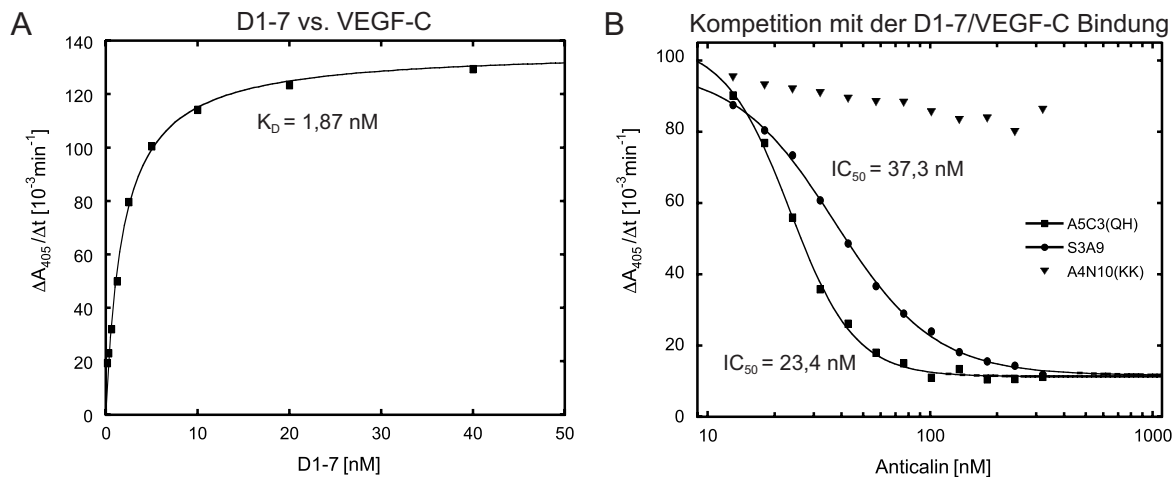
Im Hinblick auf die Produktionseigenschaften in *E. coli* zeigt A4N10(E44K/E100K) gegenüber A4N10 eine um den Faktor 4 erhöhte Tendenz zur Proteinaggregation sowie eine erniedrigte Proteinausbeute von 63 µg pro 2 L Kulturvolumen. Die Induktion der Genexpression erfolgte in diesem Fall bei OD<sub>550</sub> = 0,5 für 3 Stunden. Durch Expression des Proteins bei höherer Zelldichte (OD<sub>550</sub> = 2) und

für 5 statt 3 Stunden konnte der Anteil an Aggregat jedoch auf 7,3 % verringert und die Ausbeute auf 0,9 mg je 2 L Kulturvolumen erhöht werden, so dass im Hinblick auf die Proteinausbeute keine Einschränkung für die weitere Verwendung dieses Anticalins besteht. Das optimierte Anticalin A4N10(E44K/E100K) wird im Folgenden auch A4N10(KK) genannt.

### 3.5 Funktionelle Charakterisierung von für VEGFR-3 spezifischen Anticalinen

#### 3.5.1 Konkurrenz mit dem natürlichen VEGFR-3 Liganden VEGF-C im quantitativen ELISA

In dem zuvor durchgeführten qualitativen Bindungstest (Abschnitt 3.2.4) wurde bereits gezeigt, dass die Anticaline S3A9 und A5C3 mit der Bindung des natürlichen Liganden VEGF-C interferieren. VEGF-C ist ein dimeres Protein, dessen Interaktion mit VEGFR-3 an den Domänen 1 und 2 stattfindet (Jeltsch, 2006; Leppänen *et al.*, 2013) und die Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors induziert. Eine Konkurrenz der Anticaline mit VEGF-C kann demnach einen direkten Einfluss auf die Aktivierung der durch VEGFR-3 vermittelten Signalkaskade haben, was eine potentielle Anwendung in der Tumorthherapie bietet. Das Bindungsverhalten von S3A9 und A5C3 wurde deshalb in einem kompetitiven ELISA quantitativ untersucht und dafür die inhibitorische Konstante  $K_i$  ermittelt (Abbildung 28). Für die Detektion von D1-7 wurde im ELISA der bereits in Abschnitt 3.1.3 charakterisierte Antikörper MAB3491 verwendet, da dieser ein in den Domänen 3-7 gelegenes Epitop aufweist und demnach nicht mit der Bindung von VEGF-C an die Domänen 1-2 interferiert.



**Abbildung 28 | Quantitative Untersuchung der VEGF-C/VEGFR-3 Blockierungsaktivität verschiedener Anticaline im kompetitiven ELISA.** (A) Bestimmung der Bindungsaktivität von VEGF-C gegenüber VEGFR-3 (D1-7). Eine mit VEGF-C beschichtete Mikrotiterplatte wurde mit einer Konzentrationsreihe von D1-7 inkubiert und der gebundene Anteil an D1-7 nachgewiesen. (B) Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte von S3A9 und A5C3(QH). Verschiedene Konzentrationen der Anticaline wurden in einer mit VEGF-C beschichteten Mikrotiterplatte mit 2,5 nM D1-7 vermischt und der an VEGF-C gebundene Anteil an D1-7 detektiert. A5C3(QH) entspricht der optimierten Doppelmutante A5C3(F71Q/Y77H), A4N10(E44K/E100K) ist als A4N10(KK) abgekürzt.

Im Einklang mit den vorangegangenen Ergebnissen wurde für S3A9 und A5C3(QH) eine Reduktion des Bindungssignals zwischen D1-7 und VEGF-C in Abhängigkeit von der Anticalin-Konzentration

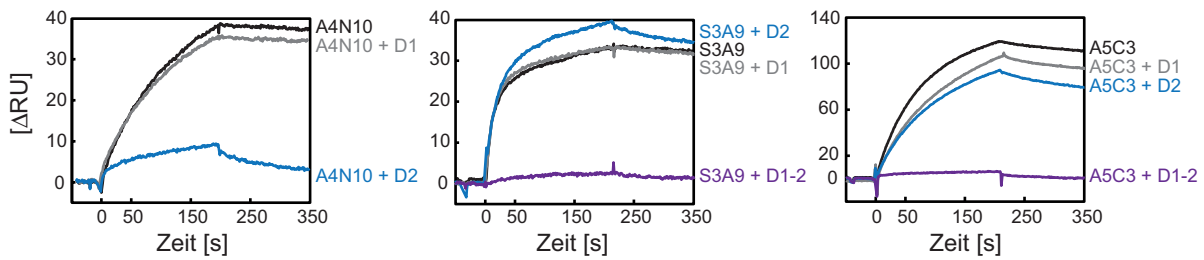
gemessen. Die inhibitorische Konzentration  $IC_{50}$ , bei welcher halbmaximale VEGF-C/VEGFR-3-Bindung gemessen wurde, belief sich im Fall von A5C3(QH) auf 23,4 nM und auf 37,3 nM für S3A9. Die Bindungsaffinität von D1-7 gegenüber dem immobilisierten VEGF-C wurde in einem analogen ELISA in Abwesenheit eines Anticalins zu  $K_D = 1,87$  nM bestimmt. Gemäß der Cheng Prusoff-Gleichung (Cheng & Prusoff, 1973) ergaben sich somit für A5C3(QH) und S3A9  $K_i$ -Werte von 10 bzw. 16 nM. Ähnliche Werte wurden auch für einen bivalenten VEGF-C-blockierenden Antikörper beschrieben (Jimenez *et al.*, 2005). A4N10(KK) hingegen zeigte einhergehend mit den Ergebnissen der SPR-Spektroskopie keinerlei Beeinflussung der Bindungswechselwirkung zwischen D1-7 und VEGF-C.

### 3.5.2 Bestimmung der Domänenspezifität gegenüber VEGFR-3

Das während des Phage Display eingesetzte Target-Molekül aus den Domänen 1 und 2 weist gegenüber der Ligandenbindestelle der Lipocaline eine relativ große Proteinoberfläche auf, so dass eine Erkennung von verschiedenen Epitopen durch die Lcn2-Varianten möglich ist. Die drei Anticaline A5C3, S3A9 und U3D7 (bzw. deren optimierte Varianten A5C3(QH), A4N10 und A4N10(KK)) wiesen bereits im Hinblick auf ihre Bindungswechselwirkungen mit D1-7 in Gegenwart von VEGF-C unterschiedliche Eigenschaften auf, was auf eine Erkennung verschiedener Epitope hinweist. Um die genaue Domänenspezifität der Varianten näher zu charakterisieren, sollten die Wechselwirkungen mit den isolierten Einzeldomänen durch SPR-Spektroskopie bestimmt werden.

Die qualitative Analyse der Domänenspezifität erfolgte hierbei durch einen kompetitiven Bindungstest im BIAcore-Instrument. D1, D2 (D2.1, s. Abschnitt 3.1.1) oder D1-2 wurden zur Komplexbildung einzeln mit dem jeweiligen Anticalin mit der 10-fachen Menge für 30 min inkubiert, so dass bei gegebener Spezifität eine Assoziation des Anticalin:Domänen-Komplexes in Lösung stattfinden konnte. Der Proteinmix wurde anschließend auf einen mit D1-7 kovalent beladenen Mikrosensorchip im BIAcore-Instrument appliziert und der Anstieg des Resonanzsignals beobachtet (Abbildung 29). Eine Reduktion des Bindungssignals im Vergleich zu einer Referenzinjektion des Anticalins alleine offenbarte hierbei Bindungsaffinität gegenüber der jeweiligen Einzeldomäne. Ein Vorteil des hier gewählten experimentellen Aufbaus ist, dass die Assoziation des Anticalin:Domänen-Komplexes in Lösung stattfindet und so die vollständige Funktionalität der beteiligten Komponenten gewährleistet war.

Für die Bindungsstudien mit dem Anticalin U3D7 wurde die in der ersten Affinitätsmaturierungsrunde generierte Variante A4N10 verwendet. Anhand der gleichbleibenden Bindungsaktivität von A4N10 in Gegenwart von D1 bzw. des reduzierten Resonanzsignals nach Präinkubation mit D2 konnte für A4N10 ein ausschließlich in Domäne 2 gelegenes Epitop bestimmt werden. A5C3 und S3A9 zeigten im Gegensatz dazu nur eine leichte Präferenz für D2, wobei eine vollständige Unterdrückung der Wechselwirkung mit dem immobilisierten D1-7 lediglich nach Präinkubation mit dem Zweidomänenfragment D1-2 beobachtet werden konnte.



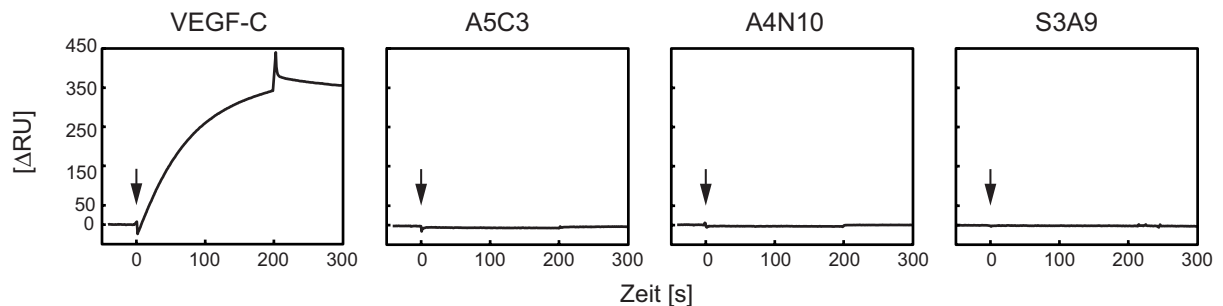
**Abbildung 29] Bindungswchselwirkungen von Anticalinen mit den Einzeldomänen D1 und D2.** Ein vorinkubierter Mix aus dem jeweiligen Anticalin und der zehnfachen Menge der VEGFR-3 Einzeldomänen D1 oder D2 bzw. dem Zweidomänenfragment D1-2 wurde in einem kontinuierlichen Fluss auf einen mit D1-7 beschichteten SPR-Sensorchip appliziert und daraufhin der Anstieg des Resonanzsignals beobachtet. Eine Reduktion des Resonanzsignals im Vergleich zur vorhergehenden Referenzmessung des Anticalins alleine deutet auf Bindung der zugesetzten Einzeldomäne. A4N10 zeigt demnach ein allein in D2 gelegenes Epitop; die Sensorgramme von A5C3 und S3A9 hingegen deuten auf eine im Kontext beider Domänen (D1-2) ausgebildete Interaktionsfläche.

In einem qualitativen Bindungstest wurde zudem die simultane Bindung der drei Anticaline an den VEGFR-3 mittels SPR untersucht, analog den vorangegangenen Experimenten zum Nachweis der VEGFR-3 Bindungsaktivität von Lcn2-Varianten in Gegenwart von VEGF-C (vgl. Abschnitt 3.2.4 und Abbildung 20). Hierzu wurden jeweils zwei Anticaline (A5C3 vs. A4N10, A5C3 vs. S3A9 sowie S3A9 vs. A4N10) nacheinander auf einen mit D1-7 beschichteten Sensorchip im BIAcore-Instrument appliziert und der Anstieg des Resonanzsignals für das jeweilige Anticalin im Vergleich zu einer Referenzmessung ermittelt. Einhergehend mit den unterschiedlichen beobachteten Spezifitäten von A4N10 gegenüber A5C3 und S3A9 kann eine gleichzeitige Bindung der Anticaline A4N10 und A5C3 bzw. A4N10 und S3A9 an D1-7 erfolgen (nicht gezeigt). Eine simultane Bindungswchselwirkung von A5C3 und S3A9 mit D1-7 hingegen ist nicht möglich. Trotz der im Hinblick auf die Domänenspezifität und die Konkurrenz mit VEGF-C festgestellten Gemeinsamkeiten von S3A9 und A5C3 deuten die unterschiedlichen  $K_i$ -Werte sowie die verschiedenen Aminosäure-Sequenzen der Anticaline auf unterschiedliche Wechselwirkungen innerhalb der Domänen 1 und 2 bzw. individuelle Epitope hin.

### 3.5.3 Kreuzreaktivität gegenüber dem nah verwandten VEGFR-2

VEGFR-2 weist als verwandtes Mitglied der VEGF-Familie eine 31 %ige Aminosäure-Sequenzidentität mit VEGFR-3 auf. Weiterhin war aus der Literatur bekannt, dass die vollständig prozessierte Form (A112-R227) des VEGF-C ebenso an VEGFR-2 binden kann (Joukov *et al.*, 1996), wenngleich mit niedrigerer Affinität. Eine Kreuzreaktivität der für VEGFR-3 spezifischen Anticaline mit VEGFR-2 ist demnach prinzipiell möglich und sollte in einem weiteren Bindungsexperiment im BIAcore-Instrument überprüft werden. Analog den vorangegangenen Experimenten wurde der extrazelluläre Teil (D1-7) des VEGFR-2 auf der Oberfläche eines Dextranchips kovalent immobilisiert. Zur qualitativen Analyse wurde eine 1  $\mu$ M Lösung der gereinigten Anticaline A5C3, S3A9 und A4N10 injiziert und die Zunahme des SPR-Signals gemessen. VEGF-C diente in diesem Experiment als Positivkontrolle zum Nachweis der Funktionalität des immobilisierten VEGFR-2-Fragments. Für keines der

drei Anticaline konnte ein Anstieg des Resonanzsignals während der Injektion gemessen werden (**Abbildung 30**), was ein Beweis für die ausgeprägte Spezifität der selektierten Anticaline gegenüber VEGFR-3 ist.



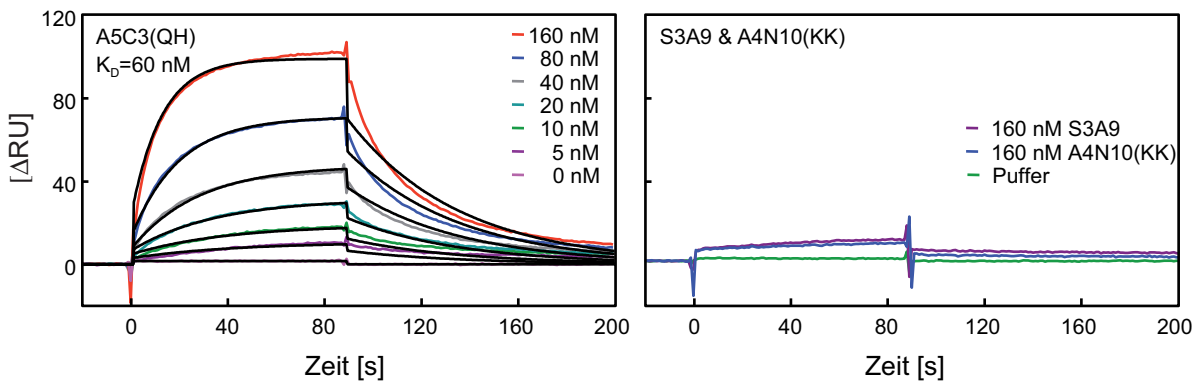
**Abbildung 30| Bindungswechselwirkungen der Anticaline mit VEGFR-2.** Die Oberfläche eines CM5-Sensorchips wurde mit ca. 4300 RU der extrazellulären Domäne D1-7 des VEGFR-2 über Lysin-Seitenketten derivatisiert und anschließend eine 1  $\mu$ M Proteinlösung der Anticaline A5C3, S3A9 und A4N10, sowie VEGF-C als Referenzprotein, unter einem konstanten Fluss von 25  $\mu$ l/min appliziert. Der Injektionsstart der jeweiligen Messung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die drei für VEGFR-3 spezifischen Anticaline zeigten keinerlei Kreuzreaktivität mit VEGFR-2.

### 3.5.4 Interaktion der Anticaline mit VEGFR-3 der Maus

Für die Anwendung der Anticaline im Tiermodell, beispielsweise für das *in vivo* Tumor-Imaging in einer Maus mit einem Tumor-Xenograft, wurden diese hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem murinen VEGFR-3 (mVEGFR-3) untersucht. Der extrazelluläre Teil des murinen VEGFR-3 umfasst ähnlich dem humanen Rezeptor sieben Ig-ähnliche Domänen und die Domänen 1 und 2 weisen gemäß *Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011) eine 85 %ige Aminosäure-Sequenzidentität zu dem humanen VEGFR-3 auf.

Die Bindungsstudien erfolgten analog zu den vorhergehenden Experimenten zum Studium der Kreuzreaktivität mit dem humanen VEGFR-2 (Abschnitt 3.5.3) im BIAcore-Instrument. Der kommerziell verfügbare extrazelluläre Teil (D1-7) des murinen VEGFR-3 wurde in einer EDC/NHS Kopplungs-Reaktion auf einer Flusszelle des CM5-Sensorchips immobilisiert. Eine Konzentrationsreihe des jeweiligen Anticalins wurde injiziert, und unter Abgleich mit einem unmodifizierten Referenzkanal wurde die Änderung des Resonanzsignals während und nach der Injektion gemessen.

A5C3(QH) wies hierbei eine Dissoziationskonstante von 59,7 nM mit einer im Vergleich zur humanen Rezeptorversion stark veränderten Bindungskinetik auf (Abbildung 31). Charakteristisch für die Interaktion zwischen A5C3(QH) und mVEGFR-3 ist eine schnelle  $k_{on}$  von  $3,64 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  und eine ebenso schnelle Dissoziation des Komplexes mit  $\tau_{1/2} = 32 \text{ s}$ .



**Abbildung 31 | Bindungsaktivität der maturierten Anticaline gegenüber dem VEGFR-3 der Maus im BIAcore-Instrument.** Gezeigt sind die zweifach korrigierten Sensorgramme der optimierten Anticaline A5C3(QH), A4N10(KK) und S3A9 auf einem mit 1675 RU des murinen VEGFR-3(D1-7) beladenen Sensorchip. Die globale Anpassung der Messkurven einer Verdünnungsreihe von 160 – 5 nM Anticalin gemäß dem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell ergab für A5C3(QH) einen  $K_D$ -Wert von 59,7 nM. Im Fall von S3A9 und A4N10(KK) wurde bei der höchsten Konzentration der Verdünnungsreihe nur eine vernachlässigbare Änderung des Resonanzsignals ( $\Delta$ RU) detektiert. A5C3(QH) entspricht der optimierten Doppelmutante A5C3(F71Q/Y77H), A4N10(E44K/E100K) ist als A4N10(KK) abgekürzt.

Im Fall der Anticaline S3A9 und A4N10(KK) zeigten die Sensorgramme bereits nach Injektion der niedrigsten Verdünnung von 160 nM nur eine vernachlässigbare Bindung des immobilisierten Liganden mVEGFR-3, so dass auf die Messung einer kompletten Verdünnungsreihe verzichtet wurde (Abbildung 31). Diese Ergebnisse verdeutlichen wiederum die hohe Spezifität der Anticaline gegenüber dem humanen Rezeptor.

Für eine präklinische Anwendung der Anticaline für das gezielte Targeting tumorassoziierter Neoangiogenese und Lymphangiogenese wäre eine Kreuzreaktivität der Anticaline mit dem murinen VEGFR-3 wünschenswert. A5C3(QH) bietet aufgrund der bereits vorhandenen moderaten Affinität gegenüber mVEGFR-3 die Grundlage hierfür. Durch erneute Diversifizierung der Ligandenbindestelle von A5C3(QH) und einem anschließenden Selektionsverfahren, ähnlich der Affinitätsmaturierung der Lcn2-Variante U3D7 (vgl. Abschnitt 3.4), kann ein für mVEGFR-3 spezifischer Abkömmling generiert werden.

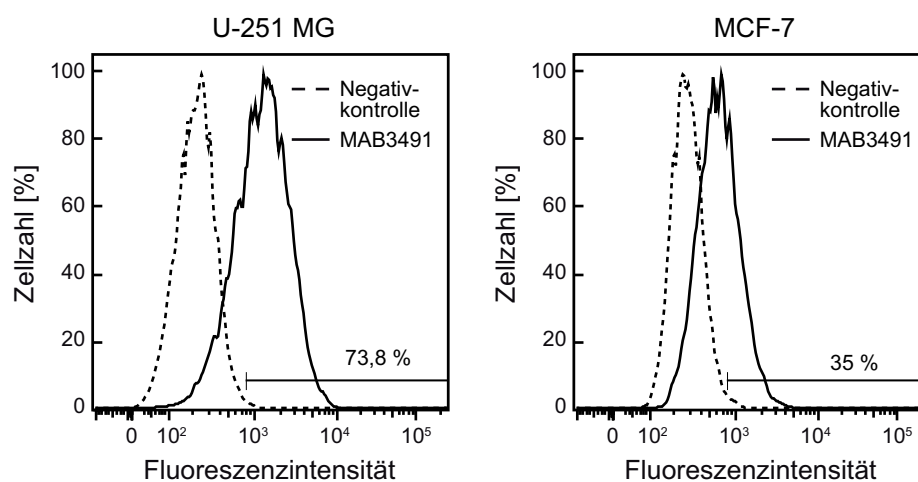
### 3.6 Untersuchungen zur spezifischen Expression und zum Anticalin-vermittelten Nachweis von VEGFR-3 in Zellkultur

#### 3.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von VEGFR-3 auf verschiedenen Zelllinien

Als Ausgangspunkt für den Nachweis der spezifischen Bindungsaktivität der *in vitro* selektierten und optimierten Anticaline gegenüber VEGFR-3 im natürlichen Kontext der Zelloberfläche wurde eine VEGFR-3 exprimierende Zelllinie benötigt. Im Rahmen der Evaluierung des VEGFR-3 als Tumortarget wurde die aus einem humanen Glioblastom stammende Zelllinie U-251 MG als VEGFR-3 exprimierende Zelllinie identifiziert (Gieser, 2014). Eine andere epithelähnliche, aus humanem

Brustkrebsgewebe gewonnene Zelllinie, MCF-7, war aus der Literatur als Zelllinie mit niedrigem VEGFR-3 Expressionslevel bekannt (Kurenova *et al.*, 2009). Zur Validierung der VEGFR-3 Oberflächenpräsentation wurden die beiden Zelllinien mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie hinsichtlich der Expression des Rezeptors untersucht. Als Nachweisreagenz diente hierfür der monoklonale IgG1-Antikörper MAB3491 (Su *et al.*, 2008), welcher entsprechend den vorangegangenen Untersuchungen im ELISA (Abschnitt 3.1.3) ein innerhalb der extrazellulären Domänen 3-7 gelegenes Epitop erkennt.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab im Fall der U-251 MG Zellen ein hohes VEGFR-3 Expressionslevel (Abbildung 32). Die analysierte Zellpopulation wies im Vergleich zur Kontrolle (*StrepMAB-Immo*) eine siebenfach höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) auf. Dabei konnte bei 73,8 % der analysierten Population ein positiver VEGFR-3 Status detektiert werden. Für die Zelllinie MCF-7 wurde ein niedrigerer VEGFR-3 Expressionsstatus bestätigt, so dass sich diese Zelllinie als Negativkontrolle für Folgeexperimente eignete. Für den Nachweis einer funktionellen Bindung der gegen VEGFR-3 gerichteten Anticaline – etwa durch Immunfluoreszenzfärbung oder im radioaktiven Zellbindungstest – standen nun zwei geeignete Zelllinien zur Verfügung.



**Abbildung 32| Zytofluorimetrische Analyse der Tumorzelllinien U-251 MG und MCF-7 auf VEGFR-3 Expression.** Der quantitative Nachweis des an der Zelloberfläche präsentierten Rezeptors erfolgte durch Inkubation mit dem für VEGFR-3 spezifischen Antikörper MAB3491 in Kombination mit einem mit Alexa Fluor 488 modifizierten Sekundär-Antikörper. Zur lebend/tot-Unterscheidung innerhalb der analysierten Zellpopulation wurden die Zellen kurz vor der Messung mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Die in den Histogrammen gezeigte Kontrolle entspricht den mit einem Kontroll-Antikörper (*StrepMAB-Immo*) zusammen mit dem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper versetzten Zellen in Abwesenheit von MAB3491.

