

Lehrstuhl für Biologische Chemie
Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen

Evolutives Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin

Dipl.-Ing. Steffen Schlehuber

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra
2. Univ.-Prof. Dr. H. Klostermeyer, emeritiert

Die Dissertation wurde am 12.10.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 06.12.2001 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Proteinchemie am Institut für Biochemie, Fachbereich Chemie, der Technischen Universität Darmstadt begonnen und am Lehrstuhl für Biologische Chemie im Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München weitergeführt und abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. A. Skerra danke ich für die interessante und vielseitige Themenstellung, für zahlreiche inspirierende Diskussionen sowie das stete Interesse am Fortgang und Erfolg meiner Arbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Proteinchemie und des Lehrstuhls für Biologische Chemie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt meinem Vorgänger auf dem Arbeitsgebiet der Anticaline, Herrn Dr. Gerald Beste, sowie meinen Kollegen Markus Fiedler und Martin Vogt, die immer Zeit für einen wissenschaftlichen Disput fanden.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen danke ich Herrn Dr. F. J. Winkler; Herrn Dr. R. Medina danke ich für die Synthese eines Säulenmaterials.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits bzw. werden in Kürze durch folgende Veröffentlichungen der Fachwelt zugänglich gemacht:

Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A. (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* **297**, 1105-1120.

Schlehuber, S. & Skerra, A. (2001) Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* **382**, 1335-1342.

Schlehuber, S. & Skerra, A. Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – "anticalin" – using a molecular random approach. *Biophys. Chem.* accepted for publication.

Korndörfer, I. P., Schlehuber, S. & Skerra, A. The crystal structure of the DigA16 anticalin, an engineered digoxigenin binding variant of the bilin-binding protein from *Pieris brassicae*, shows a new alpha helix. In preparation.

Skerra, A. & Schlehuber, S. (1999) „Muteine des Bilin-Bindungsproteins“, Patentschrift DE 199 26 068 C1 (erteilt am 11. Januar 2001).

Meiner Familie

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline	1
1.2 Das Bilin-Bindungsprotein aus <i>Pieris brassicae</i>	4
1.3 „Anticaline“: Künstliche Bindungsproteine auf der Grundlage der Lipocalin-Architektur	7
1.4 Das Phagemid-Präsentationssystem und der Kolonie-Filterstapel-Test	9
1.5 Die Bibliothek randomisierter BBP-Varianten	11
1.6 Der Phasmidvektor für das <i>Phage Display</i> des BBP	15
1.7 Digoxigenin: Anwendungen in der Therapie und als molekularer Marker	18
1.8 Aufgabenstellung	20
2 Material & Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Biologisches Material	21
2.1.1 Plasmide	21
2.1.2 Oligodesoxynukleotide	22
2.1.4 Proteine bzw. Enzyme	23
2.1.5 Chemikalien	24
2.1.6 Standards und Kits	27
2.1.7 Geräte	28
2.1.8 Sonstiges Material	31
2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	33
2.2 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	40
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen mit Plasmid-DNA	40
2.2.2.1 Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	41
2.2.2.2 Transformation mittels Elektroporation	41
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	43
2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.2.3.2 Präparation von Einzelstrang-DNA	43
2.2.4 Gelelektrophorese von DNA	44
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	45
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	45
2.2.4.3 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese	45
2.2.5 <i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	46
2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	46
2.2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel	47

2.2.5.3 Sequenzierung doppelsträngiger DNA	48
2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.5.5 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	49
2.2.5.6 Dephosphorylierung von DNA	49
2.2.5.7 Entfernung überstehender DNA-Enden	50
2.2.5.8 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	50
2.2.5.9 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	51
2.3 Phagemid-Präsentation und -Selektion	51
2.3.1 Propagation von Helferphagen.....	51
2.3.2 Präparation rekombinanter Phagemide	52
2.3.2.1 Produktion von Phagemid-Bibliotheken.....	52
2.3.2.2 Amplifizierung selektierter Phagemide	54
2.3.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	54
2.3.3.1 Anreicherung durch Adsorption an funktionalisierte Polystyrolstifte	55
2.3.3.2 Anreicherung durch Adsorption an paramagnetische Partikel	56
2.3.4 Titerbestimmung von Phagemidlösungen.....	57
2.3.5 Kolonie-Filterstapel-Test	57
2.4 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	59
2.5 Proteinchemische Methoden	61
2.5.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose	61
2.5.2 Metallchelat-Affinitätschromatographie	62
2.5.3 Analytische <i>Batch</i> -Chromatographie	62
2.5.4 Gelpermeations-Chromatographie	63
2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.5.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	64
2.5.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	66
2.5.8 <i>Western Blotting</i>	70
2.6 Biophysikalische Methoden.....	71
2.6.1 Fluoreszenztitration.....	71
2.6.2 CD-Spektroskopie.....	74
2.6.3 Denaturierung durch Guanidiniumchlorid	78
2.6.4 Massenspektrometrie	80
2.7 Synthese von Affinitäts-Säulenmaterialien.....	80
2.7.1 Herstellung von Digoxigenin-Sepharose	80
2.7.2 Herstellung von 3-Glutaryl-5-pregnen-3 β -ol-20-on-Sepharose	81
3 Ergebnisse.....	83
3.1 Selektion Digoxigenin bindender BBP-Varianten.....	83
3.1.1 Reamplifizierung einer Bibliothek randomisierter BBP-Varianten.....	83

3.1.2	Affinitätsanreicherung von BBP-Varianten an mit Digoxigenin funktionalisierter Polystyroloberfläche.....	83
3.1.3	Konstruktion des Vektors pBBP22 und Anwendung im Kolonie-Filterstapel Test.....	85
3.2	Charakterisierung selektierter BBP-Varianten.....	88
3.2.1	DNA-Sequenzanalyse der selektierten Varianten.....	88
3.2.2	Bakterielle Produktion der BBP-Variante DigA.....	88
3.2.3	Funktionelle Charakterisierung der BBP-Variante DigA.....	90
3.3	Verbesserung der Bindungsaffinität von DigA durch <i>in vitro</i> -Affinitätsmaturierung.....	92
3.3.1	Gerichtete Zufallsmutagenese im ersten Schleifensegment des Lipocalins und Präparation einer partiell randomisierten Bibliothek.....	92
3.3.2	Selektion von DigA-Varianten mit verbesserter Affinität unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel und des Kolonie-Filterstapel-Tests.....	93
3.3.3	Sequenzanalyse der selektierten DigA-Varianten.....	96
3.3.4	Produktion der DigA-Varianten in <i>E. coli</i> und Bestimmung der Affinität für Digoxigenin.....	97
3.3.5	Einsatz von DigA und DigA16 zur Detektion von Digoxigenin-Gruppen in einem indirekten ELISA.....	99
3.3.6	Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften der Variante DigA16 mittels Fluoreszenztitration.....	101
3.4	Versuche zur weiteren Verbesserung der Bindungseigenschaften durch Affinitätsmaturierung von DigA16.....	105
3.4.1	Parallele Randomisierung der Schleifenbereiche Nr. 3 und 4.....	105
3.4.2	Selektion von Mutanten mittels <i>Phage Display</i> und Kolonie-Filterstapel-Test..	108
3.4.3	Sequenzanalyse der selektierten DigA16-Varianten.....	111
3.4.4	Produktion in <i>E. coli</i> und Liganden-Bindungsstudien.....	113
3.4.5	SDS-PAGE-Analyse von BBP, DigA und weiteren Digoxigenin bindenden Lipocalin-Varianten.....	116
3.5	Physikochemische Analyse von BBP und seinen Digoxigenin bindenden Varianten.	117
3.5.1	Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes mittels CD.....	117
3.5.2	Stabilität der BBP-Varianten gegenüber thermischer Denaturierung.....	118
3.5.3	Stabilität der BBP-Varianten gegenüber chemischer Denaturierung.....	121
3.6	„Duocaline“: Konstruktion bispezifischer Lipocalin-Varianten.....	123
3.6.1	Konstruktion des Vektors pBBP31 zur Fusion von DigA16 bzw. DigA16/19 mit der Fluorescein bindenden BBP-Variante FluA.....	123
3.6.2	Nachweis des bispezifischen Bindungsverhaltens im ELISA.....	125

3.6.3 Untersuchung der zweifachen Liganden-Bindungseigenschaft mittels Fluoreszenztitration.....	126
3.7 Konstruktion von bifunktionellen Fusionsproteinen aus den Digoxigenin bindenden BBP-Varianten und der Alkalischen Phosphatase	128
3.7.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pBBP27 und pBBP29	128
3.7.2 Produktion der Fusionsproteine in <i>E. coli</i>	130
3.7.3 Einsatz der Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Digoxigenin- Gruppen im <i>Western Blot</i>	131
3.7.4 Anwendung zur Bestimmung von Digoxigenin-Gruppen im ELISA.....	132
3.8 Untersuchungen zur Stöchiometrie der Komplexbildung zwischen den hergestellten BBP-Varianten und Digoxigenin am Beispiel von DigA16	134
3.8.1 Experimentelle Überprüfung des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten	135
3.8.2 Massenspektrometrische Untersuchungen an der BBP-Variante DigA16	136
3.8.3 Versuche zur Entfernung potentieller endogener Liganden aus dem bak- teriell produzierten Protein.....	137
3.8.3.1 Einsatz der Metallchelate-Affinitätschromatographie als alternative Methode zur Reinigung des rekombinanten Proteins	137
3.8.3.2 Gelfiltrationsexperimente mit nativem und denaturiertem DigA16	139
3.8.3.3 Bakterielle Produktion von DigA16 in Minimalmedium	141
3.8.4 Wiederherstellung der Salzbrücke zwischen Glu28 und Lys31 in der BBP- Variante DigA16	142
3.8.5 Versuche zur Quantifizierung des funktionellen Gehaltes in der Präparation der rekombinanten BBP-Variante durch <i>Batch</i> -Chromatographie an Digoxigenin-Sepharose.....	143
4 Diskussion	146
4.1 Selektion Digoxigenin bindender Anticaline durch Kombination von <i>Phage</i> <i>Display</i> mit einem Kolonie-Filterstapel-Test.....	146
4.2 Verbesserung der Digoxigenin-Bindung durch <i>in vitro</i> -Affinitätsmaturierung und Charakterisierung der Bindungseigenschaften.....	149
4.3 Effekt der substöchiometrischen Komplexbildung von Steroid-Liganden durch manche Anticaline.....	153
4.4 Anticaline als Reagenzien zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe.....	155
4.5 Anticaline als Grundlage bispezifischer Rezeptorproteine: Duocaline	157
4.6 Anticaline als Klasse neuartiger Bindungsproteine mit antikörperartigen Eigen- schaften	160
5 Zusammenfassung.....	164
6 Abkürzungsverzeichnis	166
7 Literatur.....	168

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline

Die Familie der Lipocaline (Sawyer, 1987) bildet mit derzeit mehr als einhundert bekannten Vertretern eine strukturell und funktionell vielseitige Gruppe kleiner extrazellulärer Proteine (Flower, 1996). Ihre Mitglieder zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Bindung kleiner, meist hydrophober Liganden, wie Retinoide, Steroide, Lipide oder Tetrapyrrole, in einer kelchartigen Bindungstasche aus, die namensgebend für die Proteinfamilie ist (gr.: *calyx* = Kelch). Die Lipocaline, die aus 140 bis 200 Aminosäuren bestehen, werden in zahlreichen unterschiedlichen Organismen gefunden, von Bakterien (Bishop & Weiner, 1996; Bishop, 2000) über Pflanzen (Hieber *et al.*, 2000) bis zum Menschen (Newcomer *et al.*, 1984). Sie erfüllen hierbei diverse physiologische Funktionen, wie z. B. die Vermittlung von Pheromon-Aktivität (Cavaggioni *et al.*, 1987), olfaktorische Reizleitung (Pevsner *et al.*, 1985), Speicherung von Pigmenten (Kayser, 1984), Transport von Vitaminen (Newcomer & Ong, 2000) enzymatische Katalyse (Urade *et al.*, 1989; Nagata *et al.*, 1991; Bugos *et al.*, 1998), sowie Aufgaben bei Zellregulationsprozessen und der Immunmodulation (Flower, 1996). Einige allergische Reaktionen des Menschen sind zudem auf die Wirkung von bestimmten Lipocalinen in tierischen Hautschuppen zurückzuführen. Die speziellen strukturellen Charakteristika, die für die allergenen Eigenschaften dieser Proteine verantwortlich sind, sind Gegenstand aktueller Forschung (Zeiler *et al.*, 1999; Lascombe *et al.*, 2000; Mäntyjärvi *et al.*, 2000).

Trotz ihrer funktionellen Vielfalt zeigen die Lipocaline eine bemerkenswerte strukturelle Homologie (Abbildung 1). Diese wird aus einer Überlagerung der bekannten Strukturen einer Reihe unterschiedlicher Lipocaline ersichtlich (Tabelle 1), welche fast ausnahmslos durch Röntgendiffraktometrie aufgeklärt wurden. Lediglich die Struktur des humanen Neutrophilen Gelatinase-assoziierten Lipocalins wurde zunächst durch Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt (Coles *et al.*, 1999). Die Proteinarchitektur der Lipocaline wird durch ein konserviertes Faltungsmuster aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen dominiert. Diese sind in zwei orthogonal gestapelten, sich gleichsinnig um eine zentrale Achse windenden β -Faltblättern angeordnet und bilden als Supersekundärstruktur ein sogenanntes β -Faß (β -*Barrel*) mit abgeflachtem bzw. leicht elliptischem Querschnitt aus. An einem Ende wird die konische Struktur durch Schleifensegmente in Kombination mit einer dichten Packung der Aminosäure-Seitenketten verschlossen. Die gegenüberliegende Seite des β -*Barrels* ist zum Lösungsmittel hin geöffnet. Sie bildet die kelchförmige Bindungstasche für die natürlichen Liganden der einzelnen Lipocaline aus, die durch paarweise Verknüpfung der einzelnen Faltblattstränge durch vier Peptidschleifen entsteht. Ein weiteres stark konserviertes Strukturmerkmal der Lipocaline ist ein kurzer α -helikaler Bereich in der Nähe des C-Terminus, dem ein gestrecktes Peptid-Segment folgt, sowie häufig eine kurze 3_{10} -Helix nahe des N-Terminus (vgl. Abbildung 2).

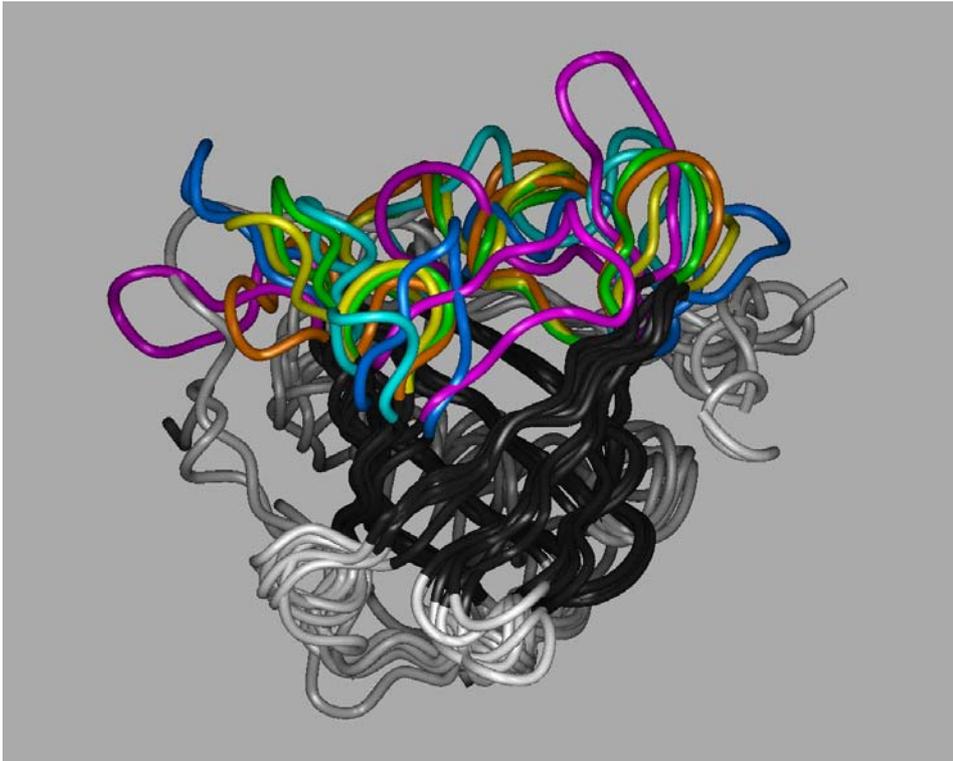


Abbildung 1: Überlagerung von sechs charakteristischen Lipocalin-Strukturen. Gezeigt ist der Verlauf der C_{α} -Atome der Polypeptidkette. Die vier Peptidschleifen der einzelnen Lipocaline, die die Liganden-Bindungsstellen ausbilden, sind farblich hervorgehoben: Retinol-Bindungsprotein (PDB-Eintrag: 1rbp) in magenta, Bilin-Bindungsprotein (1bbp) in blau, Major Urinary Protein (1mup) in gelb, epididymales Retinsäure-Bindungsprotein (1epa) in cyan, β -Lactoglobulin (1beb) in orange und Lipocalin-Allergen Bos d 2 (1bj7) in grün. Das β -Barrel ist in schwarz, die restliche Proteinstruktur in hellgrau dargestellt. Die Graphik wurde mit Hilfe der Software Insight II (Biosym/MSI) erstellt (mit freundlicher Genehmigung von A. Skerra).

Einige Mitglieder der rasch wachsenden Familie der Lipocaline weisen Besonderheiten in ihrer Tertiärstruktur auf. So besteht zum Beispiel das bovine Odorant-Bindungsprotein aus einem verschränkten Dimer, bei dem die α -Helix nahe des C-Terminus ein Strukturelement der jeweils anderen Proteindomäne bildet (Bianchet *et al.*, 1996). Das Nitrophorin 1 hingegen besitzt zwei zusätzliche α -Helices (Weichsel *et al.*, 1999; Montfort *et al.*, 2000), während im Fall des Triabin zwei β -Faltblattstränge aus dem β -Barrel eine im Vergleich zu den übrigen Lipocalinen invertierte Orientierung aufweisen (Fuentes-Prior *et al.*, 1997). Eine funktionelle Besonderheit zeigen die Tick Histamin-Bindungsproteine, die zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen für Histamin auf gegenüberliegenden Seiten der β -Barrel-Struktur ausbilden (Paesen *et al.*, 1999; Paesen *et al.*, 2000).

Obwohl die Tertiärstruktur aller Lipocaline sehr ähnlich ist, besitzen die einzelnen Proteine untereinander bloß schwache paarweise Sequenzhomologie, die teilweise unter 10 % betragen kann (Cowan *et al.*, 1990). Dennoch finden sich bei unterschiedlichen Vertretern kurze charakteristische Sequenzmotive, anhand derer heute eine eindeutige Zuordnung zur Proteinfamilie der Lipocaline möglich ist (Flower, 1996; Flower *et al.*, 2000). Diese strukturell kon-

servierten Regionen umfassen den β -Faltblattstrang A zusammen mit der vorangehenden 3_{10} -Helix, die Faltblattstränge F und G, einschließlich der verbindenden Peptidschleife, sowie den Faltblattstrang H mit dem sich anschließenden Peptidbereich (vgl. Abbildung 2) und zeichnen sich gleichzeitig durch eine überdurchschnittliche Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz aus.

Die Lipocaline bilden zusammen mit den Fettsäure-Bindungsproteinen und den Avidinen die Protein-Superfamilie der Calycine. Ähnlich den Lipocalinen sind die Mitglieder der beiden anderen Proteinfamilien in der Lage, kleine bzw. hydrophobe Liganden zu komplexieren, und sie weisen eine β -Barrel-Proteinarchitektur auf. Während die Fettsäure-Bindungsproteine jedoch eine zehnsträngige diskontinuierliche β -Faltblatt-Struktur besitzen, zeigen die Avidine ein den Lipocalinen entsprechendes achtsträngiges Faltungsmuster. Die von ihnen gebildete Kavität ist allerdings – verglichen mit dem β -Barrel der Lipocaline – von weniger elliptischem Querschnitt, und diese Proteine bilden stabile Tetramere aus.

Lipocalin	Spezies	PDB-Eintrag	Referenz
Bilin-Bindungsprotein	<i>Pieris brassicae</i>	1bbp	Huber <i>et al.</i> , 1987b
Epididymales Retinsäure-Bindungsprotein	<i>Rattus norvegicus</i>	1epa	Newcomer, 1993
		1epb	Newcomer, 1993
Insecticyanin	<i>Manduca sexta</i>	–	Holden <i>et al.</i> , 1987
β -Lactoglobulin	<i>Bos taurus</i>	1b0o	Wu <i>et al.</i> , 1999
		1beb	Papiz <i>et al.</i> , 1986; Bronlow <i>et al.</i> , 1997
		1bso	Qin <i>et al.</i> , 1998a
		1bsy	Qin <i>et al.</i> , 1998b
		2blg	Qin <i>et al.</i> , 1998b
		3blg	Qin <i>et al.</i> , 1998b
		1bsq	Qin <i>et al.</i> , 1999
Lipocalin-Allergen Bos d 2	<i>Bos taurus</i>	1bj7	Rouvinen <i>et al.</i> , 1999
Lipocalin-Allergen Equ c 1	<i>Equus caballus</i>	1ew3	Lascombe <i>et al.</i> , 2000
Major Urinary Protein	<i>Mus musculus</i>	1mup	Böcskei <i>et al.</i> , 1992
Neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin	<i>Homo sapiens</i>	1ngl*	Coles <i>et al.</i> , 1999
		1dfv	Goetz <i>et al.</i> , 2000
Nitrophorin 1	<i>Rhodnius prolixus</i>	1np1	Weichsel <i>et al.</i> , 1998
		2np1	Weichsel <i>et al.</i> , 1998
		3np1	Weichsel <i>et al.</i> , 1998
		4np1	Weichsel <i>et al.</i> , 1998
Nitrophorin 4	<i>Rhodnius prolixus</i>	1np4	Andersen <i>et al.</i> , 1998

Lipocalin	Spezies	PDB-Eintrag	Referenz	
Odorant-Bindungsprotein	<i>Bos Taurus</i>	1obp	Bianchet <i>et al.</i> , 1996	
		1pbo	Bianchet <i>et al.</i> , 1996	
	<i>Sus scrofa</i>	1a3y	Spinelli <i>et al.</i> , 1998	
Retinol-Bindungsprotein	<i>Sus scrofa</i>	1aqb	Zanotti <i>et al.</i> , 1998	
		<i>Homo sapiens</i>	1rbp	Cowan <i>et al.</i> , 1990
			1brp	Zanotti <i>et al.</i> , 1993a
	1brq		Zanotti <i>et al.</i> , 1993a	
	<i>Bos taurus</i>	1erb	Zanotti <i>et al.</i> , 1993c	
		1fel	Zanotti <i>et al.</i> , 1994	
		1fem	Zanotti <i>et al.</i> , 1994	
		1hbp	Zanotti <i>et al.</i> , 1993b	
		<i>Gallus gallus</i>	1hbq	Zanotti <i>et al.</i> , 1993b
			1rlb	Monaco <i>et al.</i> , 1995
1rlb			Monaco <i>et al.</i> , 1995	
Triabin	<i>Triatoma pallidipennis</i>	1avg	Fuentes-Prior <i>et al.</i> , 1997	
Tick Histamin-Bindungsprotein	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	1qft	Paesen <i>et al.</i> , 1999	
		1qfv	Paesen <i>et al.</i> , 2000	
Urinary α 2-Globulin	<i>Rattus norvegicus</i>	2a2g	Böcskei <i>et al.</i> , 1992;	
		2a2u	Chaudhuri <i>et al.</i> , 1999	

Tabelle 1: Lipocaline bekannter Tertiärstruktur. *Struktur wurde durch Kernspinresonanzspektroskopie bestimmt.

1.2 Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae*

Eines der ersten Lipocaline mit bekannter Kristallstruktur war das Bilin-Bindungsprotein (BBP) aus dem großen Kohlweißling *Pieris brassicae* (Abbildung 2). Seine Färbung erhält das BBP durch die Komplexierung des blau-grünen Chromophors Biliverdin IX γ (Abbildung 3; Rüdiger *et al.*, 1968; Kayser, 1984), welches ein Hauptfolgeprodukt der Porphyrin-Biosynthese in *Lepidoptera* darstellt. Zusammen mit gelben Carotinoiden ist das Holoprotein für die grüne Pigmentierung der Schmetterlingslarven und -puppen verantwortlich.

Die genaue physiologische Funktion des Bilin-Bindungsproteins ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde jedoch postuliert, daß die Hauptfunktion des Komplexes – neben der Färbung der Raupen – in der Photoprotektion des Imago besteht (McDonagh, 1979; Kayser, 1984; Schmidt & Skerra, 1994). Das BBP ist dabei entweder direkt an der Photoprotektion beteiligt oder stellt als stabile Speicherform für Biliverdin IX γ einen langlebigen und effektiven Quencher für Singulett-Sauerstoff dar, der den oxidativen Stress für das Insekt vermin-

dern kann. Eine zuvor postulierte photorezeptive Funktion des Holo­proteins (Vuillaume & Dattée, 1980) hingegen ist unwahrscheinlich, da die Expression der BBP-mRNA in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium während der Ontogenese sehr starken Schwankungen unterliegt. Diese Tatsache widerspricht einer Funktion des Bilin-Bindungsproteins als Photo­rezeptor, da die Genaktivität solcher Rezeptoren nicht in der beobachteten Weise schwanken sollte (Schmidt & Skerra, 1994).

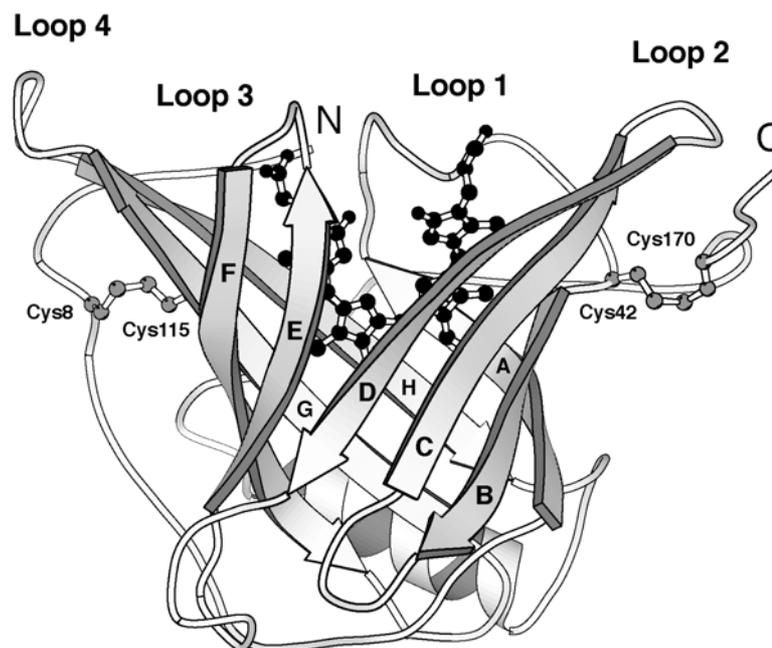


Abbildung 2: Kristallstruktur des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae*. Das Rückgrat des Proteins mit dem Verlauf der C_{α} -Atome ist als Bänder-Modell dargestellt. Zu sehen sind die acht antiparallelen β -Faltblattstränge (A-H), die als Supersekundärstruktur das β -Barrel ausbilden. N und C bezeichnen die entsprechenden Termini der Proteinkette. In der Bindungstasche, die durch die vier kurzen Peptidschleifen (Loops) Nr. 1 bis 4 ausgebildet wird, ist der natürliche Ligand Biliverdin IX γ als Kugel/Stab-Modell gezeigt. Auf der rechten bzw. linken Seite sind – ebenfalls als Kugel/Stab-Modell – die beiden Disulfidbrücken des Bilin-Bindungsproteins dargestellt. Die Graphik wurde mit Hilfe des Programmes MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und den Koordinaten des BBP (PDB-Eintrag: 1bbp; Huber *et al.*, 1987b) erstellt (mit freundlicher Genehmigung von A. Skerra).

Im Jahre 1988 konnte von Suter *et al.* durch automatisierten Edman-Abbau die 173 Aminosäure umfassende Polypeptidsequenz des BBP mit zwei Isoformen (BBP I und BBP II) bestimmt werden, die sich in der jeweiligen N-terminalen Aminosäure unterscheiden. In der vorherrschenden Form BBP I beginnt das Protein mit der Aminosäure Asparagin, die seltenere Isoform BBP II beginnt mit einem Aspartat-Rest am N-Terminus. Die Aminosäuresequenz des BBP I konnte 1994 durch Klonierung der cDNA – allerdings mit einem zusätzlichen C-terminalen Asparaginrest (Nr. 174) – bestätigt werden (Schmidt & Skerra, 1994). Für die Isoform BBP II konnte keine cDNA identifiziert werden. Somit entsteht die seltenere

Isoform des Bilin-Bindungsproteins vermutlich durch posttranslationale Deamidierungsreaktion am N-terminalen Asparagin-Rest aus BBP I. Das mature BBP besteht somit aus 174 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 19,8 kDa.

Die beiden Isoformen des Proteins wurden kristallisiert und ihre dreidimensionale Raumstruktur durch Röntgendiffraktometrie bestimmt (Huber *et al.*, 1987a; b). Von geringen Abweichungen am N-Terminus abgesehen ist die Struktur beider Formen identisch und zeigt die für die Lipocaline typische β -Barrel-Proteinarchitektur. Das Biliverdin wird im Holoprotein fast vollständig in der Bindungstasche des Bilin-Bindungsproteins eingebettet. Lediglich die geladenen Propionyl-Seitenketten des Chromophors ragen aus der Bindungstasche heraus. Durch die Art der Komplexierung wird einerseits die Wasserlöslichkeit des bei neutralem pH-Wert nahezu unlöslichen Biliverdins erreicht, andererseits wird sein chemisch labiles π -Elektronensystem vor oxidativer Zerstörung geschützt. Die optische Aktivität des in Lösung achrallen Biliverdins IX γ im Komplex mit dem BBP ist auf die zyklisch-helikale Bindung des linearen Chromophors und die dadurch induzierte rechtshändige Helizität zurückzuführen (Scheer & Kayser, 1988; Schneider *et al.*, 1988).

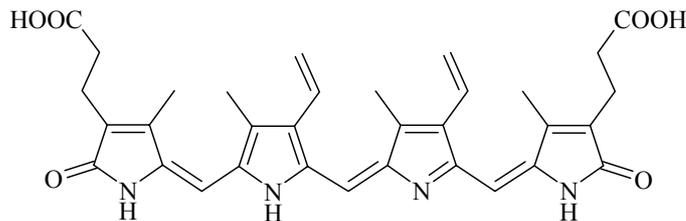


Abbildung 3: Strukturformel von Biliverdin IX γ , dem natürlichen Liganden des Bilin-Bindungsproteins.

Bilin-Pigmente, die durch oxidative Ringspaltung von Porphyrinen entstehen (Kikuchi & Yoshida, 1980), sind in biologischen Systemen weit verbreitet und in der Regel mit Proteinen assoziiert. Die bekanntesten Beispiele sind die Proteingruppen der Phytochrome und Phycobiliproteine, die regulatorische Aufgaben beim Stoffwechsel der Pflanzen bzw. Schlüsselfunktionen bei der Photosynthese der Cyanobakterien erfüllen.

1.3 „Anticaline“: Künstliche Bindungsproteine auf der Grundlage der Lipocalin-Architektur

Höhere Lebewesen sind stets dem Angriff von Mikroorganismen ausgesetzt. Zum Schutz vor Pathogenen hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem entwickelt. Ein Teil des Immunsystems, die humorale Immunität, richtet sich vor allem gegen Bakterien- und Virusinfektionen und wird durch die Proteinklasse der Antikörper (Immunglobuline) vermittelt. Die Immunglobuline sind in der Lage, nahezu jedes Antigen zu komplexieren.

Aufgrund dieser universellen Eigenschaft finden die Immunglobuline – bzw. heute auch deren rekombinante F_{ab} - und F_v -Fragmente – in der biochemischen Analytik, der medizinischen Diagnostik und sogar der Humantherapie weite Verbreitung. Doch auch in technischen Prozessen gewinnen Verfahren zur selektiven und hochaffinen Bindung von Liganden immer mehr an Bedeutung. Durch gezielte An- oder Abreicherung eines Inhaltsstoffes kann zum Beispiel die Wertigkeit eines Nahrungsmittels gesteigert und auf diese Weise ein verändertes Lebensmittel mit maßgeschneiderten Eigenschaften, sogenanntes *Novel Food*, hergestellt werden.

Der moderne Einsatz der Immunglobuline als universelle Bindungsmoleküle wurde allerdings erst praktikabel, nachdem das Methodenspektrum zur Herstellung von Antikörpern und ihren Fragmenten nach der klassischen Hybridomtechnik (Köhler & Milstein, 1975) durch deren effiziente funktionelle Produktion in *Escherichia coli* erweitert wurde (Skerra & Plückthun, 1988). Durch *Protein Engineering* von Antikörpern, vor allem durch Einsatz des *Phage Display* (Smith, 1985a; McCafferty *et al.*, 1990), ist es möglich geworden, maßgeschneiderte Bindungsproteine zu kreieren. Der Einsatz kombinatorischer Antikörper-Bibliotheken ermöglicht heutzutage sogar die Generierung quasi humaner Immunglobuline mit spezifischen Bindungseigenschaften *in vitro*, wobei die Immunisierung eines Tieres und anschließende aufwendige Humanisierung der gewonnenen Antikörper vermieden werden kann (Knappik *et al.*, 2000).

Trotzdem ergeben sich aus der Verwendung der Immunglobuline gewisse Nachteile. Antikörper – und auch deren F_{ab} -Fragmente – bestehen aus Heterodimeren zweier verschiedener Polypeptidketten. Dies führt in der Praxis zu komplizierten Klonierungsschritten, da stets zwei Strukturgene parallel gehandhabt und gleichzeitig exprimiert werden müssen (Skerra, 1993). Die Antigen-Bindungsstelle wird aus sechs hypervariablen Regionen gebildet, deren konzentrierte Manipulation zur Generierung synthetischer Molekülbibliotheken vergleichsweise kompliziert ist. Zudem sind Antikörper recht große Moleküle, deren Gewebepenetration bei therapeutischen Anwendungen daher oft eingeschränkt ist (Chester & Hawkins, 1995).

Selbst die kleinste antigenbindende Immunglobulin-Einheit – das F_v -Fragment – besteht noch aus ca. 250 Aminosäuren. Die proteinchemische Stabilität von F_v -Fragmenten ist darüber hi-

naus aufgrund der nicht kovalenten Assoziation von V_H - und V_L -Domäne begrenzt. Durch die Einführung eines flexiblen Peptid-*Linkers* zwischen den beiden Domänen wurde versucht, dieses Problem zu umgehen. Allerdings ergeben sich bei der Verwendung dieser sogenannten *Single Chain* F_V -Fragmente (scF_V) einige andere schwerwiegende Nachteile. In der Praxis werden eingeschränkte Faltungseigenschaften, verminderte Proteinstabilität und oft eine verschlechterte Ligandenbindung beobachtet. Die reduzierte Affinität ist dabei auf die Verbindung des N-Terminus einer der variablen Domänen, welcher in direkter räumlicher Nähe zur Antigen-Bindungsstelle liegt, mit dem Peptid-*Linker* zurückzuführen.

Die Summe dieser eher nachteiligen Eigenschaften der Immunglobuline führte zur Suche nach einfacheren molekularen Architekturen, die als künstliche Rezeptorproteine Einsatz finden könnten. Als solche kommen prinzipiell Proteine mit exponierten Oberflächenstrukturen in Frage, die Aminosäureaustausche tolerieren, ohne daß es dabei zu signifikanten Veränderungen ihrer Faltung kommt (Ku & Schultz, 1995). Zusätzlich sollten diese sogenannten Protein-*Scaffolds* (engl.: *scaffold* = Gerüst) aus nur einer Polypeptidkette bestehen, eine möglichst geringe Größe aufweisen und sich effizient gentechnisch produzieren lassen (Skerra, 2000a; b).

Neben wenigen anderen Gerüststrukturen erfüllen vor allem die Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie diese Voraussetzungen. Der Vergleich von dreidimensionalen Strukturen offenbart einerseits ihr bemerkenswert rigides Protein-Gerüst in Form des konservierten β -*Barrels* und andererseits die hohe strukturelle Variabilität ihrer vier exponierten Peptidschleifen, die die molekulare Oberfläche der Bindungstasche ausbilden (Abbildung 1). Mit einer Molekularmasse von nur ca. 20 kDa sind sie zudem sogar kleiner als F_V -Fragmente, die eine Molmasse von 25-30 kDa aufweisen. Aufgrund der ähnlichen Strukturprinzipien von Lipocalinen und Antikörperfragmenten (Schmidt, 1995) sollte es möglich sein, die Bindungsvielfalt und -spezifität der Immunglobuline durch Generieren neuer Bindungseigenschaften auf der Grundlage des Lipocalin-*Scaffolds* zumindest teilweise zu erreichen. So sollten durch Austausch bestimmter Aminosäuren innerhalb der variablen Peptidschleifen die molekulare Oberfläche der Bindungstasche verändert und verschiedene Liganden komplexiert werden können. Als Modellprotein zur Generierung neuer Bindungsspezifitäten wurde das BBP gewählt, da sich dessen vergleichsweise große und flache Bindungstasche bezüglich der sterischen Zugänglichkeit grundsätzlich zur Komplexierung vorgegebener Moleküle anbietet.

Bindungsaffinität für einen ausgewählten Zielliganden kann prinzipiell auf zwei Wegen erzeugt werden. Das rationale Design verwendet theoretische Vorhersagen mit den Methoden des *Molecular Modelling* (Essen & Skerra, 1994). Grundlage des eleganteren evolutiven Designs hingegen ist die experimentelle Herstellung einer Bibliothek von Proteinvarianten mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften durch gerichtete, konzertierte Zufallsmutagenese innerhalb der für die Bindungstasche kodierenden Bereiche. In einem kombinierten

Ansatz können dabei mit Hilfe des *Molecular Modelling* die für das Bindungsereignis voraussichtlich verantwortlichen Aminosäurepositionen bestimmt und so die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung von Protein-Varianten mit der gewünschten Ligandenspezifität erhöht werden. Zusätzlich können dabei für die korrekte Faltung verantwortliche Reste bestimmt und von der Mutagenesestrategie ausgenommen werden. Die Protein-Bibliothek wird dann einem geeigneten Selektionsverfahren unterworfen, um Varianten mit der gewünschten Bindungsspezifität zu isolieren (Wells & Lowman, 1992; O'Neil & Hoess, 1995).

Aus einer so generierten Bibliothek, die durch Randomisierung von 16 Aminosäurepositionen in der Bindungstasche des BBP erhalten wurde, konnten tatsächlich Varianten mit Affinität zu dem Modell-Hapten Fluorescein selektiert werden. Wegen der bestehenden Analogie zum Bindungsprinzip der Antikörper wurden daher die Proteine, deren artifizielle Bindungseigenschaften auf der Lipocalin-Proteinarchitektur beruhen, als „Anticaline“ bezeichnet (Beste *et al.*, 1999).

1.4 Das Phagemid-Präsentationssystem und der Kolonie-Filterstapel-Test

Grundlage aller bekannten Systeme zur Durchmusterung von Proteinbibliotheken bezüglich vorgegebener Eigenschaften ist die physikalische Kopplung von Phänotyp und Genotyp der einzelnen Protein-Varianten. Derzeit finden drei unterschiedliche Verfahren Anwendung, die sich in der Umsetzung dieser Vorgabe unterscheiden. Das Phagemid-Präsentationssystem oder *Phage Display* (Smith, 1985a; McCafferty *et al.*, 1990; Kay *et al.*, 1996), das *Ribosome Display* (Hanes & Plückthun, 1997) und das *Bacterial Surface Display* (Stahl & Uhlén, 1997). Von diesen Systemen hat die *Phage Display*-Technologie aufgrund ihrer problemlosen und gut etablierten Handhabung die weiteste Verbreitung gefunden.

Den Grundstein für diese Technologie legte Smith (1985a) durch die Konstruktion eines Fusionsproteins aus einem Peptidsegment der Restriktionsendonuklease *EcoRI* und dem *Minor Capsid Protein* pIII filamentöser Phagen der fd/M13-Familie (Übersicht in Model & Russel, 1988). Durch Verwendung eines gegen *EcoRI* gerichteten Antikörpers konnte er die funktionelle Präsentation des Peptid-Antigens auf der Oberfläche des filamentösen Phagen demonstrieren. Wenig später wurde gezeigt, daß rekombinante Phagemide, die bindungsaktive Proteindomänen oder Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren, durch Affinitätsanreicherung von nativen Phagen abgetrennt werden können (Parmley & Smith, 1988).

Um mit Hilfe der *Phage Display*-Methode auf gewünschte Bindungseigenschaften einzelner Vertreter aus einer Protein-Bibliothek zu selektieren, werden die Varianten auf der Oberfläche von Phagemiden präsentiert. Bei der zur Zeit geläufigsten Strategie, dem sogenannten monovalenten *Phage Display* werden die Strukturgene der einzelnen Mitglieder auf einem Phasmidvektor (Abschnitt 1.6) kloniert, so daß sie als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII ex-

primiert werden (Hoogenboom *et al.*, 1991; Wells & Lowman, 1992; Kay *et al.*, 1996). *E. coli*-Zellen, die mit den Phasmiden transformiert worden sind, werden anschließend zusätzlich mit einem Helferphagen infiziert. Dadurch wird das Phasmid in einzelsträngiger Form zusammen mit dem kodierten Fusionsprotein in Phagemide verpackt. Nach der Koinfektion werden hauptsächlich die nativen Hüllproteine des Helferphagen produziert. Bei geeigneter Genregulation wird dann bei etwa 10 % der Phagemide eine der fünf Kopien des Hüllproteins pIII durch ein Fusionsprotein ersetzt, während ca. 1 % der Phagemide zwei Kopien des Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche präsentieren (Lowman *et al.*, 1991; Bradbury *et al.*, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1995).

Phagemide sind natürlichen Bakteriophagen sehr ähnlich. Wie Bakteriophagen können sie *E. coli* infizieren und die verpackte Phasmid-DNA auf die infizierte Zelle übertragen. Dabei tragen sie jedoch das Fremdprotein in funktioneller Form auf ihrer Oberfläche. Zur Selektion bindungsaktiver Protein-Varianten wird die Gesamtheit einer Phagemidbibliothek einem Selektionsprozeß (*Panning*) zugeführt, bei dem Phagemide mit den gewünschten Bindungseigenschaften durch Adsorption an den immobilisierten Zielliganden von nicht bindenden Partikeln abgetrennt werden. Durch Amplifizierung selektierter Phagemide und wiederholtes *Panning* kommt es zu einer Anreicherung von Phagemiden mit Affinität zum vorgegebenen Liganden.

Durch Einsatz von Phagemid- oder Proteinpräparationen der isolierten Vertreter in einem ELISA können dann deren individuelle Bindungseigenschaften untersucht werden (Marks *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991). Alternativ kann die Phasmid-DNA selektierter Phagemide isoliert und zwecks Charakterisierung der Bindungseigenschaften der kodierten Proteine einem sogenannten Kolonie-Filterstapel-Test zugeführt werden (Skerra *et al.*, 1991). Die für die BBP-Varianten kodierenden Gen-Abschnitte werden dabei auf einem Vektor in der Weise kloniert, daß sie als Fusionsprotein mit der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) sekretiert werden. Nach der Transformation von *E. coli* werden diese auf der Oberfläche einer hydrophilen Membran ausplattiert und auf einer Agarplatte inkubiert, bis die Kolonien eine entsprechende Größe erreicht haben. Durch anschließende Inkubation der hydrophilen Membran auf einer Induktor-haltigen Agarplatte setzen die individuellen Kolonien partiell das Fusionsprotein frei. Dieses wird mit der ABD als molekularem Affinitätsanhängsel selektiv auf einer darunterliegenden hydrophoben, mit humanem Serum Albumin beschichteten Membran immobilisiert. Auf diese Weise entsteht ein Abbild der Kolonien in Form der funktionell adsorbierten BBP-Varianten. Nach der Induktionsperiode werden die Membranfilter voneinander getrennt und die Bindungsaktivität der einzelnen Varianten kann durch Zugabe eines geeigneten Nachweisreagenzes zur hydrophoben Membran detektiert werden. Hierzu kann zum Beispiel mit dem Zielliganden derivatisierte Alkalische Phosphatase unter Ausnutzung deren enzymatischer Aktivität dienen. So können *E. coli*-Kolonien, die

bindungsaktive BBP-Varianten sekretieren, effektiv und in parallelisierter Weise durchmustert werden.

Mit Hilfe des monovalenten *Phage Displays* in Verbindung mit dem Kolonie-Filterstapel-Test kann besonders einfach und effizient auf die Bindungsfähigkeit einzelner Proteine eines ganzen Ensembles an einen vorgegebenen Liganden selektiert werden.

1.5 Die Bibliothek randomisierter BBP-Varianten

Die Selektion von BBP-Varianten mit neuartigen Bindungseigenschaften setzt eine sinnvolle Auswahl der Zufallspositionen zum Zwecke der Generierung einer Bibliothek funktionell vielfältiger molekularer Oberflächen voraus. Auf der Basis struktureller Überlegungen wurden insgesamt sechzehn Aminosäuren identifiziert, die in direktem Kontakt zum natürlichen Liganden des BBP stehen und sich über die vier Peptidschleifen am offenen Ende des β -*Barrels* sowie angrenzende Bereiche erstrecken (Abbildung 4). Die ausgewählten Positionen sollten sowohl große als auch kleine Aminosäure-Substitutionen tolerieren. Gleichzeitig sollten sie möglichst tief in die Bindungstasche des BBP hineinragen, ohne dabei die dichte Packung der Seitenketten im hydrophoben Kern des Proteins zu beeinflussen, welche den unteren Teil der β -*Barrel*-Struktur ausbilden (Beste *et al.*, 1999).

Mit Ausnahme von Ser35 und Lys95 wurden zur Generierung der Zufallsbibliothek an den randomisierten Positionen alle 20 Aminosäuren zugelassen (Tabelle 2). Da diese beiden Aminosäuren dem Lösungsmittel in besonderer Weise exponiert sind, wurden in diesen Fällen apolare Substitutionen ausgespart. Neben den Zufallsmutationen wiesen alle BBP-Varianten zusätzlich die Aminosäure-Substitution Asn1→Asp auf. Somit entsprach ihre Sequenz nicht der klonierten cDNA des Bilin-Bindungsproteins (Schmidt & Skerra, 1994) sondern der Variante BBP II (siehe Abschnitt 1.2), die im Gegensatz zum BBP I als monomeres Holo-protein in Lösung auftritt. Außerdem trugen alle Varianten zwei durch die Einführung der Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI bedingte Mutationen (Asn21→Gln und Lys135→Met; vgl. Abbildung 5.) sowie einen Austausch Lys87→Ser, mit dem eine Protease-Erkennungssequenz im maturen BBP eliminiert wurde (Beste, 1998). Diese vier Aminosäure-Substitutionen bildeten auch die Grundlage für das in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-BBP.

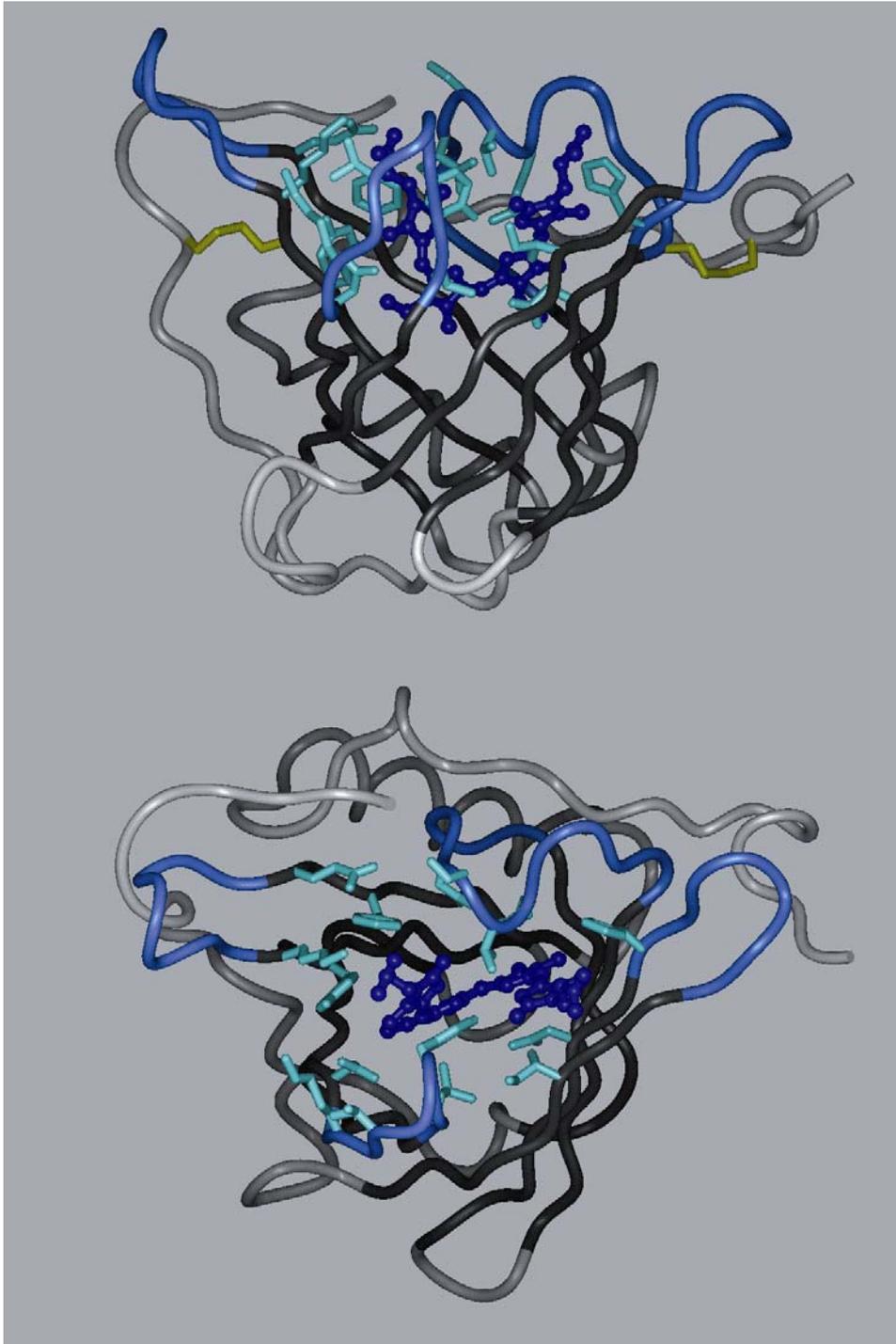


Abbildung 4: Räumliche Anordnung der Aminosäurepositionen zur Generierung einer BBP-Zufallsbibliothek. Wiedergegeben ist die Tertiärstruktur des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae* mit dem bänderförmigen Verlauf der Polypeptidkette (InsightII-Software). Die randomisierten Aminosäurepositionen sind in cyan dargestellt, die Farben des β -Barrels und der übrigen Schleifen entsprechen denen der Abbildung 1. Der natürliche Ligand des Bilin-Bindungsproteins, Biliverdin IX γ , ist in dunkelblau abgebildet. Oben: seitliche Perspektive. Unten: Blick von der offenen Seite in das Zentrum der Bindungstasche (mit freundlicher Genehmigung von A. Skerra).

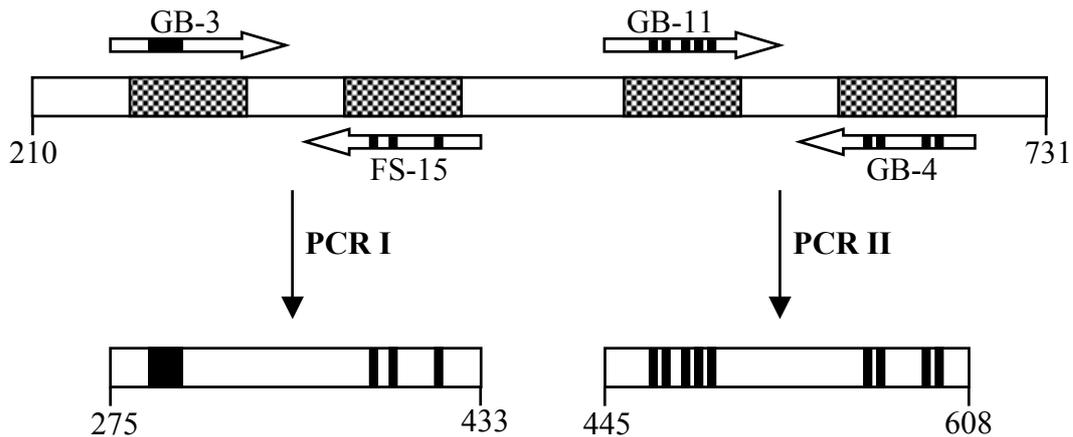
Position	Zufallskodon	erlaubte Substitutionen
Asn34	NNK	Xaa
Ser35	NMS	Xaa ohne Arg, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val
Val36	NNS	Xaa
Glu37	NNK	Xaa
Asn58	NNS	Xaa
His60	NNK	Xaa
Ile69	NNS	Xaa
Leu88	NNS	Xaa
Tyr90	NNK	Xaa
Val93	NNS	Xaa
Lys95	VVS	Xaa ohne Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val
Asn97	NNK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

Tabelle 2: Randomisierte Aminosäure-Positionen zur Generierung der BBP-Zufallsbibliothek (Beste, 1998). Die Nomenklatur der Zufallskodons folgte der NC-IUB (1985); Xaa steht für alle 20 Aminosäuren.

Für die konzertierte Mutagenese aller sechzehn Aminosäurepositionen wurde von Beste (1998) eine zweistufige PCR-Strategie etabliert (siehe auch Schmidt, 1995). Diese beruhte auf dem Einsatz von vier Oligodesoxynukleotiden mit degenerierten Basentriplets an den zu mutierenden Aminosäurepositionen, welche jeweils eine der vier zu mutierenden Peptidschleifen überspannte (siehe Abbildung 5). Je zwei der synthetischen Oligodesoxynukleotide bildeten ein *Primer*-Paar in der ersten Stufe der PCR. Sie wurden in einer von zwei parallel durchgeführten Amplifizierungsreaktionen eingesetzt. Auf diese Weise wurden zwei DNA-Fragmente produziert, von denen eines die randomisierten Gensegmente der Peptidschleifen Nr. 1 und 2, das andere Nr. 3 und 4 enthielt. In der zweiten Stufe wurden die isolierten und gereinigten Produkte dieser beiden PCR-Reaktionen als Matrize eingesetzt, wobei zwei flankierende *Primer* und ein Oligodesoxynukleotid, das die Lücke zwischen den beiden Gensegmenten überspannte, zugegeben wurden. Im Verlauf der Amplifizierungsreaktion wurden die Genfragmente innerhalb weniger PCR-Zyklen assembliert und gleichzeitig am 5'- bzw. 3'-Ende des resultierenden DNA-Fragmentes jeweils eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI eingeführt (Abbildung 5; siehe auch Abbildung 24). Die Schnittstellen dienten der gerichteten Insertion des BBP-Genpools in den Phasmidvektor pBBP20 (Abbildung 6) zum Zweck der Affinitätsanreicherung mittels *Phage Display* (siehe Abschnitt 1.6).

Weiterhin erlaubten diese Schnittstellen die Subklonierung selektierter BBP-Varianten in geeignete Vektoren für den Kolonie-Filterstapel-Test (siehe Abschnitt 1.4) sowie für die gentechnische Produktion in *E. coli*.

PCR (Stufe 1):



PCR (Stufe 2):

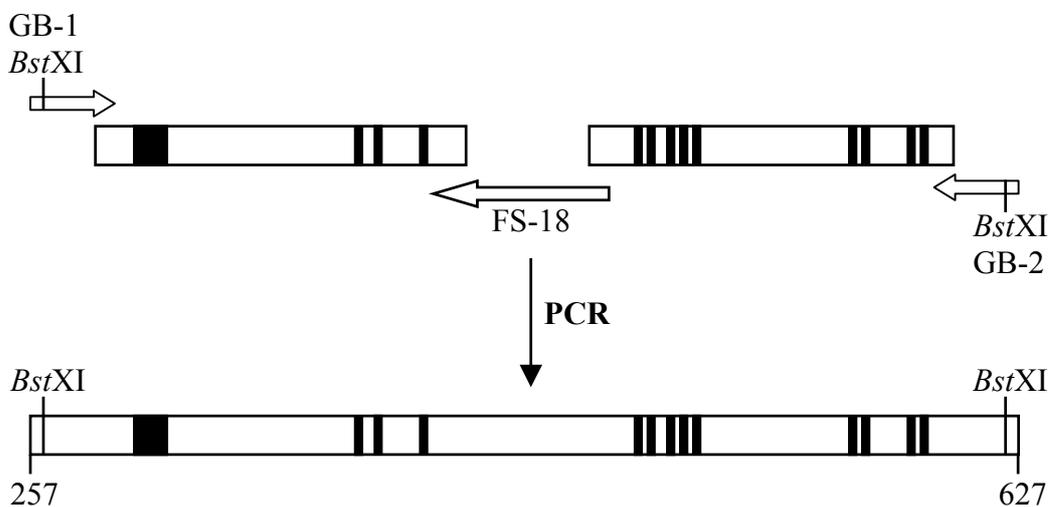


Abbildung 5: Zweistufige PCR-Strategie zur konzertierten Mutagenese von sechzehn Aminosäurepositionen im BBP. PCR (Stufe 1): Mit Hilfe der degenerierten *Primer*-Paare GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 wurden unter Verwendung des Phasmidvektors pBBP20 (Abbildung 6) mit dem klonierten BBP-Gen als Matrize zwei Fragmente separat amplifiziert (PCR I und PCR II). Die schwarzen Balken innerhalb der *Primer* sowie der entsprechenden Genabschnitte zeigen schematisch die Position der dabei randomisierten Kodons. PCR (Stufe 2): Die Genfragmente aus PCR (Stufe 1) wurden in der zweiten Stufe – zusammen mit den flankierenden *Primern* GB-1 und GB-2 sowie dem vermittelnden *Primer* FS-18 – als Matrize für die PCR-Assemblierung zum kompletten BBP-Genfragment eingesetzt. Die mittels GB-1 und GB-2 eingeführten, nicht kompatiblen Typ IIa-Restriktionsschnittstellen für *Bst*XI dienen zur Insertion der randomisierten BBP-Genkassette in den Vektor pBBP20.