### 3.6.2 Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR-3 exprimierenden Tumorzellen

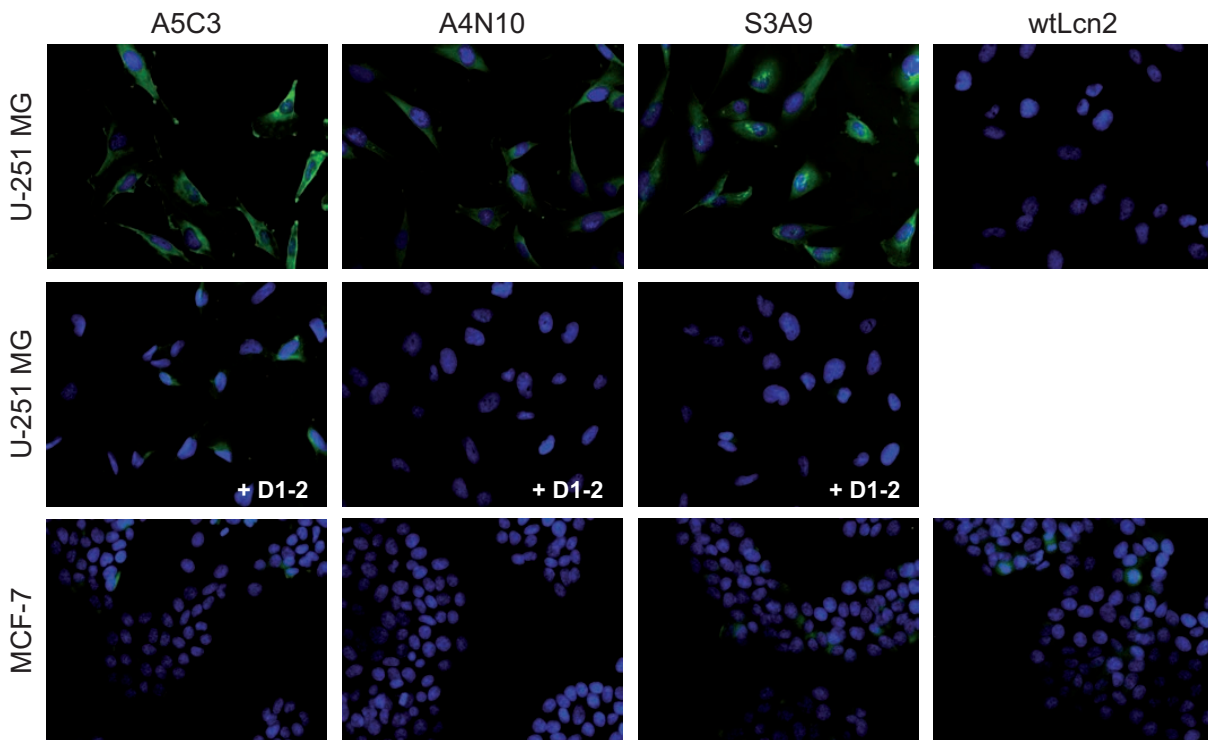
Aufgrund der verschiedenen Bindungsstudien standen drei gut charakterisierte funktionelle Anticaline mit pikomolaren Affinitäten und unterschiedlichen VEGFR-3-Bindungsmodi zur Verfügung. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung sollte nun der Nachweis bezüglich der spezifischen Erkennung des Targets auf der Oberfläche einer VEGFR-3 exprimierenden Tumorzelllinie erbracht werden. Resultierend aus den in Abschnitt 3.6.1 auf VEGFR-3 Expression analysierten Zelllinien



## Ergebnisse

wurden die U-251 MG Gliomzellen als Modellsystem für die Färbungen ausgewählt. Die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 diente mit ihrem niedrigen VEGFR-3 Expressionslevel als Kontrolle.

Für alle drei Anticaline konnte eine Bindung des VEGFR-3 auf der Zelloberfläche von U-251 MG Zellen nachgewiesen werden; eine Bindung an die MCF-7 Zellen war dagegen nicht detektierbar (Abbildung 33). Von den drei Anticalinen zeigte A5C3 die stärkste Fluoreszenzfärbung der U-251 MG Zellen. Die Zellen weisen eine gestreckte Morphologie auf, wobei neben der Färbung der gesamten Zelloberfläche eine verstärkte membranständige Lokalisierung der Fluoreszenz an den Ausläufern der Zellen sichtbar war. A4N10 zeigte schwächere VEGFR-3 Färbung; für das Wildtyp-Lcn2 war keine Bindung detektierbar. Die Bindung der Anticaline konnte in Gegenwart einer 10-fachen molaren Menge des D1-2 Rezeptorfragments unterdrückt werden. Dies und das negative Ergebnis mit den MCF-7 Zellen sind ein Nachweis für die spezifische Wechselwirkung der Anticaline mit dem Target-Rezeptor in seiner nativen Umgebung. Insgesamt bieten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung der selektierten Anticaline eine Grundlage für die Anwendung für das Tumor Imaging *in vivo*.



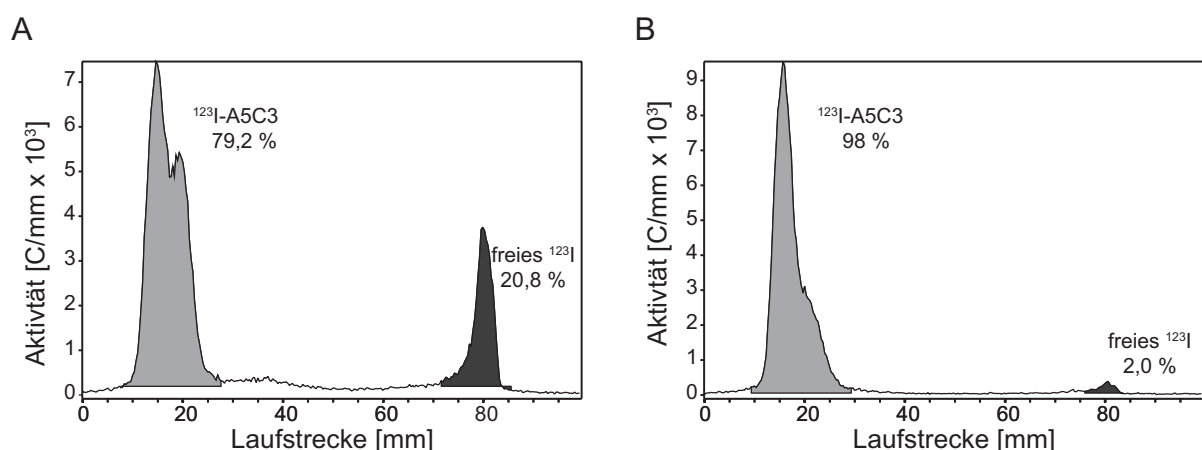
**Abbildung 33 | Spezifische Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR-3 exprimierenden U-251 MG Zellen.** Gezeigt sind die übereinandergelagerten Bilder der DAPI-markierten Zellkerne (blau) und der anhand der grünen Fluoreszenz detektierten VEGFR-3 spezifischen Färbung der Zelloberfläche (grün). Zum Nachweis der Spezifität wurde den Anticalinen eine 10-fach molare Menge des löslichen D1-2-Rezeptorfragments zugesetzt (+D1-2), was eine vollständige Blockierung der Bindung von VEGFR-3 bewirkte. Ebenfalls zeigte die Färbung der mit einem niedrigen VEGFR-3 Expressionslevel ausgestatteten Kontrollzelllinie MCF-7 keine nachweisbare Bindung des wtLcn2 und seinen Varianten.



### 3.7 Radioaktive Markierung von Anticalinen mit $^{123}\text{I}$ und quantitativer Radioliganden-Bindungstest

Die qualitativen Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zeigten bereits, dass die hier erhaltenen Lcn2-Varianten für die spezifische Erkennung des membranständigen VEGFR-3 auf der Oberfläche einer fixierten Krebszelllinie geeignet sind. Vorbereitend auf die Anwendung der Anticaline als Protein-Tracer für das *in vivo* Imaging wurden anhand von A5C3 die Markierung mit dem Radioisotop  $^{123}\text{I}$  und ein zellbasierter Liganden-Bindungsassay etabliert. Die Planung und Durchführung der Experimente wurde freundlicherweise in Kooperation mit der Nuklearmedizinischen Klinik des LMU Universitätsklinikums Großhadern von Sarah Pfeiffer und Prof. Peter Bartenstein unterstützt.

Aus den drei vielversprechendsten Anticalinen wurde A5C3 aufgrund seiner hohen Affinität beispielhaft für die Etablierung der radioaktiven Markierung ausgewählt. Die Markierung erfolgte in einer durch das Oxidationsmittel Iodogen (Ünak *et al.*, 2001) vermittelten elektrophilen Addition von  $^{123}\text{I}$  bevorzugt an die ortho-Positionen der aromatischen Tyrosinseitenketten.  $^{123}\text{I}$  besitzt als starker Emitter von  $\gamma$ -Strahlen eine radioaktive Halbwertszeit von  $\tau_{1/2} = 13,22$  h. Die Kopplungseffizienz der Iodierungsreaktion betrug typischerweise zwischen 70 und 80 %, wobei nach Abtrennung des ungebundenen  $^{123}\text{I}$  eine radiochemische Reinheit des Reaktionsprodukts von bis zu 98 % erreicht wurde (Abbildung 34).



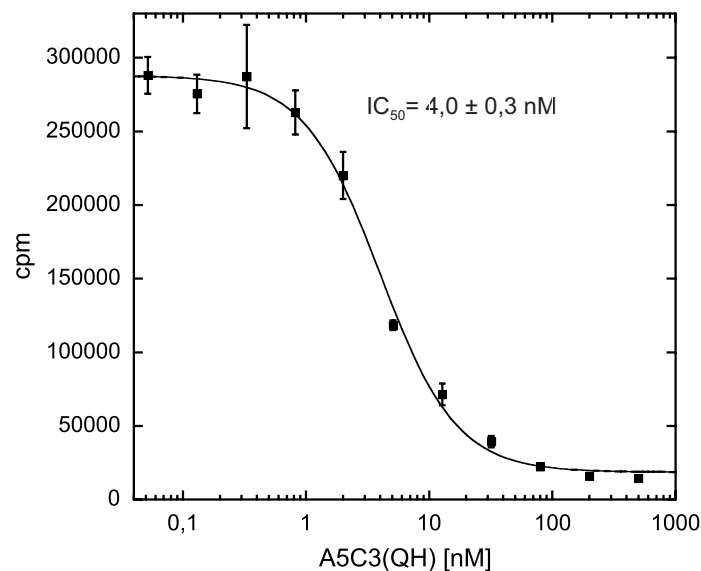
**Abbildung 34 | Dünnschichtchromatographische (DC) Analyse der Kopplungseffizienz und der radiochemischen Reinheit von  $^{123}\text{I}$ -A5C3.** Gezeigt sind die DC-Profile der während der Markierung von A5C3 mit  $^{123}\text{I}$  entnommenen Proben des Rohprodukts (A), sowie des über eine Sephadex G-25 Säule gereinigten Reaktionsprodukts (B).

Für die Bestimmung der Target-Affinität des iodierten Anticalins im BIAcore-Instrument, wurde A5C3 in einem analogen Reaktionsansatz mit nichtradioaktivem NaI „kalt“ iodiert und Assoziations- sowie Dissoziationsraten des gereinigten Reaktionsprodukts bei verschiedenen Konzentrationen wie in den vorangegangenen Bindungsstudien (s. Abschnitt 3.2.4) auf einem mit D1-7 beschichteten Sensorchip analysiert. Anhand des ermittelten  $K_D$ -Werts von 1 nM war ein Affinitätsverlust des Proteins aufgrund der Iodierung festzustellen. Offensichtlich erfolgt die Kopplung des Iods vorwiegend an für die Ligandenbindung relevante Tyr-Reste innerhalb der Bindetasche, was mit der beträchtlichen Größe des Halogensubstituenten die Wechselwirkung mit dem Target-Protein beeinträchtigen kann.

## Ergebnisse

Das radioiodierte Anticalin wurde anschließend dazu verwendet, die konzentrationsabhängige spezifische Bindung von A5C3 auf der Zelloberfläche humaner Gliomzellen in einem kompetitiven Zellassay nachzuweisen. Hierfür wurde aufgrund der benötigten größeren Proteinmenge die löslichkeitsoptimierte Variante A5C3(QH) verwendet (vgl. Abschnitt 3.3.1).

Als Zelllinie wurde während der ersten durchgeführten Experimente die zuvor mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich VEGFR-3 Expression untersuchte U-251 MG Zelllinie (vgl. Abschnitt 3.6.1) verwendet, deren moderate VEGFR-3 Expression sich allerdings während der initialen Experimente mit recht niedrigen Bindungssignalen und hohem Fehlermaß als unzureichend erwies. Aufgrund dessen wurde für die Etablierung des Assays ein mit dem VEGFR-3 kodierendes Plasmid EX-M0928-M61 (siehe Abschnitt 3.1.2) stabil transfiziertes Derivat der U-251 MG Zelllinie (Gieser, 2014) verwendet. Die als U251-R3 bezeichneten Zellen zeigten konstitutive Überexpression des VEGFR-3 (Gieser, 2014).



**Abbildung 35| Kompetitive Bindungsanalyse von A5C3(QH) im radioaktiven Zellassay.** Eine frisch präparierte Verdünnungsreihe des unmarkierten Anticalins A5C3(QH) wurde mit dem  $^{123}\text{I}$ -derivatisierten A5C3(QH) entsprechend einer Endkonzentration von 5 nM vermischt und zusammen mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen der VEGFR-3 überexprimierenden Zelllinie U251-R3 in die Vertiefungen einer 96-Well MultiScreen Filterplatte gegeben. Nach 2-stündiger Inkubation wurde die zellgebundene Radioaktivität der Verdünnungsreihe im  $\gamma$ -Szintillationszähler gemessen und der jeweils erhaltene Mittelwerte einer Vierfachbestimmung gegen die Konzentration des unmarkierten Anticalins aufgetragen.

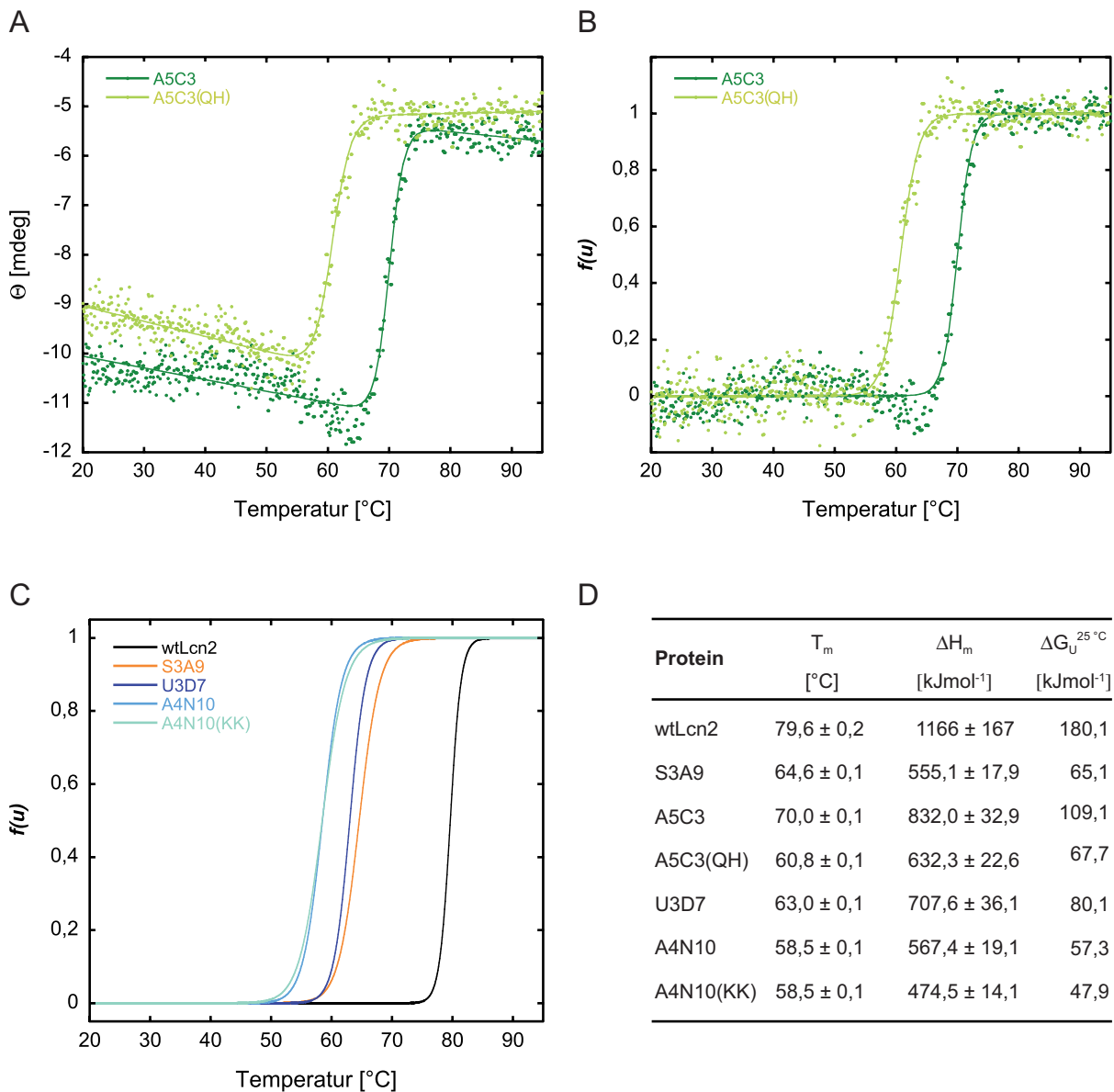
Das mit  $^{123}\text{I}$ -derivatisierte A5C3(QH) diente in dem Bindungsassay als Radioligand und wurde mit einer Verdünnungsreihe des unmarkierten Kompetitors A5C3(QH) gemischt. Die gemittelten Aktivitätswerte wurden als Funktion der Konzentrationen des unmarkierten Anticalins aufgetragen. Durch nicht-lineare Regressionsanalyse ergab sich für das unmarkierte A5C3(QH) ein  $IC_{50}$ -Wert von 4,0 nM (Abbildung 35). Ergänzend zu den vorhergehenden Ergebnissen in der Immunfluoreszenz konnte somit eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung des Anticalins auch auf lebenden Zellen nachgewiesen werden.

### 3.8 Untersuchung der thermischen Stabilität von VEGFR-3 bindenden Anticalinen

Für die Generierung eines Anticalin-basierten Radiotracers, wie oben erwähnt, ist der Prozess der Markierung mit dem Radiometall/-isotop von entscheidender Bedeutung. Die für das Anticalin A5C3 bereits durchgeführte Iodierung ist eine vergleichsweise schonende Methode zur Radiomarkierung eines Proteins, da diese Prozedur bei physiologischen Pufferbedingungen und Raumtemperatur ablaufen kann. Im Gegensatz dazu erfolgen Markierungen mit einem Radiometall (z. B.  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{67/68}\text{Ga}$ ,  $^{64/67}\text{Cu}$ ) vermittelt durch einen Chelator in der Regel unter für Proteine verhältnismäßig harschen Bedingungen, dass heißt bei hohen Temperaturen und/oder saurem pH (Fani & Maecke, 2012). Eine Voraussetzung für die Anwendung verschiedener Markierungsverfahren ist demnach eine hohe Stabilität der Anticaline. Anticaline mit Spezifitäten für diverse Targets wurden bereits in früheren Studien im Hinblick auf ihre thermische Stabilität untersucht, wobei die Robustheit des Lipocalingerüsts an sich demonstriert wurde (Eggenstein *et al.*, 2014). Die hier gewonnenen VEGFR-3 bindenden Anticaline sollten daher ebenso auf ihre Faltungstabilität anhand der thermisch induzierten Denaturierung mittels Circular dichroismus (CD)-Spektrometrie untersucht werden. Basierend auf den Unterschieden der hierbei gemessenen Elliptizitätswerte eines Proteins im nativen bzw. entfalteten Zustand können durch diese Methode konformationelle Veränderungen der Proteinarchitektur – speziell die Änderungen des Sekundärstrukturgehaltes – in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt werden (Schlehuber & Skerra, 2002).

Zu diesem Zweck wurden das rekombinante wtLcn2 und die Anticaline zunächst durch Aufnahme eines CD-Spektrums im Fern-UV-Bereich von 190 bis 250 nm hinsichtlich ihres Sekundärstrukturgehalts untersucht. Das CD-Spektrum der aus acht  $\beta$ -Faltblattsträngen bestehenden fassartigen Struktur des wtLcn2 wies im Einklang mit den publizierten Daten (Breustedt *et al.*, 2006) ein Minimum zwischen 202 und 212 nm auf (nicht gezeigt). Die Spektren der für VEGFR-3 spezifischen Anticaline wiesen allesamt dem Wildtyp-Lcn2 ähnliche Charakteristiken auf.

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität wurden die Proteine durch schrittweise Erhöhung der Temperatur bei gleichzeitiger Aufnahme des CD-Signals bei 209 nm entfaltet. Die Rohdaten zweier typischer Entfaltungskurven sind in Abbildung 36A für die Anticalin-Varianten A5C3 und A5C3(QH) dargestellt. Für A5C3 ergab sich hieraus eine Schmelztemperatur  $T_m = 70\text{ °C}$  mit einer extrapolierten freien Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_{\text{U}}^{25^\circ\text{C}} = 109,1\text{ kJ/mol}$ . Demgegenüber zeigt die hinsichtlich der Produktions-Ausbeute optimierte Variante A5C3(QH) mit  $T_m = 60,8\text{ °C}$  eine um  $9,2\text{ °C}$  niedrigere Schmelztemperatur. Ebenso deutete der Anstieg des Entfaltungsübergangs dieser Doppelmutante auf verminderte Kooperativität, was letztlich zu einer geringeren freien Denaturierungsenthalpie von  $67,7\text{ kJ/mol}$  führte.



**Abbildung 36 | Thermische Denaturierungsstudien mit den VEGFR-3 bindenden Anticalinen.** Die gereinigten Anticaline wurden bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M in CD-Puffer in einem Jasco J-810 Spektropolarimeter kontrolliert kontinuierlich auf 95 °C erhitzt und währenddessen die Elliptizität gemessen. (A) Typische Denaturierungskurven beispielhaft für A5C3 und A5C3(QH) aufgenommen bei 209 nm. Die Anpassung der Denaturierungskurven erfolgte nach Auftragung der gemessenen Elliptizitätswerte gegen die Temperatur gemäß dem Zwei-Zustand-Modell. (B) Normierte Entfaltungskurven von A5C3 und A5C3(QH). Mit Hilfe der in A ermittelten Parameter wurden die gemessenen Datenpunkte normiert und der Anteil des ungefalteten Proteins  $f(u)$  bestimmt. (C) Überlagerung der normierten Entfaltungskurven für Lcn2, S3A9 und U3D7 sowie dessen affinitätsoptimierte Varianten A4N10 und A4N10(KK). (D) Zusammenfassung der aus den thermischen Denaturierungskurven ermittelten Werte für die Schmelztemperatur  $T_m$ , die Enthalpie des Entfaltungsübergangs,  $\Delta H_m$ , und die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen  $\Delta G_U^{25^\circ C}$  für verschiedene VEGFR-3 bindende Anticaline. A5C3(QH) entspricht der Doppelmutante A5C3(F71Q/Y77H), A4N10(E44K/E100K) ist als A4N10(KK) abgekürzt.

Eine ähnliche Tendenz zu erniedrigter Faltungstabilität ergaben auch die Messdaten der affinitäts-maturierten Lcn2-Varianten A4N10 und A4N10(KK) im Vergleich zu dem ursprünglich selektierten Anticalin U3D7, wobei sich die  $\Delta G_{U}^{25^{\circ}\text{C}}$ -Werte für A4N10 und A4N10(KK) nur geringfügig unterschieden (Abbildung 36). Gegenüber dem wtLcn2 zeigten alle hier untersuchten Anticaline eine leichte konformationelle Destabilisierung der Lipocalin-Faltung. Die ermittelten Schmelztemperaturen aller VEGFR-3 bindenden Anticaline belaufen sich dennoch auf  $< 58^{\circ}\text{C}$ . Der Erhalt einer hohen konformationellen Stabilität bezogen auf die Markierung mit bspw. einem Radiometall und den Einsatz bei Körpertemperatur ( $37^{\circ}\text{C}$ ) konnte somit festgestellt werden, was die Grundlage für den Einsatz der Anticaline in der Radiochemie bietet.