Durch die vollständige konzertierte Mutagenese aller sechzehn Aminosäurepositionen nach der beschriebenen Strategie ließen sich theoretisch ca. 32^{16} verschiedene Mutanten des BBP erzeugen. In der Praxis konnte aufgrund der Limitation bei der Transformation von *E. coli* nur eine Komplexität von $3,7 \cdot 10^8$ unterschiedlichen Vertretern in der Bibliothek realisiert werden (Beste, 1998).

1.6 Der Phasmidvektor für das *Phage Display* des BBP

Zur Durchmusterung der Zufallsbibliothek des Bilin-Bindungsproteins mit Hilfe des monovalenten *Phage Display* fand der Phasmidvektor pBBP20 Verwendung (Abbildung 6; Beste *et al.*, 1999), der es erlaubt, BBP-Varianten in funktioneller Weise auf der Oberfläche filamentöser Phagemide des Typs M13 zu präsentieren. Gleichzeitig vermittelt er durch die intergenische Region des Phagen f1 (f1-IG) seine einzelsträngige Verpackung in das Phagemidpartikel. Der Vektor ist abgeleitet von dem generischen Expressionsplasmid pASK75, das eine besonders stringente Regulation der Genexpression erlaubt (Skerra, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit werden alle Plasmide, die sich durch die intergenische Region des Phagen f1 auszeichnen, als Phasmide bezeichnet.

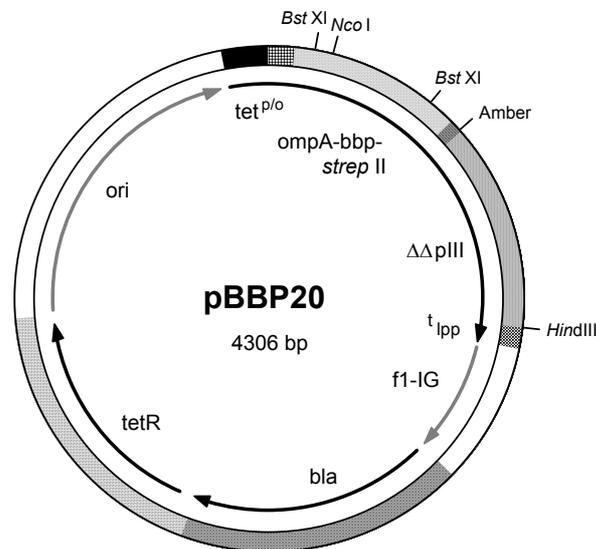


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Phasmidvektors pBBP20. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem BBP, dem *Strep*-tag II und einem N-terminal verkürzten Fragment des Phagenhüllproteins pIII ($\Delta\Delta pIII$, Aminosäuren 217 bis 406). Die Abkürzungen t_{lpp} , f1-IG, *bla*, *tetR* und *ori* bezeichnen den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Phagen f1, das β -Lactamasegen, das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors sowie den Replikationsursprung. *BstXI*, *NcoI* und *HindIII* bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen; *Amber* steht für das entsprechende Stoppkodon zwischen den Abschnitten für das BBP-*Strep*-tag II und das $\Delta\Delta pIII$.

Das Phasmid kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein aus bakterieller OmpA-Signalsequenz, dem BBP, dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) und dem C-terminalen Fragment des Phagenhüllproteins pIII ($\Delta\Delta$ pIII), welches die Aminosäuren 217 bis 406 umfaßt. Zwischen den kodierenden Sequenzen für das *Strep*-tag II und das verkürzte Phagenhüllprotein ist ein *Amber*-Stoppkodon inseriert.

Durch die bakterielle OmpA-Signalsequenz wird die Translokation des N-terminalen Segmentes des Fusionsproteins in das bakterielle Periplasma vermittelt (Movva *et al.*, 1980). Dabei durchspannt das C-terminale Fragment des Phagenhüllproteins die innere *E. coli*-Membran, gelangt zusammen mit den nativen Phagenproteinen zur Assemblierungsstelle für die naszierenden Phagemidpartikel und wird schließlich in das Phagemid eingebaut (Kay *et al.*, 1996).

Das intakte Gen III-Phagenhüllprotein wird strukturell in drei Domänen unterteilt, die aus 66, 131 bzw. 150 Aminosäuren bestehen und über glycinreiche *Linker* aus 19 bzw. 40 Aminosäuren untereinander verknüpft sind (Armstrong *et al.*, 1981). Die N-terminale und die mittlere Domäne (Aminosäuren 1 bis 66 bzw. 86 bis 216) sind für die Infektiosität der Phagenpartikel verantwortlich (Stengele *et al.*, 1990), wobei insbesondere die mittlere Domäne an der Adsorption des Bakteriophagen am F-Pilus von *E. coli* beteiligt ist. Die C-terminale Domäne (Reste 257 bis 406) dient der Verankerung des pIII in der Phagenhülle.

Aufgrund dieses modularen Aufbaus sind grundsätzlich zwei Wege zur Präsentation eines Fremdproteins auf der Oberfläche des Phagemids möglich. Das Protein kann einerseits mit dem vollständigen Hüllprotein pIII fusioniert werden, wie es zunächst für Antikörperfragmente beschrieben wurde (McCafferty *et al.*, 1990; Griffiths *et al.*, 1994). Andererseits kann auch ein N-terminal verkürztes Fragment – mit den Aminosäuren 198 bis 406 – als Fusionspartner dienen (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991), wobei verbesserte Phagemidproduktion beobachtet wurde. Der Grund dafür liegt vermutlich in der bei nicht vollständig reprimierbaren Promotoren stets konstitutiv synthetisierten Menge an Fusionsprotein. Die N-terminale und mittlere Domäne des pIII üben hierbei eine inhibitorische Wirkung auf die Superinfektion einer Phasmid-tragenden Wirtszelle durch den Helferphagen aus (Boeke *et al.*, 1982), da das gebildete Fusionsprotein vermutlich einen kompetitiven Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen dem Helferphagen und dem F-Pilus der *E. coli*-Zelle hat. Durch Deletionsstudien (Stengele *et al.*, 1990) und eine daraus resultierende funktionelle Unterteilung des pIII konnte gezeigt werden, daß die Reste 198 bis 216 des N-terminalen Fragmentes wahrscheinlich zur mittleren Domäne des pIII gehören. Durch die Verwendung eines weiter verkürzten C-terminalen pIII-Fragmentes in pBBP20 (Aminosäuren 217 bis 406; $\Delta\Delta$ pIII) konnte so die Phagemidproduktion im Fall des BBP erheblich verbessert werden (Beste, 1998).

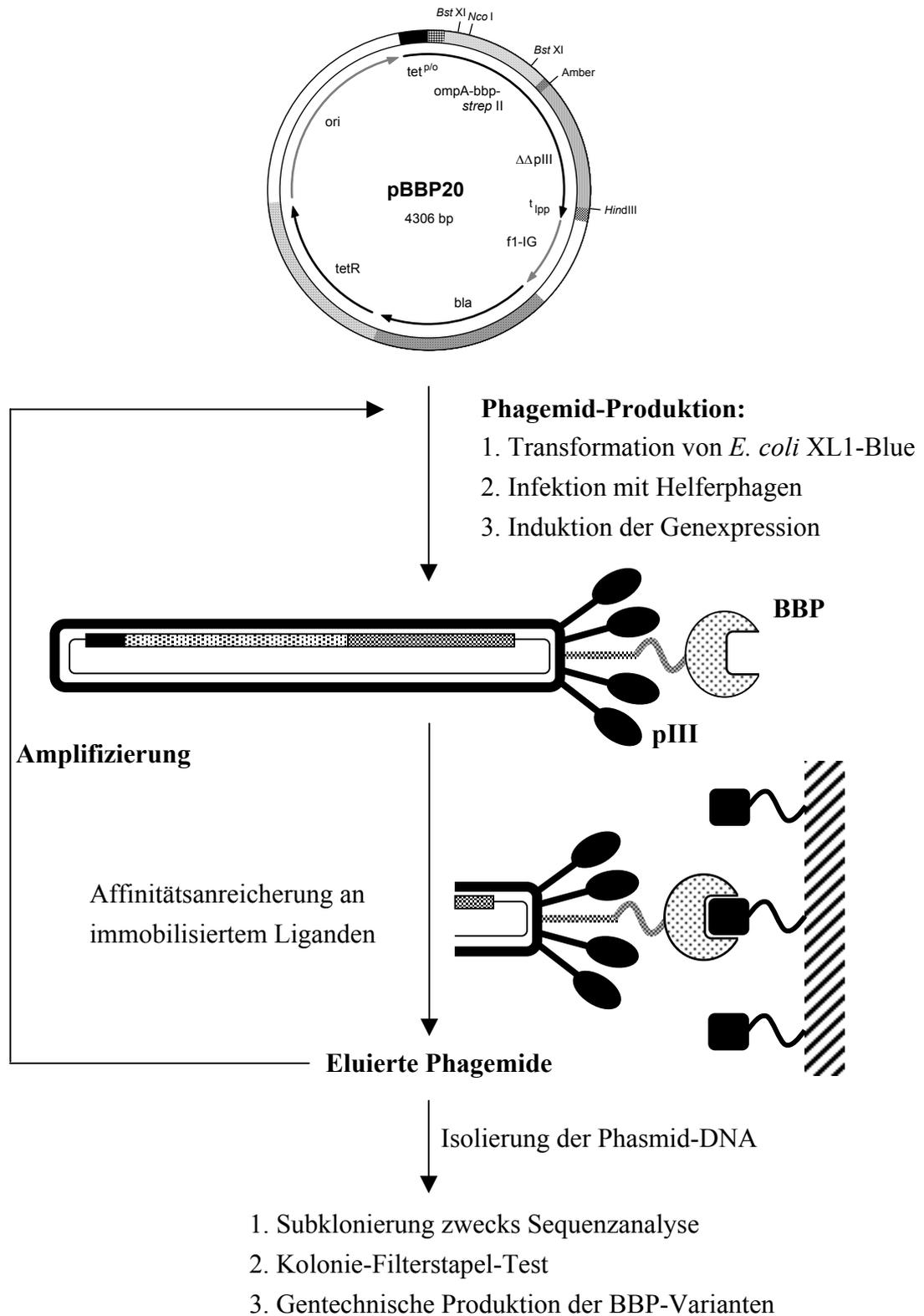


Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Funktionsweise des *Phage Display*. Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue mit einer Bibliothek von BBP-Varianten auf Grundlage des Phasmid-Vektors pBBP20 und anschließender Infektion mit Helferphagen wird die Genexpression induziert. Die gebildeten Phagemide werden einer Affinitätsanreicherung gegen den immobilisierten Liganden unterzogen. Selektierte Phagemide werden entweder amplifiziert und einem neuerlichen Anreicherungszyklus zugeführt oder für die Isolierung der Phasmid-DNA zum Zwecke der Charakterisierung selektierter Varianten eingesetzt.

Das *Amber*-Stoppkodon innerhalb des Fusionsgens sollte ursprünglich dem Zweck der alternativen Produktion sowohl der löslichen BBP-Varianten als auch des Fusionsproteins – unter Verwendung eines *Amber*-Suppressorstamms, wie *E. coli* XL1-Blue – dienen (Schmidt, 1995). Es zeigte sich aber, daß das Stoppkodon von Vorteil für die Produktion der Phagemide war. In einem *supE* *Amber*-Suppressorstamm wird die Translationstermination am Stoppkodon zu ca. 10 % durch den Einbau eines Glutamin-Restes in die wachsende Polypeptidkette umgangen (Miller, 1992).

Der versuchsweise Austausch gegen ein reguläres Glutaminkodon in diesem System führte im Verlauf der Phagemidproduktion insbesondere bei Induktion des Tetracyclin-Promotor/Operators zu erhöhter Toxizität für die infizierten Zellen (Stibora, Beste & Skerra, unveröffentlicht). Dies war vermutlich auf die auch in Abwesenheit des Induktors (wenn auch geringe) Menge gebildeten Fusionsproteins zurückzuführen. Durch das *Amber*-Stoppkodon verringert sich letztlich die Menge des produzierten BBP- $\Delta\Delta$ pIII-Fusionsproteins und somit ein potentiell ungünstiger Einfluß auf die Wirtszelle.

Für das monovalente *Phage Display* der Zufallsbibliothek des Bilin-Bindungsproteins (Abbildung 7) wurden schließlich *E. coli*-Zellen des *Amber*-Suppressorstammes XL1-Blue durch Elektroporation mit dem Ligierungsprodukt aus PCR-Fragment und pBBP20 (Abschnitt 1.5) transformiert. Durch Superinfektion der Transformanden mit VCS-M13 Helferphagen und anschließende Induktion der Genexpression wurden Phagemidpartikel produziert, die Varianten des BBP funktionell auf ihrer Oberfläche präsentierten und gleichzeitig das jeweilige Phasmid als einzelsträngiges Genom enthielten. Nach mehreren *Panning*-Zyklen wurde die Phasmid-DNA isoliert und entweder zur Identifizierung bindungsaktiver Varianten im Kolonie-Filterstapel-Test (siehe Abschnitt 1.4), zur Sequenzanalyse oder zur Produktion der löslichen Protein-Varianten eingesetzt.

1.7 Digoxigenin: Anwendungen in der Therapie und als molekularer Marker

Digoxigenin (Abbildung 8) ist eine hydrophile organische Verbindung, die zur Gruppe der herzwirksamen (cardioaktiven) Steroide gehört und daher von allgemeinem medizinischen Interesse ist (Smith, 1985b; Smith, 1988). Digoxin, das sich von Digoxigenin lediglich durch eine Trisaccharid-Substitution an Position C-3 des Steroid-Systems unterscheidet (vgl. Abbildung 8), war das meistverschriebene Medikament gegen Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen während der vergangenen zehn Jahre (Hauptman & Kelly, 1999).

Alle cardioaktiven Steroide besitzen die Eigenschaft, die Na^+/K^+ -ATPase (Na^+/K^+ -Pumpe) der Plasmamembran durch Komplexbildung einer innerhalb des Tierreiches stark konservierten Bindungsstelle hochspezifisch und sehr potent zu inhibieren. Die Na^+/K^+ -Pumpe baut einen

elektrochemischen Potentialgradienten über die Zellmembran auf, indem sie unter ATP-Verbrauch Na^+ -Ionen aus der Zelle heraus und K^+ -Ionen in die Zelle hinein transportiert. Der entstehende Konzentrationsgradient ist einerseits für die elektrische Erregbarkeit von Nervenzellen verantwortlich. Andererseits liefert er die freie Enthalpie für den aktiven Transport von z. B. Glucose oder Aminosäuren in nicht erregbaren Zellen. Die Komplexierung der Na^+/K^+ -Pumpe durch cardioaktive Steroide führt zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration und löst dadurch eine erhöhte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiportsystems aus. Der dadurch bedingte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt schließlich zu einer verstärkten Kontraktion des Myocards und wirkt so einer Herzinsuffizienz entgegen.

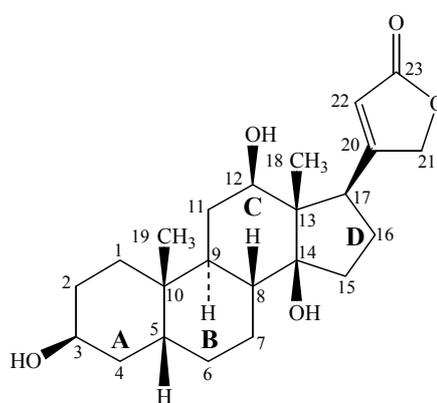


Abbildung 8: Konstitutionsformel des cardioaktiven Steroids Digoxigenin.

Allerdings macht die geringe therapeutische Breite des Digoxins, dessen wirksame Serumkonzentration nur zwischen 0,5 bis 1,5 mg/l (0,7 bis 2 μM) liegt, eine akkurate quantitative Bestimmung des Glycosids bei der Medikation herzkranker Patienten unerlässlich (Hastreiter *et al.*, 1988). Höhere Konzentrationen führen zu toxischen Nebenwirkungen wie Arrhythmien, und sie können letztlich zum Tod führen. In diesem Zusammenhang haben sich Digoxin-spezifische monoklonale Antikörper (Mudgett-Hunter *et al.*, 1982; 1985) sowohl zur quantitativen Analyse durch immunchemische Tests als auch zur Therapie bei akuten toxischen Überkonzentrationen an cardioaktiven Steroiden (Hauptman & Kelly, 1999) als wirksame Reagenzien erwiesen.

Neben seiner Verwendung als Arzneimittel findet Digoxigenin neuerdings auch zur nicht-radioaktiven Markierung von Proteinen und Nukleinsäuren zunehmende Anwendung (Höltke *et al.*, 1995; McCreery, 1997; Chevalier *et al.*, 1997). Zu diesem Zweck sind derzeit verschiedene reaktive Digoxigenin-Derivate erhältlich, deren Reihe von aktivierten Estern und alkylierenden Reagenzien über aktivierte Bausteine für die Oligodesoxynukleotid-Synthese bis hin zu Platin-Komplexen für die DNA-Markierung reicht. Markierte Biomoleküle werden dann

mittels des gekoppelten Liganden üblicherweise durch Einsatz eines Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugates nachgewiesen.

Die Markierung von Biomolekülen mit Digoxigenin kann dabei unabhängig von einer ggf. zusätzlichen, in der biochemischen Analytik häufig verwendeten Markierung mit Biotin erfolgen. Biotin wird durch Avidin, Streptavidin oder spezifische Antikörper in Verbindung mit geeigneten Reporterenzymen nachgewiesen. Während jedoch der spezifische Nachweis Biotin-markierter Proben durch praktisch ubiquitäres endogenes Biotin oft beeinträchtigt wird, besitzt die Digoxigenin-Gruppe den großen Vorteil eines ausgesprochen niedrigen unspezifischen Hintergrundsignals (Chevalier *et al.*, 1997).

Eine engierte BBP-Variante – also ein Anticalin – mit hoher Bindungsaffinität zu Digoxigenin sollte daher breite Anwendbarkeit für biochemisch-analytische Fragestellungen finden und einen ersten Zugang zu medizinischer Diagnostik und Therapie eröffnen.

1.8 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des evolutiven Protein Designs ein Anticalin mit Bindungsaffinität zu dem Steroid-Liganden Digoxigenin hergestellt werden. Ausgangspunkt war eine in der Arbeitsgruppe bereits existierende Bibliothek mit $3,7 \cdot 10^8$ unterschiedlichen BBP-Varianten (Beste *et al.*, 1999). Mit Hilfe der *Phage Display*-Technik selektierte rekombinante BBP-Varianten sollten in *E. coli* produziert und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Des Weiteren sollte die praktische Eignung eines solchen Anticalins als Reagenz zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe in verschiedenen biochemischen Testsystemen untersucht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Bakteriophagen

VCS-M13 Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg

E. coli-K12-Stämme

CJ236i	<i>dut, ung, thi, relA1</i> [F': <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)</i>] von A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von A. Skerra, TU München
JM83pro	JM83, <i>proAB</i> ⁺ (durch Rekombination komplementiert) von Markus Fiedler, TU München
TG1-F ⁻	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB)</i> von A. Skerra, TU München
XL1-Blue	<i>endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169</i> [F': <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)</i>] (Bullock <i>et al.</i> , 1987), von A. Skerra, TU München

2.1.1 Plasmide

pBBP17	(Beste, 1998), von G. Beste, TU Darmstadt
pBBP20	(Beste <i>et al.</i> , 1999), von T. Stibora, TU Darmstadt
pBBP21	(Beste <i>et al.</i> , 1999), von G. Beste, TU Darmstadt
pASK60-his	von A. Skerra, TU München
pASK75	(Skerra, 1994), von A. Skerra, TU München
pASK75-phoA- strepII	(Voss & Skerra, 1997), von Selma Voss, TU Darmstadt
pASK83	von A. Skerra, TU München
pASK90abd-D1.3	(König & Skerra, 1998), von T. König, TU Darmstadt

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

F-19:	5' - CGA TTG CAG TGG CAC TG -3'
F-83:	5' - AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA -3'
FS-15:	5' - GGG TAG GCG GTA CCT TCS NNA AAG TAT TCC TTG CCG TGG ATT ACM NNG TAS NNC GAA ACT TTG ACA CTC TT -3'
FS-18:	5' - AGA TCT TTC CAA TCT TGG AGT CAC CAA CTG GGT AGG CGG TAC CTT C -3'
GB-1:	5' - CTT CGA CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GGA -3'
GB-2:	5' - CAC CAG TAA GGA CCA TGC TTC TGG AGA GCA CCC AGA C -3'
GB-4:	5' - TCT GGA GAG CAC CCA GAC MNN GTC SNN GTG TCC CTT CTT GTC CTC GTC GTA SNN GCA MNN GTA TCC GAT GAT GTA GTT -3'
GB-7:	5' - GAC GGT GCC TGT CCC GA -3'
GB-8:	5' - GAC TAC TGG GGA GCC GA -3'
GB-11:	5' - CCA AGA TTG GAA AGA TCT ACC ACA GCN NSA CTN NKG GAG GTN NSA CCV VSG AGN NKG TAT TCA ACG TAC TCT CC -3'
PR1:	5' - CGC AGT AGC GGT AAA CG -3'
SCHLE1:	5' - CAC AGG TCA AGC TTA TTA GCT AGC TGG TTT TTC GAA CTG CGG GTG -3'
STS5:	5' - CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GNN KGT CGC CNN KTA CCC CNN KNN KNN KNN KAA GTA CGG AAA GTG CGG A -3'
STS6:	5' - AGG GGT ACG CGG CGA CCT GCC ACC ATT TAC CAT GGT A -3'
STS7:	5' - CGG GGT AAG CGG CGA CCT GCC ACC ATT TAC CAT GGT A -3'
STS8:	5' - CTG CGG GTG AGA CCA AGC GCT ATT GTT GAC CTT G -3'
STS9:	5' - GTC GTG GTA CAC GTC AGC GCT CGC TAC GGT AGC GAA -3'
STS10:	5' - ATA TGA TCG GGG TAC TTG GCG ACT TCC CAC CAT TTA CCA TG -3'
STS11:	5' - GAA CTG CGG GTG AGA CCA AGC GCT GCC ACC GCC ATT GTT GAC CTT GCA GGC -3'
STS12:	5' - CTT CGA CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GCA -3'

Die Oligodesoxynukleotide FS-18 und GB-4 wurden von H. Müller, MPI für Biophysik, Frankfurt am Main, an einem Applied Biosystems 392A-05 DNA-Synthesizer nach dem Phosphoramidit-Verfahren (Sinha *et al.*, 1984) synthetisiert und mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (Beste, 1999) gereinigt. Alle anderen Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma INTERAKTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm, in HPLC-gereinigter Qualität bezogen.

2.1.4 Proteine bzw. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
Anti-Digoxigenin-F _{ab} -Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Benzonase [®]	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovine Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ExtrAvidin [®] -Alkalische Phosphatase- Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas (89 Units/mg)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptavidin-Alkalische Phosphatase- Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 Units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (3 Weiss Units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (6 Weiss Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase (3 Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 Polynukleotidkinase (10 Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.1.5 Chemikalien

Acetonitril	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
N-Acetyl-L-tryptophanamid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (Sequagel Concentrate & Diluent)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
4-Aminofluorescein, ≥ 97 % (Fluoresceinamin, Isomer I)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
α-Cyano-4-hydroxymizsäure	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
[α- ³⁵ S]dATP, 37-55 TBq/mmol	NEN Life Science Products, Belgien

dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
1,6-Diaminohexan	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dichlordimethylsilan (2 % v/v in 1,1,1-Trichlorethan)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Digitoxigenin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Digitoxin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Digoxigenin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Digoxin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dioxan	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Essigsäure, technisch	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-Ethyl-diisopropylamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fluorescein, Natriumsalz	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Fluorescein-5(6)-carboxamido-capronsäure-N-hydroxy-succinimidester	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glutarsäureanhydrid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt

Guanidiniumchlorid, ultrapure	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Hexan	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan® für die Gewebezucht (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	E. Merck KGaA, Darmstadt
γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan (Silan A 174)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (Heavy White Oil; für die PCR)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
Ouabain	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Phenol, ≥ 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polymyxin B sulfat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
5-Pregnen-3 β -ol-20-on	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Progesteron	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Testosteron	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tc)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiamin, Hydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
tRNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Xylencyanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.6 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

λ /BstEII-Verdau	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
ϕ X174 RF/HaeIII-Verdau	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard, Low Range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range	Bio-Rad Laboratories GmbH, München; New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Kits zur DNA-Isolierung:

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

Kits zur DNA-Sequenzierung:

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

T7-Sequencing™ Kit

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

2.1.7 Geräte

ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer

Perkin Elmer, Applied Biosystems,
Weiterstadt

Autoklaven:

Varioklav® Typ 500

H & P Labortechnik GmbH,
Oberschleißheim

Sanoclav Typ LaS-201

Wolf, Geislingen

Brutschränke:

B 5060 EK CO₂

Heraeus Christ GmbH, Osterode

BM800

Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach;

Pelion

Bayer, Frankfurt/Main

Drehtisch zum Ausplattieren

Gesellschaft für Laborbedarf mbH,
Würzburg

Durchflußdetektoren:

UV/Vis Filter Photometer

Knauer, Berlin

Variable Wavelength Monitor

Knauer, Berlin

2138 Uvicord S

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

2138 Uvicord SII

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Elektroblot-Apparatur

Eigenbau

Elektrophoresekammern

Eigenbau

Elektroporatoren:

EasyjecT Basic

Eurogentec, Searing, Belgien

MicroPulser™

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Fraktionssammler:

Redi Frac

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Multirac 2111

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Superrac 2211

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Ultrorac 7000

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Gelfiltrationssäule Superdex 75 HR

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Geltrockner:

2003 Slab Gel Dryer

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Geltrockner D62

Biometra, Göttingen

Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
Dynamax® SD-300 (Pumpe)	Rainin, Woburn, MA, USA
Dynamax® UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Netzgeräte:	
TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197 Power supply 500/500	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing Renner GmbH, Dannstadt
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
E512	Metrohm, Herisau
pH 526 und pH 531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin
Pipettierhilfen:	
Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet®	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten:	
Gilson P10, P20, P100, P200, P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Multipette 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroid-Kamera MP4	Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Schreiber:

REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Österreich
2210	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Knauer	Knauer, Berlin

Schüttelgeräte:

Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
Typ 3012	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Typ 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Modell TR-125/ITE-K	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Spektrometer:

ELISA-Photometer Spectra Max 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Lumineszenz Spektrometer LS 50 B	Perkin-Elmer GmbH, Langen
MALDI-TOF-Massenspektrometer Biflex III	Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten
Spektropolarimeter J-810	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

UV/Vis-Spektralphotometer:

Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Speed-Vac-Konzentrator Univapo

UVC 150H	UniEquip, Martinsried
----------	-----------------------

UV-Transilluminator TI3

Biometra, Göttingen

Vakuumpumpen:

Drehschieberpumpe RD4	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim

Vortex-Genie 2

Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA

Waagen:

Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000 C	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 A	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

R160P-*D1	Sartorius GmbH, Göttingen
U5000D	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbäder:	
Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo PC/8A	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Julabo UC/5B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
thermomix 1460	Braun Melsungen AG, Melsungen
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus Christ GmbH, Osterode
J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman Instruments, München
Labofuge 6000	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SS-34 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RMC 14	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.8 Sonstiges Material

Chromatographie-Säulen	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dialyseschläuche:	
Spectra/Por [®] , MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dynabeads [®] M-280 Streptavidin	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen; Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Eurogentec, Searing, Belgien
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	

Glasplatten für die SDS-PAGE	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Makrosep™ 10K	Pall GmbH, Dreieich
Makrosep™ 30K	Pall GmbH, Dreieich
Mikrosep™ 10K	Pall GmbH, Dreieich
Mikrosep™ 30K	Pall GmbH, Dreieich
Vivaspin 4, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon™-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrotiter-Platten:	
Falcon Micro Test III Flexible Assay-Plates	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Removastrip 2x8 well mit hoher Bindekapazität	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Nunc-Immuno®-Sticks	Nunc GmbH, Wiesbaden
PD-10-Säulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen:	
blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Röntgenfilm X-OMAT DS	Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA
Schwan-Stabilo®-Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main
Säulenmaterialien:	
EAH Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Epoxy-aktivierte Sepharose 6B	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Sterilfilter:	
Filtropur (0,45 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex® HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Whatman-Filterpapier 3MM Chr	Bender & Hobein AG, München
Zellschaber 3010, Costar Corporation	Diagonal GmbH & Co. KG
Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren JA-10 und JA-20, sowie Sorvall- Rotoren SS-34 und SLA-3000	Nalgene Company, New York, USA

2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklaven (20 min, 121 °C) oder durch Filtration sterilisiert. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem bzw. Milli-Q⁵⁰-gereinigtem Wasser hergestellt. Lediglich Kulturmedien wurden mit nur entionisiertem Wasser angesetzt. Kulturplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und Medien bzw. Lösungen, sofern nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Antibiotika-Lösungen:

Folgende Antibiotika-Stammlösungen wurden verwendet (Aufbewahrung bei -20 °C, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert; 0,45 µm):

Ampicillin (Amp):	100 mg/ml in H ₂ O (1:1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan):	35 mg/ml in Wasser (1:500 zum Medium)
Tetracyclin (Tc):	10 mg/ml in 70 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)

Induktionslösung

Anhydrotetracyclin (aTc): 2 mg/ml in DMF

Glucose-Minimalmedium

Na ₂ HPO ₄	6 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und anschließend Zugabe folgender steriler Lösungen:

MgSO ₄ , 1 M	2 ml/l
CaCl ₂ , 1 M	0,1 ml/l
Glucose, 20 % w/v	10 ml/l
Thiaminhydrochlorid, 10 mg/ml	1 ml/l

GYT-Medium

Glycerin	10 % v/v
Bacto Yeast Extract	0,125 % w/v
Bacto Trypton	0,25 % w/v

Im Dampfautoklaven sterilisieren.