### 3.9 Bifunktionelle Anticaline

#### 3.9.1 Fusion von Anticalinen mit einem fluoreszierenden Reporterprotein

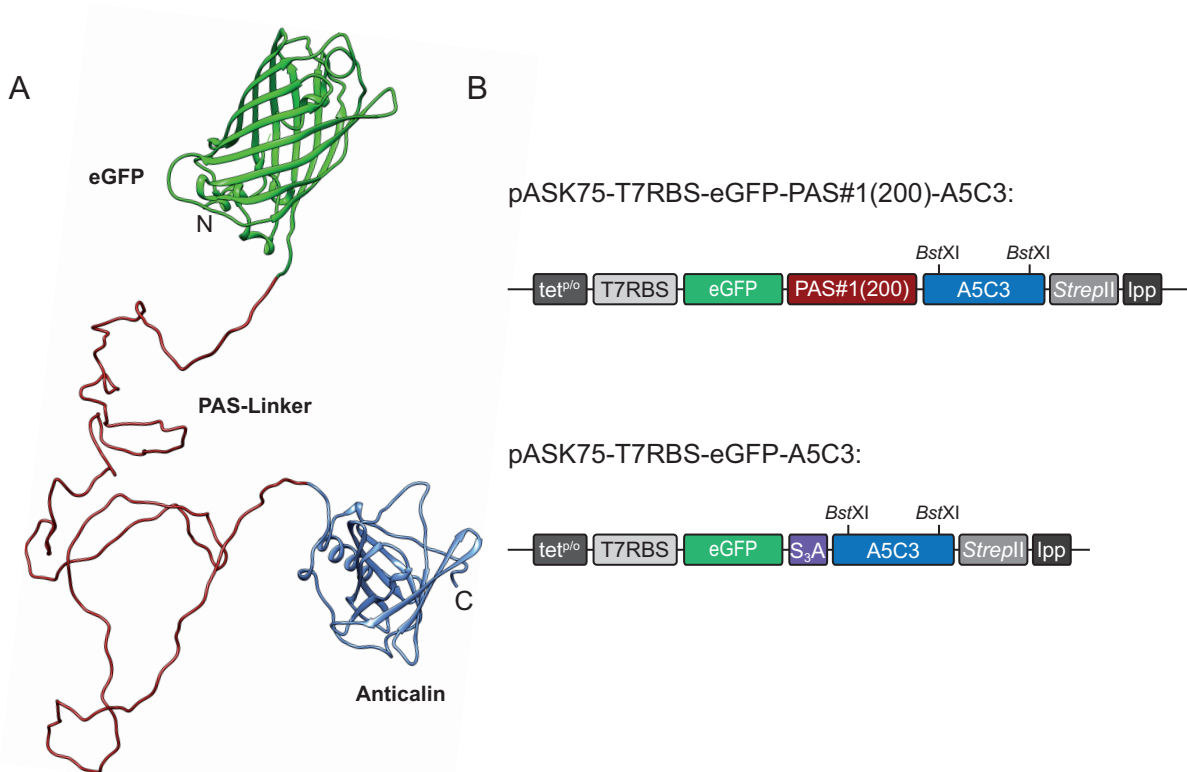
Fluoreszierende Reagenzien stellen aufgrund ihrer hohen Sensitivität und dem niedrigen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis nützliche Werkzeuge in der biomedizinischen Forschung und Diagnostik dar (Drummen, 2012). Für den fluoreszenzbasierten Nachweis des VEGFR-3 *in vitro* wurde ein bifunktionelles, für VEGFR-3 spezifisches Anticalin, ein sogenanntes „*ChromoCalin*“, generiert.

Die Markierung eines Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann grundsätzlich durch chemische Konjugation erfolgen, oder auch durch die genetische Fusion mit einem fluoreszierenden Protein (Haugland, 1995). Die letztere Methode bietet die Vorteile einer kontrollierten Stöchiometrie und einer definierten Konfiguration der beiden funktionellen Komponenten. Einen idealen Fusionspartner hierfür stellt das ursprünglich aus der pazifischen Quallenart *Aequorea victoria* isolierte und weitreichend charakterisierte grün fluoreszierende Protein (*Green Fluorescent Protein*, GFP; Tsien, 1998) bzw. dessen engineerete Mutante „*enhanced*“ GFP (eGFP; Cormack *et al.*, 1996) dar. GFP emittiert eine sehr helle Fluoreszenz bei 508 nm mit zwei Anregungsmaxima bei  $\sim 395$  nm und  $\sim 490$  nm, wobei der Beitrag zur Fluoreszenz bei Anregung bei der für zellbiologische Anwendungen bevorzugten Wellenlänge von 490 nm im Vergleich zu 395 nm lediglich  $\sim 15\%$  beträgt (Heim *et al.*, 1994). Der Fluorophor des GFP wird autokatalytisch in Anwesenheit von  $\text{O}_2$  nach Faltung der fassartig geschlossenen  $\beta$ -Faltblattstruktur durch Zyklisierung der drei Hauptkettenatome Ser65, Tyr66 und Gly67 gebildet, wobei ein hochkonjugiertes planares *p*-Hydroxybenzyliden-imidazolinon entsteht (Zhang *et al.*, 2006). Ausgehend von GFP wurde durch Substitution der für die Fluoreszenz substantziellen Aminosäuren Phe64Leu und Ser65Thr das sogenannte „*enhanced*“ GFP (eGFP) generiert, welches neben einer höheren Faltungseffizienz eine 35-fach erhöhte Emission und ein einziges zu 488 nm verschobenes Absorptionsmaximum aufweist (Cormack *et al.*, 1996; Arpino *et al.*, 2012), und deshalb besonders für zellbiologische Anwendungen geeignet ist.

Für die Konstruktion eines für VEGFR-3 spezifischen ChromoCalins wurde auf genetischer Ebene das photostabile eGFP an den N-Terminus des Anticalins A5C3 gekoppelt. Zwei Linker mit unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung wurden hierfür ausgewählt: ein konformationell ungeordnetes Polypeptid bestehend aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser („*PASylierung*“) und einer Länge von 200 Aminosäuren wurde alternativ zu einem kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linker zwischen die Gensequenzen für eGFP und A5C3 eingefügt. Die Methode der *PASylierung* wurde bisher zur Verlängerung der *in vivo* Plasmahalbwertszeit kleiner therapeutischer Protein eingesetzt, wobei

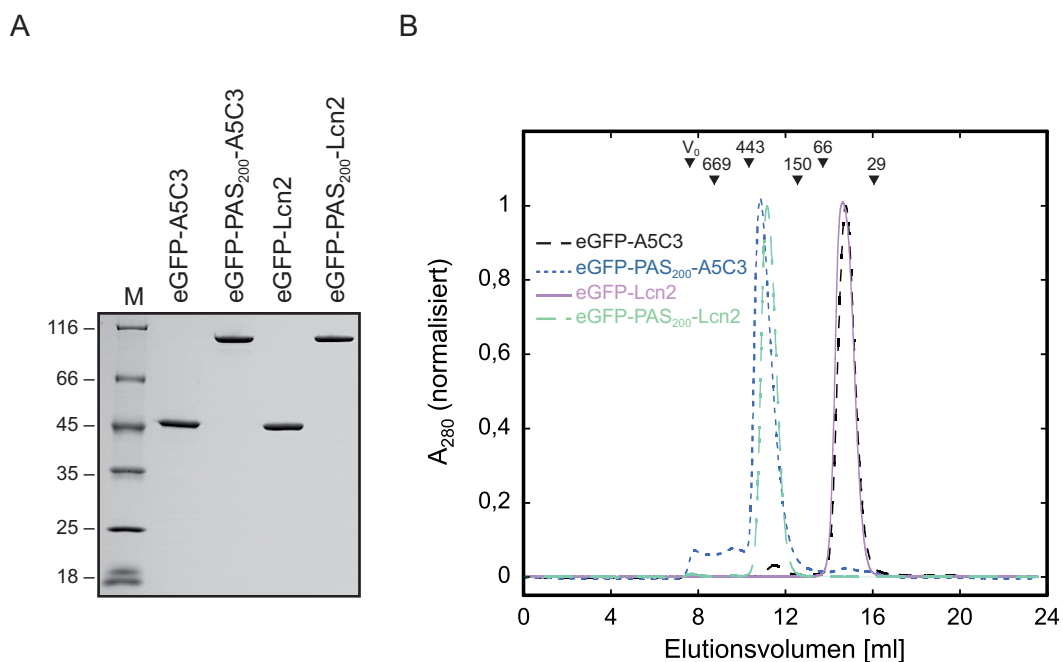
durch Fusion eines konformationell ungeordneten PAS-Polypeptid-Anhängsels mit dem C- oder N-Terminus das hydrodynamische Volumen eines Proteins drastisch vergrößert werden kann (Schlupschy *et al.*, 2013).

Ausgangspunkt für die Produktion der für VEGFR-3 spezifischen ChromoCaline bildeten die zuvor von E. Eggenstein am Lehrstuhl für Biologische Chemie konstruierten Expressionsvektoren pASK75-T7RBS-eGFP-Lcn2 und pASK75-T7RBS-eGFP-PAS#1(200)-Lcn2, welche die cytoplasmatische Expression der Fusionsproteine mit dem kurzen Ser<sub>3</sub>Ala bzw. dem aus 200 Aminosäuren bestehenden PAS#1(200)-Linker in *E. coli* Origami B ermöglichen. Mit Hilfe der im Lcn2-Gen vorhandenen *Bst*XI-Schnittstellen wurde hier die zentrale Ligandenbindestelle des Anticalins A5C3 in beiden Expressionsvektoren ausgetauscht und so die zwei Plasmide pASK75-T7RBS-eGFP-A5C3 und pASK75-T7RBS-eGFP-PAS#1(200)-A5C3 erhalten (Abbildung 37).



**Abbildung 37| Konstruktion von fluoreszierenden ChromoCalinen.** (A) Dreidimensionales Strukturmodell eines Fusionsproteins bestehend aus eGFP (grün, PDB-ID 2Y0G) und dem Anticalin A5C3 (blau, PDB-ID 1L6M und modelliert), die durch einen aus 200 Aminosäuren bestehenden konformationell ungeordneten „PAS“-Polypeptid-Linker (rot, modelliert) miteinander verknüpft sind. (B) Schematische Darstellung der Expressionskassetten für die Produktion von eGFP-Fusionsprotein im bakteriellen Cytoplasma. Die Genexpression steht unter der transkriptionellen Kontrolle des durch Anhydrotetracyclin induzierbaren tet-Promotor/Operator-Systems (tet<sup>P/O</sup>) und wird durch den Lipoprotein-Terminator (t<sub>lpp</sub>) terminiert. Für die spätere Reinigung ist das *Strep*-tag II an den C-Terminus des Proteins angehängt. T7RBS kennzeichnet die Ribosomenbindestelle des Bakteriophagen T7.

Die Biosynthese der Fusionsproteine erfolgte in dem *E. coli* Stamm Origami B, einem Abkömmling des BL21-Stamms, der aufgrund von Mutationen in den Genen für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und die Glutathion-Reduktase (*gor*) ein nur schwach oxidierendes Cytoplasma ausbildet (Prinz *et al.*, 1997), was die Ausbildung der strukturellen Disulfidbrücke in dem Anticalin ermöglicht. Gleichzeitig gestattet diese Strategie die autokatalytische Bildung des GFP-Fluorophors. Die cytoplasmatisch exprimierten Proteine wurden nach der Reinigung im Hinblick auf Homogenität und Oligomerisierungsverhalten durch SDS-PAGE und SEC untersucht (Abbildung 38). Im reduzierenden SDS-Gel migrierten die Proteine als diskrete Banden, wobei die Fusionsproteine eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 und eGFP-PAS<sub>200</sub>-Lcn2 eine im Vergleich zu ihrem berechneten Molekulargewicht (65 kDa) verlangsamte elektrophoretische Mobilität aufwiesen. Eine Besonderheit des PAS-Polypeptids ist dessen hydrophiler Charakter, was zu einer schlechteren Anlagerung des anionischen Detergenz während der Elektrophorese führt (Schlapschy *et al.*, 2013). Die PASylierten ChromoCaline zeigten deshalb ein sichtbar verändertes Migrationsverhalten und wanderten im Gel entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 100 anstelle der berechneten 65 kDa.



**Abbildung 38 | SDS-PAGE und SEC-Analyse der cytoplasmatisch in *E. coli* produzierten ChromoCaline.** (A) 12 %iges Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigten monomeren ChromoCalin-Fractionen. M entspricht dem Größenmarker in kDa. (B) Analytische SEC. Je 250  $\mu$ l Proteinlösung wurden auf eine mit PBS äquilibrierte Superdex S200 Tricorn-Säule mit 24 ml Bettvolumen aufgetragen und die Proteinabsorption bei 280 nm detektiert. Gezeigt sind die Elutionsprofile der VEGFR-3 bindenden A5C3-Fusionsproteine sowie der wtLcn2-Fusionsproteine als Referenz.

Die SEC ergab für die VEGFR-3 bindenden ChromoCaline im Vergleich zu den wtLcn2-Fusionproteinen äquivalente Elutionsprofile, die auf ein jeweils monomeres und monodisperses Verhalten hindeuten. Lediglich für eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 zeigte sich ein nennenswerter Aggregat-Anteil, im Einklang mit der bereits vorher beobachteten schlechteren Löslichkeit des Anticalins A5C3. Die ChromoCaline mit

## Ergebnisse

PAS<sub>200</sub>-Linker wiesen im Vergleich zur nicht-PASylierten Variante ein um den Faktor 5 vergrößertes apparentes Molekulargewicht von 250 kDa auf (berechnetes MW = 65 kDa), was auf die ungeordnete Struktur des PAS-Linkers zurückzuführen ist. Die molare Proteinausbeute war im Fall des PASylierten ChromoCalins interessanterweise doppelt so hoch wie bei dem über den kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linker verknüpften eGFP-A5C3 (Tabelle 9).

Die korrekte Abspaltung des N-terminalen Start-Methionins durch die bakterielle Methionin-Aminopeptidase wie auch die Ausbildung des eGFP-Chromophors wurde im ESI-MS überprüft. Im Fall des exemplarisch in Abbildung 39A gezeigten Massenspektrums von eGFP-A5C3 ergab sich die erwartete mittlere Proteinmasse nach Ausbildung des Chromophors durch intramolekulare Zyklisierung und Oxidation des eGFP-Tripeptidsegments Thr65-Tyr66-Gly67 ( $\Delta = -20$  Da) einschließlich der proteolytischen Spaltung des Start-Methionins ( $\Delta = -131$  Da) und Ausbildung der strukturellen Disulfidbrücke in dem Anticalin ( $\Delta = -2$  Da), berechnet zu 48758,5 Da, mit einem beobachteten Proteinpeak bei 48757,99 Da innerhalb der Messgenauigkeit. Ebenfalls wurde die korrekte Prozessierung des größeren eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 während der bakteriellen Produktion festgestellt.

**Tabelle 9 | Affinitäten zu D1-7 und Gesamte Proteinausbeute der bakteriell produzierten ChromoCaline.**

Variante	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}^a$ [ $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D^b$ [nM]	Ausbeute <sup>c</sup> [nmol]	Ausbeute <sup>c</sup> [mg]
eGFP-A5C3	0,127 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,11 ± 0,01	8,8	0,43
eGFP-PAS <sub>200</sub> -A5C3	0,217 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,06 ± 0,01	16,6	1,08

<sup>a</sup> Dissoziationsrate gemessen über 45 min

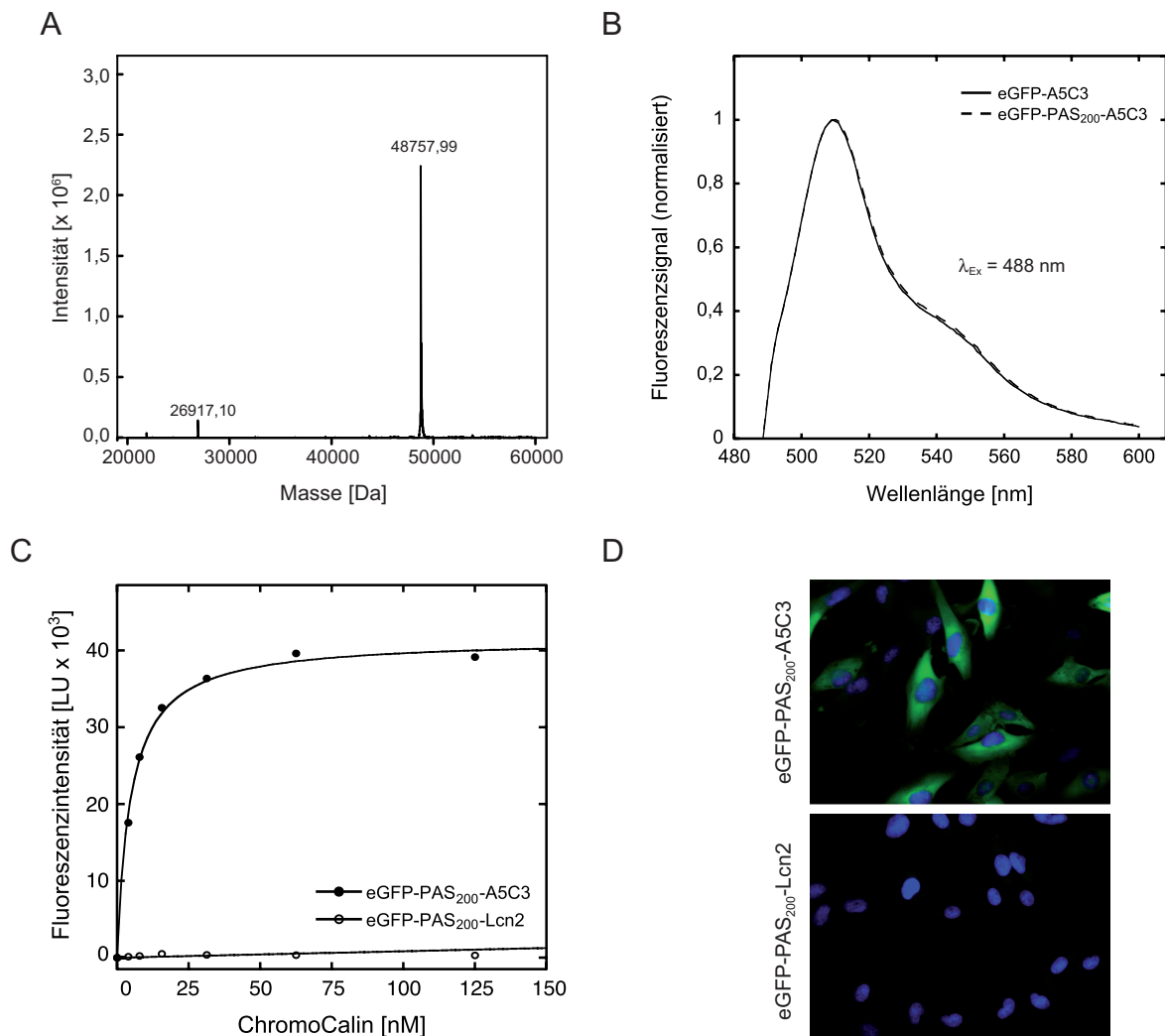
<sup>b</sup> Gleichgewichtskonstante  $K_D$  berechnet aus  $k_{off}/k_{on}$

<sup>c</sup> Monomere Proteinfraction aus 2 L Kultur gemessen nach der SEC anhand der charakteristischen Absorption bei 488 nm

Für einen Vergleich der Bindungsaktivitäten wurde die Liganden-Affinität von eGFP-A5C3 und eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 gegenüber D1-7 im BIAcore-Instrument analog zu den früheren Messungen (siehe Abschnitt 3.3.1) ermittelt. Beide ChromoCaline wiesen im Vergleich zum unfusionierten A5C3 ( $K_D = 8,3$  pM) eine leicht reduzierte Liganden-Affinität auf, wobei für eGFP-A5C3 ein  $K_D$ -Wert von 114 pM und 61,9 pM für das PASylierte Fusionsprotein bestimmt wurde (Tabelle 9). Die Länge und Flexibilität des eingebauten PAS-Linkers hat demnach einen positiven Effekt auf die Affinität, was im Einklang mit den hohen Freiheitsgraden des ungefalteten Polypeptidrückgrats und sterisch ungehinderter Interaktion des Anticalin-Moleküls mit dem Target-Protein steht.

Zur weiteren Charakterisierung der beiden ChromoCalin-Konstrukte wurden deren intrinsische Fluoreszenzeigenschaften durch Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsspektren nach Anregung bei 488 nm untersucht (Abbildung 39B). Für beide Spacer zeigten die Spektren einen nahezu identischen Kurvenverlauf mit einem Emissionsmaximum bei 509 nm, was den Fluoreszenzeigenschaften des isolierten eGFP entspricht (Kremers *et al.*, 2011).





**Abbildung 39| Biophysikalische und funktionelle Untersuchung von anti-VEGFR-3 ChromoCalinen.** (A) Massenspektrometrische Analyse nach Elektrospray-Ionisation. Gezeigt ist das Massenspektrum von eGFP-A5C3, bei welchem nach der vollständigen Prozessierung und der Ausbildung des Chromophors eine mittlere Masse von 48758,5 Da erwartet wurde. (B) Fluoreszenz-Emissionsspektrum von eGFP-Fusionsproteinen mit verschiedenen Linkern. Je 10 nM eGFP-A5C3 und eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und die Emissionsspektren zwischen 490 und 600 nm aufgezeichnet. Die normalisierten Kurven zeigen für beide Proteine ein Fluoreszenz-Maximum bei 509 nm. (C) Verwendung der ChromoCaline zum direkten Nachweis von D1-7 im ELISA. Eine eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 Verdünnungsreihe wurde im Vergleich zum wtLcn2-Fusionsprotein auf eine mit D1-7 beschichtete und mit BSA abgesättigte Mikrotiterplatte gegeben und der Anteil an gebundenem ChromoCalin nach waschen anhand der eGFP-Fluoreszenz detektiert. (D) Verwendung der ChromoCaline zum Nachweis von VEGFR-3 auf U-251 MG Gliomzellen. Eine 1  $\mu\text{M}$  ChromoCalin-Lösung, bzw. dem wtLcn2-Fusionsprotein als Negativkontrolle, wurde für 1 h mit den Paraformaldehyd-fixierten U-251 MG Zellen inkubiert. An der Zelloberfläche gebundenes ChromoCalin wurde nach DAPI-Färbung der Zellkerne mit 20-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Gezeigt sind die übereinandergelagerten Aufnahmen für eGFP (grün) und DAPI (blau).

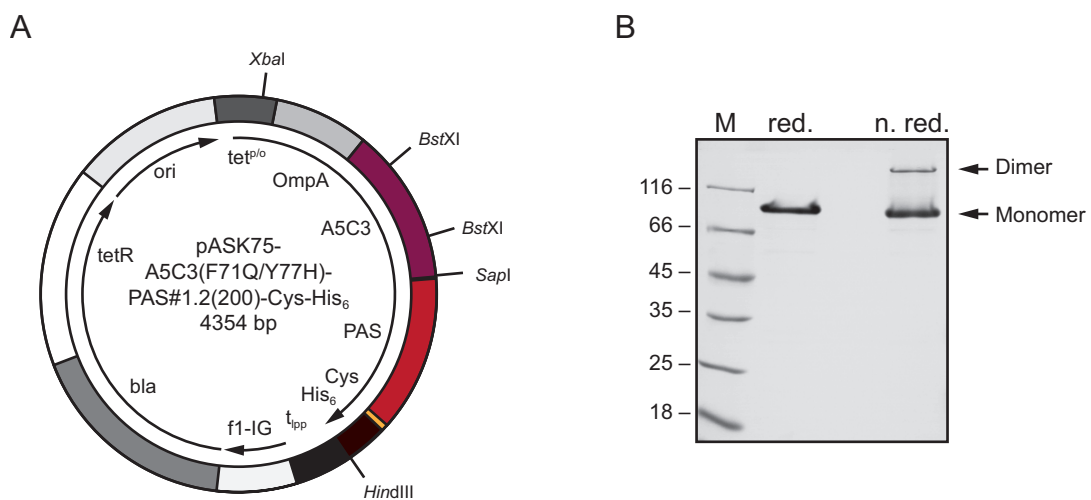
Die Funktionalität des für VEGFR-3 spezifischen ChromoCalins eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 und dessen Anwendbarkeit als Nachweisreagenz wurde im ELISA und durch *in vitro* Immunfluoreszenzfärbung demonstriert. Aufgrund der vergleichsweise niedrigeren Affinität und Produktionsausbeuten wurde das über den kürzeren Ser<sub>3</sub>Ala-Linker fusionierte eGFP-A5C3 hierbei nicht untersucht. In einem direkten ELISA wurde für eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 konzentrationsabhängige Bindung an das immobilisierte D1-7 direkt anhand der gemessenen Fluoreszenz festgestellt (Abbildung 39C). Ebenso zeigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung ein spezifisches Signal für VEGFR-3 auf der Oberfläche von adhärent wachsenden U-251 MG Gliomzellen (Abbildung 39D). Im Vergleich zu den früher mit Hilfe eines Primär-/Sekundär-Antikörperpaares erhaltenen Fluoreszenzfärbungen in Abbildung 33 konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die Verwendung des ChromoCalins zeichnete sich dagegen durch deutlich vereinfachte Handhabung und hohes Signal-/Hintergrund-Verhältnis aus, wobei in keinem der Assays Bindung des wtLcn2-Fusionsproteins festgestellt wurde.