LB Medium

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

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

SOC-Medium

Bacto Trypton	20 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren,

Zusatz von 10 ml/l einer sterilen Lösung von 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄ sowie 20 ml/l 20 % w/v Glucose (steril).

2xYT-Medium

Bacto Trypton	16 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten; 6 g/l für Weichagar)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

TBE

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele

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

Puffer für SDS-PAGE:Aufbewahrungslösung

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v

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)

Entfärbelösung

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v

Färbelösung

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

Fling & Gregerson Laufpuffer (pH 8,8; stellt sich ein)

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l

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

Lösungen für die Phenol/Chloroform Extraktion:Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol (mit Wasser gesättigt)

Kristallines Phenol ≥ 99 % wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit 1/2 Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform

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

AP-Puffer

Tris/HCl pH 8,8	0,1 M
NaCl	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

Benzonase-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

CP-Puffer

Na ₂ HPO ₄	40 mM
NaCl	1 M

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.

KSH-Puffer

HEPES 20 mM

K₂SO₄ 50 mM

Mit KOH auf pH 7,5 einstellen.

Natriumacetatlösung, 3 M

3 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 4,8 einstellen.

PBS (pH 7,4; stellt sich ein)

KH₂PO₄ 4 mM

Na₂HPO₄ 16 mM

NaCl 115 mM

PBS/E

PBS mit 1 mM EDTA

PBS/T

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

RNase-Lösung

Tris/HCl, pH 7,5 10 mM

NaCl 15 mM

RNase A 10 mg/ml

Zur Inaktivierung von DNasen 20 min im siedenden Wasser erhitzen und bei -20 °C aufbewahren.

SA-Puffer

Tris/HCl pH 8,0 100 mM

NaCl 150 mM

EDTA 1 mM

Saccharose-Aufschlußpuffer

Saccharose	0,5 M
Tris/HCl pH 8,0	0,1 M
EDTA	1 mM

Saccharose-Aufschlußpuffer (EDTA-frei)

Saccharose	0,5 M
Tris/HCl pH 8,0	0,1 M
Polymyxin B sulfat	2 mg/ml

TE-Puffer

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

TE/10-Puffer

TE, 1:10 mit Wasser verdünnt

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

E. coli-Einzelkolonien wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten in Petrischalen und ca. 14 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank erhalten. Die Selektion auf genomische Marker, Episome oder Plasmide erfolgte durch Zusatz entsprechender Antibiotika zum Nährmedium. Kulturplatten mit Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu 4 Wochen zum Animpfen neuer Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, falls nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz des für den Bakterienstamm geeigneten Antibiotikums angesetzt. Kulturen eines Volumens von 4 ml wurden in 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen, größere Kulturen in Erlenmeyer-Kolben mit jeweils dem 2,5fachen Gefäßvolumen kultiviert. Kulturen bis zu einem Volumen von 200 ml wurden direkt mit einer Kolonie von der Agarplatte angeimpft, Kulturen im präparativen Maßstab, das heißt insbesondere mit 2 l Kulturvolumen, wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur (50 ml) inokuliert. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Die Bestimmung der Zelldichten erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD_{550}) in einer 1 cm Kunststoffküvette mit Hilfe eines Ultrospec 2000- oder Ultrospec 3000-Spektralphotometers.

Für die dauerhafte Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium (im Falle einer Tetracyclin-Resistenz ohne das entsprechende Antibiotikum) mit 1 ml 87 % v/v Glycerin (im Dampfautoklaven sterilisiert) vermischt und bei -20 °C aufbewahrt.

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

E. coli-Zellen können Plasmid-DNA aufnehmen, nachdem sie in einen transformationskompetenten Zustand überführt wurden. Zwei verschiedene Methoden wurden zu diesem Zweck eingesetzt: die $CaCl_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) und die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Die klassische $CaCl_2$ -Methode liefert, in Abhängigkeit vom verwendeten *E. coli*-Stamm, 10^4 bis 10^6 Transformanden pro μg Plasmid-DNA. Eine bessere Transformationseffizienz von bis zu 10^9 Transformanden pro μg Plasmid-DNA läßt sich mit der Elektroporation erreichen. Diese Methode wurde verwendet, um die größtmögliche Ausbeute an Transformanden bei der Transformation von *E. coli* XL1-Blue mit einer Bibliothek von BBP-Zufallsmutanten zu erreichen.

2.2.2.1 Transformation nach der CaCl₂-Methode (Sambrook *et al.*, 1989)

50 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bei 200 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Kunststoff-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4K10, 4416 g, 4 °C, 10 min). Das Zellsediment wurde in 40 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert, die Suspension wie beschrieben zentrifugiert, das erhaltene Zellsediment in 20 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂, 15 % v/v Glycerin resuspendiert, in Aliquots à 200 µl auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt.

Für die Transformation wurde die frisch hergestellte oder auf Eis aufgetaute Zellsuspension mit 0,5 bis 5 µl DNA-Lösung (z. B. 5 ng Plasmid-DNA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min im Metallblockthermostaten auf 37 °C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 100 µl bis 2 ml des Ansatzes wurden in Abhängigkeit von der Anzahl erwarteter Transformanden auf LB-Agar ausplattiert, der zur Selektion auf Plasmid-Marker mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war. Die Kulturplatten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Transformation mittels Elektroporation

Die Präparation elektrokompenter Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue erfolgte gemäß den optimierten Vorschriften von Tung & Chow (1995) sowie Hengen (1996). 1 l LB-Medium wurde mit 10 bis 30 ml einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in LB/Tc angeimpft und die Kultur bei 26 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,7 (entsprechend OD₆₀₀ = 0,6) geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis abgekühlt, zu gleichen Volumina auf drei Zentrifugenbecher verteilt und sedimentiert (SLA-3000, 4000 g, 4 °C, 15 min). Nach vollständigem Abziehen des Überstandes wurden die Zellen in insgesamt 500 ml sterilem, eiskaltem 10 % v/v Glycerin resuspendiert und erneut wie oben sedimentiert. Nach Wiederholung des Waschschrtes und der Zentrifugation wurde das Sediment in insgesamt 1 ml vorgekühltem GYT-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in Portionen à 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation fanden entweder das EasyjecT Basic- oder das MicroPulser™-Gerät mit Küvetten des entsprechenden Herstellers (Elektrodenabstand 0,2 cm) Verwendung. Die Elektroporation erfolgte im Kühlraum bei 4 °C wie im folgenden beschrieben.

Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP20: Zur Reamplifizierung der Bibliothek mutagener BBP-Varianten kodiert auf pBBP20 (Beste *et al.*, 1999) wurden insgesamt 26 µg einer Phasmid-Präparation der Bibliothek (siehe Abschnitt 3.1.1) für die Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Je 2,7 µl der DNA-Lösung in TE/10 (2 µg) wurden mit 40 µl der zuvor auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen (aus dem 200 µl Aliquot) versetzt. Innerhalb von 1 min wurden Zellsuspension und DNA mit der Pipette vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Anschließend wurde der Puls mit einer elektrischen Feldstärke von 12,5 kV/cm und einer Dauer von 5 ms gestartet. Nach Entladung des Kondensators wurden die transformierten Zellen unmittelbar mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Die gesamte Suspension wurde in ein 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen überführt, die Elektroporationsküvette mit 1 ml SOC-Medium nachgespült und die Zellsuspensionen gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurden die Zellen mit 80 ml 2xYT-Medium gemischt, Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm im Kolben geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur mit einem Gesamtvolumen von 106 ml mit Helferphagen infiziert und die Produktion rekombinanter Phagemide induziert (siehe Abschnitt 2.3.2.1).

Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP24: Für die Transformation elektrokompenterer XL1-Blue mit BBP-Bibliotheken auf der Grundlage des Vektors pBBP24 zum Zwecke der Affinitätsmaturierung (Abschnitt 3.3.1) wurden jeweils ca. 6 pmol (ca. 17,3 µg) ligierter und durch Ethanol-Fällung entsalzter (siehe Abschnitt 2.2.5.8) DNA eingesetzt. Je 5 µl der DNA-Lösung in TE/10 (ca. 1,1 µg) wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 40 µl der frisch aufgetauten elektrokompenten Zellen vermischt. Nach einminütiger Inkubation und Anlegen des Pulses wurden die Zellen mit insgesamt 2 ml SOC-Medium aus den Küvetten gespült und in 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2xYT-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben zu einem Endvolumen von 200 ml versetzt und Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 mg/l zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C und 200 rpm wurde die Kultur mit Helferphagen infiziert und die Phagemidproduktion induziert (siehe Abschnitt 2.3.2.1).

Alternativ wurde die Elektroporation in größerem Maßstab durchgeführt (Abschnitt 3.4.1). In diesem Fall wurden je 200 µl der elektrokompenten Zellen mit 15 µl der ligierten Phasmid-DNA in H₂O (ca. 5,8 µg von insgesamt 17,3 µg) versetzt. Nach Anlegen des Pulses wurden die Elektroporationsküvetten mit 3x 1 ml SOC-Medium gespült und die vereinigte Zellsuspension für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen zu 1 l 2xYT/Amp-Medium gegeben und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inku-

biert. 200 ml dieser Kultur wurden in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt, mit Helferphagen infiziert und anschließend die Produktion rekombinanter Phagemide induziert (siehe Abschnitt 2.3.2.1).

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Analytischer Maßstab. Für die Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden, der ortsgerichteten Mutagenese oder durch die Infektion von *E. coli* mit Phagemiden erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab isoliert. Die DNA wurde dabei aus 4 ml einer stationären Kultur der *E. coli*-Zellen, die das entsprechende Plasmid trugen, in Selektivmedium isoliert. Hierfür wurden Kits der Firmen Genomed (JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit) oder Qiagen (QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit) eingesetzt und die DNA nach Herstellerangaben präpariert. Typischerweise wurden Ausbeuten von 10 bis 20 µg Plasmid-DNA gelöst in 75 µl TE-Puffer erhalten. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei 4 °C gelagert und für Restriktions- und Sequenzanalysen, Transformationen und die Neukonstruktion von Plasmiden eingesetzt.

Präparativer Maßstab. Um größere DNA-Mengen zu gewinnen, z. B. für den präparativen Restriktionsverdau oder die Konservierung kompletter Phasmid-Bibliotheken, wurde Plasmid-DNA im größeren Maßstab isoliert. Hierzu wurde die DNA gemäß Herstellerangaben mit Hilfe des Qiagen Plasmid Kit Midi aus einer stationären 50 ml-Kultur der *E. coli*-Zellen in Selektivmedium isoliert, die das zu präparierende Plasmid trugen. Die Ausbeuten betragen typischerweise 100 µg Plasmid-DNA gelöst in 100 µl TE-Puffer. Die DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Präparation von Einzelstrang-DNA

Für die Mutagenese nach Kunkel (1987) wurde zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) benötigt, die ausgehend von Plasmiden mit der intergenischen Region des Phagen fl präpariert wurde (sog. Phasmide; vgl. Abschnitt 1.6). Als Wirt fungierte dabei der *E. coli*-Stamm CJ236i. Dessen chromosomale Mutationen *dut⁻* und *ung⁻* bewirken einen partiellen Einbau von Desoxyuridin statt Desoxythymidin in die DNA (vgl. Abschnitt 2.2.5.3). CJ236i trägt ein F'-Plasmid und kann daher die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen des Typs M13 notwendigen Sex-Pili ausbilden. Nach Infektion der mit dem entsprechenden Phasmid transformierten Zellen mit sogenannten Helferphagen wurde die Phasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemid-Partikel verpackt, sezerniert und anschließend konnte die ssDNA aus den Phagemiden isoliert werden (Vieira & Messing, 1987; Geisselsoder *et al.*,

1987). Die hierbei zu einem geringen Anteil mitgewonnene ssDNA des Helferphagen (< 5 %) störte bei der Mutagenese nicht.

4 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Kolonie des Stammes CJ236i, der zuvor mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt. Mit der stationären Kultur wurden 20 ml LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,26 inkubiert (Zell-dichte $\approx 1,6 \cdot 10^8$ Zellen/ml). Von dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer *Multiplicity of Infection* (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 ml LB/Amp/Kan-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (SS-34, 12000 g, 4 °C, 10 min) und der klare Überstand mit den Phagemid-Partikeln in ein neues SS-34-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µl einer 10 mg/ml RNase-Lösung wurde für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Phagemide durch Zugabe von 1/4 Volumen frischem 3,5 M Ammoniumacetat, 20 % w/v PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert (SS-34, 18000 g, 4 °C, 15 min) und schließlich in 200 µl Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen. Nach Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile durch abschließende Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 2 min) entfernt.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde die Phagemidlösung zweimal mit 200 µl Phenol und einmal mit 200 µl Phenol/Chloroform extrahiert (vgl. Abschnitt 2.2.5.8). Anschließend wurde zwei Mal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und alle erhaltenen organischen Phasen zur Erhöhung der Ausbeute in der angegebenen Reihenfolge mit 100 µl TE-Puffer rückextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 µl) und die ssDNA durch Zugabe von 1/10 Volumen (30 µl) 7,8 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol (750 µl) für mindestens 1 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 15 min), das Präzipitat mit 500 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Die ssDNA wurde schließlich in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Zur Kontrolle der Reinheit und zur Abschätzung der erhaltenen DNA-Menge wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Lösung durch analytische Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Die Ausbeuten lagen – je nach Plasmid – zwischen 10 und 100 µg ssDNA.

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook

et al., 1989). Sie wurde sowohl zur analytischen Restriktionsanalyse bzw. Mengenabschätzung von Plasmiden als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau oder von Reaktionsprodukten aus der PCR eingesetzt.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden Gele mit 1 % w/v Agarose verwendet. Die Agarose wurde in TBE in der Siedehitze gelöst und nach Zugabe von 1/10000 Volumen einer Ethidiumbromidlösung (1 % w/v in Wasser) in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Einsetzen der Geltaschenformer und dem Erkalten des Gels wurde es in die mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Gel (ca. 10,5 x 7,5 x 0,5 cm; Länge x Breite x Höhe) wurde mit 1 bis 2 µg DNA pro Gelspur unter Zusatz von 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer für Agarosegele beladen und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 90 V für 50 min durchgeführt. Danach wurden die DNA-Fragmente in Form der Ethidiumbromid-Interkalate durch Bestrahlen mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu reinigen, wurden präparative Gele mit 1 % w/v „Low Melting Point“-Agarose in TAE-Puffer, der ebenso als Laufpuffer diente, verwendet. Die hierbei breiteren Geltaschen wurden, nach vorheriger Zugabe von 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer, mit bis zu 50 µl der DNA-Lösung beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V für 90 min. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente zur Vermeidung von Strahlenschäden mit UV-Licht (312 nm) geringer Intensität sichtbar gemacht und die Gelstücke, welche die gewünschten DNA-Fragmente enthielten, mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die DNA wurde mit Hilfe des JETsorb Gel Extraction Kits nach Vorschrift des Herstellers aus den Gelstücken extrahiert, gereinigt und in 20 bis 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend in der Regel mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der DNA-Größenstandards ϕ X174 RF/*Hae*III-Verdau oder λ /*Bst*EII-Verdau abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Sequenzierungsprodukten wurde die vertikale Elektrophorese in keilförmigen, 6 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen durchge-

führt. Damit das Gel nach erfolgter Elektrophorese nur an einer der beiden Platten festhaftete, wurden die Gelplatten entsprechend vorbehandelt (Heinrich, 1987). Beide Platten wurden zunächst nacheinander mit 0,1 % w/v SDS, Wasser und Ethanol, sowie mit 0,5 M NaOH und Wasser gewaschen. Nach abschließendem Waschen mit 5 ml Ethanol wurde eine Lösung aus 10 ml Ethanol, 300 µl Wasser, 35 µl Essigsäure und 35 µl γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan hergestellt und eine der beiden Platten mit 5 ml dieser Lösung behandelt. Die Lösung wurde mit einem Papiertuch aufgetragen und die Platte nach dem Trocknen der Lösung poliert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die andere Platte wurde anstelle dessen zweimal mit 5 ml 2 % v/v Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan behandelt.

Die für die DNA-Sequenzierung verwendeten Gelplatten waren ca. 60 x 20 cm groß und wurden, nach der Vorbehandlung, mit einem Stapel von Abstandhaltern verschiedener Länge (60, 40 und 12,5 cm) an den Seiten zusammengeklemmt, so daß die Dicke des keilförmigen Gels später an der Oberkante 0,2 mm und an der Unterkante 0,6 mm betrug. Eine 6 %ige w/v Acrylamid-Lösung mit 7,5 M Harnstoff in TBE wurde durch Vermischen von 7,5 ml 10x TBE, 18 ml Sequagel Concentrate (25 % w/v Acrylamid/Bisacrylamid 19:1 in 8,3 M Harnstoff) und 49,5 ml Sequagel Diluent (8,3 M Harnstoff) erhalten. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 30 µl TEMED und 600 µl 10 % w/v APS eingeleitet, die polymerisierende Lösung sofort zwischen die Gelplatten gegossen und der Taschenformer für die Ausbildung von 36 Taschen eingesetzt. Nach einstündiger Vorelektrophorese des polymerisierten Gels bei einer konstanten Leistung von 60 W mit TBE als Laufpuffer wurden die Sequenzierungsansätze aufgetragen und die Hauptelektrophorese für ca. 2,5 h bei gleichen Bedingungen durchgeführt bis der Farbstoffmarker die untere Gelkante erreicht hatte. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Platten vorsichtig getrennt und die Platte mit dem anhaftenden Gel für 15 min in 2 l 10 % v/v Essigsäure geschwenkt, um den Harnstoff zu entfernen und anschließend zweimal für 5 min in 2 l Wasser gewaschen. Das Gel wurde schließlich bei 80 °C getrocknet. Durch Exposition eines Röntgenfilmes für bis zu 60 h wurde eine Autoradiographie erstellt.

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Durch 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden wurde deren kovalente Verknüpfung durch T4 DNA-Ligase mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls ermöglicht. Dies war z. B. für die Zirkularisierung des bei der Polymerase-Reaktion *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig (siehe Abschnitt 2.2.5.2).

Dazu wurden 200 pmol des gereinigten Oligodesoxynukleotides zusammen mit 3 µl 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (700 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM Dithio-

threitol, DTT), 1,2 µl 10 mM ATP, 0,5 µl (5 u) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Polynukleotidkinase zu inaktivieren. Der Anteil des phosphorylierten Oligodesoxynukleotides, der nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese eingesetzt wurde, wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

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

Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i und dem damit verbundenen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*⁺-Stammes mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierte Mutationen selektiert.

Für die Hybridisierung wurden ca. 250 ng ssDNA (Abschnitt 2.2.3.2) mit 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂) und 0,5 µl (3,3 pmol) des phosphorylierten Oligodesoxynukleotides (Abschnitt 2.2.5.1) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die Lösung wurde in einen auf 80 °C vorgeheizten Metallblockthermostaten überführt, in diesem im Verlauf von 3 bis 4 h, auf RT abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Für die Neusynthese und Zirkularisierung des zweiten DNA-Stranges wurden 1,1 µl 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µl (1,5 u) T4 DNA-Polymerase (NEB) und 1 µl (3 u) T4 DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und zunächst für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert. 5 µl dieser Lösung wurden im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer verdünnt, und von dieser Lösung wurden 5 µl für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet. Die verbleibenden 45 µl der Lösung wurden bei -20 °C gelagert. Das restliche Volumen des unverdünnten Reaktionsansatzes (ca. 8 µl) wurde zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion durch analytische Agarose-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.5.3 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Zur DNA-Sequenzierung wurden sowohl das T7-SequenzierungTM Kit unter Verwendung der Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.3) als auch der Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit in Verbindung mit dem Sequenzierautomaten ABI-PrismTM 310, jeweils gemäß Herstellerangaben, eingesetzt. Beide Sequenzierungsmethoden beruhen auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) und gehen von doppelsträngiger, zirkulärer Plasmid-DNA aus (Chen & Seeburg, 1985).

Für eine Sequenzierungsreaktion nach der herkömmlichen Sequenzierungsmethode mit Hilfe des T7-SequenzierungTM Kits wurden 1,5 bis 2 µg alkalisch denaturierte Plasmid-DNA sowie 1 pmol des entsprechenden *Primers* eingesetzt. Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte gemäß den Herstellerangaben durch α -³⁵S-dATP im Sequenzierungsansatz.

Für Sequenzierungen mit dem Big DyeTM Terminator Kit wurden 0,2 bis 0,4 µg DNA zusammen mit 2 pmol des entsprechenden *Primers* in einer linearen Amplifizierungs-Reaktion eingesetzt. Die Farbmarkierung der Kettenabbruch-Produkte wurde durch den Einsatz von vier Didesoxynukleotiden (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) erreicht, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren.

2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die konzertierte Mutagenese mehrerer Aminosäurepositionen zur Herstellung von BBP-Zufallsbibliotheken wurde die PCR (engl.: = *Polymerase Chain Reaction*; Saiki *et al.*, 1988) unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase eingesetzt (Bloch, 1991). Die Oligodesoxynukleotide, die in der PCR als *Primer* dienten, enthielten an ihrem 3'-Ende jeweils mindestens eine 18 Basen lange und zur eingesetzten Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Die Verwendung von *Primern*, die an bestimmten Positionen Mischungen verschiedener Nukleotide aufwiesen, erlaubte die Generierung neuer, von der DNA der Matrize abweichender Zufallssequenzen.

Für einen typischen PCR-Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 5 bis 10 ng Templat-DNA (Plasmid-DNA oder ein PCR-Produkt), jeweils 10 nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP (4 µl dNTP-Mix: je 2,5 mM an den einzelnen dNTPs) sowie 25 pmol der beiden Primer eingesetzt. Zusätzlich enthielt der Reaktionsansatz 5 µl 10x *Taq* Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine und 1 % Triton X-100). Die Lösung wurde mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet, im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt und 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 u/µl) zugegeben („Hot Start“). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Thermo-Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der Primer bei 55 bis 65 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3.

Synthese der DNA bei 72 °C für 1,5 min (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 20 mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min auf 60 °C erhitzt. Wurden größere Mengen eines PCR-Produktes benötigt, wurde die Reaktion unter Verdopplung aller Komponenten in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Zur Kontrolle auf Abwesenheit von DNA-Kontaminationen im PCR-Ansatz wurde parallel jeweils eine Reaktion ohne Matrizen-DNA mitgeführt. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert oder mit dem E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt und gegebenenfalls anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten.

2.2.5.5 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Präparation von DNA-Fragmenten sowie für Restriktionsanalysen wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Hierfür wurde das jeweils vom Hersteller empfohlene Puffersystem verwendet und die eingesetzten Puffer den Reaktionsansätzen als 10fach konzentrierte Stammlösung zugegeben. Wurde eine Spaltung mit zwei Restriktionsenzymen bei derselben Temperatur durchgeführt, so wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme die maximale Aktivität aufwiesen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt.

Analytische Restriktionsspaltungen wurden für 60 min bei geeigneter Temperatur mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 10 µl unter Verwendung von 5 u der Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Eine Restriktionsspaltung im präparativen Maßstab wurde typischerweise in einem Reaktionsvolumen von 50 bis 100 µl mit 2 bis 10 µg Plasmid-DNA und 30 bis 60 u der Nuklease durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug dabei 2 h. Gereinigte PCR-Fragmente wurden analog, jedoch mit bis zu 60 u der Enzyme pro µg DNA gespalten.

Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe der präparativen Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

2.2.5.6 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*blunt ends*) wurde das Vektorfragment zur Erhöhung der Ausbeute an korrektem Ligierungsprodukt mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. Dabei wurde die Alkalische Phosphatase in den präparativen Reaktionsansätzen direkt unter Verwendung des für die Nuklease empfohlenen Puffers eingesetzt (Abschnitt 2.2.5.5). 1 µl (1 u) Alkalische Phosphatase wurde 1 h nach Beginn der Restriktionsspaltung zugegeben

und der Ansatz für weitere 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und im Verlauf der Reinigung der DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

2.2.5.7 Entfernung überstehender DNA-Enden

Für die Konstruktion eines Plasmides war mitunter die Abtrennung der durch Spaltung mit einem Restriktionsenzym erhaltenen 3'-überstehenden DNA-Enden notwendig. Hierzu wurde die T4 DNA-Polymerase unter Ausnutzung ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eingesetzt.

Zunächst wurde die durch Restriktionsverdau linearisierte Plasmid-DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung (Abschnitt 2.2.5.8) gereinigt und das erhaltene DNA-Präzipitat schließlich in 42,5 µl Wasser aufgenommen. Danach wurden 5 µl des für die T4 DNA-Polymerase empfohlenen Reaktionspuffers (10fach konzentriert), 2 µl dNTP-Lösung (je 2,5 mM an den einzelnen dNTPs) sowie 0,5 µl T4 DNA-Polymerase (1,5 u) zugegeben und der Reaktionsansatz für 20 min bei 12 °C inkubiert. Zur Abtrennung der Polymerase wurde das erhaltene DNA-Fragment erneut durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung gereinigt.

2.2.5.8 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Phenol/Chloroform-Extraktion. Im Anschluß an bestimmte Präparationen von Plasmid-DNA bzw. enzymatische Umsetzungen war die Abtrennung verbliebener Proteine oder Enzyme durch Phenol/Chloroform-Extraktion nötig.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen mit Wasser auf 400 µl eingestellt. Dann wurde die Lösung mit 400 µl Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (Sorvall RMC 14, 18500 g, RT, 2 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut nach Zentrifugation abgetrennt.

Ethanol-Fällung. Für die anschließende Ethanol-Fällung wurde die wässrige Phase mit 2,5 Volumina (1 ml) eiskalten Ethanols gemischt und für mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat, das nach Zentrifugation erhalten wurde (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 30 min), wurde mit 750 µl kaltem 70 % v/v Ethanol gewaschen, im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet und je nach der weiteren Verwendung in 50 bis 100 µl TE-Puffer gelöst.

Für die Herstellung von BBP-Zufallsbibliotheken mußte der Ligierungsansatz aus PCR- und Vektorfragment vor der Elektroporation entsalzt werden. Hierzu wurde der Ligierungsansatz typischerweise zu Aliquots von jeweils 120 µl (ca. 3,5 µg) auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße ver-

teilt und unter Zugabe von 5 μl tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (10 mg/ml) mit 125 μl einer 5 M Lösung von NH_4OAc und 500 μl Ethanol für mindestens 24 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Die Ansätze wurden zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min), die DNA-Präzipitate mit 750 μl kaltem 70 % v/v Ethanol gewaschen und für 2 min im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet. Die DNA wurde schließlich in geeigneten Volumina TE/10 oder Wasser aufgenommen und für die Elektroporation eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.2.2).

2.2.5.9 Ligierung von DNA-Fragmenten

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

Für einen Standard-Ligierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 μl wurden 2 μl 10x Puffer (Promega, 300 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 10 mM ATP), 0,5 μl T4 DNA-Ligase (Promega, 3 Weiss u/ μl) und jeweils ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei $16\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert und 5 μl der Lösung anschließend zur Transformation CaCl_2 -kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

Für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliotheken wurden in einem Gesamtvolumen von 600 μl auf ähnliche Weise jeweils 60 μl 10x Puffer (New England Biolabs (NEB), 500 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 10 mM ATP, 0,5 mg/ml BSA), 20 μl T4 DNA-Ligase (NEB, 6 Weiss u/ μl) und je 6 pmol des Vektorfragmentes sowie des PCR-Fragmentes mit dem randomisierten BBP-Gen eingesetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 18 h bei $16\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert und die DNA vor der Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue durch Ethanol-Fällung entsalzt (Abschnitt 2.2.5.8).

2.3 Phagemid-Präsentation und -Selektion

2.3.1 Propagation von Helferphagen

50 ml 2xYT/Tc-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue in 2xYT/Tc angeimpft und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von $\text{OD}_{550} = 0,3$ wurden 10 ml der Kultur abgenommen und in einen auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten, zuvor sterilisierten 50 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Zellen wurden mit $2 \cdot 10^{10}$ pfu VCS-M13 Helferphagen (Stratagene, 10^{11} pfu/ml) entsprechend einer moi von 10 infiziert und für 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt und für 8 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 rpm inkubiert. Um die Bakterien abzutöten, wurde die Kultur anschließend

im Wasserbad für 10 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt, in einen hitzesterilisierten Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SS-34, 12000g, 4 °C, 15 min). Der Überstand mit den Phagen wurde durch Sterilfiltration (Porendurchmesser = 0,45 µm) in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Zur Titerbestimmung der produzierten Helferphagen wurden 50 ml 2xYT/Tc-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären *E. coli* XL1-Blue-Kultur in 2xYT/Tc angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert. Mit der Helferphagenlösung wurden zwei Verdünnungsreihen in 2xYT-Medium bis zu einer maximalen Verdünnung von 10⁻⁹ angelegt. Für jede auszuplattierende Verdünnungsstufe wurden 3 ml verflüssigten 2xYT-Weichagars in ein 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen überführt und im Wasserbad auf 48 °C temperiert. 100 µl der exponentiell wachsenden Kultur sowie 100 µl der Helferphagenlösung in den Verdünnungsstufen 10⁻⁸, 5 · 10⁻⁹ und 10⁻⁹ wurden zu dem Weichagar gegeben, vorsichtig vermischt und zügig auf bei 37 °C vortemperierte 2xYT/Tc-Agarplatten gegossen. Um einen einheitlichen Zellrasen zu erhalten, wurde die Zellsuspension jeweils durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Nach Erstarren des Weichagars wurden die Platten für 8 h bei 37 °C und, zur Ausbildung größerer Plaques, vor dem Auszählen noch bis zu 14 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lag typischerweise zwischen 3 · 10¹¹ und 10¹² pfu/ml.

2.3.2 Präparation rekombinanter Phagemide

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von den Phasmidvektoren pBBP20 (Abschnitt 1.6) oder pBBP24 (Abschnitt 3.3.1) produziert. Beide Vektoren besitzen die für die Replikation und Verpackung als einzelsträngige Phasmid-DNA erforderliche intergenische Region des filamentösen Phagen fl und kodieren unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein aus einer BBP-Variante und einer verkürzten Form des Phagenhüllproteins pIII.

2.3.2.1 Produktion von Phagemid-Bibliotheken

Eine Bibliothek von Phasmidvektoren, die für Varianten des BBP-Fusionsproteins kodierten, wurde benutzt, um durch Elektroporation Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue zu transformieren. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen wurden Phagemide generiert, welche die Varianten des BBP-Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche präsentierten.

Reamplifizierung der BBP-Bibliothek auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP20. Nach der Elektroporation von XL1-Blue mit einer zuvor gewonnenen Bibliothek von BBP-Varianten in Form der Phasmid-DNA (Beste *et al.*, 1999) wurde die Zellsuspension mit einem Volu-

men von insgesamt 106 ml auf eine Endkonzentration von 100 mg/l Ampicillin eingestellt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert (vgl. Abschnitt 2.2.2.2). Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von $5 \cdot 10^{11}$ pfu VCS-M13 Helferphagen infiziert und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Daraufhin wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt, für 10 min bei 26 °C und 140 rpm inkubiert und schließlich die Synthese des BBP-Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin zu einer Endkonzentration von 25 µg/l für 7 h bei 26 °C und 140 rpm induziert.

Die Kultur wurde auf vier sterile SS-34 Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (SS-34, 12100 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde durch Filtration sterilisiert (0,45 µm), zu gleichen Volumina auf vier ebenfalls sterile SS-34 Zentrifugenbecher verteilt und die enthaltenen Phagemide durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation präzipitiert (SS-34, 18000 g, 4 °C, 20 min), der Überstand wurde abgezogen, und das Präzipitat in je 1 ml sterilem, vorgekühltem PBS gelöst. Nach Überführung in vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße und 30minütiger Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile abzentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % w/v PEG 8000, 15 % w/v NaCl für mindestens 30 min auf Eis gefällt. In dieser Form wurden die Phagemide gegebenenfalls bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurden sie abzentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 20 min) und nach vollständiger Entfernung des Überstandes in je 500 µl sterilfiltriertem, vorgekühltem PBS gelöst. Die Lösungen wurden nochmals für 30 min auf Eis inkubiert, zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 5 min) und jeweils zwei der Überstände in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Die so hergestellte Phagemidlösung wurde direkt für die Affinitätsanreicherung verwendet.

Phagemid-Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP24. Nach der Elektroporation der Bibliothek zum Zwecke der Affinitätsmaturierung (vgl. Abschnitt 2.2.2.2) wurde die Kultur mit dem Volumen von 200 ml und einer Endkonzentration von 100 mg/l Ampicillin für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Danach wurden die Zellen durch Zugabe von $2,4 \cdot 10^{12}$ pfu VCS-M13 Helferphagen infiziert und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Produktion und Aufarbeitung der Phagemide erfolgte wie oben beschrieben. Allerdings wurden hier die Phagemide nach dem zweiten Fällungsschritt aufgrund der geringeren Ausbeute nicht in je 500 µl, sondern lediglich in jeweils 100 µl PBS gelöst.

Nach der alternativ durchgeführten Elektroporation im größeren Maßstab (vgl. Abschnitt 2.2.2.2) wurde die erhaltene Kultur mit einem Volumen von 200 ml mit $6,1 \cdot 10^{11}$ pfu VCS-

M13 Helferphagen infiziert. Produktion und Aufarbeitung der Phagemide erfolgten ebenfalls wie oben beschrieben, wobei die Phagemide nach der zweiten Präzipitation in je 500 µl PBS gelöst wurden.

2.3.2.2 Amplifizierung selektierter Phagemide

Das Ensemble von Phagemiden, das als Ergebnis der Phagemid-Selektionszyklen im Elutionsschritt erhalten wurde (siehe Abschnitt 2.3.3) – typischerweise 10^5 bis 10^9 cfu – wurde vor dem darauffolgenden Anreicherungszyklus amplifiziert, wobei in der Regel Phagemidlösungen mit einem Titer von ca. $5 \cdot 10^{11}$ bis $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml in 1 ml PBS erhalten wurden.

Hierzu wurde eine stationäre Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in 5 ml LB/Tc-Medium, die bei 30 °C und 200 rpm inkubiert worden war, abzentrifugiert (Sigma 4K10, 4420 g, RT, 2 min). Die Zellen wurden in 2 ml 2xYT-Medium resuspendiert, um Tetracyclin aus dem Medium zu entfernen. Der Vorgang wurde mit 1 ml 2xYT-Medium wiederholt. Mit 100 bis 300 µl der erhaltenen Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT-Medium angeimpft, so daß die resultierende OD_{550} zwischen 0,03 und 0,05 lag, und bei 37 °C und 140 rpm geschüttelt. Zu den Phagemiden der Elutionsfraktion (ca. 1 ml), die kurz vor der Infektion im Metallblockthermostaten auf 37 °C temperiert worden waren, wurden 3 ml der exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{550} = 0,5$) gegeben. Die Mischung wurde für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sedimentiert (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 2 min), in 600 µl 2xYT/Amp-Medium resuspendiert und in Aliquots zu je 200 µl auf Agarplatten mit LB/Amp-Medium ($\varnothing = 14$ cm) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C für 14 bis 14,5 h. Der erhaltene Zellrasen wurde vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers unter Zugabe von 10 ml 2xYT/Amp-Medium pro Platte abgeschabt. Die Zellsuspensionen von drei Platten wurden vereinigt und zur vollständigen Resuspendierung für 30 min bei 37 °C und 200 rpm in einem sterilen 100 ml Erlenmeyer-Kolben geschüttelt. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden 50 ml 2xYT/Amp Medium mit 100 µl bis 1 ml der Zellsuspension zu einer OD_{550} von 0,08 inokuliert und bei 37 °C und 140 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5$ inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und das weitere Vorgehen zur Produktion, Reinigung und Konservierung der Phagemide erfolgte, wie weiter oben in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben.

2.3.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

Die Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide mit Bindungsaktivität für das Steroid-Hapten Digoxigenin erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen.

2.3.3.1 Anreicherung durch Adsorption an funktionalisierte Polystyrolstifte

Zur Anreicherung rekombinanter Phagemide aus der reamplifizierten ursprünglichen BBP-Zufallsbibliothek (Beste *et al.*, 1999) wurden Nunc-Immuno[®]-Sticks verwendet (Abschnitt 3.1.2). Diese wurden über Nacht mit 800 µl eines Konjugates (100 µg/ml) aus Ribonuclease A (RNase A) und Digoxigenin in PBS beschichtet.

Zur Herstellung des Konjugates wurden 1,46 µmol (0,96 mg) Digoxigenin-3-O-methylcarboxyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung mit einem Magnetrührstäbchen zu 0,73 µmol (10 mg) RNase A in 1 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat pH 8,2 gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur in einem 2 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz von dem RNase A-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) gemäß den Angaben des Herstellers abgetrennt. Hierzu wurde die Säule zunächst mit PBS äquilibriert, die Reaktionslösung aufgetragen und das Konjugat schließlich mit 3,5 ml PBS eluiert.

Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche des Immuno-Sticks wurden durch Inkubation mit 1,2 ml 2 % w/v BSA in PBS/T (Blockierungspuffer) für 2 h bei RT abgesättigt. Wie auch bei allen folgenden Schritten, wurde der Flügelstift dazu jeweils in ein neues „Cryo“-Röhrchen (Nunc) mit der entsprechenden vorgelegten Lösung eingeschraubt. Die Inkubation erfolgte jeweils auf einem um 50 ° vertikal geneigten Rollenmischer, um die Benetzung des Innengewindes zu vermeiden. Nach dreimaligem kurzen Waschen mit jeweils 1,2 ml PBS/T wurde der Immuno-Stick in einer Mischung aus 250 µl der frischen Phagemidlösung (zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml, Abschnitt 2.3.2.1) und 500 µl Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurde der Immuno-Stick achtmal mit jeweils 950 µl PBS/T für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich im Verlauf einer 15minütigen Inkubation des Immuno-Sticks mit 950 µl einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS (0,742 mg Digoxigenin wurden zunächst in 19,2 µl DMF gelöst und in 930,8 µl PBS verdünnt) kompetitiv eluiert. Alternativ wurden gebundene Phagemide auch unter denaturierenden Bedingungen eluiert. Hierzu wurde der Flügelstift für 15 min mit 950 µl einer 0,1 M Glycin/HCl-Lösung pH 2,2 gewaschen und die erhaltene Phagemid-Lösung anschließend sofort mit 160 µl einer 0,5 M Tris-Lösung neutralisiert.

Die während des Elutionsschrittes erhaltenen Phagemide wurden, bevor sie dem nächsten Anreicherungszyklus zugeführt wurden, amplifiziert (Abschnitt 2.3.2.2). Weiterhin wurden die Phagemidtitel während einzelner Waschschrte und des Elutionsschrittes, wie unter Abschnitt 2.3.4 beschrieben, bestimmt.

2.3.3.2 Anreicherung durch Adsorption an paramagnetische Partikel

Zur Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide aus den BBP-Bibliotheken zum Zweck der Affinitätsmaturierung wurden mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Dynal) zusammen mit einem Doppelkonjugat von BSA mit Digoxigenin und Biotin eingesetzt.

Zur Herstellung des Doppelkonjugates wurden Lösungen von 1,5 μmol (0,99 mg) DIG-NHS in 12,5 μl DMSO sowie von 1,5 μmol (0,68 mg) D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester in 12,5 μl DMSO μl -weise nacheinander und unter stetiger Durchmischung mit einem Magnetührstäbchen zu einer Lösung von 300 nmol (19,88 mg) BSA in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz in einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Reagenzien wurden mit Hilfe einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers vom Doppelkonjugat abgetrennt.

Zur Anreicherung Digoxigenin bindender Phagemide wurden 40 μl einer 0,5 μM oder 0,05 μM Lösung des Doppelkonjugates (33,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 3,35 $\mu\text{g/ml}$) in PBS mit 260 μl einer Lösung der frisch präparierten Phagemide ($5 \cdot 10^{11}$ bis $5 \cdot 10^{12}$ cfu/ml) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert, so daß sich Komplexe zwischen der Digoxigenin-Gruppe und den von den Phagemiden präsentierten BBP-Varianten ausbilden konnten. Anschließend wurden 100 μl einer Lösung von 8 % w/v BSA, 0,4 % v/v Tween 20 in PBS zugegeben.

Parallel wurden 100 μl der kommerziellen Suspension paramagnetischer Partikel dreimal mit jeweils 100 μl PBS gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml-Reaktionsgefäßes um eine um 50 ° vertikal geneigte Achse für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand wurde abgezogen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 μl 2 % w/v BSA in PBS/T für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Partikel mit der Mischung aus dem Doppelkonjugat und den Phagemiden versetzt, resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Absättigung freier Biotin-Bindungsstellen des Streptavidins wurden der Mischung schließlich 10 μl einer Lösung von 4 mM D-Desthiobiotin in PBS zugegeben, und es wurde für 5 min bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurde auch verhindert, daß das *Strep*-tag II (Abschnitt 1.6) als Teil des Fusionsproteins aus den BBP-Varianten und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit dem Streptavidin einen Komplex ausbilden konnte.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel achtmal mit jeweils 1 ml frischem PBS/T unter Zusatz von 1 mM D-Desthiobiotin gewaschen, mit Hilfe des Magneten gesammelt, und der Überstand wurde anschließend abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 15minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 950 μl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde

der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde sofort durch Zugabe von 140 μ l 0,5 M Tris neutralisiert.

Eluierte Phagemide wurden amplifiziert, bevor sie dem nächsten Anreicherungszyklus zugeführt wurden (Abschnitt 2.3.2.2).

2.3.4 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

Nach jedem Anreicherungszyklus wurde die Phagemid-Konzentration ausgewählter Waschlösungen sowie der Elutionslösung bestimmt, um den Verlauf der Selektion zu beurteilen.

Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10^{-8} , d. h. mit einem typischen Phagemidgehalt von 10^3 bis 10^4 cfu/ml hergestellt. 90 μ l der exponentiell wachsenden Zellkultur, die auch zur Amplifizierung eluierter Phagemide benutzt wurde (Abschnitt 2.3.2.2), wurden zu 10 μ l der kurz zuvor auf 37 °C temperierten Phagemidverdünnung gegeben und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur auf Kontaminationen wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit PBS hergestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und die gesamte Suspension von 100 μ l auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtiter durch Auszählen der Klone als cfu/ml bestimmt und um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

2.3.5 Kolonie-Filterstapel-Test

Die Selektion bindungsaktiver Phagemide gegen den Steroid-Liganden Digoxigenin mittels *Phage Display* führte zu einer relativen Anreicherung bindungsaktiver BBP-Mutanten aus der ursprünglichen Bibliothek. Um aus dem selektierten Ensemble schließlich diejenigen Varianten zu isolieren, die die höchste Affinität zu dem vorgegebenen Liganden aufweisen, wurde ein Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra *et al.*, 1991) eingesetzt. Hierfür wurden die selektierten Mutanten des Bilin-Bindungsproteins als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) sowie – zur funktionellen Immobilisierung – mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) produziert. Die Genkassette zwischen den beiden *Bst*XI-Schnittstellen wurde dazu aus dem Vektor pBBP20 bzw. pBBP24 isoliert und auf dem Vektor pBBP22 (Abschnitt 3.1.3) subkloniert.

Die eluierten Phagemide aus dem Affinitäts-Anreicherungsprozeß wurden zur Infektion einer exponentiell wachsenden Kultur von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Diese wurde auf Agarplatten mit LB/Amp-Medium ($\varnothing = 14$ cm) ausplattiert und bei 32 °C inkubiert (siehe Abschnitt 2.3.2.2). Die Zellen wurden abgeschabt, die Zelldichte der erhaltenen Suspension bestimmt, und mit einem entsprechenden Aliquot der Kultur wurden 50 ml LB/Amp-Medium zu einer

resultierenden OD₅₅₀ von 1,0 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm für ca. 7 h bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Kits Midi nach Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI geschnitten und das kleinere der beiden Fragmente (335 bp) durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und gereinigt (Abschnitt 2.2.4.2). In gleicher Weise wurde die DNA des Vektors pBBP22 mit *Bst*XI geschnitten und das größere der beiden Fragmente (3545 bp) isoliert.

Zur Ligierung wurden jeweils ca. 50 fmol der beiden DNA-Fragmente eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.5.9). Mit 5 µl dieses Ligierungsansatzes wurden 200 µl kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode transformiert (Abschnitt 2.2.2.1).

Die Transformanten wurden anschließend auf die Produktion von BBP-Varianten mit Bindungsaktivität für die Digoxigenin-Gruppe durchmustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 µm) aufgelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 7,5 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

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

Die vorbereitete, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf die hydrophobe Membran aufgelegt, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen BBP-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS/T gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml einer

Lösung von 10 µg/ml entweder des Doppelkonjugates von BSA mit Digoxigenin und Biotin (siehe Abschnitt 2.3.3.2) oder eines Konjugates von BSA mit Digoxigenin in PBS/T inkubiert.

Zur Herstellung des Konjugates von BSA und Digoxigenin wurde eine Lösung von 3,0 µmol (1,98 mg) DIG-NHS in 25 µl DMSO µl-weise und unter stetiger Durchmischung zu 300 nmol (19,88 mg) BSA (Sigma) in 1,9 ml 5 % w/v Natriumhydrogencarbonat gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert und überschüssiges Reagenz von dem BSA-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule abgetrennt.

Um durch die BBP-Varianten gebundenes Digoxigenin-Biotin-BSA-Doppelkonjugat oder Digoxigenin-BSA-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach zweimaligem Waschen für 5 min in 20 ml PBS/T für 1 h mit 10 ml ExtrAvidin®-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:10000 verdünnt in PBS/T) oder Anti-Digoxigenin F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1000 verdünnt in PBS/T) inkubiert. Die Membran wurde danach für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml PBS/T und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und schließlich kurz in AP-Puffer geschwenkt. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, 50 µg/ml in Dimethylformamid) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten BBP-Varianten, in Form der Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II und der ABD, für Digoxigenin nachgewiesen.

Um die Stringenz des Bindungstests zu erhöhen, wurde die Membran vor der Inkubation mit dem jeweiligen Reporterenzym gegebenenfalls zunächst mit einer Lösung des freien Liganden behandelt. Dazu wurde die Membran für 1 oder 10 min mit einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in PBS inkubiert (20,8 mg Digoxigenin wurden hierfür in 530 µl DMF gelöst und mit 26,6 ml PBS verdünnt) und anschließend dreimal für 5 min mit 20 ml PBS/T gewaschen.

Kolonien, die Anlaß zu starken Farbsignalen gaben, wurden ausgewählt, ihre DNA isoliert und der Sequenzanalyse unterzogen.

2.4 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Produktion rekombinanter BBP-Varianten oder Fusionsproteine in *E. coli* wurden die Expressionsplasmide pBBP21, pBBP25, pBBP27, pBBP29, pBBP31 und deren Derivate verwendet.

50 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator

kultiviert. Danach wurden 2 l LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Alternativ wurde Glucose-Minimalmedium/Amp für die Produktion eingesetzt. Eine Vorkultur entsprechend transformierter Zellen des Stammes *E. coli* JM83pro in 50 ml Glucose-Minimalmedium/Amp, die durch Kultivierung bei 30 °C für 36 h erhalten worden war, wurde hierfür im Verhältnis 1:100 für die Inokulation der Expressionskultur verwendet. Die Kultur wurde bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt, bis eine OD₅₅₀ von 0,5 erreicht wurde. Nach anschließender Induktion der Genexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (2 mg/ml in DMF) zu einer Endkonzentration von 200 µg/l wurde für weitere 3 h bei 22 °C und 200 rpm inkubiert.

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (SLA-3000, 4200 g, 4 °C, 15 min). Anschließend wurde das Medium vollständig abgenommen und das Sediment in insgesamt 1/100 des Kulturvolumens (20 ml) eiskaltem Saccharose-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Im Falle der Produktion von Fusionsproteinen aus BBP-Varianten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) wurde EDTA-freier Saccharose-Aufschlußpuffer eingesetzt, der zur Destabilisierung der äußeren *E. coli*-Membran anstelle des Komplexbildners 2 mg/ml Polymyxin B sulfat enthielt (Evans *et al.*, 1976; Dixon & Chopra, 1986). Auf diese Weise sollte die Komplexierung der für die katalytische Aktivität der PhoA essentiellen zweiwertigen Metallionen verhindert werden. Die resuspendierten Zellen wurden in einem 50 ml-Kunststoffröhrchen vereinigt und für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 20 min sowie SS-34, 27200 g, 4 °C, 15 min). Der periplasmatische Extrakt wurde danach zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert (vgl. Abschnitt 2.5.1 bis 2.5.3).

Für die spätere Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE wurde auch ein Gesamtzellaufschluß der Kultur im kleinen Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden zwei Methoden angewandt.

1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 18500 g, 4 °C, 3 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonaselösung (12,5 U/ml in Benzonasepuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden durch Benzonase im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur hydrolysiert, und danach wurde der Gesamtzellaufschluß bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

Alternativ wurden 20 µl der in Saccharose-Aufschlußpuffer resuspendierten Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, 180 µl Benzonaselösung (12,5 U/ml in Benzonasepuffer) zugegeben und die Zellen durch Zugabe von 50 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-

PAGE lysiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Gesamtzellaufschluß bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Reinigung rekombinanter Proteine in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000), erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie im Einschritt-Verfahren aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur (siehe Abschnitt 2.6).

Die Periplasmafraktion wurde über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und vor dem Auftrag auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997), mit einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/ml, wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280}) mit SA-Puffer gespült. Bis zu einem Volumen von 30 ml Periplasmafraktion betrug das Bettvolumen der Säule 2 ml. Hierbei wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flußrate von 20 ml/h betrieben. Bei größeren Volumina (bis zu 100 ml der Proteinlösung) wurde eine Säule mit 4 ml Bettvolumen verwendet und eine konstante Flußrate von 40 ml/h eingestellt. Die Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde mit einer 2,5 mM Lösung von D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer bis zur intensiven Orangefärbung des Säulenmaterials verdrängt. Das HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und gegen einen geeigneten Puffer dialysiert. Nach Sterilfiltration (0,45 µm) wurde das Protein bei 4 °C gelagert.

Bei der Reinigung rekombinanter PhoA-Fusionsproteine mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie wurden die entsprechenden Puffer, jedoch ohne den Zusatz von EDTA verwendet (vgl. Abschnitt 2.4).

2.5.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten, zu Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer besonderen Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1988). Die IMAC wurde deshalb zur Einzugs-Reinigung einer BBP-Variante mit einem C-terminalen His₆-Anhängsel aus der Periplasmafraktion einer *E. coli*-Kultur herangezogen.

Die Reinigung erfolgte unter Verwendung von Chelating Sepharose Fast Flow, einer Chromatographie-Matrix mit Iminodiessigsäure-Gruppen (IDA) als Chelatbildner. Eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml wurde zunächst bei einer konstanten Flußrate von 20 ml/h mit Wasser gespült und anschließend mit 10 ml einer 10 mM ZnSO₄-Lösung beladen. Schließlich wurde die Säule erneut mit 10 ml Wasser gespült und mit CP-Puffer äquilibriert. Danach wurde die dialysierte und sterilfiltrierte (0,45 µm) Periplasmafraktion aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit CP-Puffer gespült. Das gebundene Protein wurde durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 ml Volumen von 0 bis 300 mM Imidazol in CP-Puffer eluiert. Die Säule wurde anschließend durch Spülen mit 15 ml Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und 10 ml Wasser von den Metallionen befreit. Das gereinigte Protein wurde durch SDS-PAGE analysiert, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und bei 4 °C gelagert.

2.5.3 Analytische *Batch*-Chromatographie

Die Eignung neu synthetisierter Säulenmaterialien für die Isolierung Digoxigenin bindender BBP-Varianten mit Hilfe der Affinitätschromatographie wurde zunächst im analytischen Maßstab überprüft.

Hierzu wurden 20 µl des frisch synthetisierten und in der entsprechenden Aufbewahrungslösung resuspendierten Säulenmaterials (siehe Abschnitt 2.7) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, durch Zentrifugation sedimentiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, RT, 1 min) und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde es insgesamt viermal durch Resuspendieren in 80 µl KSH-Puffer und anschließendes Zentrifugieren (wie oben) gewaschen. Danach wurden 80 µl einer 10 µM Proteinlösung der zuvor durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten und gegen KSH-Puffer dialysierten rekombinanten BBP-Variante zugegeben; es wurde resuspendiert und unter gelegentlicher Durchmischung für 5 min bei RT inkubiert. Das Säulenmaterial wurde danach sedimentiert und viermal mit 80 µl KSH-Puffer gewaschen (wie oben). Anschliessend wurde durch Resuspendieren des Materials in 80 µl einer 2 mM Lösung

von Digoxigenin in KSH-Puffer (1,41 mg Digoxigenin wurden hierfür in 36 µl DMF gelöst und mit 1,77 ml KSH-Puffer gemischt) die gebundene BBP-Variante eluiert. Zur Elution von gegebenenfalls weiterem gebundenen Protein wurde das Säulenmaterial anschließend mit 80 µl 1x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE versetzt, resuspendiert und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde, zusammen mit den Waschlösungen und der Elutionslösung, mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

2.5.4 Gelpermeations-Chromatographie

Zur Bestimmung der Homogenität von Proteinproben im Anschluß an die Affinitätschromatographie sowie zur Auftrennung und Reinigung heterogener Proteinproben oder Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen wurde die Gelpermeations-Chromatographie angewandt, die eine Auftrennung verschiedener Moleküle nach ihrer Größe und Form erlaubt.

Hierzu wurde eine analytische Superdex 75 HR Gelfiltrationssäule unter Verwendung von PBS, PBS/E oder 6 M Guanidiniumchlorid in KSH-Puffer als Laufpuffer eingesetzt. Alle Puffer waren zuvor durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast worden. Die Chromatographie wurde bei einer konstanten Flußrate von 0,5 ml/min mit einem Dynamax® SD-300 HPLC-System betrieben. Die Absorptionsmessung erfolgte dabei mit Hilfe eines Dynamax® UV-1 Durchflußdetektors. Die Proteinproben mit Konzentrationen zwischen 1 µM und 50 µM wurden mit Hilfe von Probenschleifen mit bis zu 2 ml Volumen auf die Säule aufgetragen.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Molmasse wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt (Laemmli, 1970). Hierbei fand das Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) Anwendung, mit dem eine erhöhte Auflösung erreicht wird. Die Auftrennung der Proteine geschah in Gelen mit 15 % w/v Polyacrylamid, deren Trenngelgröße 5,5 x 8,5 cm bei einer Geldicke von 0,75 mm bzw. 1 mm betrug. Zur Herstellung eines Paares von 15 %igen SDS-Gelen wurden folgende Lösungen verwendet:

Trenngel:

Rotiphorese Gel 30	5,0 ml
4x Lower-Tris	2,5 ml
H ₂ O	2,5 ml
TEMED	2,5 µl
APS 10 % w/v	50 µl

Sammelgel:

Rotiphorese Gel 30	1,0 ml
4x Upper-Tris	1,5 ml
H ₂ O	3,5 ml
TEMED	3,0 µl
APS 10 % w/v	36 µl

Nach dem Zusammenbauen der Gelplatten und Abdichten des Gels mit 1 % w/v geschmolzener Agarose-Lösung wurden 3,6 ml polymerisierende Trenngel-Lösung zwischen die Glasplatten gefüllt und mit 900 µl Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Wasser abgegossen, polymerisierende Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Taschenformer eingesetzt.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und Fling & Gregerson-Laufpuffer eingefüllt. Proteinproben, deren Volumen weniger als 20 µl betrug, wurden jeweils mit den entsprechenden Pufferlösungen auf 20 µl aufgefüllt, mit 5 µl 5x Auftragspuffer für SDS-PAGE versetzt, gemischt und zur Denaturierung für 5 min im Metallblockthermostaten auf 95 °C erhitzt. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Proteinlösungen kurz zentrifugiert und in die Probenaschen pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker gerade aus dem Gel herausgelaufen war. Die Proteinbanden wurden durch 20minütiges Schwenken des Trenngels in Färbelösung und anschließende Entfärbung des Hintergrundes mittels Entfärbelösung sichtbar gemacht. Das Gel wurde bis zu seiner Trockenkonservierung bei 4 °C in Aufbewahrungslösung gelagert.

2.5.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration homogener Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessungen bei 280 nm (A) – unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des entsprechenden Puffers – nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

ermittelt. Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten (ε_{denat}) wurden für alle rekombinanten Proteine mit Hilfe des Computerprogrammes Peptidesort im GCG-Programmpaket (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group; Devereux *et al.*, 1984) als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin für die vollständig entfaltete Polypeptidkette berechnet (Gill & von Hippel, 1989). Für einige der rekombinanten Proteine, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit produziert wurden, sind sie in Tabelle 3 angegeben.

Die molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine im gefalteten Zustand (ε_{nativ}) können von den kalkulatorischen Koeffizienten abweichen und wurden für einige Proteine experimentell korrigiert (Gill & von Hippel, 1989). Hierfür wurde der Absorptionwert einer nativen und

einer vollständig entfalteten Proteinprobe identischer Konzentration ins Verhältnis gesetzt und mittels Gleichung (2) der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{nativ} ermittelt:

$$\epsilon_{nativ} = \epsilon_{denat} \frac{A_{nativ}}{A_{denat}} \quad (2).$$

Dazu wurde eine konzentrierte Proteinlösung (15 bis 20 μM) zunächst dreimal gegen KSH-Puffer dialysiert. 250 μl dieser Lösung wurden einmal mit 750 μl KSH-Puffer und einmal mit 750 μl 8 M Guanidiniumchlorid in KSH-Puffer pH 7,5 verdünnt und über Nacht bei 22 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Als Blindwert wurden analoge Lösungen mit dem Puffer nach dem letzten Dialyseschritt angesetzt. Anschließend wurden die Absorptionswerte bei 280 nm gemessen, der jeweilige Puffer-Blindwert subtrahiert und ϵ_{nativ} nach Gleichung (2) berechnet.