### 3.9.2 Konstruktion eines PASylierten anti-VEGFR-3 Anticalins mit freiem Cystein-Rest zur Kopplung mit einem radioaktiven Metallchelate für das *in vivo* Imaging

Zur Anwendung der Anticaline *in vivo*, z.B. als Protein-Tracer zur diagnostischen Bildgebung von VEGFR-3 exprimierenden soliden Tumoren, wurde ein bifunktionelles Anticalin konstruiert, welches neben hoher Antigen-Affinität und -Spezifität die Möglichkeit zur gerichteten Markierung mit einem Radiometallchelate wie auch verlängerte Zirkulation im Blut bietet. Hauptverantwortlich für die schnelle Ausscheidung von Proteinen aus dem Blutkreislauf ist die Filtration über die Niere, deren Ausschlussgröße von etwa 70 kDa die schnelle Ausscheidung von kleineren Proteinen bewirkt. Zur modulierbaren Verlängerung der intrinsisch kurzen Plasmahalbwertszeit der Anticaline wurde die PASylation-Technologie (Schlupschy *et al.*, 2013) angewandt. Konkret wurde durch Fusion einer 200 Aminosäuren umfassenden ungeordneten PAS-Sequenz mit dem C-Terminus das apparente hydrodynamische Volumen des Proteins vergrößert. Für die gerichtete Kopplung mit einem Radiometallchelate wurde ein freier Cystein-Rest an den C-Terminus des PAS-Polypeptids gehängt, wobei die Möglichkeit einer Isomerisierung der strukturellen Disulfidbrücke durch die räumliche Distanz vermindert wurde. Der C-Terminus des Proteins trug zudem ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel, welches in diesem Fall anstelle des *Strep*-tags II aus Gründen der bei letzterem möglichen Immunogenität ausgewählt wurde.

Für die Expression dieses Proteins in *E. coli* stand das zuvor von L. Friedrich am Lehrstuhl für Biologische Chemie konstruierte Plasmid pASK75-Lcn2-PAS#1.2(200)-Cys-His zur Verfügung, welches neben dem Gen für das wtLcn2-Fusionsprotein die N-terminal vorgelagerte Sequenz des OmpA-Signalpeptids zur Translokation des Proteins in das oxidierende Periplasma trägt. Das Anticalin A5C3(QH) wurde aufgrund seiner bereits im radioaktiven Zellassay nachgewiesenen ausgezeichneten Ligandenbindungseigenschaften für die Konstruktion eines bifunktionellen Imaging-Reagenz ausgewählt; dessen die zentrale Ligandenbindestelle kodierende *Bst*XI-Kassette wurde in das Plasmid inseriert. Der so erhaltene Expressionsvektor pASK75-A5C3(F71Q/Y77H)-PAS#1.2(200)-Cys-His (Abbildung 40A) wurde zur Produktion des Proteins in *E. coli* verwendet. Das aus dem bakteriellen Periplasma extrahierte Protein wurde durch IMAC an einer mit Zn<sup>2+</sup>-beladenen IDA-Sepharose gereinigt und wies bereits nach dem ersten Reinigungsschritt eine hohe Reinheit von > 90 % auf. Niedermolekulare Verunreinigungen und durch Oxidation des freien Cysteins gebildete Dimere wurden in einer präparativen Gelfiltration entfernt. Entsprechend der durch den hydrophilen

Charakter der PAS-Sequenz verringerten elektrophoretischen Mobilität migrierte das rekombinante Protein im SDS-Gel statt der berechneten 38 kDa bei ca. 80 kDa (Abbildung 40B). Ebenso wurde in der analytischen Gelfiltration an einer kalibrierten Säule ein im Bezug auf das berechnete Molekulargewicht um den Faktor 7 vergrößertes apparentes hydrodynamisches Volumen von 260 kDa ermittelt. Pro Liter Expressionskultur wurde 0,7 mg des monomeren A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys erhalten.



**Abbildung 40 | Expression und Reinigung des PASylierten Anticalins A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys.** (A) Schematische Darstellung des für die Produktion in *E. coli* verwendeten Expressionsplasmids. Das Plasmid pASK75-A5C3(F71Q/Y77H)-PAS#1.2(200)-Cys-His<sub>6</sub> trägt die wesentlichen Elemente zur Expression eines bifunktionellen Anticalins mit einer an den flexiblen C-Terminus angehängten PAS<sub>200</sub>-Sequenz gefolgt von einem für die Kopplung zur Verfügung stehenden freien Cysteinrest und dem zur Reinigung dienenden His<sub>6</sub>-Tag unter der Kontrolle des durch Anhydrotetracyclin induzierbaren tet-Promotor/Operatorsystems. (B) SDS-PAGE Analyse des im 2 L Schüttelkolben produzierten rekombinanten Proteins nach zwei Reinigungsschritten. A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys wurde durch IMAC und SEC von Verunreinigungen und dimeren Proteinspezies befreit. Eine Probe der monomeren Proteinfraction wurde unter reduzierenden (red.) und nicht reduzierenden (n. red.) Bedingungen in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel analysiert und die hohe Reinheit bestätigt. Die zusätzliche Proteinbande bei ca. 130 kDa ist auf die Ausbildung von Proteindimeren durch eine Oxidation des freien Cystein-Rests unter Lagerungsbedingungen zurückzuführen. M entspricht dem Größenstandard in kDa.

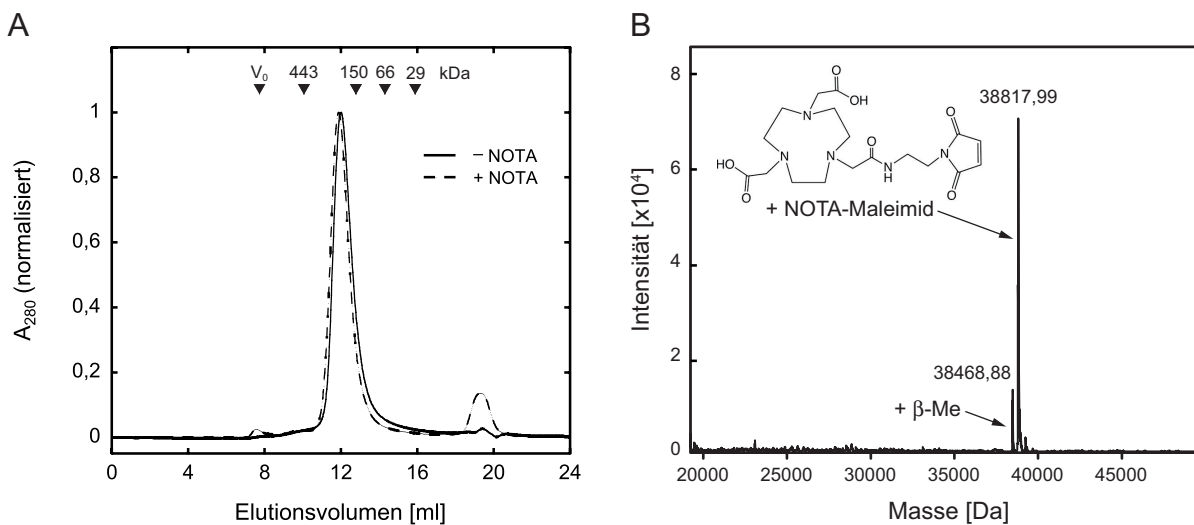
Das gereinigte Protein wurde anschließend einer ESI-MS-Analyse unterzogen. Hierbei wurde eine kovalente Modifizierung des zusätzlichen Cysteins u.a. mit dem Isotripeptid Glutathion nachgewiesen. Die Kopplung des Proteins mit einem Chelatormolekül erforderte demzufolge eine vorherige Reduktion mit einem geeigneten Reagenz.

Für die Funktionalisierung des Proteins mit einer radiometallbindenden Komponente wurde der mit einer N-Ethylmaleimid-Gruppe derivatisierte makrozyklische Chelatbildner 1,4,7-Triazacyclononatriessigsäure (NOTA) ausgewählt. NOTA ist mit seiner neunatomigen Ringstruktur in der Lage, ein breites Spektrum von bi- und trivalenten Metallionen zu komplexieren (Förster *et al.*, 2011). Aufgrund der schnellen und stabilen Komplexbildung in wässrigem Milieu und bei Raumtemperatur hat sich NOTA für radiopharmazeutische Anwendungen als chelatierendes Agens für verschiedene

## Ergebnisse

Radionuklide wie  $^{67/68}\text{Ga}$  und  $^{64/67}\text{Cu}$  bewährt (Fani & Maecke, 2012) und wurde deshalb hier für die Konstruktion eines bifunktionellen Anticalin-Tracers eingesetzt.

Für die Chelator-Kopplung wurde die zusätzliche Thiolgruppe des A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys-Proteins zunächst durch milde Reduktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol von kovalent gebundenem Glutathion befreit. Die Abtrennung des Thiolreagenz erfolgte daraufhin durch Gelfiltration über eine mit einem schwach sauren Phosphatpuffer (pH 5,5) äquilibrierte PD-10 Säule. Dadurch wurde eine vollständige Protonierung der reduzierten Thiolgruppen erreicht und Re-Oxidation unterbunden. Die chemische Umsetzung mit dem Maleimid-NOTA erfolgte im zweifach molaren Überschuss nach gezielter Erhöhung des pH-Werts auf 7,2 – 7,5, wobei durch Michael-Addition eine stabile Thioether-Bindung zwischen der Sulfhydryl-Gruppe des C-terminalen Cysteins und der Maleimid-Gruppe des Chelators gebildet wurde. Nicht umgesetztes Chelator-Reagenz wurde in einer anschließenden Gelfiltration abgetrennt und das bifunktionelle Protein dabei im Hinblick auf sein Elutionsverhalten untersucht. Aggregation oder Oligomerisierung des Proteins während des Kopplungsprozederes konnte somit ausgeschlossen werden (Abbildung 41A). Die Analyse des gekoppelten Proteins durch ESI-MS ergab eine etwa 85 %ige Kopplungs-Effizienz, wobei die detektierte Masse von 38817,99 Da mit einer Abweichung von +0,6 Da dem berechneten Molekulargewicht des bifunktionellen Proteins mit einer ausgebildeten Disulfidbrücke und einem gekoppelten Chelatormolekül entsprach (Abbildung 41B).



**Abbildung 41 | Biophysikalische Charakterisierung des mit NOTA derivatisierten Anticalins A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys.** (A) Analytische SEC an einer Superdex S200 10/300 Säule mit 24 ml Bettvolumen. Je eine Probe des underivatisierten sowie des mittels Maleimid-Kopplungschemie mit dem NOTA-Chelator funktionalisierten Proteins wurde auf eine äquilibrierte Säule aufgetragen und anhand der Absorption bei 280 nm detektiert. (B) ESI-MS nach der chemischen Kopplung mit dem Metallchelator NOTA. Die zweite Proteinspezies von 38468,88 Da kann einer Verunreinigung des ungekoppelten Proteins mit einem an die Thiolgruppe gebundenem  $\beta$ -Mercaptoethanol zugeordnet werden.

Der Vergleich der durch SPR ermittelten Liganden-Affinität gegenüber immobilisiertem D1-7 ergab für die PASylierte Variante im Vergleich zu dem unfusionierten Anticalin A5C3(QH) ( $K_D = 14,2$  pM) eine um den Faktor 4 verminderte Affinität von 53,7 pM sowie einen deutlich erhöhten  $K_D$ -Wert von 221 pM nach Kopplung des Chelators (Tabelle 10). Eine verlangsamte Komplex-Assoziation infolge

sterischer Abschirmungseffekte durch die strukturell ungeordnete PAS-Sequenz ist hierbei ein möglicher Grund für die erniedrigte Affinität. Im Fall des NOTA-derivatisierten Proteins kann die zusätzlich verringerte Affinität auf eine elektrostatische Abstoßung des freien, negativ geladenen Chelators von der carboxylierten Oberfläche des Sensorchips zurückgeführt werden. Die gemessenen Affinitäten liegen dennoch im pikomolaren Bereich, so dass mit dem hier konstruierten bifunktionellen Anticalin A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys-NOTA ein vielversprechendes für die Radio-Immundiagnostik geeignetes Proteinreagenz mit hoher Affinität und Spezifität zur Verfügung steht.

**Tabelle 10| Vergleich der Ligandenbindungsaktivität funktionalisierter Anticaline gegenüber D1-7 gemessen im BIAcore-Instrument.**

Variante	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [ $10^{-12} \text{ M}$ ]
A5C3(QH)	1,30	18,4	14,2
A5C3(QH)-PAS <sub>200</sub> -Cys	0,56	30,1	53,7
A5C3(QH)-PAS <sub>200</sub> -Cys-NOTA	0,29	63,8	221

A5C3(QH) entspricht A5C3(F71Q/Y77H)



## 4 Diskussion

### 4.1 Expression und Charakterisierung von rekombinanten VEGFR-3 Domänen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Fragmente des Zelloberflächenproteins VEGFR-3 in *E. coli* und in Zellkultur produziert, was die Grundlage für die Generierung von VEGFR-3 spezifischen Anticalinen bildete. Besondere Bedeutung kam dabei dem bakteriell produzierten VEGF-C bindenden D1-2 Fragment, sowie dem durch transiente Transfektion in 293T-Zellen synthetisierten D1-7 zu, da diese beiden Proteine als Target-Moleküle für die kombinatorische Selektion, die biochemische Charakterisierung und Optimierung der Anticaline dienen.

#### 4.1.1 Produktion von D1-2 in *E. coli*

Unter der Vielzahl verschiedener verfügbarer Systeme für die heterologe Proteinproduktion ist das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* aufgrund seines schnellen Wachstums zu hohen Zelldichten in kostengünstigen Nährmedien sowie der gut charakterisierten Genetik eines der am häufigsten eingesetzten Wirtsorganismen in der Biotechnologie (Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Besonders attraktiv für die Expression von eukaryotischen Proteinen ist dabei die kotranslationale Translokation in das Periplasma, da aufgrund des dort vorherrschenden oxidierenden Milieus, sowie verschiedener Faltungshelferenzyme, die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken möglich ist (Georgiou & Segatori, 2005). Ein Nachteil bei der Proteinproduktion in *E. coli* ist jedoch das Fehlen posttranslationaler Modifikation, insbesondere Glycosylierung. Die kovalente Verknüpfung von N-Glycanresten an eukaryotische sekretorische wie auch Membranproteine kann direkten Einfluss auf die Faltungstabilität, Oligomerisierung und Proteaseresistenz haben (Helenius & Aebi, 2004; Kayser *et al.*, 2011; Walsh, 2010). Die Produktion natürlicherweise mehrfach glycosylierter Proteine (in unglycosylierter Form) in *E. coli* ist deshalb häufig von Aggregation und dem Auftreten von Disulfidisomeren begleitet.

Bei der Expression des mit drei Disulfidbrücken und drei Glycosylierungsstellen ausgestatteten D1-2 Fragments von VEGFR-3 wies ein großer Anteil der Proteinpräparation Tendenz zur Aggregation und Multimerisierung auf, wobei entstandene Oligomere während des Reinigungsprozesses von der monomeren Proteinfraction abgetrennt wurden. Die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken wurde im Fall von D1-2 durch die Koexpression der auf pTUM4 kodierten Thiol-/Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC sowie den Prolyl-cis/trans-Isomerasen FkpA und SurA (Schlapschy *et al.*, 2006) unterstützt, so dass das Auftreten von Disulfidisomeren nachweislich im SDS-Gel unterbunden und das Protein in funktioneller Form präpariert werden konnte. Gründe für die erhöhte Aggregationsanfälligkeit von D1-2 liegen wahrscheinlich in der Abwesenheit der C-terminalen Domäne und in der fehlenden Glycosylierung, was durch Exposition hydrophober Bereiche an der Oberfläche des Proteins zu einer verminderten Proteinstabilität führen kann (Kayser *et al.*, 2011). Das aus dem 8 L Bioreaktor gewonnene und gereinigte D1-2 zeigte aufgrund dessen nur eine verhältnismäßig geringe Protein-Ausbeute, wobei das gereinigte Protein unter physiologischen Pufferbedingungen als Monomer vorlag.

Eine Besonderheit bei der Produktion der Rezeptorfragmente in *E. coli* war die inkorrekte Prozessierung des Präproteins während der (kotrationalen) Translokation in das bakterielle Periplasma. Sowohl bei D1 als auch bei D1-2 resultierten die initialen Expressionsexperimente in Proteinpräparationen, die teilweise um die zwei aminoterminalen Aminosäuren Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub> verkürzt waren. Um den Transport über die innere Zellmembran zu ermöglichen, wurde der Gensequenz des maturen Rezeptorfragments die Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA-SS) vorgeschaltet. Das bakterielle OmpA-Signalpeptid wird im Cytoplasma zusammen mit seinem Fusionspartner über die Proteine SecA/SecB des Sec-Systems zum membrandurchspannenden SecYEG Translokon in der Zellmembran geleitet, wo das Präprotein durch Hydrolyse von ATP durch den Kanal geschleust wird (Auclair *et al.*, 2012). Nachdem zumindest ein Teil des Präproteins durch die Membran transloziert wurde, erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids durch die membran-gebundene Signalpeptidase I (Auclair *et al.*, 2012).

Prokaryotische Signalpeptide bestehen üblicherweise aus 20 bis 30 Aminosäuren, die in drei Bereiche unterteilt sind (Gierasch, 1989): 1.) einem positiv geladenen aminoterminalen Teil aus 1-3 Resten; 2.) einer hydrophoben Kernsequenz aus 14-20 Resten; 3.) einer an die hydrophobe Region angrenzende Schnittstelle mit polarem Charakter. Die Aminosäurekomposition dieser Schnittstelle folgt der sogenannten „-1, -3 Regel“ (von Heijne, 1984), nach der die Aminosäuren an Position -1 und -3 – ausgehend von der Spaltstelle – kleine, neutrale Reste sind. In Bakterien sind diese zwei Positionen ausschließlich durch Alanin, Serin oder Glycin besetzt. Hingegen wird die -2 Position von großen, sperrigen Aminosäuren dominiert. Bei der N-terminalen Fusion der OmpA-SS mit D1 ergibt sich ein Sequenzmotiv aus Ala<sub>-3</sub>-Gln<sub>-2</sub>-Ala<sub>-1</sub>-Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub>, so dass gemäß der o.g. Regel eine alternative zweite Schnittstelle aus Ala<sub>-1</sub>-Tyr<sub>1</sub>-Ser<sub>2</sub> entsteht. Obwohl das von der Signalpeptidase I bevorzugte Sequenzmotiv das Ala-X-Ala Motiv ist, wurde der Großteil des exprimierten D1 und D1-2 Proteins während der Translokation an der alternativen Schnittstelle gespalten, was in einem heterogenen Proteingemisch aus maturem (Spaltung nach Ala-Gln-Ala) und um zwei Aminosäuren verkürztem Protein resultierte.

Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einer durch den Fusionspartner veränderten Sekundärstruktur des Signalpeptids. Für die Prozessierung durch die Signalpeptidase I liegt das Präprotein in Form einer membrandurchspannenden Schleifenstruktur vor, wobei der von der Signalpeptidase erkannte Bereich einen zum Periplasma gewandten  $\beta$ -Turn ausbildet (Duffaud & Inouye, 1988). Die Konformation dieser Sekundärstruktur spielt eine essentielle Rolle bei der Vorgabe der exakten Schnittstelle und ist ausschlaggebend für die Effizienz der Prozessierung. Im Fall von zwei oder mehr benachbarten Schnittstellen kann die Interaktion des aktiven Zentrums der Signalpeptidase mit der Erkennungssequenz des Signalpeptids jedoch gewisse Flexibilität zeigen (Pratap & Dikshit, 1998). Die Präferenz für ein bestimmtes Sequenzmotiv unterliegt dann der Sekundärstruktur im Bereich der Präprotein-Schnittstelle. Im Fall von OmpA-SS-D1 kann also die alternative Schnittstelle aufgrund einer konformationellen Änderung begünstigt für die enzymatische Spaltung vorliegen. Zur Expression von D1-2 in homogener Form in *E. coli* wurden deshalb die N-terminalen Aminosäuren Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub> deletiert und letztlich eine monodisperse Proteinpräparation für die nachfolgenden Selektionsexperimente erhalten.

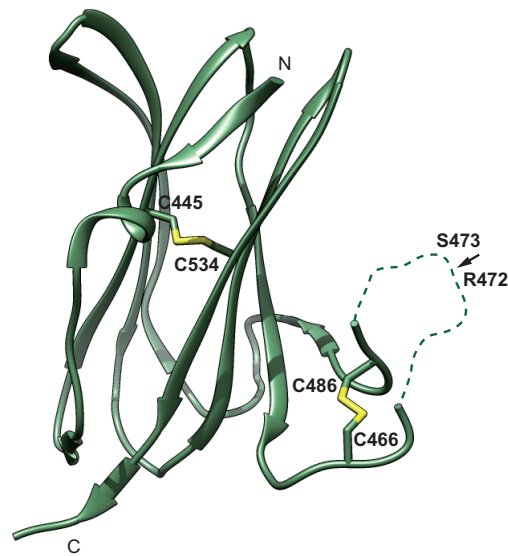


#### 4.1.2 Produktion von D1-7 in Zellkultur

Obwohl die Produktion in Prokaryoten oder mikrobiellen eukaryotischen Systemen schneller und ökonomischer ist, ist zur Sicherstellung der Funktionalität eines sekretorischen Proteins häufig die Verwendung von Säugerzellkultur-Systemen erforderlich, um korrekte Faltung, Prozessierung und ko-/posttranslationale Modifizierungen zu gewährleisten (Almo & Love, 2014). Unter den mammalen Zellkultur-Systemen stellen die *Chinese Hamster Ovary* (CHO), 293 und die NS0 (*Mouse Myeloma*) Zellen die am häufigsten in der biopharmazeutischen Industrie verwendeten Expressions-Plattformen dar, wobei vor allem CHO-Zellen das „Arbeitspferd“ für die rekombinante Proteinproduktion darstellen (Bandaranayake & Almo, 2014). Das im Vergleich zu D1-2 deutlich größere D1-7 Fragment wurde aufgrund seiner komplexeren Architektur und Glycosylierung in einem Derivat der 293 Zellen exprimiert. Ein Vorteil der 293-Zellen ist ihr humaner Ursprung und folglich deren Fähigkeit, eine natürliche posttranslationale Modifikation des Proteins zu gewährleisten (Walsh, 2010). Die hier eingesetzte 293T-Zelllinie, die das SV40 *Large T-Antigen* trägt (DuBridge *et al.*, 1987), unterstützt zudem die episomale Replikation des passend gewählten Plasmids pM61-Flt4-(D1-7)-His, was eine verlängerte Expressionsphase des Ziel-Gens nach der transienten Transfektion bewirkt.

Das so gewonnene und zur Homogenität gereinigte D1-7 wies im Gegensatz zu D1-2 in der Gelfiltration ein strikt dimeres Elutionsverhalten mit einem apparenten hydrodynamischen Volumen von 200 kDa auf. Auch das ebenfalls aus einer humanen Zelllinie gewonnene und als Referenzprotein verwendete kommerziell verfügbare D1-7 (SinoBiological) eluierte unter physiologischen Pufferbedingungen als dimeres Protein. Aus der Literatur war bekannt, dass sowohl D1-2 als auch D1-7 in Abwesenheit des Liganden als Monomer in Lösung vorliegen (Leppänen *et al.*, 2013). Eine Dimerisierung des extrazellulären Teils des VEGFR-3 erfolgt demnach erst nach der Bindung des homodimeren Liganden (z.B. VEGF-C). Homotypische Interaktionen innerhalb des in den Domänen 5 und 7 gelegenen Dimerisierungs-Interface bewirken dabei durch elektrostatische Anziehung eine Assoziation beider Rezeptoreinheiten (Leppänen *et al.*, 2013). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte das in dieser Arbeit produzierte D1-2 Fragment in Abwesenheit des Liganden einen monomeren Status.

Auffällig bei der Expression von D1-7 in 293T-Zellen war die im reduzierenden SDS-Gel sichtbare partielle Proteolyse des Proteins. Unter den Rezeptoren der VEGF-Familie unterliegt lediglich der VEGFR-3 der selektiven proteolytischen Spaltung innerhalb von Domäne 5 (Pajusola *et al.*, 1994). Eine strukturelle Besonderheit der Typ-I Immunglobulin-ähnlichen Domäne 5 ist die zwischen den  $\beta$ -Strängen C und D gelegene und ungefähr 35 Reste umfassende verlängerte Schleifenregion, die aus dem  $\beta$ -Sandwich hervorsticht (Abbildung 42). Neben einer im  $\beta$ -Sandwich zentral verborgenen Disulfidbrücke zwischen zwei  $\beta$ -Stängen trägt D5 eine zweite, in der C–D-Schleife liegende und damit exponierte Disulfidbrücke zwischen Cys466 und Cys486. Die proteolytische Spaltung des extrazellulären Rezeptor-Teils erfolgt innerhalb der verlängerten C–D-Schleife zwischen Arg472 und Ser473, wobei zwei doppelt disulfidverbrückte Polypeptidketten entstehen.



**Abbildung 42| Die VEGFR-3 Domäne 5.** Gezeigt ist die dreidimensionale Kristallstruktur der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 5 mit dem charakteristischen Sandwich aus sieben antiparallel angeordneten  $\beta$ -Strängen mit zwei intramolekularen Disulfidbrücken (gelb). Der Pfeil kennzeichnet die Protease-Schnittstelle in der flexiblen C–D-Schleifenregion. Die Reste 469-484 sind in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und als gestrichelte Linie angedeutet (PDB-ID 4BSJ).

Die biologische Rolle dieser Prozessierung ist bisher ungeklärt. Bekannt ist, dass die proteolytische Spaltung erst nach der Glycosylierung und Translokation des Proteins an die Zelloberfläche erfolgt (Pajusola *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Deletions- und Substitutions-Analysen konnte der verlängerten Schleifenregion zusammen mit den internen Disulfidbrücken eine konformationelle Rolle für die Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Tvorogov *et al.*, 2010); die proteolytische Spaltung hat hierfür jedoch nur untergeordnete Bedeutung. Auch die Analyse der VEGFR-3(D4-5) Kristallstruktur lässt darauf schließen, dass durch die proteolytische Spaltung keine signifikanten Änderungen in der Konformation von D5 ausgelöst werden (Leppänen *et al.*, 2013). Eine Involvierung in die Dimerisierung des Rezeptors konnte dabei ebenfalls ausgeschlossen werden, so dass die Funktion dieses Prozessierungsschrittes unklar bleibt.