Protein	ϵ_{280} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
BBP	54.860
BBP	54.150*
DigA	53.580
DigA-Varianten	53.580
FluA-DigA16	101.470
FluA-DigA16/19	101.470
PhoA-DigA16	84.970
PhoA-DigA16/19	84.970
DigA16-PhoA	84.970
DigA16/19-PhoA	84.970

Tabelle 3: Molare Extinktionskoeffizienten verschiedener rekombinanter Proteine bei 280 nm. * Für das native Protein nach Gill & von Hippel (1989) korrigierter kalkulatorischer Extinktionskoeffizient (Beste, 1998).

Zusätzlich wurden die Extinktionskoeffizienten einzelner Proteine nach der Methode von Scopes (1974) bestimmt. Hierzu wurden die Absorptionswerte einer Proteinlösung bei 205 und 280 nm gemessen und der molare Extinktionskoeffizient bei 205 nm (ϵ_{205}) nach Gleichung (3) errechnet:

$$\epsilon_{205} = \left(27 + 120 \frac{A_{280}}{A_{205}} \right) M_R \quad (3).$$

Dabei bezeichnet M_R die Molmasse des jeweiligen Proteins. Für die Messung der Absorptionen bei 205 nm wurden 20 μ l einer 9 bis 20 μ M Proteinlösung in PBS/E mit 700 μ l Wasser gemischt, im Spektralphotometer vermessen und um den entsprechenden Puffer-Blindwert sowie den Verdünnungsfaktor korrigiert. Die gleiche Proteinlösung wurde unverdünnt bei 280 nm vermessen und ebenfalls um die Eigenabsorption des Puffers korrigiert. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde schließlich aus ϵ_{205} der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm (ϵ_{280}) errechnet:

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{205} \frac{A_{280}}{A_{205}} \quad (4).$$

2.5.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis der Bindungsaktivität Digoxigenin bindender BBP-Varianten wurden ELISA-Experimente mit immobilisierten Digoxigenin-Gruppen durchgeführt. Ebenso wurde die Bindungsaffinität von Fusionsproteinen aus zwei unterschiedlichen rekombinanten BBP-Varianten zu ihren Liganden Digoxigenin bzw. Fluorescein untersucht. Weiterhin wurde die Detektion von Digoxigenin durch Proteinfusionen aus verschiedenen BBP-Varianten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase in ELISA-Experimenten verglichen. Die rekombinanten BBP-Varianten bzw. deren Fusionsproteine wurden vor der Verwendung im ELISA durch Affinitätschromatographie gereinigt und einmal gegen PBS/E dialysiert.

Nachweis der Digoxigenin-Gruppe durch rekombinante BBP-Varianten im indirekten ELISA. Der Steroid-Ligand Digoxigenin wurde zur Detektion durch unterschiedliche BBP-Varianten als Proteinkonjugat mit BSA (vgl. Abschnitt 2.3.5) oder Ovalbumin in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Greiner; Removastrip 2x8 well mit hoher Bindekapazität) adsorbiert und die Bindung der BBP-Varianten an den Liganden anhand des C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels detektiert (Schmidt & Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000).

Ein Konjugat von Digoxigenin mit Ovalbumin wurde hergestellt, indem 1,5 μ mol (0,99 mg) DIG-NHS in 25 μ l DMSO μ l-weise und unter stetiger Durchmischung mit einem Magnetrührstäbchen zu 300 nmol (13,5 mg) Ovalbumin in 1,9 ml 5 % NaHCO_3 gegeben wurden. Der Ansatz wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers von dem Ovalbumin-Konjugat abgetrennt (vgl. Abschnitt 2.3.3.1).

Zunächst wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 100 μ l einer Lösung von 100 μ g/ml des Digoxigenin-BSA- oder Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugates in PBS befüllt

und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten Vertiefungen, die mit den unmodifizierten Trägerproteinen beschichtet wurden. Die Proteinlösungen wurden abgezogen und unbelegte Bindungsstellen nach dreimaligem Waschen mit PBS/T durch einstündige Inkubation der Vertiefungen mit 200 μ l 2 % w/v BSA in PBS/T bei RT abgesättigt.

Nach wiederum dreimaligem Waschen mit PBS/T wurden jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 100 μ l einer 1 μ M Lösung der gereinigten BBP-Variante in PBS pipettiert und die Lösung durch Zugabe von 1 μ l einer 10 %igen v/v Tween 20-Lösung auf eine Konzentration von 0,1 % v/v Tween 20 eingestellt. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l PBS/T vorgelegt. Ausgehend von der Proteinlösung der ersten Vertiefung wurden jeweils 50 μ l Protein entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise eine Verdünnungsreihe in PBS/T hergestellt.

Nach 1 h Inkubation bei RT wurde erneut dreimal mit PBS/T gewaschen und 50 μ l einer 1:1000-Verdünnung von Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat in PBS/T in die Vertiefungen gegeben. Es wurde für 1 h bei RT inkubiert, die Lösung entfernt und zunächst zweimal mit PBS/T und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Der Nachweis gebundener BBP-Varianten erfolgte nach Zugabe von 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in AP-Puffer, das in einer durch die Alkalische Phosphatase katalysierten Hydrolyse zum farbigen p-Nitrophenolat umgesetzt wird. Die Produktbildung wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines SpectraMax 250 ELISA-Photometers bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Temperatur von 25 °C verfolgt.

Nachweis der Digoxigenin-Gruppe durch rekombinante BBP-Fusionsproteine im direkten ELISA. Zum Nachweis von Digoxigenin-Gruppen mit Hilfe eines rekombinanten Fusionsproteins aus der BBP-Variante und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase im Sandwich-ELISA wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zunächst mit je 100 μ l einer 100 μ g/ml-Lösung eines Konjugates von Digoxigenin mit BSA (Abschnitt 2.3.5), mit Ovalbumin (siehe oben) oder mit RNase A (Abschnitt 2.3.3.1) in PBS befüllt und über Nacht bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten wiederum Vertiefungen mit nicht konjugiertem Trägerprotein. Nach Entfernen der Lösung wurden unbelegte Bindungsstellen mit 200 μ l einer Lösung von 2 % w/v BSA in PBS/T für 1 h abgesättigt.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurde – analog wie oben – eine Verdünnungsreihe, jeweils ausgehend von 100 μ l einer Lösung des gereinigten Fusionsproteins, hergestellt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gewaschen.

Der Nachweis des an die Digoxigenin-Gruppen gebundenen Fusionsproteins erfolgte schließlich unmittelbar unter Ausnutzung dessen katalytischer Aktivität anhand der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat.

Nachweis der Digoxigenin-Gruppe durch rekombinante bispezifische Fusionsproteine aus zwei BBP-Varianten im ELISA. Die Digoxigenin-Gruppe wurde durch Fusionsproteine aus zwei BBP-Varianten nachgewiesen, von denen eine Fluorescein, die andere Digoxigenin als Liganden erkennt. Hierfür wurden Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wie oben beschrieben zunächst mit je 100 μl einer 100 $\mu\text{g/ml}$ -Lösung des digoxigenierten Trägerproteins beschichtet (Kontrolle mit unmodifiziertem Trägerprotein) und, nach dreimaligem Waschen mit PBS/T, unbelegte Bindungsstellen in Gegenwart von 200 μl 2% w/v BSA in PBS/T abgesättigt.

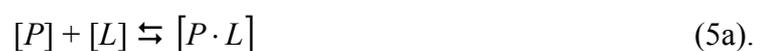
Danach wurden jeweils ausgehend von je 100 μl einer 1 μM Lösung des gereinigten bispezifischen Fusionsproteins Verdünnungsreihen hergestellt (s. o.) und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurden 50 μl einer 1:200-Verdünnung Fluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugat in PBS/T (ca. 7 u/ml) in die Vertiefungen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert.

Für die Herstellung des Fluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugates wurden 33 nmol (2 mg; spezifische Enzymaktivität >2500 u/mg) Alkalische Phosphatase (CIP) in 2 ml 5 % w/v NaHCO_3 mit 100 nmol (58,6 μg) Fluorescein-5(6)-carboxamido-capronsäure-N-hydroxy-succinimidester in 25 μl DMSO für 1 h bei RT unter Durchmischung mit einem Magnetührstäbchen in einem 2 ml Reaktionsgefäß umgesetzt. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend vom Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule nach den Angaben des Herstellers abgetrennt und das Konjugat dabei mit insgesamt 3,5 ml von der Säule eluiert.

Anschließend wurde zweimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gewaschen und die enzymatische Produktbildung nach Zugabe von 100 μl pNPP-Lösung (0,5 mg/ml in AP-Puffer) bei 405 nm verfolgt.

Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten mittels ELISA.

Im thermodynamischen Gleichgewicht einer Reaktion:



ist die Dissoziationskonstante K_D definiert als:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} \quad (5b).$$

Hierbei bezeichnet $[P]$ die Konzentration des unkomplexierten Proteins, $[L]$ die Konzentration des nicht gebundenen Liganden und $[P \cdot L]$ die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes.

Setzt man – anhand der Bilanzgleichungen für die bimolekulare Komplexbildung – die Konzentrationen:

$$[P] = [P]_t - [P \cdot L] \quad (6a)$$

und

$$[L] = [L]_t - [P \cdot L] \quad (6b)$$

mit $[P]_t$ als Gesamtkonzentration des eingesetzten Proteins und $[L]_t$ als Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationschritt, ergibt sich:

$$K_D = \frac{([P]_t - [P \cdot L]) ([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]} \quad (6c).$$

Unter der Annahme, daß $[P]_t \gg [P \cdot L]$, ergibt sich aus Gleichung (6c) durch Auflösung nach $[P \cdot L]$:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t [L]_t}{[P]_t + K_D} \quad (7).$$

$[P]_t$ entspricht der eingesetzten bekannten Konzentration der BBP-Variante bzw. des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \cdot L]$ wird indirekt als ligandengebundenes Protein anhand der katalytischen Aktivität des für die gemessene Umsetzung verantwortlichen Enzyms quantifiziert. Somit verbleiben als anzupassende Parameter bei Variation von $[P]_t$ die Gesamtkonzentration des immobilisierten Digoxigenins $[L]_t$ sowie die gesuchte Dissoziationskonstante K_D .

Auf diese Weise wurden durch Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderungen gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe ($\Delta A/\Delta t$ in $10^{-3}/\text{min}$; mOD/min) und Anpassung der erhaltenen Kurve gemäß Gleichung (7) mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“ die Parameter K_D sowie $[L]_t$ bestimmt (Voss & Skerra, 1997).

2.5.8 Western Blotting

Für den immunchemischen Nachweis der an Trägerproteine gekoppelten Digoxigenin-Gruppe wurde die Methode des *Western Blotting* verwendet. Proteingemische wurden hierfür zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend wurde die Digoxigenin-Gruppe selektiv angefärbt.

Die Proben mit an Trägerproteine gekoppelten Digoxigenin-Gruppen (vgl. Abschnitte 2.3.3.1, 2.3.5 und 2.5.7) wurden mittels eines 15 %igen Polyacrylamidgels aufgetrennt und das Trenngel anschließend für 20 min in Fling & Gregerson Laufpuffer mit 20 % v/v Methanol geschwenkt. Für den Elektrotransfer wurden acht Blatt 5,5 x 8,5 cm große Whatman-Filterpapiere in 20 % v/v Methanol-haltigem Fling & Gregerson Laufpuffer getränkt. Vier Blatt wurden auf die Edelstahl-Kathode der Elektroblotapparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, der ebenfalls mit Puffer benetzte Nitrozellulose-Membranfilter und weitere 4 Blatt Whatman-Papier gestapelt. Dabei wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten eingeschlossen waren. Anschließend wurde die Graphit-Anodenplatte aufgelegt und der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulose-Membran dreimal für 15 min in je 20 ml PBS/T geschwenkt.

Für den immunchemischen Nachweis der Digoxigenin-Gruppen mit Hilfe eines kommerziellen Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugates (Roche) wurde die Membran für 1 h bei RT mit 10 ml einer 1:1000 Verdünnung des Konjugates in PBS/T auf dem Wippisch inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit 20 ml PBS/T gewaschen und daraufhin kurz in 20 ml AP-Puffer geschwenkt. Die Anfärbung erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Durch mehrmaliges Spülen der Membran mit destilliertem Wasser wurde die Reaktion bei Erreichen der gewünschten Farbintensität der Banden abgebrochen.

Der „immunchemische“ Nachweis der Digoxigenin-Gruppe unter Verwendung rekombinanter Fusionsproteine aus BBP-Varianten und der bakteriellen Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Inkubation der Membran für 1 h mit 10 ml einer 0,5 µM Lösung des Fusionsproteins in PBS. Danach wurde wie oben gewaschen und gebundenes Fusionsprotein anhand der chromogenen Reaktion (vgl. Abschnitt 2.3.5) nachgewiesen.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Fluoreszenztitration

Messung der Proteinfluoreszenz. Die Liganden-Bindungseigenschaften von BBP-Varianten und gegebenenfalls deren Fusionsproteinen wurden mittels der Methode der Fluoreszenztitration bestimmt. Gemessen wurde dabei die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden (*Quenching*). Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 345 nm (Spaltbreite 6 nm). Die Liganden zeigten bei den angegebenen Wellenlängen keine signifikante Eigenfluoreszenz oder – abgesehen von Fluorescein – Eigenabsorption.

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

Korrektur des inneren Filtereffektes von Fluorescein. Bei der Verwendung von Fluorescein als Liganden wurden die gemessenen Fluoreszenzdaten aufgrund dessen Eigenabsorption bei der Anregungswellenlänge von 295 nm um diesen Betrag korrigiert. Die bei der Emissionswellenlänge von 345 nm ebenfalls vorhandene, geringe Eigenabsorption wurde nicht explizit mit in die Korrektur einbezogen.

Die Verringerung der gemessenen Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Fluorescein wurde durch Fluoreszenztitration mit einer geeignet konzentrierten N-Acetyl-L-tryptophanamid-Lösung ermittelt (ca. 5 μM). Da Fluorescein nicht mit N-Acetyl-L-tryptophanamid durch molekulare Komplexbildung wechselwirkt, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Fluorescein in erster Linie auf dessen Eigenabsorption zurückzuführen.

Für die Fluoreszenz F eines Proteins P gilt bei niedriger Proteinkonzentration allgemein:

$$F = f_P [P] I_{Anregung}^0 \quad (8).$$

Dabei ist f_P der molare Proteinfluoreszenzkoeffizient, $[P]$ die molare Konzentration des Proteins und $I_{Anregung}^0$ die Intensität des (ungeschwächten) Anregungslichtes im Emissions-Fokus.

Durch den inneren Filtereffekt des Liganden in der Lösung wird die Intensität des Anregungslichtes in Abhängigkeit von dessen Konzentration ggf. abgeschwächt. Es gilt daher für die gemessene, apparente Fluoreszenz F_{App} mit $I_{Anregung}^0 > I_{Anregung}$:

$$F_{App} = f_P [P] I_{Anregung} \quad (9).$$

Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetz läßt sich für die Abschwächung des Anregungslichtes formulieren:

$$\log \frac{I_{Anregung}^0}{I_{Anregung}} = \varepsilon_L c_L d \quad (10).$$

Dabei ist ε_L der molare Extinktionskoeffizient des Liganden, c_L die Ligandenkonzentration und d die (unbekannte) Wegstrecke des Anregungslichtes von der Küvettenwand bis zum Emissions-Fokus. Die Umstellung von Gleichung (10) führt zu:

$$I_{Anregung} = I_{Anregung}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (11).$$

Damit ergibt sich aus Gleichung (9):

$$F_{App} = f_P [P] I_{Anregung}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (12)$$

bzw. unter Verwendung von Gleichung (8):

$$F_{App} = F \cdot 10^{-\varepsilon_L c_L d} \quad (13).$$

Werden die bei der Titration von N-Acetyl-L-tryptophanamid [*Trp*] mit Fluorescein erhaltenen Fluoreszenzsignale F_{App} halblogarithmisch gegen die Fluorescein-Konzentration c_L aufgetragen, kann der apparente Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{App} = \varepsilon_L d$ als Steigung der Regressionsgeraden bestimmt werden:

$$\log F_{App} = \log \left(f_{Trp} [Trp] I_{Anregung}^0 \right) - \varepsilon_{App} c_L \quad (14).$$

Die Korrektur der bei der Titration von Proteinlösungen mit Fluorescein gemessenen Werte für die Fluoreszenzintensitäten erfolgt dann jeweils mittels:

$$F = F_{App} \cdot 10^{\varepsilon_{App} c_L} \quad (15).$$

Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Im Verlauf der Fluoreszenztitration läßt sich die Komplexbildung aus Protein (*P*) und Ligand (*L*) durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (siehe Abschnitt 2.5.7). Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich gemäß Gleichung (6c). Deren exakte Auflösung als gemischt quadratische Gleichung nach $[P \cdot L]$ ergibt:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (16).$$

Unter Zuhilfenahme der o. g. Bilanzbeziehungen (Gleichungen (6a) und (6b)) ergibt sich analog für $[P]$ und für $[L]$:

$$[P] = \frac{[P]_t - [L]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (17)$$

$$[L] = \frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (18).$$

Die gemessene Gesamtfluoreszenz einer Mischung aus Protein, Ligand und Protein-Ligand-Komplex setzt sich angenähert additiv aus den Termen für die Fluoreszenzen der einzelnen Komponenten des Gemisches zusammen:

$$F = f_P [P] + f_L [L] + f_{PL} [P \cdot L] \quad (19).$$

Dabei stehen f_P , f_L und f_{PL} für die jeweiligen molaren Fluoreszenzkoeffizienten. Nach Einsetzen der Gleichungen (16) bis (18) erhält man:

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([L]_t - [P]_t - K_D) \frac{f_L}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P + f_L - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (20).$$

Da die hier verwendeten Liganden unter den Meßbedingungen für die Proteinfluoreszenz keine Eigenfluoreszenz zeigten, vereinfacht sich Gleichung (20) mit $f_L = 0$ zu:

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (21).$$

Die gemessenen Fluoreszenzwerte eines Titrationsexperimentes wurden durch Subtraktion um den Einfluß des Puffers und evtl. des Liganden (bei der Titration mit Fluorescein mittels Gleichung (15)) korrigiert, auf einen Anfangswert von 100 % normiert und gegen die Konzentration des titrierten Liganden aufgetragen. Die Kurvenanpassung der Daten erfolgte schließlich gemäß Gleichung (21) durch nicht-lineare Regression mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“ (siehe oben) unter Anpassung von f_P , f_{PL} und K_D , sowie, soweit erforderlich, von $[P]_t$ (vgl. Abschnitt 3.3.5).

2.6.2 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) tritt auf, wenn sich die Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R für die gegenläufigen zirkular polarisierten Komponenten, in die sich linear polarisiertes Licht zerlegen läßt, beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium voneinander unterscheiden (Berova *et al.*, 2000). Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen, bei denen das Phänomen des Circulardichroismus insbesondere zu beobachten ist, unterscheidet man einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptid-Bindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). Letztere erlauben eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung ergeben dagegen Aufschluß über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente. Messungen der CD-Signale im Bereich zwi-

schen 190 und 220 nm eignen sich daher zur Messung von Konformationsänderungen, z. B. bei der thermischen Denaturierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD-Spektroskopie sowohl zur qualitativen Abschätzung struktureller Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen in BBP-Varianten als auch für Untersuchungen zur Proteinstabilität einzelner Varianten durch thermische Denaturierung eingesetzt.

Zur Vorbereitung für die Messung wurden die zu untersuchenden BBP-Varianten nach der Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie zunächst viermal gegen 20 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 dialysiert. Dann wurden die Proteinproben mit einer Konzentration von ca. 100 bis 350 µg/ml (5 bis 17 µM) in eine Spezialküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 mm pipettiert, mit einem Deckel luftdicht verschlossen und in den temperierbaren Probenhalter des Jasco J-810 Spektropolarimeters gestellt.

CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm wurden durch Akkumulation von 15 bis 20 Einzelspektren (*Response* 2 s, *Bandwidth* 1 nm, *Data pitch* 0,2 nm, *Scan speed* 50 nm/min) bei einer Proben temperatur von 22 °C erhalten. Die bei der Messung der CD-Spektren ermittelten Werte für die Elliptizität Θ bei der Wellenlänge λ wurden für jede BBP-Variante nach Gleichung (22) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ ($MRW = \text{Mean Residue Weight}$) umgerechnet (Schmid, 1989):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta_{(\lambda)} M_R}{10 c d N_A} \quad [\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}] \quad (22).$$

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

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

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

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



ist definiert als:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f(u)}{1-f(u)} \quad (23b).$$

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

$$f(u) = \frac{K_U}{1+K_U} \quad (24).$$

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

$$f(u) = \frac{y_{obs} - y_N}{y_U - y_N} \quad (25)$$

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

$$y_N = m_N T + b_N \quad (26)$$

$$y_U = m_U T + b_U \quad (27).$$

Die Parameter b_N und b_U stehen für die Ordinatenabschnitte der Basislinien von nativem und denaturiertem Zustand, während m_N und m_U die Steigungen der jeweiligen Basislinien in Abhängigkeit von der Temperatur beschreiben. Durch Gleichsetzen von Gleichung (24) und (25) und Auflösen der Beziehung nach y_{obs} ergibt sich:

$$y_{Obs} = \frac{y_U K_U + y_N}{1 + K_U} \quad (28).$$

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

$$K_U = \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (29).$$

Unter Substitution von K_U , y_N und y_U in Gleichung (28) durch Gleichungen (26), (27) und (29) erhält man (Nasser Brumano *et al.*, 2000):

$$y_{Obs} = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \left\{ \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\}}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (30).$$

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

Um die Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen BBP-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung (25) unter Verwendung der aus der nicht-linearen Regression nach Gleichung (30) gewonnen Parameter b_N , b_U , m_N und m_U auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Die so erhaltenen normierten Entfaltungskurven konnten anschließend nach Gleichung (31), die sich aus Gleichung (24) und (29) ergibt, angepaßt werden:

$$f(u) = \frac{\exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (31).$$

Die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen (25 °C) $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ kann bei Annahme einer temperaturunabhängigen Entfaltungsenthalpie ΔH_m unter Verwendung der *van't Hoff'schen* Reaktionsisochore (Gleichung (29)) mit der Schmelztemperatur T_m für $T = 298,15$ K berechnet werden:

$$\Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = -RT \ln K_U^{25^\circ\text{C}} \quad (32).$$

2.6.3 Denaturierung durch Guanidiniumchlorid

Die Faltungsstabilität ausgewählter BBP-Varianten wurde durch chemische Denaturierung mit Guanidiniumchlorid (GdnHCl) untersucht (Pace 1986; Pantoliano *et al.*, 1991). Hierzu wurde die reversible Entfaltung in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 6 M GdnHCl anhand der konformationsabhängigen Proteinfluoreszenz verfolgt. Die Änderung des Fluoreszenzsignales im Verlauf der De- bzw. Renaturierung war dabei für die einzelnen BBP-Varianten verschieden stark ausgeprägt.

Zur Herstellung von Proteinlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an GdnHCl wurde zunächst eine 8 M Stammlösung des Denaturierungsmittels in KSH-Puffer zubereitet. Diese Stammlösung sowie alle übrigen Lösungen, die im Denaturierungsexperiment eingesetzt wurden, wurden durch Sterilfiltration von Partikeln befreit (0,45 µm). Ausgehend von der Stammlösung wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen durch Verdünnung mit KSH-Puffer typischerweise 30 Arbeitslösungen mit unterschiedlichen GdnHCl-Konzentrationen hergestellt. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, daß möglichst viele Meßpunkte im Übergangsbereich der Denaturierungskurve lagen. Als Konzentrationsunterschied zwischen zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurde vor dem Übergang typischerweise 0,2 M, während des Übergangs 0,1 M und nach dem Übergang wiederum 0,2 M GdnHCl gewählt.

Für jeden Meßwert wurde eine Probe mit einem Volumen von 500 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Dafür wurden je 450 µl der GdnHCl-Arbeitslösung mit 50 µl einer ca. 10 µM Lösung der jeweiligen BBP-Variante in KSH-Puffer gemischt. Zusätzlich wurde zur Korrektur des Fluoreszenzsignals für jeden Meßwert eine weitere Lösung angesetzt, bei der anstelle der Proteinlösung KSH-Puffer zugegeben wurde. Die Ansätze wurden durchgemischt, zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 g, RT, 1 min) und für mindestens 20 h bei 22 °C inkubiert. Vor der Messung wurden die Ansätze nochmals kurz gemischt und wie oben zentrifugiert.

Die Rückfaltung der BBP-Varianten wurde untersucht, indem zunächst eine 40 µM Proteinlösung in KSH-Puffer mit dem dreifachen Volumen der 8 M GdnHCl-Stammlösung gemischt wurde, so daß die Endkonzentration an Protein 10 µM und die Konzentration an GdnHCl

etwa 6 M betrug. Dieser Ansatz wurde zum Zwecke der Denaturierung für mindestens 20 h bei 22 °C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, zu niedrigeren GdnHCl-Konzentrationen verdünnt. Um die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes zu ermöglichen, wurde die Probe abermals für mindestens 20 h bei 22 °C inkubiert.

Zur Messung der Faltungs- bzw. Entfaltungskurve wurde die Proteinfluoreszenz der einzelnen Entfaltungsansätze bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt (Spaltbreite 4 nm). Das über 10 s gemittelte Fluoreszenzsignal wurde bei derjenigen Wellenlänge gemessen (Spaltbreite 9 nm), bei der die maximale Änderung der Intensität im Verlauf der Denaturierung zu beobachten war, und für jede BBP-Variante zunächst separat bestimmt wurde. Dazu wurde das Differenzspektrum der Emission einer vollständig denaturierten Proteinprobe in 6 M GdnHCl sowie einer nativen Proteinprobe in KSH-Puffer gemessen. Die Einzelspektren wurden vor der Differenzbildung zusätzlich um ihre Blindwertspektren korrigiert.

Nach den Fluoreszenzmessungen wurde die tatsächliche GdnHCl-Konzentration der einzelnen Entfaltungsansätze refraktometrisch überprüft. Als Meßwert wurde die Differenz der Brechungsindizes der Probenlösungen und des KSH-Puffers, Δn_{GdnHCl} , bestimmt und die tatsächliche GdnHCl-Konzentration $[D]$ – unter Vernachlässigung des Proteingehaltes – nach dem Modell von Pace (1986) errechnet:

$$[D] = 55,147 \cdot \Delta n_{GdnHCl} + 38,68 \cdot \Delta n_{GdnHCl}^2 - 91,6 \cdot \Delta n_{GdnHCl}^3 \quad (33).$$

Die mathematische Auswertung der skalierten Entfaltungskurve und die Bestimmung der auf eine Konzentration von 0 M GdnHCl extrapolierten freien Entfaltungsenthalpie $\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O}$ sowie der Kooperativität des Überganges m erfolgte nach dem Modell vom Pace (1986) gemäß folgender Gleichung (zur Herleitung siehe Müller, 1995; Schmidt, 1998):

$$f(u) = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O} - m[D]}{RT}\right)}{\exp\left(-\frac{\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O} - m[D]}{RT}\right) + 1} \quad (34).$$

Für die Bestimmung des relativen Anteils an entfaltetem Protein, $f(u)$, gelten die weiter oben gemachten Angaben (vgl. Abschnitt 2.6.2). Die so skalierten Fluoreszenzdaten wurden auch zur Berechnung der charakteristischen GdnHCl-Konzentration herangezogen, $[D]_{1/2}$, bei der das Protein zu 50 % im ungefalteten Zustand vorliegt:

$$[D]_{1/2} = \frac{\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O}}{m} \quad (35).$$

2.6.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung der rekombinanten BBP-Varianten erfolgte mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (MALDI-TOF = *Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation – Time of Flight*; Zenobi & Knochenmuss, 1998) des Typs Biflex III (Bruker) und wurden freundlicherweise von F. J. Winkler, TU München, durchgeführt. Das Verfahren dient der zerstörungsfreien Überführung der Proteinmoleküle in die Gasphase nach Kokristallisation mit einer sublimierbaren Matrix, in diesem Falle α -Cyano-4-hydroxycimtsäure, die ein Absorptionsmaximum bei 337 nm aufweist. Durch anschließendes gepulstes Einstrahlen von Licht eines N₂-Lasers mit einer Wellenlänge von 337 nm kommt es zu einer thermisch induzierten Sublimation der Matrixmoleküle. Hierbei werden auch die Proteinmoleküle freigesetzt, die durch Zusatz von Trifluoressigsäure im Kristallisationsansatz protoniert sind und schließlich im Spektrometer entsprechend ihrer Molekülmasse und Ladung aufgetrennt werden können. Die Eichung der Massenskala erfolgte durch Vermessen eines Proteins mit bekannter Molekülmasse (Streptavidin Mutante 1, kalkulierte Masse = 13.372,6 Da; Voss & Skerra, 1997).

Für die Probenvorbereitung wurden zunächst 5 μ l einer 10 μ M Lösung der BBP-Variante in KSH-Puffer mit demselben Volumen einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxycimtsäure-Lösung in 66 % v/v Acetonitril, 1 % v/v Trifluoressigsäure gemischt. Anschließend wurden jeweils 0,5 μ l dieser Lösung in die Vertiefungen des Probenträgers gegeben, im Luftstrom getrocknet und in das Spektrometer eingebracht. Die Spektren wurden durch Akkumulation von jeweils 200 bis 280 Datensätzen im linearen Betriebsmodus des Detektors bei einer Abschwächung des Laserlichtes von 42 - 44 % erhalten. Die Beschleunigungsspannung betrug 19 kV und wurde nach einer Verzögerungszeit von 45 μ s nach Ende des Laserpulses angelegt. Die Masse der BBP-Varianten wurde anhand der m/z-Skala als Signal für das einfach positiv geladene Molekül bestimmt.

2.7 Synthese von Affinitäts-Säulenmaterialien

2.7.1 Herstellung von Digoxigenin-Sepharose

Für die Affinitätschromatographie einer BBP-Variante unter Ausnutzung ihrer Bindungsspezifität für Digoxigenin wurde eine Aminohexyl-Sepharose-Säulenmatrix mit der Digoxigenin-Gruppe derivatisiert.

Hierfür wurde 1 ml EAH-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), mit einer Konzentration von 7 - 12 μ mol an freien NH₂-Gruppen, zunächst in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt

und anschließend zehnmal mit jeweils 8 ml 5 % w/v NaHCO₃, pH 8,2 (5 % w/v NaHCO₃ wurde durch Zugabe von NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt) gewaschen. Zwischen den Waschschrritten wurde das Säulenmaterial jeweils durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4K10, 4420 g, RT, 1 min) und der Überstand abgezogen. Danach wurden μ l-weise und unter stetiger Durchmischung mit einem Magnetrührstäbchen 7,6 μ mol (5 mg) DIG-NHS, gelöst in 100 μ l DMSO, zugegeben und die Mischung für 2 h bei RT inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend durch zehnmaliges Waschen mit jeweils 8 ml 30 % v/v EtOH abgetrennt und das Säulenmaterial schließlich in 500 μ l der Waschlösung bei 4 °C gelagert.

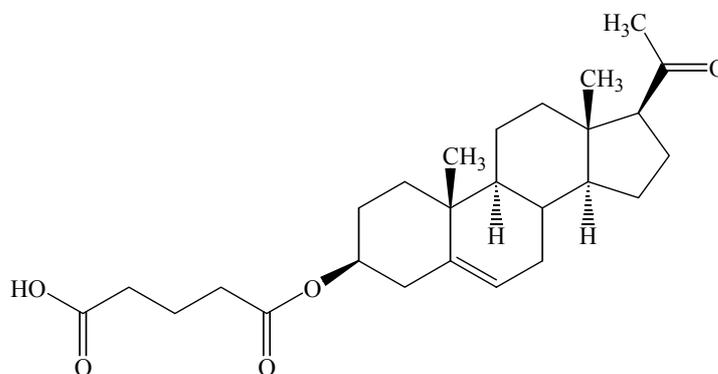
2.7.2 Herstellung von 3-Glutaryl-5-pregnen-3 β -ol-20-on-Sepharose

Für analoge Zwecke wurde 3-Glutaryl-5-pregnen-3 β -ol-20-on (Abbildung 9) an Sepharose gekoppelt. Die Synthese des Säulenmaterials wurde freundlicherweise von R. Medina, TU München durchgeführt.

Synthese des 3-Glutaryl-5-Pregnen-3 β -ol-20-ons (nach Medina, R., unveröffentlicht). In einem Reagenzglas mit Deckel wurden zunächst 2 mmol (633 mg) 5-Pregnen-3 β -ol-20-on, 2,2 mmol (341 mg) Glutarsäureanhydrid und 2,2 mmol (450 μ l) N-Ethyl-diisopropylamin in 2 ml Dioxan suspendiert und in einem Metallblockthermostaten für eine Dauer von 6 h auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die entstandene Lösung in 15 ml Eiswasser gegossen, der gebildete Niederschlag filtriert und zur Abtrennung überschüssiger Glutarsäure mit 50 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag in 10 ml 5 % w/v NaHCO₃ gelöst und zur Entfernung des nicht umgesetzten 5-Pregnen-3 β -ol-20-ons dreimal mit jeweils 15 ml Ethylacetat extrahiert. Der Glutarsäuremonoester wurde durch Zugabe von 1 M HCl ausgefällt, der Feststoff durch dreimaliges Ausschütteln der Suspension mit 15 ml Ethylacetat in die organische Phase überführt und diese unter Vakuum auf ein Volumen von 5 ml eingengt. Der Glutarsäuremonoester wurde beim Abkühlen der Lösung auf 4 °C als kristallines Produkt erhalten und anschließend abfiltriert. Nach Waschen des erhaltenen Filtrats mit 15 ml Hexan wurde das Produkt aus 3 ml einer Mischung von Hexan:Ethylacetat im Verhältnis 2:1 umkristallisiert. Aus der Mutterlauge wurde nach Zusatz von 1,5 ml Hexan und Inkubation bei -20 °C über Nacht eine zweite Produkt-Fraktion erhalten. Die vereinigten Produkte ergaben eine Gesamtausbeute von ca. 53 % d. Th. und wurden durch Dünnschichtchromatographie sowie NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Synthese von Aminohexyl-Sepharose (nach Beste, 1998). 5 g Epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Amersham Pharmacia Biotech; ca. 15 ml gequollenes Säulenmaterial) wurden zunächst in einer Glasfritte unter Eigenfluß mit 1000 ml Wasser gewaschen. 1,6-Diaminohexan wurde bei 45 bis 50 °C im Wasserbad verflüssigt, anschließend 45 mmol (5,25 g) davon zu 1,5 ml Wasser in einem 50 ml-Zentrifugenglas mit Schliff gegeben und die Lösung unter Eiskühlung

mit ca. 5 ml konz. HCl auf pH 10 eingestellt. Nach Zugabe des durch Zentrifugation sedimentierten (Sigma 4K10, 4420 g, RT, 5 min) und vom Überstand befreiten Säulenmaterials wurde für 16 h unter stetiger Durchmischung auf 40 °C erhitzt. Die Sepharose wurde schließlich nacheinander mit 500 ml Wasser, 500 ml 0,1 M NaHCO₃ und 500 ml 0,1 M NaOAc-Puffer pH 4,0 (0,1 M Essigsäure wurde hierfür mit NaOH auf pH 4,0 eingestellt) auf einer Glasfritte gewaschen. Nicht umgesetzte Epoxid-Gruppen wurden durch Inkubation des Säulenmaterials mit 1,5 ml Ethanolamin in 5 ml Wasser für 16 h bei 50 °C blockiert. Anschließend wurde erneut mit 500 ml Wasser, 500 ml 0,1 M NaHCO₃, 500 ml 0,1 M NaOAc-Puffer (pH 4,0) und 500 ml 0,1 M Natriumborat-Puffer pH 8,5 (0,1 M Borsäure wurde hierfür mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt) gewaschen und die Aminohexyl-Sepharose schließlich bei 4 °C in 5 ml einer 0,02 % w/v Natriumazid-Lösung aufbewahrt.



Molekulargewicht 430,58

Abbildung 9: Strukturformel von 3-Glutaryl-5-pregnen-3β-ol-20-on.

Synthese der 3-Glutaryl-5-pregnen-3β-ol-20-on-Sepharose (nach Cuatrecasas, 1970). 2,49 g (ca. 7 ml) der synthetisierten Aminohexyl-Sepharose (Feuchtgewicht) wurden in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt, dreimal mit jeweils 7 ml Wasser gewaschen und durch Zentrifugation wie oben sedimentiert (siehe Abschnitt 2.7.1). Danach wurden 70 μmol (30,2 mg) 3-Glutaryl-5-pregnen-3β-ol-20-on in 4 ml DMF gelöst, zur vom Überstand befreiten Sepharose gegeben und die Suspension mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 4,7 eingestellt. Nach portionsweiser Zugabe von 0,26 mmol (50 mg) EDC in 300 μl Wasser im Verlauf von 5 min wurde die Suspension für 20 h bei RT unter Rotieren inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial in der Glasfritte mit 1000 ml 50 % v/v DMF gewaschen, in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt, dreimal mit 7 ml Wasser gewaschen (siehe oben) und schließlich bei 4 °C in 5 ml einer 0,02 % w/v Natriumazid-Lösung aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Selektion Digoxigenin bindender BBP-Varianten

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer Variante des Bilin-Bindungsproteins, die den in der Biochemie gebräuchlichen Steroid-Liganden Digoxigenin erkennen sollte. Grundlage für die Isolierung eines solchen „Anticalins“ (siehe Abschnitt 1.3) war eine Zufallsbibliothek (hier die Bibliothek Nr. 1) mit einer Komplexität von $3,7 \cdot 10^8$ BBP-Mutanten (Beste *et al.*, 1999). Diese Molekül-Bibliothek war durch gerichtete Zufallsmutagenese von insgesamt sechzehn Aminosäurepositionen innerhalb derjenigen vier Peptidschleifen generiert worden, die die Bindungstasche für den natürlichen Liganden Biliverdin IX γ des BBP bilden (Abschnitt 1.5).

3.1.1 Reamplifizierung einer Bibliothek randomisierter BBP-Varianten

Voraussetzung für die Selektion einer Digoxigenin bindenden BBP-Variante mit Hilfe der *Phage Display*-Technik war die Präsentation der in der Bibliothek Nr. 1 vorhandenen Zufallsmutanten auf der Oberfläche von Phagemiden. Für die Produktion einer solchen Phagemid-Bibliothek wurden *E. coli*-Zellen mit der Zufallsbibliothek als Phasmid-Präparation auf der Grundlage des Vektors pBBP20 transformiert.

Für die Reamplifizierung der BBP-Bibliothek wurden insgesamt 26 μ g Phasmid-DNA in 13 Ansätzen zur Elektroporation elektrokompenter Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Dabei wurden insgesamt $1,1 \cdot 10^{10}$ Transformanden erhalten so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die ursprüngliche Komplexität der Bibliothek zu 99,98 % erhalten blieb (Schreiber, 1988; siehe dazu Diskussion in Abschnitt 4.1). Nach Kultivierung der Transformanden wurde eine Phagemid-Bibliothek produziert, die zur darauffolgenden Affinitätsselektion eingesetzt wurde (Abschnitt 2.3.2.1).

3.1.2 Affinitätsanreicherung von BBP-Varianten an mit Digoxigenin funktionalisierter Polystyroloberfläche

Eine Voraussetzung für die Selektion bindungsaktiver Protein-Varianten mit Hilfe der *Phage Display*-Technik ist die funktionelle Immobilisierung des vorgegebenen Liganden. Für diesen Zweck erschien die Ribonuklease A (RNase A) aus Rinderpankreas als kleines, robustes und hydrophiles Protein in besonderer Weise geeignet (vgl. Abschnitt 4.1). Die Digoxigenin-Gruppe wurde in Form ihres aktivierten Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidesters an RNase A gekoppelt. Die ϵ -Aminocapronsäure-Gruppe diente dabei als molekularer Abstandshalter (*Spacer*) um die Zugänglichkeit des Digoxigenins auf der Oberfläche des Trägerproteins zu gewährleisten. Als makroskopische Träger zur

Immobilisierung des Digoxigenins in Form des Proteinkonjugates wurden Nunc-Immuno[®]-Sticks eingesetzt, deren flügelartige Polystyroloberfläche eine besonders hohe Protein-Bindungskapazität aufweist.

Nach Beschichtung des Flügelstiftes mit dem Digoxigenin-RNase A-Konjugat und anschließender Inkubation mit der Phagemid-Bibliothek zwecks Komplexierung der bindungsaktiven Varianten wurden nicht bindende Phagemide in insgesamt acht Waschschrritten abgetrennt. Die verbliebenen Phagemide wurden anschließend kompetitiv mit einer Lösung von 2 mM freiem Digoxigenin in einem physiologischen Puffer eluiert und nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue amplifiziert (Abschnitt 2.3.2.2).

Zur Analyse der einzelnen Selektionszyklen wurde der Phagemidgehalt ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion bestimmt (siehe Abbildung 10) und der relative Anteil bezogen auf die für den Selektionsprozeß insgesamt eingesetzten Phagemide errechnet.

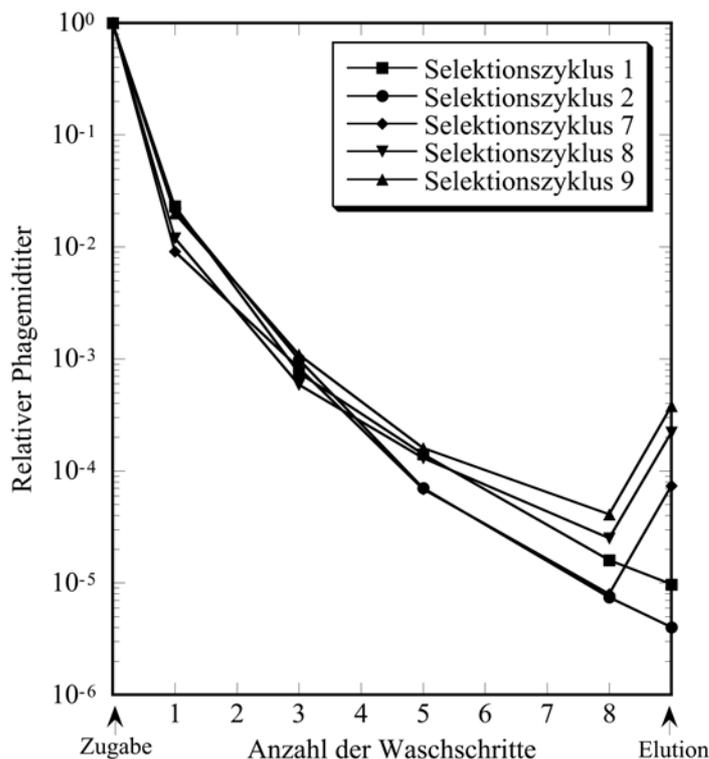


Abbildung 10: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1, 2, 7, 8 und 9 im Verlauf der Anreicherung Digoxigenin bindender BBP-Varianten aus einer Zufallsbibliothek mittels *Phage Display*. Nach Inkubation eines mit Digoxigenin-RNase A-Konjugat beschichteten Flügelstiftes mit $2,7 \cdot 10^{11}$ bis $1,4 \cdot 10^{12}$ Phagemiden für 1 h wurden nicht bindende Phagemide durch wiederholtes Waschen des Flügelstiftes mit PBS/T entfernt. Nach acht Waschschrritten wurden die adsorbierten Phagemide mit einer 2 mM Lösung an freiem Digoxigenin eluiert. Der Phagemidtitel ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion wurden bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide (relativer Phagemidtitel) halblogarithmisch aufgetragen. Die kompetitiv eluierten Phagemide wurden vor dem Einsatz im darauffolgenden Selektionszyklus amplifiziert.

Bei den ersten sechs Anreicherungszyklen zeigte sich ein stetiger Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschfraktionen und der Elutionsfraktion. Ab dem siebten Selektionszyklus konnte dagegen ein signifikanter Anstieg des Phagemidtiters in der Elutionsfraktion beobachtet werden, der sich beim achten Zyklus bezüglich der vorangegangenen Selektionsrunde um den Faktor 3 und im neunten Zyklus – bezogen auf den achten Zyklus – um den Faktor 1,7 erhöhte. Nach der neunten Affinitätsanreicherung konnten letztlich 0,038 % der eingesetzten Phagemide wieder eluiert werden.

Der beobachtete Effekt war auf die Anreicherung bindungsaktiver Protein-Varianten zurückzuführen und ist in ähnlicher Weise bei der Durchmusterung entsprechender Antikörper-Bibliotheken beobachtet worden (Marks *et al.*, 1991). Die Phagemide, die im Elutionsschritt des neunten Anreicherungszyklus erhalten wurden, wurden zur Untersuchung der individuellen Liganden-Bindungseigenschaften der jeweils kodierten BBP-Varianten herangezogen.

3.1.3 Konstruktion des Vektors pBBP22 und Anwendung im Kolonie-Filterstapel-Test

Zur effizienten und parallelen Durchmusterung einer größeren Zahl von BBP-Varianten wurde im Anschluß an die Phagemidselektion der Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra *et al.*, 1991) verwendet. Für diesen Zweck wurde der Vektor pBBP22 (Abbildung 11) konstruiert, der für ein Fusionsprotein aus dem BBP bzw. seinen Varianten und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) kodiert. Die ABD besteht aus einer einzelnen, 46 Reste umfassenden Domäne des Protein G von *Streptococcus* G148 (Guss *et al.*, 1986; Åkerström *et al.*, 1987; Olsson *et al.*, 1987) und ermöglicht die funktionelle Immobilisierung der rekombinanten Fusionsproteine auf der Oberfläche eines mit humanem Serumalbumin (HSA) beschichteten Membranfilters.

Ausgehend von dem Phasmid pBBP17 (Beste, 1998) wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem Oligodesoxynukleotid SCHLE1 eine für die Aminosäuren Pro-Ser-Ala kodierende Sequenz, die gleichzeitig eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *NheI* enthält, direkt hinter dem Genabschnitt für das *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel inseriert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung bestätigt und der erhaltene Vektor mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NheI* hydrolysiert. Das entstandene 639 bp große Fragment mit dem BBP-Strukturgen wurde isoliert und mit dem 3241 bp großen DNA-Fragment des analog verdauten Expressionsphasmides pASK90abd-D1.3 (König & Skerra, 1998) ligiert. Der erhaltene Phasmidvektor pBBP22 kodiert somit für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen *OmpA*-Signalsequenz, dem rekombinanten BBP, dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000), einem Pro-Ser-Ala-Peptid-*Linker* und der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne.

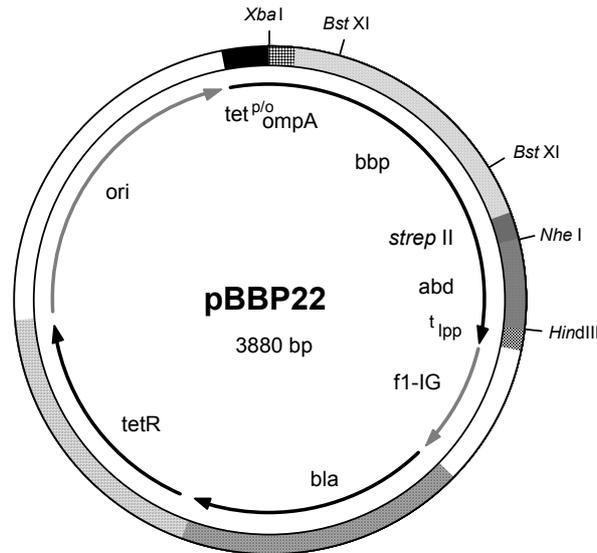


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Vektors pBBP22. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P/o}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem rekombinanten Wildtyp-BBP (mit den Mutationen N1D, N21Q, K87S und K135M, vgl. Abschnitt 1.5), dem *Strep*-tag II, einem Pro-Ser-Ala-Peptid-Linker und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD). *XbaI*, *BstXI*, *NheI* und *HindIII* bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Für weitere Abkürzungen siehe die Legende zu Abbildung 6.

Zur Analyse der individuellen Bindungseigenschaften der BBP-Varianten wurden die aus dem neunten Anreicherungszyklus erhaltenen Phagemide zur Infektion von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt und anschließend die gesammelte Phasmid-DNA präpariert. Schließlich wurde der Genpool der selektierten BBP-Varianten nach Restriktionsverdau mit *BstXI* isoliert und auf dem analog geschnittenen Vektor pBBP22 subkloniert. Nach Transformation von *E. coli* TG1-F⁻ mit dem Ligierungsprodukt wurde die erhaltene Zellsuspension direkt auf einer hydrophilen Membran ausplattiert. Der *Amber*-Suppressor-Stamm *E. coli* TG1-F⁻ wurde für diesen Test ausgewählt, damit auch Varianten mit einem internen, bei der Mutagenestrategie zugelassenen *Amber*-Stoppkodon (siehe Abschnitt 1.5) als funktionelles Fusionsprotein mit der ABD produziert werden konnten. Das sekretierte Fusionsprotein, das während der Induktionsphase teilweise von den Bakterienkolonien freigesetzt wurde, wurde am Ort der entsprechenden Kolonie selektiv auf einer darunterliegenden zweiten Membran, welche zuvor mit HSA beschichtet worden war, gebunden.

BBP-Varianten mit Affinität zu Digoxigenin wurden anhand ihrer Komplexbildung mit einem Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugat bzw. einem Digoxigenin-BSA-Konjugat detektiert (Abbildung 12). Die hierbei erhaltenen Farbspots (ca. 90 % der untersuchten Transformanten) waren von sehr ähnlicher Morphologie und Intensität. Einige der dazugehörigen Kolonien wurden ausgewählt und einer Analyse unterzogen.

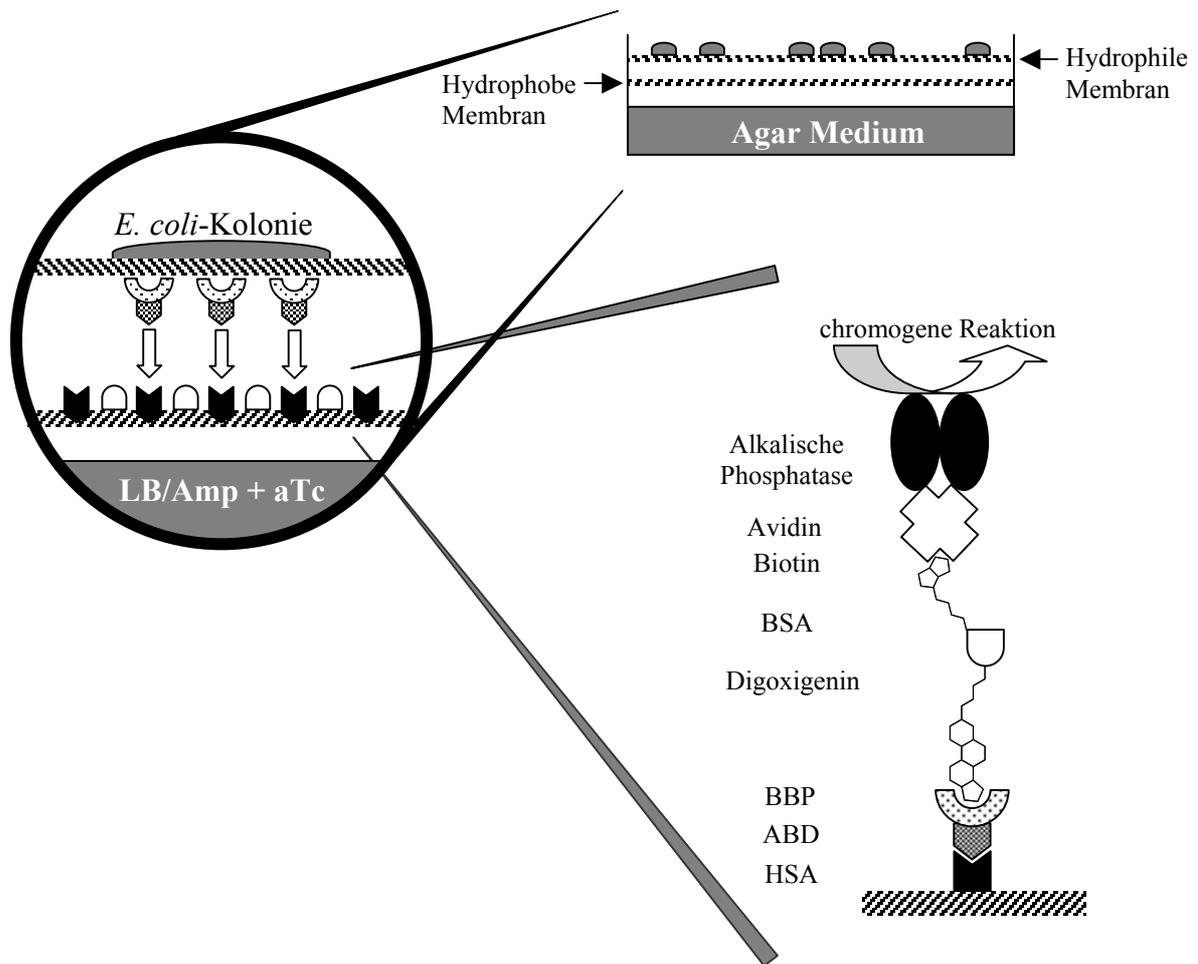


Abbildung 12: Schema des Kolonie-Filterstapel-Tests für die Identifizierung einzelner BBP-Varianten mit Affinität zu Digoxigenin (in verschiedenen Ausschnitts-Vergrößerungen). Nach der Transformation von *E. coli* TG1-F⁻ mit dem Ligierungsansatz wurde die Zellsuspension auf einer hydrophilen Membran auf LB/Amp-Agar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Kolonien eine Größe von ca. 0,5 mm erreicht hatten, wurde die Membran auf einer hydrophoben und zuvor mit HSA beschichteten zweiten Membran platziert. Diese lag zur Induktion der Genexpression auf einer LB/Amp-Agarplatte mit Anhydrotetracyclin. Während einer Induktionsperiode von 15 h wurde das Fusionsprotein aus der BBP-Variante und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) zunächst mittels der bakteriellen OmpA-Signalsequenz in das Periplasma von *E. coli* sekretiert und partiell von den Kolonien freigesetzt. Das Protein diffundierte durch die hydrophile Membran und wurde schließlich durch Komplexbildung zwischen ABD und HSA funktionell am Ort der *E. coli*-Kolonie auf der Oberfläche der darunterliegenden hydrophoben Membran immobilisiert, welche dann entnommen und mit Puffer gespült wurde. Die Liganden-Bindungseigenschaften der immobilisierten BBP-Varianten wurden durch sukzessive Behandlung der hydrophoben Membran mit Digoxigenin-BSA-Biotin-Konjugat und Avidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat, gefolgt durch eine chromogene Nachweisreaktion, detektiert. Alternativ konnte der Nachweis auch durch Zugabe von Digoxigenin-BSA-Konjugat und anschließende Behandlung mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugat erfolgen (siehe Abschnitt 2.3.5).

3.2 Charakterisierung selektierter BBP-Varianten

3.2.1 DNA-Sequenzanalyse der selektierten Varianten

Nach Isolierung der Plasmid-DNA von insgesamt acht der *E. coli*-Kolonien wurde die DNA-Sequenz der einzelnen Varianten bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, daß es sich in allen Fällen um dieselbe BBP-Variante handelte.

Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab, daß fünfzehn der insgesamt sechzehn randomisierten Aminosäurepositionen von der ursprünglichen Sequenz im Wildtyp-BBP (Abschnitt 1.5) verschieden waren. Lediglich Valin an Position 93 stimmte zwischen dem BBP und der selektierten Variante überein. Außerhalb der sechzehn randomisierten Kodons wurden keine zusätzlichen Mutationen beobachtet (siehe Abbildung 13). Die selektierte BBP-Variante wurde im weiteren Verlauf der Arbeit als DigA bezeichnet.



Abbildung 13: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der aus Bibliothek Nr. 1 selektierten BBP-Variante DigA im Vergleich zum Wildtyp-BBP. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Sequenz des BBP, der die Aminosäurepositionen 19 bis 138 umfaßt. Das unter Verwendung der degenerierten *Primer*-Paare GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 in einer zweistufigen PCR randomisierte Gensegment (Abschnitt 1.5; für detaillierte Bezeichnung der *Primer* siehe Abschnitt 3.4.1, Abbildung 24) ist beiderseits von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankiert. Diejenigen Aminosäurepositionen, die für die Konstruktion der ursprünglichen Bibliothek (Bibliothek Nr. 1) einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind unterstrichen (34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127). Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek Nr. 1 randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz des BBP angegeben (mit Punkten für unveränderte Basen). Im Fall der selektierten Variante DigA sind nur die von der Sequenz des Wildtyp-BBP verschiedenen Basen zusammen mit den kodierten Aminosäuren angegeben. Gleiche Basen sind durch Punkte gekennzeichnet. Die geänderte Sequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 ist auf die Einführung einer *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragmentes im Verlauf der PCR-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998). Die Nomenklatur der Zufallskodons wurde gemäß NC-IUB (1985) verwendet.

3.2.2 Bakterielle Produktion der BBP-Variante DigA

Die bakterielle Produktion der BBP-Variante erfolgte mit dem Expressionsplasmid pBBP21 (Abbildung 14). Hierzu wurde die kodierende Genkassette von DigA analog zu Abschnitt

3.1.3 aus dem isolierten Phasmid des Typs pBBP22 subkloniert und der Ligierungsansatz zur Transformation kompetenter *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt.

Der Vektor pBBP21 (Beste, 1998) kodiert unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators für das BBP mit der bakteriellen OmpA-Signalsequenz am N-Terminus und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus. Zusätzlich trägt der Vektor auf einem zweiten Cistron das Gen für die *E. coli*-eigene Protein-Disulfidisomerase *DsbC*, die zu einer Erhöhung des Anteils an korrekt gefaltetem rekombinantem Protein beitragen kann (Schmidt *et al.*, 1998).