Die Funktionalität des bakteriell produzierten D1-2 sowie von D1-7 aus Zellkultur wurde in zwei verschiedenen Bindungstests nachgewiesen: 1.) im ELISA mit Hilfe von zwei gegen den extrazellulären Teil des VEGFR-3 gerichteten kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörpern, sowie 2.) anhand der Bindungsaktivität gegenüber dem natürlichen Liganden VEGF-C in SPR-Messungen. Für die Wechselwirkung von D1-2 mit VEGF-C wurde ein  $K_D$ -Wert von 40,1 nM ermittelt, für D1-7 mit VEGF-C eine  $K_D$  von 0,3 nM. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Werte entsprechen prinzipiell den bereits publizierten Daten von Leppänen *et al.* (2013). In der Studie von Leppänen *et al.* wurden die Bindungsaktivitäten verschiedener extrazellulärer VEGFR-3 Fragmente gegenüber VEGF-C untersucht. VEGF-C wurde zu verschiedenen C-terminal verkürzten Fragmenten bestehend aus D1-2, D1-3, D1-5 und D1-7 gegeben und die Bindungsaktivität gegenüber dem jeweiligen Fragment kalorimetrisch gemessen. Hierbei wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der Domäne 3 wie auch der membranproximalen Domänen 4-7 zu einer erhöhten Affinität führen. VEGF-C wies in dieser Studie gegenüber D1-7 ( $K_D^{D1-7} = 5,6$  nM) im Vergleich zu D1-2 ( $K_D^{D1-2} = 250$  nM) eine um den Faktor 45

erhöhte Affinität auf, was auf zusätzliche Interaktionen der Domäne 3 mit VEGF-C sowie der Liganden-induzierten Dimerisierung der Domänen 4-7 zurückgeführt wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SPR-Experimente bestätigen die publizierten Befunde. Allerdings wird aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit von einem dimeren D1-7 Protein ausgegangen, was die deutlich erhöhte Affinität gegenüber dem ebenso dimeren Liganden im Vergleich zu dem monomeren D1-2 erklärt.

Insgesamt konnten die in zwei verschiedenen Expressionssystemen produzierten VEGFR-3 Domänen D1-2 und D1-7 erfolgreich in funktioneller Form präpariert werden. Beide Proteine wurden zur Homogenität gereinigt und zeigten, neben einem monodispersen Verhalten in der Gelfiltration, die Fähigkeit, den natürlichen Liganden VEGF-C mit hoher Affinität zu binden. Die beiden Rezeptor-Fragmente unterschieden sich im Hinblick auf ihren Glycosylierungsstatus und boten damit eine geeignete Grundlage, um als Target-Moleküle für die Selektion von Anticalinen mit einer glycosylierungsunabhängigen Epitopspezifität zu dienen.

## **4.2 Selektion, Charakterisierung und Optimierung von Anticalinen für das molekulare Targeting VEGFR-3 exprimierender Tumore**

In der vorliegenden Arbeit sind auf der Basis des humanen Lcn2-Proteingerüsts mit Hilfe von Protein-Engineering sowie evolutiven Mutagenese- und Selektionsverfahren Anticaline gegen den tumor-assoziierten Wachstumsrezeptor VEGFR-3 generiert worden. VEGFR-3 stellt aufgrund seiner Expression in den Blut- und Lymphgefäßen solider Tumore ein biomedizinisch relevantes Target für die Diagnose und Therapie dar. Von besonderem Interesse ist dabei dessen hohe Expression in malignen Gehirntumoren wie *Glioblastoma multiforme* (GBM) (Grau *et al.*, 2007), da aufgrund des natürlicherweise immunprivilegierten Gehirns die Expression des lymphangiogenen VEGFR-3 auf das maligne Gewebe beschränkt ist. In der klinischen Bildgebung, beispielsweise durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET), ist ausgehend von einer spezifischen Anreicherung des mit einem Radionuklid gekoppelten Bindeproteins ein hoher Kontrast zwischen Tumor und umliegendem Hirngewebe zu erwarten. Eine zentrale Rolle außerhalb des Gehirns nimmt VEGFR-3 zusammen mit seinem Liganden VEGF-C zudem während der Ausbreitung von Tumorzellen über die Lymphbahnen in die umliegenden Lymphknoten ein (Skobe *et al.*, 2001; Mandriota *et al.*, 2001; Karpanen *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006; Hirakawa *et al.*, 2007). Eine Eignung des VEGFR-3 als Ziel zur Intervention der tumorassoziierten Lymphangiogenese und Metastasierung wurde unter anderem durch die präklinischen Erfolge eines mit der Signalweiterleitung des VEGFR-3 interferierenden Antikörpers belegt (Tvorogov *et al.*, 2010).

### **4.2.1 Selektion von VEGFR-3 bindenden Anticalinen**

Die Generierung von Anticalinen gegen ein gegebenes Target erfolgt in einem mehrstufigen Verfahren, welches zunächst die Konstruktion einer geeigneten Lipocalin-Bibliothek, die funktionelle Präparation des Target-Moleküls sowie die Selektion von spezifischen Lipocalin-Varianten z.B. durch Phage Display (Beste *et al.*, 1999) oder Bacterial Surface Display (Binder *et al.*, 2010) umfasst. Im Anschluss werden vielversprechende Anticalin-Kandidaten in *E. coli* in löslicher Form produziert und gereinigt und hinsichtlich ihrer biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften untersucht. In

einem Prozess der Maturierung können Affinität und Stabilität nachfolgend gegebenenfalls durch rationale oder kombinatorische Mutagenese optimiert werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten VEGFR-3 spezifischen Anticaline stand eine auf dem Proteingerüst des humanen Lcn2 basierende Zufallsbibliothek zur Verfügung. Das Design dieser in mehrerer Hinsicht optimierten Bibliothek beruhte auf den Erfahrungen mit vorangegangenen Lipocalin-Bibliotheken sowie Röntgenstrukturanalysen verschiedener Anticaline im Komplex mit ihren Liganden (Gebauer *et al.*, 2013). Diese Lcn2-Bibliothek umfasste eine Auswahl definierter Aminosäurepositionen innerhalb der exponierten Schleifenregionen wie auch tiefer im Barrel gelegener Reste, um den Anforderungen an unterschiedliche Ligandentypen gerecht zu werden.

Die Wahrscheinlichkeit, einen potenten Binder aus einer naiven Zufallsbibliothek zu selektieren, hängt direkt von der Komplexität der verwendeten Bibliothek ab, wie auch für Antikörper gezeigt werden konnte (Perelson, 1989). Experimentell erfolgreiche Bibliotheken zeichnen sich in der Tat durch eine hohe Komplexität aus (Griffiths *et al.*, 1994; de Haard *et al.*, 1999). Die theoretische Anzahl möglicher Aminosäuresequenzen innerhalb einer kombinatorischen Bibliothek kann dabei jedoch schnell eine unüberschaubare Größe erreichen. Beispielsweise ergibt sich für die Antigenbindungsstelle von Antikörperfragmenten (scFv, Fab) bei Randomisierung von 25 Aminosäuren eine theoretische Komplexität von  $20^{25} \approx 3 \times 10^{32}$  Sequenzkombinationen (Skerra, 2003). Der resultierende Sequenzraum ist demnach enorm und kann durch die derzeitig vorhandenen biotechnologischen Verfahren nur im Bruchteil abgebildet werden. Leistungsfähige *in vitro* Selektionsmethoden wie das hier verwendete Phage Display ermöglichen die Durchmusterung von maximal  $10^{11}$  bis  $10^{12}$  Varianten. Die physikalisch abgebildete Diversität unterschreitet den theoretischen Sequenzraum also bei weitem. Die Randomisierung kompletter Schleifenregionen führt naturgemäß auch zur Bildung einer Vielzahl von fehlgefalteten Proteinen. Die funktionelle Anzahl an Varianten ist demnach deutlich niedriger als die apparente Diversität der Bibliothek, die üblicherweise durch das Auszählen von Transformanten bestimmt wird.

Mit dem Ziel, die Anzahl an funktionellen Varianten zu erhöhen und die apparente Diversität auf ein repräsentativ abbildbares Maß zu reduzieren, wurde während des Designs der in dieser Arbeit verwendeten Lcn2-Bibliothek der Schwerpunkt der Randomisierung auf solche Sequenzregionen gelegt, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zur sterischen Interaktion mit Targetmolekülen unterschiedlicher Form und Größe befähigt sind und zudem die Lipocalinfaltung nicht beeinträchtigen sollten. In Anlehnung an die natürlicherweise hohe Sequenzvariabilität der Lipocaline (Åkerström *et al.*, 2000) wurden bisher generierte Lipocalin-Bibliotheken durch eine gezielte Auswahl von 16-24 Positionen innerhalb der vier Schleifen und angrenzenden Regionen des  $\beta$ -Barrels generiert (Beste *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2013). Das konservierte Grundgerüst der Lipocaline zeichnet sich in diesem Bereich durch eine außerordentliche Plastizität aus und wird durch die Aminosäuresubstitutionen nur geringfügig beeinträchtigt. Dies wurde nicht zuletzt anhand der Kristallstrukturanalyse von Anticalinen im Komplex mit den Liganden ED-B, DTPA und CTLA-4 gezeigt (Gebauer *et al.*, 2013; Eggenstein *et al.*, 2014; Schönfeld *et al.*, 2009). Die Tolerabilität des Lipocalin-grundgerüsts gegenüber Seitenkettenaustauschen erfüllt eine Grundvoraussetzung für das Design einer potenten Bibliothek und die Selektion funktioneller Anticaline daraus. Insbesondere das Lcn2 bietet aufgrund seiner vorteilhaften biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften, d.h. effiziente Produktion in *E. coli*, hohe thermische Stabilität und strikt monomeres Verhalten, einen

optimalen Ausgangspunkt für die Generierung von Lipocalin-Varianten mit gewünschten Bindungsaktivitäten.

Um den limitiert zur Verfügung stehenden kombinatorischen Raum effektiv zu nutzen, ist die Qualität der durchmusterten Bibliothek von entscheidender Bedeutung. Im Fall der hier verwendeten Lcn2-Bibliothek wurden insgesamt zwanzig definierte Positionen der konzertierten Zufallsmutagenese unterzogen. Die randomisierten Positionen umfassen mit Ausnahme von Cystein alle Standard-Aminosäuren. Cystein wurde aufgrund seiner Tendenz zur Ausbildung von Disulfidbindungen bzw. -isomeren – vor allem bei der kotranslationalen Translokation in das oxidierende Periplasma – und damit einhergehender Oligomerisierung oder den konformationellen Auswirkungen auf das Proteingerüst von der Mutagenese ausgeschlossen. Mit dem Ziel, bereits auf genetischer Ebene eine größtmögliche Diversität funktionaler Lipocalin-Varianten zu erzeugen, wurde die Lcn2-Bibliothek der dritten Generation mit Hilfe der modernen Slonomics®-Technologieplattform (Van den Brulle *et al.*, 2008) konstruiert.

Konventionelle, PCR-basierte Gensyntheseverfahren führen aufgrund der intrinsisch hohen Fehlerrate bei der Genamplifizierung sowie Fehlpaarungen komplementärer Oligonukleotide zu einem hohen Anteil missgefalteter Genprodukte. Die Slonomics®-Technologie hingegen ist ein Ligierungs-basiertes Prinzip und beruht auf der sukzessiven enzymatischen Verknüpfung von zufällig ausgewählten doppelsträngigen Basentriplets aus einem Pool von neunzehn definierten Codons (Bausteinen) mit der wachsenden Gensequenz (Van den Brulle *et al.*, 2008). In diesem Verfahren werden die einzelnen Aminosäuren durch jeweils ein definiertes Codon repräsentiert. Die Redundanz des genetischen Codes wird dadurch umgangen, was eine ausgewogene Verteilung der einzelnen Aminosäuren an jeder Position birgt. Ebenso wird der Einbau unerwünschter Stoppcodons unterbunden, im Gegensatz zu der beispielsweise früher praktizierten NNK oder NNS (N = A/C/G/T, K = G/T und S = C/G) Mutagenese (Beste *et al.*, 1999; Vogt & Skerra, 2004; Kim *et al.*, 2009).

Für das Phage Display wurde die synthetische Lipocalin-Bibliothek auf genetischer Ebene mit dem Phagenhüllprotein pIII fusioniert und als integrales Fusionsprotein auf der Oberfläche des filamentösen Phagen M13 präsentiert (Gebauer *et al.*, 2013). Die resultierende monovalente Phagemid-Bibliothek mit  $1,7 \times 10^{10}$  individuellen Varianten wurde zur Selektion VEGFR-3 spezifischer Anticaline insgesamt sechs aufeinanderfolgenden Anreicherungszyklen unterzogen. Die Stringenz der Selektion wurde dabei durch Erniedrigung der Targetkonzentration von 100 nM (Runde 1–4) auf 10 nM (Runde 5–6) erhöht. Durch den steigenden Selektionsdruck konnte so die erfolgreiche Selektion und Anreicherung verschiedener Binder bewerkstelligt werden, die sich zum einen durch eine hohe Affinität, zum anderen durch verschiedene Epitopspezifitäten auszeichneten. Während der sechs Anreicherungszyklen wurde das in *E. coli* hergestellte Rezeptorfragment D1-2 als Target eingesetzt, in den darauffolgenden ELISA-Screenings diente neben D1-2 das aus 293T-Zellen gewonnene glycosylierte D1-7 als Target. Die Verwendung der in unterschiedlichen Wirtszellen produzierten Target-Proteine erwies sich als vorteilhaft, da so die Selektion von Anticalinen gegen die VEGF-C bindenden Domänen D1-2 mit glycosylierungsunabhängigen Epitopspezifitäten verwirklicht werden konnte.

#### 4.2.2 Verbesserung der Bindungseigenschaften von U3D7 durch *in vitro* Affinitätsmaturierung

Die für das kombinatorische Design der Anticaline eingesetzte Zufallsbibliothek umfasste mit ihren 20 randomisierten Positionen einen theoretischen Sequenzraum von insgesamt  $19^{20}$  möglichen Lcn2-Varianten. Diese theoretische Komplexität übersteigt jedoch die hier mittels Phage Display physikalisch abgebildete Diversität von etwa  $10^{10}$  Varianten. Die Wahrscheinlichkeit, einen potenten Binder mit maximaler Affinität gegen ein gegebenes Epitop auf Anhieb zu selektieren ist demnach verhältnismäßig gering. Im Fall von U3D7 wurde nur ein  $K_D$ -Wert von 75 nM gegenüber VEGFR-3 (D1-7) erreicht, so dass dessen Aminosäurekomposition für die Bindung des Target-Proteins noch nicht optimal war.

Eine ähnliche Situation ist auch bei der Generierung von Antikörpern durch das Immunsystem zu finden. Das menschliche Repertoire naiver Antikörper-produzierender B-Lymphozyten umfasst  $10^9$  Varianten (Winter, 1998). Diese initiale Variabilität wird antigenunabhängig während der B-Zell-entwicklung durch die Kombination verschiedener Gensegmente (*V(D)J-Joining*) generiert. Die Bindung eines Antigens durch den B-Zellrezeptor erfolgt deshalb zunächst mit vergleichsweise moderater Affinität. Die Interaktion mit dem Antigen bewirkt schließlich eine Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle, woraufhin der Prozess der somatischen Hypermutation initiiert wird (Neuberger & Milstein, 1995). Durch die gerichtete Zufallsmutagenese erfährt der naive Antikörper eine erneute Diversifizierung im Bereich der V-Genregion, gefolgt von dem Prozess der klonalen Selektion, was zu einer Verbesserung der Antigenbindung um bis zu mehreren Größenordnungen führt (Kocks & Rajewsky, 1988).

Ähnlich diesem in der Natur bewährten evolutiven Ansatz wurden zur Verbesserung der Affinität von U3D7 mit Hilfe der Error-Prone PCR zufällige Mutationen in das Anticalin eingeführt und so die Komplexität der naiven Bibliothek quasi im Nachhinein erhöht. Nach dem Prinzip des molekularen Darwinismus wurden anschließend wiederum durch Phage Display Varianten mit verbesserter Affinität selektiert. Für die Affinitätsoptimierung von U3D7 wurden hierfür zwei aufeinanderfolgende Maturierungsrunden durchgeführt, wobei für jede Runde eine auf der jeweiligen Ausgangsvariante basierende Bibliothek mit bis zu vier Mutationen innerhalb der zentralen Lipocalin-Genkassette generiert und durchmustert wurde. In der ersten Maturierungsrunde wurde eine Anreicherung von Varianten mit erhöhter Affinität erreicht, indem die Konzentration des Target-Proteins während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes auf einen Wert unterhalb der gewünschten  $K_D$  von  $\leq 10$  nM eingestellt wurde. Auf diese Weise wurde das mit zwei zusätzlichen Substitutionen (K74R/D127N) ausgestattete Anticalin A4N10 mit einer gegenüber U3D7 um den Faktor 7 verbesserten Affinität ( $K_D = 10$  nM) selektiert.

Im zweiten Zyklus der Affinitätsmaturierung wurden durch kombinatorisches und rationales Protein-Engineering zwei für die Affinität relevante Aminosäurepositionen innerhalb der Bindungstasche des Anticalins identifiziert. Diese zwei negativ geladenen Glutaminsäure-Reste an den Positionen 44 und 100 befanden sich in den gegenüberliegenden Schleifenregionen Nr. 1 und 3. Die Substitution beider Reste gegen Lysin bewirkte unter Veränderung der Nettoladung ( $pI = 9,2$  gegenüber  $7,9$ ) eine im Vergleich zu A4N10 30-fache Erhöhung der Target-Affinität ( $K_D = 0,33$  nM).

Die berechneten elektrostatischen Oberflächenpotentiale von A4N10, A4N10(E44K/E100K) und VEGFR-3(D1-2) zeigten erwartungsgemäß eine verstärkt positive Ladung der Schleifenregionen bei A4N10(E44K/E100K) gegenüber A4N10. Der Einfluss der Ladung auf die Affinität erscheint insofern

plausibel, als dass durch die Erhöhung der positiven Nettoladung der Bindetasche die Assoziation mit den negativ geladenen D1-2 Rezeptordomänen beschleunigt wird, was auch anhand der Assoziationskonstanten von A4N10 und der E44K/E100K-Doppelmutante (A4N10(KK)) ersichtlich ist ( $k_{\text{on}}^{\text{A4N10}} = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ;  $k_{\text{on}}^{\text{E44K/E100K}} = 12,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Kinetische Untersuchungen gegenständig geladener Proteine zeigen, dass die elektrostatisch getriebene Komplexbildung zwischen Proteinen in zwei Stufen verläuft (Schreiber & Fersht, 1996). Diffusion und weitreichende elektrostatische Wechselwirkungen („*Electrostatic Steering*“) führen dabei zunächst zur Bildung eines wenig stabilen und spezifischen frühen Proteinkomplexes; die Bildung des hochaffinen Komplexes erfolgt daraufhin über einen Übergangszustand durch präzises Docking der beiden Bindungspartner unter Ausbildung kurzreichender Interaktionen, insbesondere Seitenkettenpackung und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Assoziation eines Proteinkomplexes in verdünnter Lösung erfolgt nach einer langen Diffusionsphase, bevor die beiden Interaktionspartner aufeinander stoßen, was durch attraktive elektrostatische Kräfte beschleunigt wird (Schreiber, 2002). Ein solcher Mechanismus erscheint auch im Fall der Komplexbildung zwischen A4N10(KK) und D1-2 plausibel. Im Einklang mit den beobachteten Effekten bei der Affinitäts-Maturierung von U3D7 weisen die anderen selektierten Anticaline S3A9 und A5C3 ebenfalls basischen pI (9,2 – 9,3) und eine vergleichbar schnelle Komplex-Assoziation auf (vgl. Tabelle 6).

Ein analoger Beitrag elektrostatischer Wechselwirkungen zur Komplex-Assoziation wurde auch im Fall der gegen die Extradomäne-B (ED-B) des Fibronektins (Fn) gerichteten Anticaline beobachtet (Gebauer *et al.*, 2013). Für das kombinatorische Design sowie die biochemische und strukturelle Charakterisierung der Anticaline wurde ED-B im Kontext seiner benachbarten Domänen Fn7 und 8 (Fn7B8) verwendet, wobei dieses ähnlich der VEGFR-3 Domänen 1-2 negative Ladung (pI = 4,4) aufweist. Die drei unterschiedlichen ED-B spezifischen Anticaline N7A, N9B und N7E zeigten im SPR mit dem immobilisierten Target eine rasche Assoziationskinetik mit Konstanten im Bereich von  $10^6 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Eine auf den komplementären Ladungen beruhende Interaktion der hochaffinen Variante N7A mit dem Target-Protein wurde auch durch die röntgenkristallographische Strukturuntersuchung bestätigt.

Insgesamt konnte durch Kombination aus evolutivem und rationalem Protein-Engineering die Affinität des aus einer naiven Lcn2-Bibliothek selektierten Anticalins U3D7 um das 226-fache verbessert werden. In zwei sukzessiven Maturierungsrunden wurden dabei vier für die Affinität vorteilhafte Mutationen identifiziert. Insbesondere der Austausch zweier oberflächenexponierter Glutaminsäurereste zu Lysin offenbarte Einblick in den elektrostatischen Bindungsmechanismus des für VEGFR-3 spezifischen Anticalins. Die maturierte Variante A4N10(E44K/E100K) bietet aufgrund ihrer günstigen Bindungskinetik einen vielversprechenden Kandidaten für die biomedizinische Anwendung.

#### 4.2.3 Verbesserung der Löslichkeit des Anticalins A5C3

Das aus der naiven Lcn2-Bibliothek selektierte Anticalin A5C3 wies hohe Affinität und Spezifität gegenüber dem Target-Rezeptor auf. Dennoch zeigte sich während der Produktion in *E. coli*, dass dessen Biosynthese mit einem großen Aggregatanteil einherging.

Auch wenn die Information für die funktionelle dreidimensionale Struktur eines Proteins vollständig in dessen Aminosäuresequenz enthalten ist (Anfinsen, 1973), kommt es bei der Biosynthese von

rekombinanten Proteinen häufig vor, dass die Ausbeute der Proteinfaltung geringer als 100 % ist. Dies ist durch die als Nebenreaktion zur produktiven Proteinfaltung ablaufende quasi irreversible Aggregation der naszierenden Polypeptidketten zu erklären. In ungefalteten oder partiell gefalteten Polypeptidketten liegen die im nativen Zustand des Proteins im hydrophoben Kern begrabenen hydrophoben Aminosäuren exponiert und lösungsmittelzugänglich vor. Die unspezifische Wechselwirkung dieser exponierten hydrophoben Bereiche kann zu Proteinaggregation führen, wobei unlösliche Aggregate dem im Prinzip reversiblen dynamischen Proteinfaltungsgleichgewicht entzogen sind.

Für die Erhöhung der „Löslichkeit“ eines Proteins während der Überexpression in heterologen Expressionssystemen gibt es keine universelle Strategie, allerdings existieren verschiedene Vorgehensweisen, um diesem Problem entgegenzuwirken. Konventionelle Methoden zur Erhöhung der Löslichkeit beinhalten die Induktion der Genexpression bei niedriger Temperatur, die Verwendung von verschiedenen starken Promotoren, den Wechsel des Wirtsstamms, die Verwendung modifizierter Kulturmedien oder die Fusion mit hochlöslichen Protein-/Peptid-Anhängseln (Gopal & Kumar, 2013). Eine weitere Methode ist die Änderung der Aminosäuresequenz mit dem Ziel, die Hydrophobie relevanter Strukturbereiche zu reduzieren oder die Faltungstabilität zu erhöhen, ohne dabei die Funktionalität des Proteins zu beeinflussen.

Vor allem für Antikörper wurde bereits eine Vielzahl solcher Ansätze verwirklicht, darunter die Modifizierung der Netto-Ladung bzw. das Einfügen von geladenen Seitenketten in unmittelbarer Nähe zu hydrophoben affinitätsbestimmenden Regionen (CDRs) (Perchiacca *et al.*, 2012), die Substitution oberflächenexponierter hydrophober Aminosäuren (Wu *et al.*, 2010), das Einfügen von zusätzlichen Disulfidbrücken oder von Glycosylierungsstellen (Wu *et al.*, 2010; Compton *et al.*, 2011) oder auch die Fusion mit hochlöslichen Anhängseln oder Proteinen (Hansted *et al.*, 2011). Anticaline sind aufgrund ihrer kompakten Architektur bzw. der heterologen Produktion in *E. coli* nicht für das Einführen von zusätzlichen Disulfidbrücken oder Glycosylierungen geeignet. Ein Löslichkeits-Engineering durch Änderung der Nettoladung wurde aufgrund des bereits ausgeprägten positiven Ladungscharakters des Anticalins ausgeschlossen. A5C3 besaß mit einem berechneten pI von 9,3 unter physiologischen Puffer-Bedingungen schon eine positive Nettoladung und damit eine zu dem stark negativ geladenen Target-Protein komplementäre Elektrostatik, was für dessen hohe Affinität bedeutsam erschien.

Die Optimierung der Löslichkeit erfolgte im Fall von A5C3 deshalb durch systematische Substitution oberflächenexponierter hydrophober Aminosäuren. Basierend auf einem *in silico* generierten, auf der Kristallstruktur des Wildtyp-Lcn2 beruhenden Modells von A5C3 konnte in der Schleifenregion Nr. 2 ein Cluster von aromatischen Seitenketten identifiziert werden. Durch den gezielten Austausch von zwei in dieser Schleifenregion gelegenen Aminosäuren zu hydrophileren Seitenketten (F71Q/Y77H) konnte die Löslichkeit von A5C3 in der Tat deutlich verbessert werden, was sich in einer erhöhten Ausbeute an monomerem Protein und einem reduzierten Aggregatanteil äußerte, wie durch Gelfiltration nachgewiesen wurde. Die gleiche Strategie wurde auch schon erfolgreich zum Zweck der Kristallisation des humanen Lipocalins ApoD angewandt (Nasreen *et al.*, 2006). Im Fall von ApoD wurde durch den gezielten Austausch von drei hydrophoben Aminosäureseitenketten dessen Löslichkeit bei gleichbleibender Liganden-Affinität entscheidend verbessert.



Im Fall von A5C3 bewirkte der Austausch von Tyr77 zu His eine veränderte Bindungskinetik mit einem leichten Verlust an Target-Affinität (vgl. Tabelle 6). Tyr77 konnte somit als ein an der Bindung des Target-Proteins beteiligter Rest identifiziert werden. Obgleich die Substitution des Phenylalanins an Position 71 zu Glutamin allein nur einen geringfügigen Einfluss auf die Produktionsausbeute in *E. coli* hatte, zeigte die Kombination beider Mutationen einen synergistischen Effekt auf den monomeren Proteingehalt bei nur minimal reduzierter Target-Affinität ( $K_D^{A5C3} = 8,3 \text{ pM}$ ;  $K_D^{A5C3(F71Q/Y77H)} = 14,2 \text{ pM}$ ). Im Hinblick auf die thermische Faltungsstabilität besitzt A5C3(QH) im Vergleich zur Ausgangsvariante A5C3 eine um fast 10 °C verringerte Schmelztemperatur. Der Effekt der Doppelsubstitution F71Q/Y77H auf die Proteinausbeute beruht demnach auf einer Erhöhung der Löslichkeit während der Biosynthese und des Faltungsprozesses.

Des Weiteren zeigten auch die anderen VEGFR-3 bindenden Anticaline im Vergleich zu dem recht robusten Wildtyp-Lcn2 ( $T_m = 79,6 \text{ °C}$ ) reduzierte Faltungsstabilität mit Schmelztemperaturen zwischen 58,5 und 70,0 °C. Insgesamt erfüllen die VEGFR-3 spezifischen Anticaline mit diesen Werten dennoch die Stabilitätsanforderungen an ein für medizinische Anwendungen geeignetes Proteinreagenz, das z.B. durch chemische Kopplung mit einem Metallchelate modifizierbar ist, ohne seine Faltung und Target-Bindungsfunktion einzubüßen.

### 4.3 Die Anticaline und deren VEGFR-3 Bindungsmodi

Die Mitglieder der VEGF-Familie stellen aufgrund ihrer integralen Schlüsselfunktionen in der Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese bereits vielseitig charakterisierte und vor allem für die Entwicklung von Angiogenese-Inhibitoren relevante Targets für die Tumorthherapie dar. Die einzelnen VEGF-Liganden weisen im Hinblick auf ihre individuellen Bindungseigenschaften unterschiedliche Spezifitätsmuster für die drei Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 auf und führen nach der Aktivierung des korrespondierenden Rezeptors zu unterschiedlichen zellulären Antworten (Lohela *et al.*, 2009). Aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit sind die VEGFRs in der Lage, neben der ligandenabhängigen Homodimerisierung auch in heterodimerer Form Signalaktivierung zu induzieren (Cudmore *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2010). Mit Hilfe der Röntgenkristallographie konnten die dreidimensionalen Strukturen aller humanen VEGFs aufgeklärt und deren Wechselwirkung mit den Ektodomänen ihrer Rezeptoren näher analysiert werden (Abbildung 43), wobei die Strukturen mit VEGF-C und VEGF-D erst während der Anfertigung dieser Arbeit bekannt wurden (Leppänen *et al.*, 2011; Leppänen *et al.*, 2013).

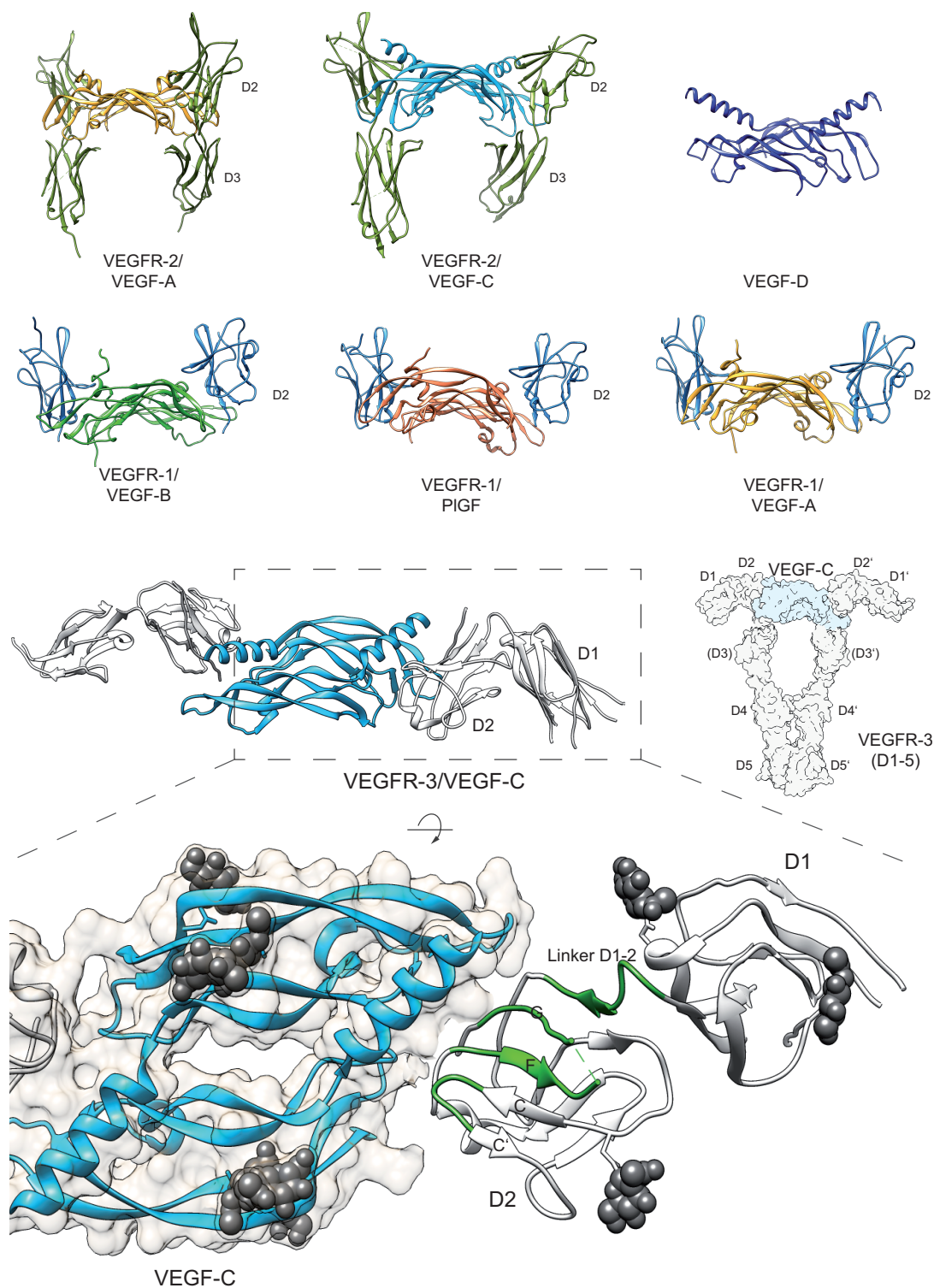
Die löslichen VEGFs liegen natürlicherweise als disulfidverbrückte homodimere Proteine vor. Durch Bindung an den jeweiligen VEGF-Rezeptor induzieren sie dessen Dimerisierung. Die Wechselwirkung erfolgt bei allen drei Rezeptoren hauptsächlich über eine in Domäne 2 gelegene Region. Im Fall von VEGFR-2 offenbaren die Kristallstrukturen zusätzliche Wechselwirkungen der Liganden VEGF-A und VEGF-C mit der Domäne 3 (Fuh *et al.*, 1998; Leppänen *et al.*, 2010). Die erst kürzlich veröffentlichte Strukturanalyse der extrazellulären VEGFR-3 Domänen D1-2 im Komplex mit VEGF-C ließ analog zu den anderen VEGFRs eine Interaktion mit D2 erkennen (Leppänen *et al.*, 2013). Anhand von funktionellen Untersuchungen wurde zuvor jedoch für VEGFR-3/VEGF-C eine wichtige Rolle der Domäne 1 für die Ligandenbindung nahegelegt (Jeltsch, 2006). Im Gegensatz dazu zeigt in der Kristallstruktur die Domäne 1 vom Liganden weg und lässt nur wenige Interaktionen mit VEGF-C

erkennen (Abbildung 43). Hingegen deuten die Bindungsstudien verschiedener verkürzter VEGFR-3 Fragmente auf eine Mitwirkung von D3 bei der Bindung von VEGF-C (Leppänen *et al.*, 2013).

Vor diesem Hintergrund wurden die gegen den VEGFR-3 gerichteten Anticaline A5C3, S3A9 und U3D7 in qualitativen Bindungstests hinsichtlich ihrer individuellen Domänenspezifitäten und der möglichen Konkurrenz mit VEGF-C untersucht. Die drei in dieser Arbeit entwickelten Anticaline offenbarten verschiedene Bindungsmodi innerhalb der Rezeptordomänen D1-2. Hierbei wurde für A5C3 und S3A9 ein mit der Bindung von VEGF-C überlappendes Epitop ermittelt, wobei für die Bindung strukturelle Bereiche sowohl in D1 als auch D2 erforderlich sind. Die hier nachgewiesenen kompetitiven Bindungsmodi der beiden Anticaline erscheinen bezüglich der Relevanz von D1 für die Bindung von VEGF-C konsistent mit den zuvor publizierten Ergebnissen von Jeltsch *et al.* (2006).

Für die Bindung der Anticaline A5C3 und S3A9 ist angesichts der Kristallstruktur des Komplexes D1-2/VEGF-C eine Wechselwirkung mit den in D2 gelegenen  $\beta$ -Faltblattsträngen F und G sowie deren verknüpfender Schleifenregion (Abbildung 43) wahrscheinlich. Die F-G-Schleife ragt aus dem kompakten Sandwich der Ig-ähnlichen C2-Typ Domäne heraus und stellt ein für die Bindungstasche der Anticaline sterisch geeignetes Epitop dar. Das kompetitive Bindungsverhalten von A5C3 und S3A9 gegenüber VEGF-C lässt auf zusätzliche Wechselwirkungen dieser Anticaline mit dem C-C'-Hairpin in D2 schließen, welcher zusammen mit dem Strang E die Hauptinteraktionsfläche für die N-terminale Helix von VEGF-C ausbildet. Die Wechselwirkung der Anticaline mit den isolierten Einzeldomänen D1 und D2 sowie D1-2 wurde in einem kompetitiven Bindungstest mittels SPR-Spektroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Bindung von A5C3 und S3A9 an die immobilisierte Ektodomäne D1-7 in Anwesenheit eines Überschusses der isolierten Einzeldomänen D1 oder D2 möglich ist; durch Zugabe eines Überschusses D1-2 zum jeweiligen Anticalin konnte die Wechselwirkung mit D1-7 unterdrückt werden. Diese Ergebnisse deuten des Weiteren auf eine Beteiligung des D1 und D2 verknüpfenden Linkers an der Bindung.

Im Gegensatz zu A5C3 und S3A9 wiesen das Anticalin U3D7 bzw. dessen im Hinblick auf die Target-Affinität optimierte Varianten A4N10 und A4N10(KK) einen gegenüber VEGF-C unabhängigen Bindungsmodus auf. Die Wechselwirkung zwischen U3D7 und dem Rezeptor erfolgt hierbei lediglich in D2. U3D7 bzw. seine maturierte Variante A4N10(KK) könnte ein auf der VEGF-C abgewandten Seite von D2 gelegenes, hin zur 3. Domäne gerichtetes Epitop erkennen, was die anfänglich um den Faktor 10 schlechtere Affinität von U3D7 für D1-7 gegenüber D1-2 erklären würde. Die mutmaßlichen Epitope aller drei Anticaline befinden sich bemerkenswerterweise außerhalb der Glycosylierungsstellen des Rezeptors.



**Abbildung 43| Kristallstrukturen humaner VEGFs im Komplex mit ihren Rezeptoren.** Dargestellt sind die Kristallstrukturen der Liganden VEGF-A (gelb), VEGF-B (hellgrün), VEGF-C (hellblau), VEGF-D (dunkelblau) und PlGF (orange) im Komplex mit den Ektodomänen des VEGFR-1 (blau), VEGFR-2 (olivgrün) und VEGFR-3 (grau). Die in der Kristallstruktur aufgelösten Zuckerseitenketten im VEGFR-3/VEGF-C-Komplex sind als dunkelgraue Kalotten dargestellt. Die grün hervorgehobenen Bereiche entsprechen dem vermuteten Epitop der Anticaline A5C3 und S3A9. Das Strukturmodell des VEGFR-3(D1-5)/VEGF-C-Komplexes wurde durch Überlagerung der Kristallstrukturen von VEGFR-3(D1-2)/VEGF-C (PDB-ID 4BSK) und dem D4-5 Homodimer (PDB-ID 4BSJ) mit dem KIT/SCF-Komplex (PDB-ID 2E9W) generiert. PDB-IDs: 4BSK, 2XV7, 2X1W, 3V2A, 2XAC, 1RV6 und 1FLT.

Keines der selektierten Anticaline wies eine Kreuzreaktivität gegenüber dem nah verwandten VEGFR-2 auf, was die ausgezeichnete Spezifität der Anticaline verdeutlicht. Im Zusammenhang mit der Entwicklung VEGFR-3 spezifischer Protein-Reagenzien für das *in vivo* Imaging bot zu Beginn der Arbeit die Liganden-Variante VEGF-C(Cys156Ser) (Joukov *et al.*, 1998) einen potentiellen Kandidaten. Publierte Daten deuten darauf hin, dass VEGF-C(Cys156Ser) im Gegensatz zu VEGF-C selektive Bindung an den VEGFR-3 mit agonistischer Wirkungsweise zeigt (Joukov *et al.*, 1998). Eine Wechselwirkung mit dem verwandten VEGFR-2 scheint aufgrund der Aminosäuresubstitution nicht mehr gegeben zu sein. VEGF-C(Cys156Ser) weist jedoch einen signifikant erhöhten Monomeranteil (Jeltsch, 2006) bei insgesamt heterogener Ligandenpräparation auf. Die für VEGFR-3 spezifischen Anticaline stellen im Vergleich dazu aufgrund ihrer kleinen Molekülgröße (ähnlich VEGF-C (Cys156Ser)), der hohen Affinität sowie der monodispersen Konstitution eine vielversprechende Alternative als Protein-Reagenz mit exklusiver Spezifität für VEGFR-3 dar. Eine Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors ist aufgrund des monovalenten Bindungsmodus der Anticaline, ähnlich dem bereits beschriebenen VEGF-A-bindenden Anticalin (Gille *et al.*, 2015), nicht zu erwarten. Die drei Anticaline A5C3, S3A9 und U3D7 bzw. die optimierten Varianten A5C3(QH) und A4N10(KK) bieten demnach hochspezifische monovalente Bindungsreagenzien, die mit ihren unterschiedlichen Bindungsmodi als Ausgangspunkt für verschiedene biomedizinische Anwendungen fungieren können.

### 4.4 Bifunktionelle Anticaline für die molekulare Bildgebung solider Tumore

Basierend auf dem hoch affinen Anticalin A5C3, bzw. dessen löslichkeitsoptimierter Variante A5C3(QH), wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei bifunktionelle Fusionsproteine konstruiert. Zum einen wurde für den Einsatz in der *in vitro* Diagnostik durch genetische Kopplung des Anticalins mit dem fluoreszierenden Reporterprotein eGFP ein sogenanntes „ChromoCalin“ generiert. Zum anderen wurde A5C3 für die Anwendung in tomographischen Bildgebungsverfahren *in vivo* am C-Terminus mit einem freien Cystein-Rest für die chemische Kopplung mit einem Metallchelat ausgestattet. In beiden Fällen stellte die PASylation-Technologie (Schlapschy *et al.*, 2013) eine Komponente der bifunktionellen Reagenzien dar. Die Verwendung der PAS-Polypeptidsequenz, entweder als C-terminales Proteinanhängsel oder zwischen beiden Protein-/Peptidpartnern als *Spacer*, offenbarte dabei für die jeweilige Anwendung vorteilhafte Effekte.

#### 4.4.1 ChromoCaline

Für die Konstruktion des für VEGFR-3 spezifischen ChromoCalins wurde das fluoreszierende Reporterprotein eGFP an den flexiblen N-Terminus des Anticalins A5C3 fusioniert. Das aus 200 Aminosäuren bestehende konformationell ungeordnete PAS-Polypeptid wurde dabei als flexible Spacer-Sequenz auf genetischer Ebene zwischen die beiden Fusionspartner eingefügt (eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3). Im Vergleich zu einem kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linker (eGFP-A5C3) zeigte die Verwendung des PAS-Polypeptids einen vorteilhaften Effekt auf die Affinität und die Ausbeute, wobei die molare Proteinausbeute des PASylierten ChromoCalins um den Faktor zwei höher war als bei eGFP-A5C3. Die Auswahl des geeigneten Linkers kann demnach neben der Funktionalität eine Rolle für die effiziente Produktion des rekombinanten Proteins spielen. Die Verwendung der PAS-Sequenz als Spacer zwischen zwei Fusionspartnern zeigte bereits bei der Konstruktion eines bifunktionellen Enzymkomplexes vorteilhaften Effekt auf die monomere Proteinausbeute (Lerchner *et al.*, 2016).

Neben dem Einsatz der PASylierung spielte für das Design des VEGFR-3 spezifischen ChromoCalins auch die Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes eine wichtige Rolle. Die Markierung von Proteinen, wie beispielsweise den in der *in vitro* Diagnostik häufig eingesetzten Antikörpern, mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt üblicherweise durch chemische Konjugation über Amin- oder Sulfhydrylgruppen, wobei heterogene Reaktionsprodukte, oftmals mit reduzierter Antigen-Affinität entstehen können. Fluoreszenzfarbstoffe wie das häufig verwendete Fluorescein leiden zudem nach der Belichtung unter schnellem Ausbleichen (Schots & van der Wolf, 2002). Die genetische Fusion von fluoreszierenden Proteinen, wie bspw. GFP oder eGFP, stellt deshalb eine Alternative dar, wobei schon auf genetischer Ebene definierte Stöchiometrie und Konfiguration der beiden funktionellen Bestandteile erzielt werden kann. Die Fusion mit einem fluoreszierenden Protein ist im Fall von Antikörpern bekanntermaßen mit Hürden verbunden. Grund hierfür sind die verschiedenen Anforderungen von GFP (und eGFP), welches bevorzugt im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas seine korrekte Faltung annimmt, an die Biosynthese; die komplexe disulfidverbrückte Architektur der Antikörper kann sich hingegen lediglich unter oxidierenden Bedingungen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eukaryotischer Zellen oder aber im bakteriellen Periplasma ausbilden. Aufgrunddessen liegt der Fokus bei der Konstruktion chimärer Antikörper-basierter Reagenzien auf der Verwendung von kleineren Antikörperfragmenten, insbesondere scFv oder Nanobodies aus dem Kamel (Abbadly *et al.*, 2014).

Eine Alternative dazu ist die genetische Kopplung mit einem nicht-Ig basierten Bindeprotein, wie hier einem Anticalin, welches eine noch einfachere Architektur aufweist und günstigere Ausgangsbedingungen bietet. Durch den modularen Aufbau der hier verwendeten Expressionsvektoren können nach dem Baukastenprinzip ChromoCaline gegen eine Vielzahl von Zielstrukturen generiert werden. Dabei ist auch die Auswahl eines alternativen fluoreszierenden Proteins als Fusionspartner möglich, wie z.B. YFP (Ormö *et al.*, 1996) oder mCherry (Shaner *et al.*, 2004).

Generell zeigten derlei Fusionsproteine bereits in mehreren Anwendungen vielversprechende Ergebnisse. Unter den Ig-basierten Fusionsproteinen wurde ein in *Pichia Pastoris* exprimiertes GFP-scFv Fusionsprotein, welches gegen das Kolorektalkarzinom-assoziierte Antigen A33 gerichtet ist, erfolgreich als diagnostisches Reagenz für Tumore eingesetzt (Petrausch *et al.*, 2007). In einem anderen Ansatz wurde ein mit GFP fusionierter Kamel-Nanobody, ein sogenannter *Chromobody*, für Protein-Lokalisationsstudien in Zellkultur eingesetzt, wobei der Chromobody *in situ* exprimiert wurde (Rothbauer *et al.*, 2006).

Ein Beispiel für eine erfolgreiche Anwendung von fluoreszierenden nicht Ig-basierten Proteinreagenzien *in vivo* bieten die sogenannten *Affiprobos*. HER-2- und EGFR-spezifische Affiprobos wurden durch Fusion entsprechender Affibody-Proteine mit eGFP bzw. mCherry mit hohen Ausbeuten in *E. coli* produziert und zur Homogenität präpariert (Lyakhov *et al.*, 2010). Neben der immunhistochemischen Anwendung zeigte der Einsatz der anti-EGFR-eGFP Affiprobe in einem Gliom-Modell der Maus bereits vielversprechende Ergebnisse für die fluoreszenzbasierte Neurochirurgie (Sexton *et al.*, 2013). Eine Anwendung des im Rahmen dieser Arbeit konstruierten VEGFR-3 spezifischen ChromoCalins in der fluoreszenzgestützten Neurochirurgie ist aufgrund der hohen Expression des VEGFR-3 in GBM ebenfalls denkbar. Aufgrund der einfachen molekularen Architektur und der daraus resultierenden effizienten Produktion in *E. coli*, der vorteilhaften Eigenschaften des photostabilen Fluorophors sowie dem modularen Aufbau des Expressionsvektors stellt das

ChromoCalin eGFP-PAS<sub>200</sub>-A5C3 ein vielversprechendes Reagenz für die *in vitro* Diagnostik von VEGFR-3 dar.

### 4.4.2 A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys für die Radio-Immundiagnostik

Für die besonderen Anforderungen in der Radio-Immundiagnostik wurde das hinsichtlich der Löslichkeit optimierte Anticalin A5C3(QH) mit einem 200 Aminosäuren umfassenden PAS-Anhängsel sowie einem C-terminalen Cysteinrest versehen (A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys). Speziell für die Bildgebung von soliden Tumoren in tomographischen Verfahren wie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind neben der Affinität und Spezifität die pharmakokinetischen Eigenschaften des Radio-Immuntracers von entscheidender Bedeutung. Bestimmend für die Pharmakokinetik sind, im Fall intravenöser Applikation, die beiden Teilprozesse der Distribution, d.h. Verteilung im Gewebe, und der Eliminierung. Die Eliminierung von proteinbasierten Wirkstoffen erfolgt hauptsächlich durch (1.) renale, (2.) hepatische und (3.) rezeptorvermittelte Beseitigungsmechanismen, neben (4.) proteolytischem Abbau (Mahmood & Green, 2005; Tang *et al.*, 2004). Kleine Proteine unterhalb der glomerulären Ausschlussgröße von ca. 60-70 kDa werden vorwiegend über die Niere ausgeschieden, wobei vor allem größenabhängige glomeruläre Filtration die Zirkulationsdauer im Blut limitiert (Mutschler, 1981).

Antikörper zeigen zum einen aufgrund ihrer erheblichen Größe, zum anderen durch das endosomale Recycling über den neonatelen Fc-Rezeptor (FcRn) (Ghetie & Ward, 2002) eine Plasmahalbwertszeit in der Größenordnung von 2-3 Wochen im Menschen (Lobo *et al.*, 2004). Im Hinblick auf die Anwendung für die biomolekulare Bildgebung, bei welcher ein besonders hoher Kontrast zwischen Tumor und dem umliegenden Gewebe und Blutgefäßen erwünscht ist, zeigen Antikörper häufig nur schlechtes Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis trotz hoher Tumoranreicherung (Wu & Senter, 2005). Hauptproblem hierbei ist die für derlei Anwendungen zu lange Zirkulation im Blut wie auch das mit der großen Molekülgröße einhergehende schlechte Diffusionsvermögen (Dreher *et al.*, 2006). Letzter Parameter verhält sich umgekehrt proportional zum Radius des als Tracer verwendeten Makromoleküls (Thurber *et al.*, 2008). Kleinere Ig-Fragmente (scFv, Fab und dAb) zeigen eine schnellere Eliminierung aus dem Blutkreislauf, jedoch nur moderate Tumoranreicherung (Wu & Senter, 2005). Die Herausforderung beim Engineering eines geeigneten Radiotracers besteht also in dessen idealerweise gegenläufigem Verhalten hinsichtlich systemischer Eliminierung und Extravasation, also Austritt des Radiotracers aus dem Blut und Verteilung in das umliegende Gewebe.

Die geeignete Kombination aus Molekülgröße und resultierender Plasmahalbwertszeit sowie Target-Affinität ist von Wirkstoff zu Wirkstoff verschieden. Eine gängige Strategie zur Modulation der Pharmakokinetik und Biodistribution sowohl bei bildgebenden als auch therapeutischen Anwendungen ist ein modularer Aufbau aus einem kleineren Antigen-bindenden Teil – z.B. einem Ig-Fragment oder anderen Bindeprotein – und einer die Zirkulationsdauer im Blut modulierenden Komponente. Für die gezielte Verlängerung der Plasmahalbwertszeit wurden Methoden wie die Konjugierung mit Polyethylenglycol (PEG) (Yang *et al.*, 2003), die Fusion mit Albumin (Müller *et al.*, 2007) oder einem albuminbindenden Peptid (Nguyen *et al.*, 2006), oder auch die Fusion mit dem Fc-Teil eines Antikörpers (Holliger & Hudson, 2005) etabliert. Während die erste Methode lediglich auf dem Prinzip der Vergrößerung des hydrodynamischen Radius des Proteins beruht, bewirkt die Kopplung von Albumin oder einer Fc-Domäne eine zusätzliche Verlängerung der Zirkulationsdauer durch FcRn-vermitteltes Recycling (Chaudhury *et al.*, 2006; Roopenian & Akilesh, 2007).

Die PEGylierung erfolgt üblicherweise durch chemische Kopplung eines aktivierten Derivats an Lysinseitenketten oder Cysteinreste, wobei in der Regel ein heterogenes Reaktionsprodukt mit oftmals erheblich reduzierter Target-Affinität resultiert, vor allem bei der Kopplung mit mehreren PEG-Molekülen (Chapman *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit für die Modulierung des hydrodynamischen Volumens des VEGFR-3 bindenden Anticalins A5C3(QH) verwendete genetische Fusion mit der flexiblen PAS-Sequenz stellt eine Alternative zu den genannten Methoden dar, deren Vorteile vor allem in der definierten Stöchiometrie und regiospezifischen Kopplung liegen (Schlapschy *et al.*, 2013). Durch den kassettenartigen Charakter kann die PAS-Sequenz auf genetischer Ebene verlängert oder verkürzt und somit optimal an die Anforderungen des *in vivo* Imagings angepasst werden. In einer ersten *in vivo* Imaging Studie mit PASylierten Fab-Fragmenten gegen die Tumormarker CD20 und Her2 – fusioniert mit PAS-Polymeren verschiedener Längen (100, 200, 400 und 600 Aminosäuren) – konnte für beide Fabs eine hohe Anreicherung und ein optimaler Kontrast nach 24 h für die Fusionen mit PAS<sub>100</sub> und PAS<sub>200</sub> ermittelt werden (Mendler *et al.*, 2015).

Der Einsatz eines Anticalins mit vergrößertem hydrodynamischen Radius wurde erst kürzlich im Rahmen einer *in vivo* Imaging Studie des Tumormarkers MET erfolgreich demonstriert (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2014). Die Rezeptortyrosinkinase MET stellt aufgrund ihrer Funktionen bei der Proliferation und Migration von Tumorzellen sowie der mit einer Dysregulierung der MET-induzierten Signalaktivierung einhergehenden schlechten Prognose einen prognostischen Marker und einen Angriffspunkt gezielter Therapien dar. Das hoch spezifische antagonistisch wirksame Anticalin PRS-110 (Olwill *et al.*, 2013) wurde in PEGylierter Form mit <sup>89</sup>Zr-Desferrioxamin konjugiert und zeigte ausgeprägte dosisabhängige Anreicherung in MET exprimierenden Tumor-Xenograft-Mäusen (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2014). Zwei chemisch gekoppelte Polyethylenglycol-Moleküle dienten hierbei der Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und resultierten in einer ansteigenden Tumorakkumulation bis zu 24 h nach Injektion. Diese Ergebnisse verdeutlichen das große Potential der Anticaline als Radiopharmazeutika für die nicht-invasive theranostische Auswahl von Patienten für eine gezielte Therapie.

Aufgrund der modulierbaren Molekülgröße sowie der hohen Affinität und Spezifität stellt A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys als Ergebnis der vorliegenden Arbeit einen vielversprechenden Kandidaten für das *in vivo* Imaging von VEGFR-3 positiven Tumoren dar. Die optimale Länge des PAS-Anhängsels für einen hohen Kontrast ist in zukünftigen präklinischen *in vivo* Studien zu ermitteln.





## 5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des kombinatorischen Protein-Engineerings aus einer randomisierten Lcn2-Bibliothek drei Anticaline mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten und Bindungsmodi gegen die extrazellulären Domänen 1 und 2 des VEGFR-3 selektiert. Die drei Anticaline S3A9, A5C3(QH), A4N10(KK) – mitunter erhalten nach Affinitätsmaturierung – weisen Target-Affinitäten im niedrigen picomolaren Bereich sowie hohe Spezifität auf, was grundsätzlich für eine Eignung zur Anwendung in der Radio-Immundiagnostik (RID) von Tumorerkrankungen spricht. Welches der drei Kandidaten dabei die beste Tumor-Anreicherung aufzeigt, muss künftig im Rahmen der präklinischen Evaluierung der Anticaline in Tumor-Xenograft-Tiermodellen untersucht werden. Die Anticaline A5C3(QH) und S3A9 interferieren mit der VEGF-C Ligandenbindestelle des VEGFR-3 und können somit die ligandeninduzierte Internalisierung des Rezeptors unterbinden. Generell sollte der Einfluss der Anticaline auf die Signalaktivierung des VEGFR-3 in An- und Abwesenheit von VEGF-C (und VEGF-D) zunächst im *Tube Formation Assay* oder im Sphäroidmodell (Tvorogov *et al.*, 2010) untersucht werden. In Abhängigkeit der Ergebnisse *in vitro* könnten die Anticaline S3A9 und A5C3(QH) Potential für eine Anwendung in der Tumorthherapie zeigen. Aufgrund ihrer Interferenz mit der VEGF-C Ligandenbindestelle des VEGFR-3 können sie möglicherweise die Aussprossung neuer Gefäßstrukturen und die Metastasierung über die Lymphbahnen inhibieren.

Für das gezielte Targeting der tumorassoziierten Neoangiogenese und Lymphangiogenese im Mausmodell wäre eine Kreuzreaktivität der Anticaline mit dem murinen VEGFR-3 (mVEGFR-3) wünschenswert. A5C3(QH) besitzt mit  $K_D = 60$  nM bereits eine moderate Affinität für den murinen Rezeptor. Auf dieser Grundlage kann durch erneute Diversifizierung der Ligandenbindestelle des Anticalins in Kombination mit einem *in vitro* Selektionsverfahren im Prinzip ein Abkömmling von A5C3(QH) mit verbesserter Affinität für mVEGFR-3 generiert werden.

Aufgrund der kleinen Molekülgröße der Anticaline von ca. 20 kDa können diese des Weiteren als VEGFR-3 spezifische „Bausteine“ zur Konstruktion von bifunktionellen Wirkstoffen dienen und mit einem anderen Binde- oder Effektorprotein, oder auch mit einem zweiten Anticalin – resultierend in einem sogenannten *Duocalin* (Schlehuber & Skerra, 2001) – fusioniert werden. Hierbei wäre sogar eine Kombination des VEGF-C unabhängigen Anticalins A4N10(KK) mit dem die Ligandenbindestelle blockierenden Anticalin A5C3(QH) denkbar.

Ein auf diesem Prinzip basierendes Fusionsprotein wurde bereits in Form eines sogenannten chelatierenden rekombinanten Antikörpers (CRAb) generiert (Neri *et al.*, 1995). Hierzu wurde ein bispezifisches Antikörperfragment bestehend aus zwei verschiedenen scFv-Fragmenten, welche benachbarte nicht-überlappende Epitope auf dem Target-Antigen erkennen, in flexibler Weise miteinander fusioniert, so dass eine simultane Bindung beider Epitope möglich war. Durch die gleichzeitige Bindung beider CRAb-Komponenten, ähnlich der mehrzähligen Bindung eines Metallions durch einen Chelator, wird eine erhöhte apparente Affinität gegenüber dem monomeren Antigen erreicht. Bei der Konstruktion eines chelatierenden gegen VEGFR-3 gerichteten Duocalins ist die Auswahl eines Linkers mit geeigneter Länge entscheidend. Die PAS-Sequenz erscheint aufgrund ihres sehr flexiblen Charakters und des günstigen Effekts auf die Produktionsausbeuten hierfür besonders geeignet, wobei die optimale Länge des PAS-Linkers experimentell zu ermitteln ist.

Besonders für die nuklearmedizinische Anwendung in der Radio-Immundiagnostik durch bildgebende Verfahren stellt die im Hinblick auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften engierte Variante A5C3(QH)-PAS<sub>200</sub>-Cys-NOTA einen guten Ausgangspunkt für Versuche im Tiermodell dar. Die Markierung mit dem Radiometall <sup>64</sup>Cu bietet hierbei ein für PET geeignetes Radioisotop. <sup>64</sup>Cu besitzt eine radioaktive Halbwertszeit von 12,7 h und erscheint damit passend für die Kombination mit dem mit einer verlängerten Zirkulationsdauer ausgestatteten PASylierten Anticalin.

Die grundsätzliche Eignung des VEGFR-3 als Target für die diagnostische Bilgebung konnte bereits in einer ersten Imaging Studie in Mäusen demonstriert werden (Huhtala *et al.*, 2010). Der gegen den murinen VEGFR-3 gerichtete Ratten-Antikörper mF4-31C1 (Pytowski *et al.*, 2005) stellte den Ausgangspunkt für den dabei verwendeten Tracer dar und wurde für die Bildgebung durch SPECT mit dem Metallchelat DTPA-<sup>111</sup>In chemisch konjugiert. In Mäusen mit orthotop implantierten Ovarkarzinom-Xenograft-Tumoren konnte eine deutliche Anreicherung dieses Tracers detektiert werden. Aufgrund der für Antikörper typischen Pharmakokinetik wurde jedoch erst 48 h p.i. eine signifikante Akkumulation von  $5,77 \pm 0,62$  % ID/g ermittelt. Diese vielversprechenden Ergebnisse demonstrieren demnach die Eignung des VEGFR-3 als Target für das *in vivo* Imaging und bieten eine Grundlage für die präklinische Evaluierung verschiedener Anticalinformate als Radiotracer mit verbesserten Eigenschaften.

## 6 Zusammenfassung

Die Mitglieder der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) sind Mediatoren der Angiogenese und Lymphangiogenese und erfüllen wichtige Funktionen bei der Versorgung und dem Wachstum von Tumoren. Der lymphangiogene VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR-3) und seine Liganden VEGF-C und VEGF-D haben sich aufgrund ihrer Expression in den Endothelzellen von Tumor-assoziierten Blutgefäßen und ihrer Rolle bei der Metastasierung zu vielversprechenden Zielstrukturen für die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen entwickelt.

Mit dem Ziel, Proteinreagenzien für die diagnostische Bildgebung zu erzeugen, wurden in dieser Arbeit Anticaline gegen die extrazellulären Domänen 1 und 2 (D1-2) des VEGFR-3 durch kombinatorisches Protein-Engineering generiert. Anticaline basieren auf dem Gerüst der Lipocaline, hier speziell des humanen Lipocalin 2 (Lcn2), auf dessen Grundlage durch konzertierte Randomisierung von 20 ausgewählten Aminosäurepositionen innerhalb der Ligandenbindestelle eine Lcn2-Zufallsbibliothek konstruiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Phage Display-Methode Lcn2-Varianten mit Bindungsaktivität für VEGFR-3(D1-2) selektiert. Die VEGFR-3 Domänen 1 und 2 wurden hierzu in *E. coli* funktionell produziert und dienten als Zielstrukturen. Gleichzeitig wurde der komplette extrazelluläre Teil des Rezeptors VEGFR-3(D1-7) in einem humanen Zellkultursystem produziert und für das anschließende ELISA-Screening eingesetzt, um so die Identifizierung von solchen Lcn2-Varianten zu ermöglichen, die ein glycosylierungsunabhängiges Epitop erkennen.

Nach sechs Phage Display Anreicherungszyklen wurden aus einem Pool von ca. 280 Varianten im ELISA-Screening Kandidaten mit Bindungsaktivität gegenüber D1-2 sowie D1-7 identifiziert und diese zur weiteren Charakterisierung im präparativen Maßstab in *E. coli* produziert. Für sechs Lcn2-Varianten konnte in der analytischen Gelfiltration ein monomeres Elutionsprofil ähnlich dem Wildtyp-Lcn2 bestätigt werden. Die Untersuchung der Bindungsaktivität im ELISA zeigte für die drei vielversprechendsten Varianten, A5C3, S3A9 und U3D7, sowohl für D1-2 als auch für D1-7 jeweils vergleichbare Affinitäten zwischen 12 und 171 nM. Die genauere Bestimmung der Bindungskonstanten mit Hilfe der SPR-Spektroskopie offenbarte für A5C3 und S3A9 gegenüber D1-7 picomolare Affinitäten von 8 bzw. 253 pM, U3D7 wies einen höheren  $K_D$ -Wert von 75 nM auf.

Zur näheren Charakterisierung wurden die drei Anticaline im Hinblick auf ihre Bindungsmodi und Kreuzreaktivität gegenüber dem nah verwandten VEGFR-2 untersucht, wobei speziell die Domänenspezifitäten sowie das Bindungsverhalten in Gegenwart des natürlichen Liganden VEGF-C durch SPR qualitativ analysiert wurden. Hierbei konnte mit Hilfe der in *E. coli* produzierten Einzeldomänen für U3D7 ein in Domäne 2 gelegenes, VEGF-C unabhängiges Epitop identifiziert werden. A5C3 und S3A9 hingegen wiesen eine mit VEGF-C überlappende Bindestelle und einer in D1 und D2 gelegenen Interaktionsfläche auf. Keines der drei Anticaline zeigte Kreuzreaktivität gegenüber VEGFR-2.

Das Anticalin A5C3 wies im Gegensatz zu seiner hervorragenden Affinität nur eine geringe Produktionsausbeute in *E. coli* auf, was sich in einer monomeren Proteinausbeute von durchschnittlich 65 µg je 2 L Expressionskultur und einem Aggregatanteil von 16 % äußerte. Zur Verbesserung der Löslichkeit dieses Anticalins wurden auf der Grundlage eines *in silico* generierten

Modells von A5C3 hydrophobe Oberflächenbereiche identifiziert und darin ausgewählte Positionen durch ortsgerichtete Mutagenese gegen hydrophile Reste ausgetauscht. Die Kombination zweier in der hydrophoben Schleifenregion Nr. 2 gelegener Substitutionen, F71Q und Y77H, führte bei nur geringfügig veränderter Affinität zu einer um den Faktor 13 erhöhten monomeren Proteinausbeute mit einem Aggregatanteil von lediglich 5 %.

Aufgrund seines von VEGF-C unabhängigen Epitops und dem strikt monomeren Oligomerisierungsverhalten wurde auch das Anticalin U3D7 weiterentwickelt und in diesem Fall hinsichtlich seiner Affinität optimiert. Hierzu wurde die Antigenbindestelle des Anticalins durch Error-Prone PCR erneut diversifiziert und die resultierende Bibliothek dem Phage Display unterzogen, wobei D1-7 als Zielstruktur fungierte. In zwei Maturierungsrunden wurde die Affinität von U3D7 von 75 nM auf zunächst 10 nM und schließlich auf 329 pM erhöht. Die resultierende Variante A4N10(E44K/E100K) unterscheidet sich durch vier Mutationen von U3D7.

Die Bindung des VEGFR-3 im nativen Zellkontext wurde schließlich durch Immunfluoreszenzfärbung der VEGFR-3 exprimierenden Tumorzelllinie U-251 MG nachgewiesen. Die drei teilweise optimierten Anticaline zeigten hierbei spezifische Zellfärbung anhand des Rezeptors, was durch einen Überschuss D1-2 blockiert werden konnte. Die quantitative Bestimmung der Bindungsaktivität des nativ auf der Zelloberfläche vorliegenden Rezeptors erfolgte zudem für die löslichkeitsoptimierte Variante A5C3(F71Q/Y77H) in einem kompetitiven radioaktiven Assay, wobei ein  $IC_{50}$  von 4 nM ermittelt wurde. Schließlich wurde das Kompetitionsvermögen von A5C3(F71Q/Y77H) und S3A9 gegenüber dem VEGFR-3 Liganden VEGF-C im kompetitiven ELISA bestimmt, wobei sich  $K_i$ -Werte von 10 bzw. 16 nM ergaben.

Die Lcn2-Variante A5C3 diente zudem als Grundbaustein für die Konstruktion von bifunktionellen Anticalinformaten. Durch Fusion mit dem Reporterprotein eGFP wurde in dieser Arbeit ein sogenanntes „*ChromoCalin*“ generiert und dessen Funktionalität im ELISA wie auch der Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Darüberhinaus wurde durch PASylierung ein speziell für die Anforderungen der Radio-Immundiagnostik zugeschnittenes Anticalin mit verlängerter Plasmahalbwertszeit konstruiert, welches durch einen freien Cysteinrest zudem für die regioselektive Markierung mit einem Metallchelat geeignet ist. Der humane Ursprung des Lcn2-Grundgerüsts und die demzufolge zu erwartende niedrige Immunogenität bieten zudem eine Grundvoraussetzung zur Anwendung der hier generierten für VEGFR-3 spezifischen Anticaline in der *in vivo* Diagnostik oder Therapie.

## 7 Literatur

- Abbady, A.Q., Al-Shemali, R., Mir Assaad, J. & Murad, H. (2014) Generation and characterization of nanobodies against rhGH expressed as sfGFP fusion protein. *Gen Comp Endocrinol* 204, 33-42.
- Åkerström, B., Flower, D.R. & Salier, J.P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 1482, 1-8.
- Åkerström, B., N. Borregaard, N., Flower, D.A. & Salier, J.-S. (2006) *Lipocalins*. Landes Bioscience, Georgetown, Texas.
- Albrecht, V., Richter, A., Pfeiffer, S., Gebauer, M., Lindner, S., Gieser, E., Schuller, U., Schichor, C., Gildehaus, F.J., Bartenstein, P., Tonn, J.C., Skerra, A. & Glass, R. (2016) Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. *Int J Cancer* 138, 1269-1280.
- Alitalo, A. & Detmar, M. (2012) Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene* 31, 4499-4508.
- Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T.V. (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 438, 946-953.
- Almo, S.C. & Love, J.D. (2014) Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol* 26C, 39-43.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- Arap, M.A. (2005) Phage display technology: applications and innovations. *Genet Mol Biol* 28, 1-9.
- Arpino, J.A., Rizkallah, P.J. & Jones, D.D. (2012) Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35 Å resolution reveals alternative conformations for Glu222. *PLoS one* 7, e47132.
- Auclair, S.M., Bhanu, M.K. & Kendall, D.A. (2012) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* 21, 13-25.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10037-10041.
- Baldwin, M.E., Halford, M.M., Roufail, S., Williams, R.A., Hibbs, M.L., Grail, D., Kubo, H., Stacker, S.A. & Achen, M.G. (2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 25, 2441-2449.
- Bandaranayake, A.D. & Almo, S.C. (2014) Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett* 588, 253-260.

- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10, 411-421.
- Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K. & Silverman, G.J. (2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bergers, G. & Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8, 592-603.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- 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.
- Binder, U., Matschiner, G., Theobald, I. & Skerra, A. (2010) High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. *J Mol Biol* 400, 783-802.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7297-7301.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- Bullock, W.O., Fernandes, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-378.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Chapman, A.P., Antoniow, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S. & King, D.J. (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol* 17, 780-783.
- Chaudhury, C., Brooks, C.L., Carter, D.C., Robinson, J.M. & Anderson, C.L. (2006) Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* 45, 4983-4990.
- Cheng, Y. & Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.
- Compton, J.R., Legler, P.M., Clingan, B.V., Olson, M.A. & Millard, C.B. (2011) Introduction of a disulfide bond leads to stabilization and crystallization of a ricin immunogen. *Proteins* 79, 1048-1060.

- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Cudmore, M.J., Hewett, P.W., Ahmad, S., Wang, K.Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., Miller, M.R., Newby, D.E., Gu, Y., Barleon, B., Weich, H. & Ahmed, A. (2012) The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun* 3, 972.
- de Haard, H.J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S.E., Roovers, R.C., Henderikx, P., de Bruine, A.P., Arends, J.W. & Hoogenboom, H.R. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem* 274, 18218-18230.
- Diamandis, E.P. & Christopoulos, T.K. (1991) The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 37, 625-636.
- Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.
- Dreher, M.R., Liu, W., Michelich, C.R., Dewhirst, M.W., Yuan, F. & Chilkoti, A. (2006) Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 98, 335-344.
- Drummen, G.P. (2012) Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques – illuminating biological and biomedical research. *Molecules* 17, 14067-14090.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Duffaud, G. & Inouye, M. (1988) Signal peptidases recognize a structural feature at the cleavage site of secretory proteins. *J Biol Chem* 263, 10224-10228.
- Eggenstein, E., Eichinger, A., Kim, H.J. & Skerra, A. (2014) Structure-guided engineering of Anticalins with improved binding behavior and biochemical characteristics for application in radio-immuno imaging and/or therapy. *J Struct Biol* 185, 203-214.
- Europäisches Arzneibuch (2016) 8. Ausgabe, 8. Nachtrag (Ph. Eur. 8.8), Monographie 8.8/0125. Deutscher Apotheker Verlag.
- Fani, M. & Maecke, H.R. (2012) Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39 Suppl 1, S11-30.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 25, 581-611.

- Ferrara, N. (2005) VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 11-16.
- Ferrara, N. & Adamis, A.P. (2016) Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 15, 385-403.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J. & Moore, M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- 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.
- Förster, C., Schubert, M., Pietzsch, H.-J. & Steinbach, J. (2011) Maleimido-Functionalized NOTA Derivatives as Bifunctional Chelators for Site-Specific Radiolabeling. *Molecules* 16, 5228-5240.
- Friedrich, L., Kornberger, P., Mendler, C.T., Multhoff, G., Schwaiger, M. & Skerra, A. (2017) Selection of an Anticalin® against the membrane form of Hsp70 via bacterial surface display and its theranostic application in tumour models. *Biol Chem*, [Epub ahead of print].
- Fuh, G., Li, B., Crowley, C., Cunningham, B. & Wells, J.A. (1998) Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 273, 11197-11204.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Walker, J.M. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G. & Skerra, A. (2013) Combinatorial design of an anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol* 425, 780-802.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13, 245-255.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2012) Anticalins. *Methods Enzymol* 503, 157-188.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2015) Alternative Protein Scaffolds as Novel Biotherapeutics. In Rosenberg, A. & Demeule, B. (Eds.) *Biobetters: Protein Engineering to Approach the Curative*. Springer, New York.
- Georgiou, G. & Segatori, L. (2005) Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* 16, 538-545.
- Ghetie, V. & Ward, E.S. (2002) Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res* 25, 97-113.
- Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. University of Cambridge.



- Gierasch, L.M. (1989) Signal sequences. *Biochemistry* 28, 923-930.
- Gieser, E. (2014) VEGF-Rezeptor 3 als vielversprechendes Target im malignen Gliom. *Neurochirurgische Klinik und Poliklinik*. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gille, H., Hülsmeier, M., Trentmann, S., Matschiner, G., Christian, H.J., Meyer, T., Amirkhosravi, A., Audoly, L.P., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2015) Functional characterization of a VEGF-A-targeting Anticalin, prototype of a novel therapeutic human protein class. *Angiogenesis*, 1-16.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10, 1033-1043.
- Gopal, G.J. & Kumar, A. (2013) Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. *Protein J* 32, 419-425.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grau, S.J., Trillsch, F., Herms, J., Thon, N., Nelson, P.J., Tonn, J.-C. & Goldbrunner, R. (2007) Expression of VEGFR3 in glioma endothelium correlates with tumor grade. *J. Neurooncol.* 82, 141-150.
- Green, N.M. (1970) Spectrophotometric determination of avidin and biotin. *Methods in Enzymol.* Academic Press, New York.
- Griffiths, A.D., Williams, S.C., Hartley, O., Tomlinson, I.M., Waterhouse, P., Crosby, W.L., Kontermann, R.E., Jones, P.T., Low, N.M., Allison, T.J. & et al. (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J* 13, 3245-3260.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hansted, J.G., Pietikainen, L., Hog, F., Sperling-Petersen, H.U. & Mortensen, K.K. (2011) Expressivity tag: a novel tool for increased expression in Escherichia coli. *J Biotechnol* 155, 275-283.
- Haugland, R.P. (1995) Coupling of monoclonal antibodies with fluorophores. *Methods Mol Biol* 45, 205-221.
- He, Y., Kozaki, K., Karpanen, T., Koshikawa, K., Yla-Herttuala, S., Takahashi, T. & Alitalo, K. (2002) Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 94, 819-825.

- Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12501-12504.
- Helenius, A. & Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.
- Hiller, Y., Gershoni, J.M., Bayer, E.A. & Wilchek, M. (1987) Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochem J* 248, 167-171.
- Hirakawa, S., Brown, L.F., Kodama, S., Paavonen, K., Alitalo, K. & Detmar, M. (2007) VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 109, 1010-1017.
- Histed, S.N., Lindenberg, M.L., Mena, E., Turkbey, B., Choyke, P.L. & Kurdziel, K.A. (2012) Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl Med Commun* 33, 349-361.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- Holmes, D.I. & Zachary, I. (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* 6, 209.
- Hughes, D. (2001) Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J Mol Evol* 53, 77-79.
- Huhtala, T., Laakkonen, P., Sallinen, H., Ylä-Herttua, S. & Närvänen, A. (2010) In vivo SPECT/CT imaging of human orthotopic ovarian carcinoma xenografts with <sup>111</sup>In-labeled monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol* 37, 957-964.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.
- Jarasch, A., Kopp, M., Eggenstein, E., Richter, A., Gebauer, M. & Skerra, A. (2016) ANTICALIgN: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel* 29, 263-270.
- Jeltsch, M. (2006) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/VEGF-C Mosaic Molecules Reveal Specificity Determinants and Feature Novel Receptor Binding Patterns. *J Biol Chem* 281, 12187-12195.
- Jenny, B., Harrison, J.A., Baetens, D., Tille, J.-C., Burkhardt, K., Mottaz, H., Kiss, J.Z., Dietrich, P.-Y., De Tribolet, N., Pizzolato, G.P. & Pepper, M.S. (2006) Expression and localization of VEGF-C and VEGFR-3 in glioblastomas and haemangioblastomas. *J Pathol* 209, 34-43.
- Jimenez, X., Lu, D., Brennan, L., Persaud, K., Liu, M., Miao, H., Witte, L. & Zhu, Z. (2005) A recombinant, fully human, bispecific antibody neutralizes the biological activities mediated by both vascular endothelial growth factor receptors 2 and 3. *Mol Cancer Ther* 4, 427-434.

- Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G., Edström, Å., Müller Hillgren, R.M. & Hansson, A. (1995) Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. *J Mol Recognit* 8, 125-131.
- Joukov, V., Kumar, V., Sorsa, T., Arighi, E., Weich, H., Saksela, O. & Alitalo, K. (1998) A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 273, 6599-6602.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. & Alitalo, K. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 15, 290-298.
- Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N. & Alitalo, K. (1997) Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. *Embo J* 16, 3898-3911.
- Karkkainen, M.J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T.V., Jeltsch, M., Jackson, D.G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C. & Alitalo, K. (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5, 74-80.
- Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* 145, 229-240.
- Karpanen, T., Egeblad, M., Karkkainen, M.J., Kubo, H., Ylä-Herttuala, S., Jäättelä, M. & Alitalo, K. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61, 1786-1790.
- Kaur, S., Venkaraman, G., Jain, M., Senapati, S., Garg, P.K. & Batra, S.K. (2012) Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett.* 315, 97-111.
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B. & Trout, B.L. (2011) Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol J* 6, 38-44.
- Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc* 131, 3565-3576.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. & Claesson-Welsh, L. (2011) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 437, 169-183.
- Kocks, C. & Rajewsky, K. (1988) Stepwise intraclonal maturation of antibody affinity through somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8206-8210.
- Kremers, G.J., Gilbert, S.G., Cranfill, P.J., Davidson, M.W. & Piston, D.W. (2011) Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* 124, 157-160.

- Kurenova, E.V., Hunt, D.L., He, D., Fu, A.D., Massoll, N.A., Golubovskaya, V.M., Garces, C.A. & Cance, W.G. (2009) Vascular endothelial growth factor receptor-3 promotes breast cancer cell proliferation, motility and survival in vitro and tumor formation in vivo. *Cell Cycle* 8, 2266-2280.
- Laakkonen, P., Waltari, M., Holopainen, T., Takahashi, T., Pytowski, B., Steiner, P., Hicklin, D., Persaud, K., Tonra, J.R., Witte, L. & Alitalo, K. (2007) Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* 67, 593-599.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laffly, E. & Sodoyer, R. (2005) Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Hum Antibodies* 14, 33-55.
- Lee, D.Y. & Li, K.C. (2011) Molecular theranostics: a primer for the imaging professional. *AJR. American journal of roentgenology* 197, 318-324.
- Lee, J., Gray, A., Yuan, J., Luoh, S.M., Avraham, H. & Wood, W.I. (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1988-1992.
- Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.
- Leppänen, V.-M., Jeltsch, M., Anisimov, A., Tvorogov, D., Aho, K., Kalkkinen, N., Toivanen, P., Ylä-Herttua, S., Ballmer-Hofer, K. & Alitalo, K. (2011) Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity. *Blood* 117, 1507-1515.
- Leppänen, V.-M., Prota, A.E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Kalkkinen, N., Strandin, T., Lankinen, H., Goldman, A., Ballmer-Hofer, K. & Alitalo, K. (2010) Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2425-2430.
- Leppänen, V.M., Tvorogov, D., Kisko, K., Prota, A.E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Markovic-Mueller, S., Stutfeld, E., Goldie, K.N., Ballmer-Hofer, K. & Alitalo, K. (2013) Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12960-12965.
- Lerchner, A., Daake, M., Jarasch, A. & Skerra, A. (2016) Fusion of an alcohol dehydrogenase with an aminotransferase using a PAS linker to improve coupled enzymatic alcohol-to-amine conversion. *Protein Eng Des Sel* 29, 557-562.
- Lobo, E.D., Hansen, R.J. & Balthasar, J.P. (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93, 2645-2668.
- Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. & Alitalo, K. (2009) VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 21, 154-165.

- Lyakhov, I., Zielinski, R., Kuban, M., Kramer-Marek, G., Fisher, R., Chertov, O., Bindu, L. & Capala, J. (2010) HER2- and EGFR-specific affiprobos - novel recombinant optical probes for cell imaging. *ChemBioChem* 11, 345-350.
- Macarulla, T., Sauri, T. & Tabernero, J. (2014) Evaluation of aflibercept in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther* 14, 1493-1505.
- Mahmood, I. & Green, M.D. (2005) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clin Pharmacokinet* 44, 331-347.
- Mäkinen, T., Jussila, L., Veikkola, T., Karpanen, T., Kettunen, M.I., Pulkkanen, K.J., Kauppinen, R., Jackson, D.G., Kubo, H., Nishikawa, S., Ylä-Herttua, S. & Alitalo, K. (2001) Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 7, 199-205.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L. & Plummer, T.H., Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* 180, 195-204.
- Mandriota, S.J., Jussila, L., Jeltsch, M., Compagni, A., Baetens, D., Prevo, R., Banerji, S., Huarte, J., Montesano, R., Jackson, D.G., Orci, L., Alitalo, K., Christofori, G. & Pepper, M.S. (2001) Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 20, 672-682.
- Martineau, P. (2002) Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs. In O'Brien, P.M. & Aitken, R. (Eds.) *Antibody Phage Display*. Humana Press.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McColl, B.K., Baldwin, M.E., Roufail, S., Freeman, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Alitalo, K., Stacker, S.A. & Achen, M.G. (2003) Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* 198, 863-868.
- Meerman, H.J. & Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* 12, 1107-1110.
- Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2015) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *mAbs* 7, 96-109.
- Model, P. & Russel, M. (1988) Filamentous bacteriophage. In Calendar, R. (Ed.) *The Bacteriophages*. Plenum Press, New York.
- 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.

- Müller, D., Karle, A., Meissburger, B., Höfig, I., Stork, R. & Kontermann, R.E. (2007) Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem* 282, 12650-12660.
- Mutschler, E. (1981) *Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12, 279-284.
- Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H., Eichinger, A. & Skerra, A. (2006) Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci* 15, 190-199.
- National Cancer Institute (2013) Tumor Grade. 3 May 2013 ed., <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/tumor-grade>.
- Neri, D., Momo, M., Prospero, T. & Winter, G. (1995) High-affinity antigen binding by chelating recombinant antibodies (CRAbs). *J Mol Biol* 246, 367-373.
- Neuberger, M.S. & Milstein, C. (1995) Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 7, 248-254.
- Nguyen, A., Reyes, A.E., 2nd, Zhang, M., McDonald, P., Wong, W.L., Damico, L.A. & Dennis, M.S. (2006) The pharmacokinetics of an albumin-binding Fab (AB.Fab) can be modulated as a function of affinity for albumin. *Protein Eng Des Sel* 19, 291-297.
- Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., Soderberg, O., Anisimov, A., Kholova, I., Pytowski, B., Baldwin, M., Yla-Herttuala, S., Alitalo, K., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. (2010) VEGF receptor 2/3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *Embo J* 29, 1377-1388.
- Nygren, P.Å. & Skerra, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 290, 3-28.
- Olwill, S.A., Joffroy, C., Gille, H., Vigna, E., Matschiner, G., Allersdorfer, A., Lunde, B.M., Jaworski, J., Burrows, J.F., Chiriaco, C., Christian, H.J., Hülsmeier, M., Trentmann, S., Jensen, K., Hohlbaum, A.M. & Audoly, L. (2013) A highly potent and specific MET therapeutic protein antagonist with both ligand-dependent and ligand-independent activity. *Mol Cancer Ther* 12, 2459-2471.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395.
- Paavonen, K., Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T. & Alitalo, K. (2000) Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol* 156, 1499-1504.
- Pajusola, K., Aprelikova, O., Armstrong, E., Morris, S. & Alitalo, K. (1993) Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene* 8, 2931-2937.

- Pajusola, K., Aprelikova, O., Pelicci, G., Weich, H., Claesson-Welsh, L. & Alitalo, K. (1994) Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 9, 3545-3555.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J. & Wright, D.A. (1996) QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies* 9, 3-4.
- Perchiacca, J.M., Ladiwala, A.R., Bhattacharya, M. & Tessier, P.M. (2012) Aggregation-resistant domain antibodies engineered with charged mutations near the edges of the complementarity-determining regions. *Protein Eng Des Sel* 25, 591-601.
- Perelson, A.S. (1989) Immune network theory. *Immunol Rev* 110, 5-36.
- Persaud, K., Tille, J., Liu, M., Zhu, Z., Jimenez, X., Pereira, D., Miao, H., Brennan, L., Witte, L. & Pepper, M. (2004) Involvement of the VEGF receptor 3 in tubular morphogenesis demonstrated with a human anti-human VEGFR-3 monoclonal antibody that antagonizes receptor activation by VEGF-C. *J Cell Sci* 117, 2745-2756.
- Petrausch, U., Dervedde, J., Coelho, V., Panjideh, H., Frey, D., Fuchs, H., Thiel, E. & Deckert, P.M. (2007) A33scFv-green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel* 20, 583-590.
- Petrova, T.V., Bono, P., Holnthoner, W., Chesnes, J., Pytowski, B., Sihto, H., Laakkonen, P., Heikkilä, P., Joensuu, H. & Alitalo, K. (2008) VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell* 13, 554-556.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Pontén, J. & Macintyre, E.H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, 465-486.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Pratap, J. & Dikshit, K.L. (1998) Effect of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase from *Escherichia coli*: requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol Gen Genet* 258, 326-333.
- Prinz, W.A., Åslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* 272, 15661-15667.
- Pytowski, B., Goldman, J., Persaud, K., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D.J., Skobe, M., Boardman, K.C. & Swartz, M.A. (2005) Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* 97, 14-21.

- Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. (2011) Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 13, 51-76.
- Rauth, S., Hinz, D., Borger, M., Uhrig, M., Mayhaus, M., Riemenschneider, M. & Skerra, A. (2016) High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Biochem J* 473, 1563-1578.
- 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.
- Rinderknecht, M., Villa, A., Ballmer-Hofer, K., Neri, D. & Detmar, M. (2010) Phage-derived fully human monoclonal antibody fragments to human vascular endothelial growth factor-C block its interaction with VEGF receptor-2 and 3. *PLoS One* 5, e11941.
- Roberts, N., Kloos, B., Cassella, M., Podgrabinska, S., Persaud, K., Wu, Y., Pytowski, B. & Skobe, M. (2006) Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res* 66, 2650-2657.
- Roopenian, D.C. & Akilesh, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M.C. & Leonhardt, H. (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3, 887-889.
- Saif, W.M., Knost, J.A., Chiorean, E.G., Kambhampati, S.R.P., Yu, D., Pytowski, B., Qin, A., Kauh, J.S. & O'Neil, B.H. (2015) Phase I study of anti-VEGF receptor-3 (VEGFR-3) monoclonal antibody (mab) LY3022856/IMC-3C5 (3C5). *ASCO Meeting Abstracts* 33, 3530.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schiefner, A. & Skerra, A. (2015) The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc Chem Res* 48, 976-985.
- 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., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26, 489-501.



- 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. *Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt*. Freising, Technische Universität München.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2001) Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol Chem* 382, 1335-1342.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called ‘anticalin’ – using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* 676, 337-345.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528-1535.
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8198-8203.
- Schots, A. & van der Wolf, J.M. (2002) Green fluorescent protein fluobody immunosensors. Immunofluorescence with GFP-antibody fusion proteins. *Methods Mol Biol* 183, 265-273.
- Schreiber, G. (2002) Kinetic studies of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 12, 41-47.
- Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1996) Rapid, electrostatically assisted association of proteins. *Nat Struct Biol* 3, 427-431.
- Schuck, P. (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 541-566.
- Sexton, K., Tichauer, K., Samkoe, K.S., Gunn, J., Hoopes, P.J. & Pogue, B.W. (2013) Fluorescent affibody peptide penetration in glioma margin is superior to full antibody. *PLoS One* 8, e60390.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567-1572.

- Shawber, C.J., Funahashi, Y., Francisco, E., Vorontchikhina, M., Kitamura, Y., Stowell, S.A., Borisenko, V., Feirt, N., Podgrabinska, S., Shiraishi, K., Chawengsaksophak, K., Rossant, J., Accili, D., Skobe, M. & Kitajewski, J. (2007) Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. *J Clin Invest* 117, 3369-3382.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. & Higgins, D.G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 1-6.
- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 20, 3551-3554.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Skerra, A. (2001) 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *Rev Mol Biotechnol* 74, 257-275.
- Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7, 683-693.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D.G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. & Detmar, M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 7, 192-198.
- Sleeman, J.P. & Thiele, W. (2009) Tumor metastasis and the lymphatic vasculature. *Int J Cancer* 125, 2747-2756.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Stacker, S.A., Achen, M.G., Jussila, L., Baldwin, M.E. & Alitalo, K. (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2, 573-583.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Su, J.-L., Yang, P.-C., Shih, J.-Y., Yang, C.-Y., Wei, L.-H., Hsieh, C.-Y., Chou, C.-H., Jeng, Y.-M., Wang, M.-Y., Chang, K.-J., Hung, M.-C. & Kuo, M.-L. (2006) The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. *Cancer Cell* 9, 209-223.
- Su, J.L., Chen, P.S., Chien, M.H., Chen, P.B., Chen, Y.H., Lai, C.C., Hung, M.C. & Kuo, M.L. (2008) Further evidence for expression and function of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer cells. *Cancer Cell* 13, 557-560.
- Swartz, J.R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 12, 195-201.

- Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellström, M., Schomber, T., Peltonen, R., Freitas, C., Duarte, A., Isoniemi, H., Laakkonen, P., Christofori, G., Ylä-Herttuala, S., Shibuya, M., Pytowski, B., Eichmann, A., Betsholtz, C. & Alitalo, K. (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454, 656-660.
- Tang, L., Persky, A.M., Hochhaus, G. & Meibohm, B. (2004) Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *J Pharm Sci* 93, 2184-2204.
- Terwisscha van Scheltinga, A.G., Lub-de Hooge, M.N., Hinner, M.J., Verheijen, R.B., Allersdorfer, A., Hülsmeier, M., Nagengast, W.B., Schröder, C.P., Kosterink, J.G., de Vries, E.G., Audoly, L. & Olwill, S.A. (2014) In vivo visualization of MET tumor expression and anticalin biodistribution with the MET-specific anticalin <sup>89</sup>Zr-PRS-110 PET tracer. *J Nucl Med* 55, 665-671.
- Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M. & Schirrmann, T. (2009) Affinity maturation by phage display. In Dimitrov, A.S. (Ed.) *Therapeutic Antibodies*. Humana Press.
- Thurber, G.M., Schmidt, M.M. & Wittrup, K.D. (2008) Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1421-1434.
- Trichonas, G. & Kaiser, P.K. (2013) Aflibercept for the treatment of age-related macular degeneration. *Ophthalmol Ther* 2, 89-98.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.
- Tvorogov, D., Anisimov, A., Zheng, W., Leppänen, V.-M., Tammela, T., Laurinavicius, S., Holnthoner, W., Heloterä, H., Holopainen, T., Jeltsch, M., Kalkkinen, N., Lankinen, H., Ojala, P.M. & Alitalo, K. (2010) Effective Suppression of Vascular Network Formation by Combination of Antibodies Blocking VEGFR Ligand Binding and Receptor Dimerization. *Cancer Cell* 18, 630-640.
- Ünak, T., Akgün, Z., Yildirim, Y., Duman, Y. & Erenel, G. (2001) Self-radioiodination of iodogen. *Appl Radiat Isot* 54, 749-752.
- UniProt Consortium (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 42, D191-198.
- Valtola, R., Salven, P., Heikkilä, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., deWaal, R. & Alitalo, K. (1999) VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 154, 1381-1390.
- Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'Connell, T., O'Connell, D., Auckenthaler, A. & Schwer, H. (2008) A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *BioTechniques* 45, 340-343.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *ChemBioChem* 5, 191-199.

- von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* 133, 17-21.
- von Heijne, G. (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol* 173, 243-251.
- 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.
- Walsh, G. (2010) Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* 15, 773-780.
- Webster, R. (2001) Filamentous phage biology. In Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K. & Silverman, G.J. (Eds.) *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S. & Carmeliet, P. (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* 123, 3190-3200.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A. & de Vos, A.M. (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91, 695-704.
- Winter, G. (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. *FEBS Lett* 430, 92-94.
- Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. & Searson, P.C. (2013) The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6, 7.
- Wu, A.M. & Senter, P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23, 1137-1146.
- Wu, S.J., Luo, J., O'Neil, K.T., Kang, J., Lacy, E.R., Canziani, G., Baker, A., Huang, M., Tang, Q.M., Raju, T.S., Jacobs, S.A., Teplyakov, A., Gilliland, G.L. & Feng, Y. (2010) Structure-based engineering of a monoclonal antibody for improved solubility. *Protein Eng Des Sel* 23, 643-651.
- Yang, K., Basu, A., Wang, M., Chintala, R., Hsieh, M.C., Liu, S., Hua, J., Zhang, Z., Zhou, J., Li, M., Phyu, H., Petti, G., Mendez, M., Janjua, H., Peng, P., Longley, C., Borowski, V., Mehlig, M. & Filpula, D. (2003) Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng* 16, 761-770.
- 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.
- Zeng, Y., Opeskin, K., Baldwin, M.E., Horvath, L.G., Achen, M.G., Stacker, S.A., Sutherland, R.L. & Williams, E.D. (2004) Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 by

lymphatic endothelial cells is associated with lymph node metastasis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 5137-5144.

Zhang, D., Li, B., Shi, J., Zhao, L., Zhang, X., Wang, C., Hou, S., Qian, W., Kou, G. & Wang, H. (2010) Suppression of tumor growth and metastasis by simultaneously blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and VEGF-C with a receptor-immunoglobulin fusion protein. *Cancer Res* 70, 2495-2503.

Zhang, L., Patel, H.N., Lappe, J.W. & Wachter, R.M. (2006) Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein. *J Am Chem Soc* 128, 4766-4772.



# Anhang

## A Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D1) aus cDNA:

```

5' -cctactccatgaccccccg- 3' AR19_for
      |||
agtggtactccatgaccccccg      gagcagcattcatcaacaagcctgaca
---+-----+-----+ ... ---+-----+-----+---
tcaccgatgaggtactggggggc      ctcgtcggtaagtagttgttcgactgt
                                   |||
                                   3' -gtaagtagttgttcgactgtcg- 5' AR20_rev

>> D1
SerGlyTyrSerMetThrProPro ... GluGlnProPheIleAsnLysProAsp
      25                                144

```

## B Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D2.1) aus cDNA:

```

5' -ccgagcagccattcatcaac- 3' AR21_for
      |||
gactttgagcagccattcatcaac      tccaacccttctctggtgcacatcaca
---+-----+-----+ ... +-----+-----+-----+
ctgaaactcgtcggtaagtagttg      aggttggggaaggaccacgtgtagtgt
                                   |||
                                   3' -gaaggaccacgtgtagtgttcg- 5' AR23_rev

>> D2.1
AspPheGluGlnProPheIleAsn ... SerAsnProPheLeuValHisIleThr
      136                                225

```

## C Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D2.2) aus cDNA:

```

5' -ccgacacgctccttggtcaac- 3' AR22_for
      |||
aagcctgacacgctccttggtcaac      tccaacccttctctggtgcacatcaca
---+-----+-----+ ... +-----+-----+-----+
ttcggactgtgcgagaaccagttg      aggttggggaaggaccacgtgtagtgt
                                   |||
                                   3' -gaaggaccacgtgtagtgttcg- 5' AR23_rev

>> D2.2
LysProAspThrLeuLeuValAsn ... SerAsnProPheLeuValHisIleThr
      144                                225

```

## D Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D3) aus cDNA:

```

5' -ccaacgagctctatgacatcc- 3' AR24_for
      |||
acaggcaacgagctctatgacatccag      cgggagagcaccgaggtcattgtg
---+-----+-----+ ... +-----+-----+-----+
tgtccgtgtgctcgagatactgtagtc      gccctcctcgtggtccagtaaac
                                   |||
                                   3' -ctcgtggtcctcagtaaacactcg- 5' AR25_rev

>> D3
ThrGlyAsnGluLeuTyrAspIleGln ... ArgGluSerThrGluValIleVal
      227                                327

```

## E Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D1-2) aus cDNA:

```

5' -cctactccatgaccccccg- 3' AR19_for
      |||
agtggtactccatgaccccccg      tccaacccttctctggtgcacatcaca
---+-----+-----+ ... +-----+-----+-----+
tcaccgatgaggtactggggggc      aggttggggaaggaccacgtgtagtgt
                                   |||
                                   3' -gaaggaccacgtgtagtgttcg- 5' AR23_rev

>> D1
SerGlyTyrSerMetThrProPro ... SerAsnProPheLeuValHisIleThr
      26                                225

```

**Abbildung A1| Amplifizierung von VEGFR-3 Domänen durch PCR.** Gezeigt sind die relevanten Genabschnitte zusammen mit den komplementären Oligodesoxynukleotidpaaren zur Amplifizierung der Domänen D1 (A), D2 (B, C), D3 (D), und D1-2 (E). Im Fall von D2 wurden zwei verschiedene Konstrukte, die sich in ihrer Länge um acht N-terminale Aminosäuren unterscheiden (D2.1 und D2.2), realisiert. Die Oligodesoxynukleotidpaare wurden als Primer für die Amplifizierung durch die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Zum Zweck der Klonierung wurde am 5'-Ende der Forwärtsprimer ein mit dem Leserahmen der *OmpA*-Signalsequenz kompatibler „CC“-Überhang, sowie am 5'-Ende des rückwärtigen Primers ein zusätzliches Basentriplett zur Rekonstitution der *Eco47III*-Schnittstelle nach der „Blunt-End“-Ligierung eingefügt (fett).



A Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D1-7) aus cDNA:

```

      NspV
5' -ACTCAATTCGAACCatgcagcggggcgccg- 3' AR44_for
      |||
      atgcagcggggcgccgctgtgc      gaggataagggcagcatggagatc
      -----+-----+----- ... -----+-----+-----
      tacgtcgccccgcggcgacacg      ctctattcccgctcgtacctctag
                                      |||
                                      3' -ttcccgctcgtacctctag- 5' AR43_rev
>> VEGFR-3 Signalsequenz      D7 <<
MetGlnArgGlyAlaAlaLeuCys ... GluAspLysGlySerMetGluIle
      1                                776
  
```

B Amplifizierung des Genabschnitts für VEGFR-3(D1-7) mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag aus dem Zwischenprodukt pASK75-OmpA-Flt4-D1-7-His:

```

      NspV
5' -ACTCAATTCGAACCatgcagcggggcgccg- 3' AR44_for
      |||
      atgcagcggggcgccgctgtgc
GCGCAGGACTCAATTCGAACCatgcagcggggcgccgctgtgc
      -----+-----+----- ... -----+-----+-----
      CGCGTCTGAGTTAAGCTTGGtacgtcgccccgcggcgacacg

OmpA      >> VEGFR-3 Signalsequenz
AlaGlnAspSerIleArgThrMetGlnArgGlyAlaAlaLeuCys
      -1                                1

      gagatcgctcaccatcaccatcaccatTAA
      ... -----+-----+-----+
      ctctagcgagtggtagtggtagtggtgtaATT
                                      |||
                                      3' -ggtagtggtagtggtgtaATTgCGCCGGCGtgatcat- 5' AR45_rev
      D7 <<                                NotI
      ... GluIleAlaHisHisHisHisHisHisHisEnd
      776
  
```

**Abbildung A2| Amplifizierung von D1-7 zur Konstruktion des Expressionsplasmids pM61-Flt4-D1-7-His.** (A) Ein für die Transfektion von humanen Zellen geeigneter Expressionsvektor wurde konstruiert, indem zunächst der D1-7 umfassende Genabschnitt aus der VEGFR-3-cDNA mit der Hercules II Fusion DNA-Polymerase unter Verwendung der Primer AR44\_for und AR43\_rev amplifiziert wurde. Für die C-terminale Fusion eines AH<sub>6</sub>-Affinitätsanhängsels wurde das Amplifikat in den unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen, mit *StuI/Eco47III* geschnittenen Vektor pASK75-OmpA-His mittels *Blunt End* inseriert und so das Zwischenprodukt pASK75-OmpA-D1-7-His erhalten. (B) Im zweiten Schritt wurde D1-7 zusammen mit dem C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag aus dem Plasmid amplifiziert und dabei mit den Überhängen der Primer AR44\_for und AR45\_rev die Schnittstellen für die *NspI* und *NotI* Restriktionsendonukleasen am 5'- bzw. 3'-Ende des Amplifikats eingeführt. Der 2382 bp umfassende Genabschnitt für D1-7-His wurde anschließend, nach Verdau mit *NspI* und *NotI*, mit dem Rückgrat des Plasmids pReceiver-M61-VEGFR-3 (ursprünglich als EX-M0928-M61 bezeichnet) ligiert und so der Expressionsvektor pM61-Flt4-D1-7-His erhalten.