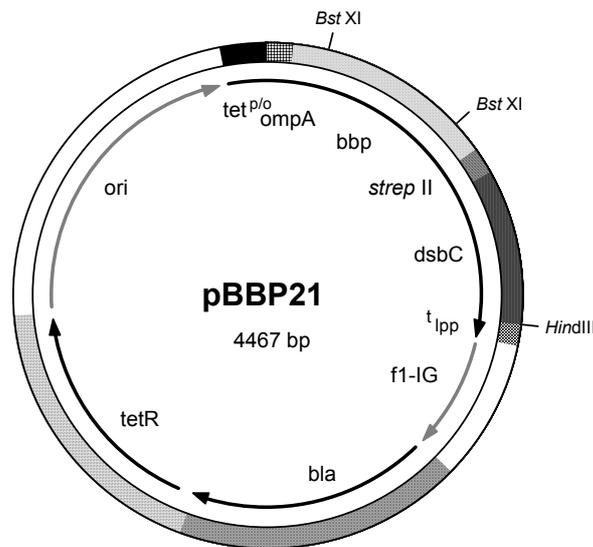


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Expressionsphasmid pBBP21. Das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, BBP und dem *Strep*-tag II steht unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet^{p/o}*). Der Leserahmen wird zur Steigerung der Ausbeute korrekt gefalteten Proteins von der Gensequenz für die Protein-Disulfidisomerase *DsbC* einschließlich deren ribosomaler Bindungsstelle (Zapun *et al.*, 1995) gefolgt und die Disulfidisomerase somit koüberexprimiert. Die Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 6.

Die bakterielle Produktion von DigA erfolgte durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli* wie unter Abschnitt 2.4 beschrieben. Hierbei wurde die BBP-Variante als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus synthetisiert. Das *Strep*-tag II diente zur Einschrittreinigung des rekombinanten Proteins aus der periplasmatischen Proteinfraction durch Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000). DigA konnte mit typischen Ausbeuten von 0,3 mg pro Liter Kulturmedium bei einer Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte von $OD_{550} = 1,1$ von der Säule eluiert werden. Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung durch SDS-PAGE zeigte kaum nachweisbare Verunreinigungen. Somit konnten die BBP-Variante DigA effizient im Einschritt-Verfahren von kontaminierenden Proteinen aus dem bakteriellen Periplasma abgetrennt werden (siehe Abbildung 15).

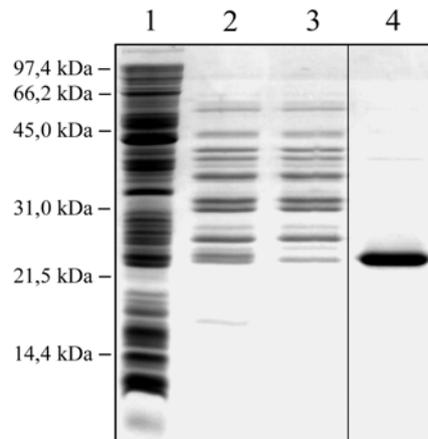


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse zur Dokumentation der Einschnitt-Reinigung der rekombinanten BBP-Variante DigA aus dem Periplasma von *E. coli*. Auf ein 15 %iges SDS Polyacrylamidgel wurde eine Probe des Gesamtzellproteins einer für 3 h mit 200 $\mu\text{g/l}$ aTc induzierten Expressionskultur (Spur 1), der periplasmatische Proteinextrakt (Spur 2), der Durchlauf (Spur 3) sowie das Eluat der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Spur 4) aufgetragen. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.

3.2.3 Funktionelle Charakterisierung der BBP-Variante DigA

Die Affinität der Variante DigA zu Digoxigenin wurden mit der Methode der Fluoreszenztitration untersucht. Um näheren Aufschluß über die Bindungseigenschaften von DigA zu erhalten, wurde zusätzlich dessen Bindungsaffinität zum strukturell homologen Digoxin bestimmt. Digoxin unterscheidet sich vom Digoxigenin durch drei Kohlenhydrat-Gruppen, die durch glycosidische Bindung mit der Position C-3 verknüpft sind.

Für die Durchführung der Fluoreszenztitrationen wurde eine Anregungswellenlänge von 295 nm gewählt, bei der Tryptophan-Reste selektiv spektroskopiert werden. Die maximale Proteinfluoreszenz wurde bei 345 nm beobachtet und daraufhin als Emissionswellenlänge festgelegt. Zur Fluoreszenztitration wurde jeweils eine 1 μM Proteinlösung der BBP-Variante DigA bzw. des rekombinanten Wildtypproteins, das unter gleichen Bedingungen wie DigA hergestellt und gereinigt worden war, mit einer 0,5 mM Lösung des betreffenden Liganden in DMF titriert. Dabei wurde die Ligandenlösung in Volumen-Schritten von 1 μl bis 4 μl bis zu einer Endkonzentration von 10 μM zugegeben.

Bei der Titration der BBP-Variante DigA mit Digoxigenin und Digoxin kam es zu einer Abnahme der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen Liganden mit einem charakteristischen Sättigungsverhalten bei hoher Ligandenkonzentration (Abbildung 16). Der beobachtete *Quenching*-Effekt war mit 18 % bei der Titration mit Digoxigenin sehr ähnlich wie bei der Titration mit Digoxin (ca. 16 %). Bei der Titration des Bilin-Bindungsproteins mit Digoxigenin konnte dagegen kein signifikanter *Quenching*-Effekt beobachtet werden. Darüberhinaus wurde bei einer Titration von DigA und von BBP mit DMF kein Einfluß des Lösungsmittels auf die Proteinfluoreszenz beobachtet (Daten nicht gezeigt).

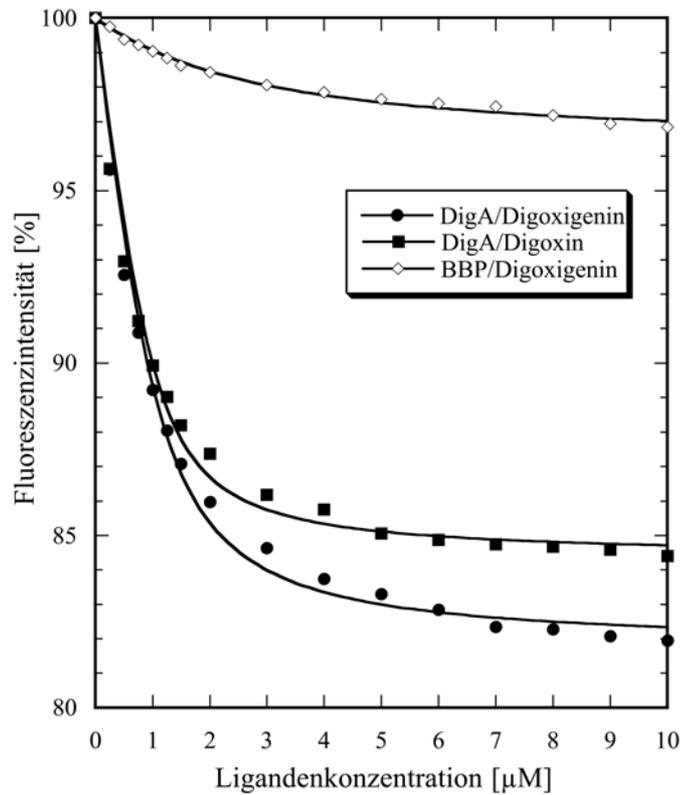


Abbildung 16: Fluoreszenztitrationskurven von DigA mit den Steroid-Liganden Digoxigenin und Digoxin sowie von BBP mit Digoxigenin. Die Proteine wurden in *E. coli* produziert und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Eine 1 µM Lösung der Proteine in PBS/E wurde mit den Liganden, als konzentrierte Stammlösung in DMF, titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz (Anregungswellenlänge = 295 nm, Emissionswellenlänge = 345 nm) durch Messung mit einem LS 50 B-Lumineszenz-Spektrometer in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration verfolgt. Die Anpassung der auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % skalierten Meßwerte erfolgte durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (21) (Abschnitt 2.6.1).

Die erhaltenen Titrationskurven wurden durch nicht-lineare Regression angepasst. Dabei wurde eine Dissoziationskonstante (K_D) von 295 ± 37 nM für den Komplex aus DigA und Digoxigenin sowie von 200 ± 34 nM für den DigA/Digoxin-Komplex bestimmt. Eine spezifische Komplexbildung zwischen Digoxigenin und dem BBP ist demgegenüber unwahrscheinlich (Tabelle 4).

BBP-Variante	Ligand	Q_{\max} [%]	K_D [nM]
Wildtyp	Digoxigenin	$3,7 \pm 0,1$	–*
DigA	Digoxigenin	$18,2 \pm 0,3$	295 ± 37
	Digoxin	$15,6 \pm 0,3$	200 ± 34

Tabelle 4: Durch Anpassung der Titrationskurven aus Abbildung 16 nach Gleichung (21) ermittelte maximale Quenching-Effekte (Q_{\max}) und Dissoziationskonstanten (K_D) für die Wechselwirkung der BBP-Variante DigA mit Digoxigenin und Digoxin. * Keine nachweisbare Bindung.

Die Ergebnisse der Fluoreszenztitrations-Experimente zeigten, daß die BBP-Variante DigA zur molekularen Erkennung der Digoxigenin-Gruppe mit nanomolarer Affinität in der Lage ist. In folgenden Studien sollte untersucht werden, ob die erreichte Bindungskonstante durch eine sog. „Affinitätsreifung“ noch weiter verbessert werden konnte.

3.3 Verbesserung der Bindungsaffinität von DigA durch *in vitro*-Affinitätsmaturierung

Die für den ersten Selektionsprozeß eingesetzte Bibliothek stellte mit $3,7 \cdot 10^8$ unabhängigen Varianten lediglich einen sehr begrenzten Anteil der bei einer konzertierten Mutagenese von sechzehn Aminosäurepositionen insgesamt möglichen Zahl von ca. 32^{16} Mutanten dar (vgl. Abschnitt 4.2). Die daraus selektierte Variante DigA verfügte somit höchstwahrscheinlich noch nicht an allen randomisierten Positionen über die optimale Auswahl an Aminosäuren zur Bindung des vorgegebenen Liganden Digoxigenin. Ausgehend von DigA sollte daher in einem als „*In-vitro*-Affinitätsmaturierung“ bezeichneten Prozeß ein Anticalin mit einer erhöhten Bindungsaffinität zu Digoxigenin generiert werden (Hawkins *et al.*, 1992; Hoogenboom, 1997). Hierzu wurde ausgehend von DigA eine eingeschränkte Bibliothek hergestellt, bei der nur eine der Schleifenregionen – im Kontext der drei anderen – randomisiert wurde. Die Anzahl der Zufallspositionen wurde dabei auf insgesamt sechs Aminosäure-Reste und somit 32^6 (ca. 10^9) mögliche Varianten beschränkt.

3.3.1 Gerichtete Zufallsmutagenese im ersten Schleifensegment des Lipocalins und Präparation einer partiell randomisierten Bibliothek

Bei der Analyse der Primärstruktur von DigA zeigte sich, daß die Aminosäurepositionen 34 bis 37 (His-His-Glu-Arg) der ersten Schleifenregion ausschließlich geladene Seitenketten aufwiesen. Diese sind vermutlich nicht optimal für die Komplexierung der hydrophilen aber ungeladenen Digoxigenin-Gruppe geeignet. Aus diesem Grund wurden diese Reste erneut einer konzertierten Zufallsmutagenese unterworfen und die resultierende Bibliothek in einer Affinitätsanreicherung auf DigA-Varianten mit verbesserter Digoxigenin-Bindung durchmustert. Zusätzlich zu den Positionen 34 bis 37 wurden die ebenfalls geladenen benachbarten Aminosäure-Reste im ersten Schleifenbereich, Glu28 und Lys31, für die gerichtete Zufallsmutagenese ausgewählt. Deren beide Seitenketten bilden in unmittelbarer räumlicher Nähe zur Bindungstasche eine intramolekulare Salzbrücke aus (Huber *et al.*, 1987b).

Für die konzertierte Mutagenese der sechs ausgewählten Reste wurde die kodierende DNA der Variante DigA auf dem Phasmid pBBP22 zusammen mit den *Primern* STS5 und GB-2 in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Das degenerierte Oligodesoxynukleotid STS5, welches die zu randomisierenden Positionen umfaßte, wies an den relevanten Kodons eine Mischung der

entsprechenden Basen auf. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI geschnitten und mit einem analog verdauten Vektorfragment des Phasmides pBBP24 (Beste, 1998) ligiert.

Der Phasmidvektor pBBP24 unterscheidet sich von pBBP20 durch die Anwesenheit eines inaktivierten BBP-Gens (vgl. Abschnitt 1.6). Durch das Einführen benachbarter *Ochre*- und *Opal*-Stoppkodons an den Aminosäurepositionen 42 und 43 innerhalb des Strukturgens wurde beim *Phage Display*-Verfahren der Anteil an Phagemiden, die das Wildtyp-BBP auf ihrer Oberfläche präsentieren, eliminiert. Diese Fraktion, die durch teilweise unvollständige Spaltung des Phasmidvektors mit *Bst*XI und anschließende Religierung des lediglich linearisierten Vektors zustande kommt, bildete zuvor bis zu 10 % der Bibliothek. Die Qualität der Bibliothek wurde auf diese Weise verbessert (Beste, 1998).

3.3.2 Selektion von DigA-Varianten mit verbesserter Affinität unter Verwendung funktionalisierter paramagnetischer Partikel und des Kolonie-Filterstapel-Tests

Der Ligierungsansatz wurde zur Transformation elektrokompeter *E. coli* XL1-Blue-Zellen eingesetzt und auf diese Weise eine nahezu redundante Bibliothek (Bibliothek Nr. 2) mit $1,5 \cdot 10^9$ Transformanten erhalten. Ausgehend davon wurden Phagemide produziert und einer nachfolgenden Affinitätsanreicherung mittels *Phage Display* zugeführt.

Nach Hawkins *et al.* (1992) können durch Ermöglichung einer selektiven Komplexierung hochaffine rekombinante Antikörper mit dem *Phage Display*-Verfahren genau dann selektiert werden, wenn bei der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichtes zwischen den Bindungspartnern eine Antigenkonzentration eingesetzt wird, die höchstens so hoch wie die gewünschte Dissoziationskonstante des Protein-Ligand Komplexes ist. Gleichzeitig soll ein Überschuß an Liganden im Vergleich zum Bindungspartner herrschen. Aus diesem Grund wurde der Ligand in Form eines Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugates mit einer Endkonzentration von 70 nM eingesetzt und mit bis zu $1,2 \cdot 10^{12}$ Phagemiden inkubiert. Anschließend wurden paramagnetische Partikel zugegeben, die auf ihrer Oberfläche Streptavidin-Moleküle trugen. Mit ihrer Hilfe wurden selektiv diejenigen Phagemide abgefangen, die aufgrund der vorangegangenen Komplexbildung mit dem Digoxigenin-Doppelkonjugat auch die Biotin-Gruppe präsentierten. Phagemide, die keine Komplexbildung eingegangen waren, wurden durch anschließendes Waschen der paramagnetischen Partikel entfernt. Die gebundenen Phagemide wurden durch Absenkung des pH-Wertes im Waschpuffer eluiert und vor dem Einsatz in einem neuerlichen Selektionszyklus amplifiziert. Durch Bestimmung des Phagemidtiters ausgewählter Waschlösungen und der Elutionslösung wurde ein Elutionsprofil für die durchgeführten Anreicherungszyklen erstellt (Abbildung 17).

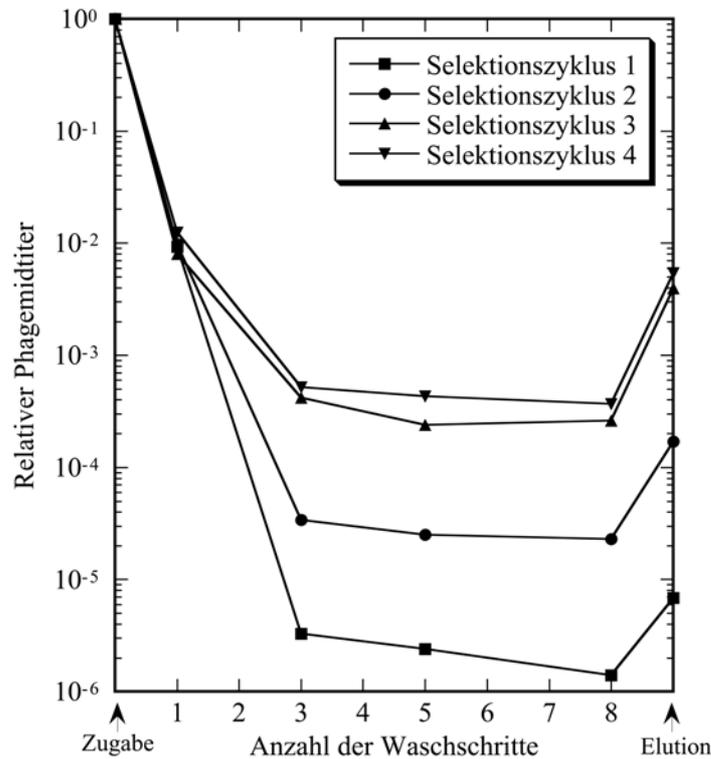


Abbildung 17: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen zur Affinitätsreifung der BBP-Variante DigA. Eine eingeschränkte Zufallsbibliothek, die durch gerichtete PCR-Mutagenese der Aminosäurepositionen 28, 31 und 34 bis 37 der BBP-Variante DigA hergestellt worden war (Bibliothek Nr. 2), wurde zur Präparation einer Phagemid-Bibliothek eingesetzt. Die frische Phagemidlösung ($1,5 \cdot 10^{11}$ bis $1,2 \cdot 10^{12}$ cfu) wurde zunächst mit 20 pmol eines Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugates in einem Volumen von 300 μ l inkubiert und komplexierte Phagemide durch Zugabe Streptavidin-beschichteter paramagnetischer Partikel isoliert. Die Partikel wurden gewaschen und durch pH-Erniedrigung eluierte Phagemide vor einem neuen Anreicherungszyklus amplifiziert. Der relative Phagemidtitel bezüglich der Gesamtmenge der eingesetzten Phagemide ist gegen die Anzahl der Waschschrirte aufgetragen.

Der Phagemidtitel der Waschlösungen nahm in allen Selektionszyklen bis zum dritten Waschschrirte stark ab und erreichte anschließend ein Plateau. Bei der Elution durch pH-Erniedrigung, d. h. unter denaturierenden Bedingungen konnte ein signifikanter Anstieg der Anzahl eluierter Phagemide beobachtet werden. Dabei erhöhte sich die relative Anzahl der sowohl beim Waschen als auch im Elutionsschrirte eluierten Phagemide im Verlauf der ersten drei Anreicherungszyklen jeweils ca. um den Faktor 10 und erreichte im vierten Selektionszyklus ein im Vergleich zum dritten Zyklus nahezu konstantes Niveau. Im letzten Anreicherungszyklus wurden insgesamt 0,54 % der eingesetzten Phagemide wieder eluiert.

Die DNA der im Elutionsschrirte des vierten Selektionszyklus erhaltenen Phagemide wurde präpariert und das mutagenisierte Gensegment des BBP-Strukturgens nach Restriktionsverdau mit *Bst*XI mit dem entsprechend geschnittenen Vektorfragment des Phasmides pBBP22 ligiert (siehe Abschnitt 3.1.3). Kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes TG1-F⁻ wurde mit dem Ligierungsansatz transformiert und zur Durchführung eines Kolonie-Filterstapel-Tests auf zwei hydrophilen Membranen ausplattiert.

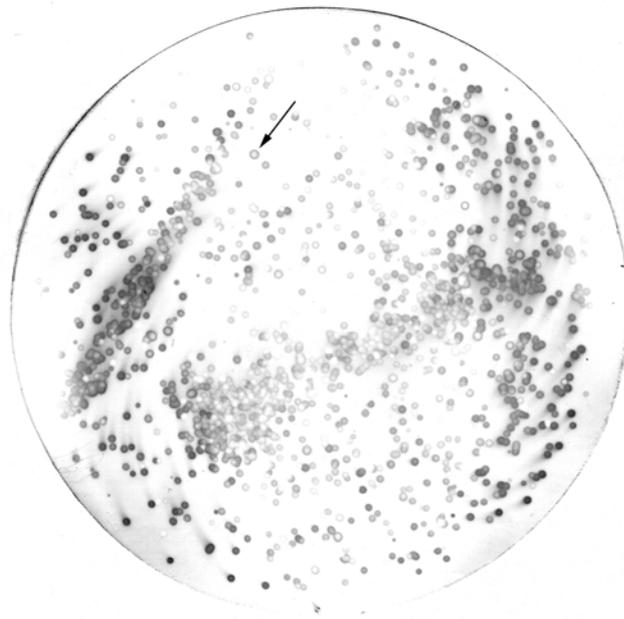


Abbildung 18: Ergebnis des Kolonie-Filterstapel-Tests zur Selektion von DigA-Varianten mit erhöhter Affinität zu Digoxigenin. Die Phasmid-DNA der gepoolten Phagemide aus dem Elutionsschritt des vierten Anreicherungszyklus (Abbildung 17) wurde präpariert und auf dem Vektor pBBP22 (Abschnitt 3.1.3) subkloniert. Entsprechend transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf einer hydrophilen Membran ausplattiert und die funktionell durch den Komplex zwischen ABD und HSA auf einer hydrophoben Membran immobilisierten BBP-Varianten auf ihre individuellen Digoxigenin-Bindungseigenschaften untersucht. Gezeigt ist der Membranfilter, der nach Behandlung mit Digoxigenin-BSA-Konjugat und anschließender Inkubation mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Reaktion erhalten wurde. Der Pfeil deutet auf den Farbspot, der zur Isolierung der BBP-Variante DigA16 führte (Abschnitt 3.3.3).

Anschließend wurden die auf einer hydrophoben Membran funktionell immobilisierten DigA-Varianten auf ihre Bindungsfähigkeit für Digoxigenin überprüft. Hierfür wurde eine der Membranen zunächst mit Digoxigenin-BSA-Konjugat inkubiert und gebundenes derivatisiertes Protein anschließend durch Behandlung mit einem Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugat und chromogene Reaktion nachgewiesen. Die zweite Membran wurde zunächst mit Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugat und anschließend mit Avidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat behandelt, gefolgt von der Farbreaktion. Auf diese Weise konnten in beiden Tests die sekretierten BBP-Varianten bei jeweils mehr als 90 % der Kolonien angefärbt werden, wobei sich die individuellen Farbspots sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer Morphologie teilweise voneinander unterschieden (Abbildung 18).

Sieben Kolonien, die für die Ausbildung der intensivsten Farbspots verantwortlich waren, wurden ausgewählt, ihre Phasmid-DNA isoliert und der DNA-Analyse unterzogen. Die von ihnen kodierte BBP-Varianten wurden als DigA9 bis DigA14 und DigA16 bezeichnet.

3.3.3 Sequenzanalyse der selektierten DigA-Varianten

Die DNA-Sequenzierung ergab, daß in allen selektierten Klonen entweder vier oder fünf der insgesamt sechs randomisierten Aminosäure-Kodons ausgetauscht waren (Abbildung 19).

20	30	40	50	
<i>TrpSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProHisHisGluArgLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerArg</i> TGTC <u>CCAGTACCA</u> GGTAAATGGTGGAAAGTCGCCAAATACCCCATCACGAGCGGAAGTACGGAAAGTGGCGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCCAAGAGTGTCAAAGTTTCGCCG				DigA
..... NNK NNK NNKNNKNNKNNK				Bibliothek 2
..... TAG GCG TTGCATTTGCGG				DigA9
..... Gln Ala LeuHisLeuArg				
..... TAG GCT GAGCATTTGCTT				DigA10
..... Gln Ala GluHisLeuLeu				
..... TAG GCG GAGCATTTGGTG				DigA11
..... Gln Ala GluHisLeuVal				
..... TAG GCG GATCATCTTCGT				DigA12
..... Gln Ala AspHisLeuArg				
..... TAG GCT TTGCATTTGCGG				DigA13
..... Gln Ala LeuHisLeuArg				
..... TAG GCT GATCATGTTGTG				DigA14
..... Gln Ala AspHisValVal				
..... CAG GCG GATCATATTACG				DigA16
..... Gln Ala AspHisIleThr				
60	70	80	90	
<i>TyrSerValIleHisGlyLysGluTyrPheSerGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerTyrThrIleGlyGlyValThrGlnGluGlyVal</i> TACTCTGAATCCACGGCAAGGAATACTTTTCCGAAGGTACCCTACCAGTGGTGAATCCAAGATTGGAAGATCTACCACAGCTACACTATTGGAGGTGTGACCACAGGAGGTGTA				DigA
.....				Bibliothek 2
.....				DigA9-14,16
100	110	120	130	
<i>PheAsnValLeuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrPheCysSerTyrAspGluAspLysLysGlyHisMetAspLeuValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThr</i> TTCACGCTACTCTCCACTGACCAACAAGAACTACATCATCGGATACTTTTGCCTCGTAGCAGGAGGACAGAAGGGACACATGGACTTGGTCTGGGTGCTCT <u>CCA</u> GAGCAT <u>GC</u> TCTACT				DigA
.....				Bibliothek 2
.....				DigA9
..... T Val				DigA10
..... T Val				DigA11-14,16

Abbildung 19: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der selektierten DigA-Varianten aus der Bibliothek Nr. 2 im Vergleich zum DigA. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der Sequenz des DigA, der die Aminosäurepositionen 19 bis 138 umfaßt. Das randomisierte Gensegment ist beiderseits von Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankiert. Die Aminosäurepositionen innerhalb der Sequenz der Variante DigA, die unter Verwendung des degenerierten *Primers* STS5 in Verbindung mit GB-2 zum Zweck der Affinitätsmaturierung randomisiert wurden (für detaillierte Bezeichnung der *Primer* siehe Abschnitt 3.4.1, Abbildung 24), sind durch Unterstreichung gekennzeichnet (28, 31 und 34 bis 37). Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek Nr. 2 randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz von DigA angegeben (mit Punkten für unveränderte Basen). In der Gensequenz der BBP-Varianten, die aus dieser Bibliothek gewonnen wurden (DigA9 bis DigA16) sind nur diejenigen Basen und kodierten Aminosäurepositionen angegeben, die sich von der DigA-Sequenz unterscheiden (gleiche Basen sind durch Punkte gekennzeichnet). Das *Amber*-Stoppkodon „TAG“ wird in geeigneten Suppressorstämmen, wie XL1-Blue, als Gln translatiert. Die Nomenklatur der Zufallskodons wurde gemäß NC-IUB (1985) verwendet.

Glu28 war stets durch ein Gln oder ein *Amber*-Stoppkodon ersetzt. Dies war das einzige Stoppkodon, welches durch die Mutagenese-strategie zugelassen war (siehe auch Abschnitt 1.5). In den für die Selektionsexperimente verwendeten *E. coli*-Stämmen (XL1-Blue bzw. TG1-F) wurde es ebenfalls als Gln translatiert. Lys31 war in allen sieben Varianten gegen Ala ausgetauscht, während His34 (Asn im BBP) entweder durch eine geladene saure Aminosäure (Asp, Glu) oder durch die aliphatische Aminosäure Leu ersetzt worden war. An Position 35 (Ser im BBP) war in allen Varianten His zu finden, wohingegen Glu36 (Val im BBP)

einmal durch Val, einmal durch Ile und fünfmal durch Leu substituiert war. Arg37 (Glu im BBP) wurde dreimal unverändert gefunden und war jeweils einmal gegen Thr bzw. Leu sowie zweimal gegen Val ausgetauscht. Zwei der Varianten trugen je eine zusätzliche Mutation (Glu119→Val bzw. Asp120→Val) innerhalb des exponierten Abschnitts von Schleifenbereich 4, was auf Fehler bei der PCR-Mutagenese oder bei der Phagemid-Replikation zurückzuführen war. Insgesamt hatte der mutierte Schleifenbereich damit einen weniger polaren Charakter angenommen.

3.3.4 Produktion der DigA-Varianten in *E. coli* und Bestimmung der Affinität für Digoxigenin

Vier der DigA-Varianten (DigA9, 10, 14 und 16), die sich durch charakteristische Aminosäuresubstitutionen auszeichneten, wurden exemplarisch zur Bestimmung der Affinität zu Digoxigenin ausgewählt. Da alle selektierten BBP-Varianten, bis auf DigA16, ein *Amber*-Stoppkodon (TAG) an Aminosäureposition 28 trugen, mußte dieses vor einer effizienten Produktion in *E. coli* gegen ein Glutaminkodon (CAG) ausgetauscht werden. Hierzu wurde jeweils eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt, wobei im Falle von DigA9 das Oligodesoxynukleotid STS6 und für die Varianten DigA10 und DigA14 gemeinsam das Oligodesoxynukleotid STS7 verwendet wurde. Der erfolgreiche Basenaustausch wurde in allen Fällen durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt.

Die Strukturgene aller vier Varianten wurden nach Restriktionsverdau mit *Bst*XI isoliert und zum Zweck der gentechnischen Produktion mit dem Vektorfragment des entsprechend geschnittenen Expressionsplasmides pBBP21 ligiert. Die Ligierungsansätze wurden direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt, die einzelnen Varianten im präparativen Maßstab produziert und anschließend durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die erhaltenen Ausbeuten wurden für DigA9 zu ca. 0,3 mg, für DigA10 zu ca. 0,5 mg und für DigA14 und DigA16 jeweils zu ca. 0,4 mg pro Liter Kulturvolumen (Zell-dichte zum Zeitpunkt der Ernte $OD_{550} = 1,0$) bestimmt.

Alle vier DigA-Varianten wurden zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten einer Fluoreszenztitration mit Digoxigenin unterzogen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Bei allen vier DigA-Varianten wurde eine deutliche Abnahme der Proteinfluoreszenz mit zunehmender Ligandenkonzentration beobachtet (Abbildung 20). Unterdessen übte das Lösungsmittel ohne gelösten Liganden keinen Einfluß auf die Proteinfluoreszenz aus (Daten nicht gezeigt).

Die Titrationskurven wurden durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (21) angepasst. Allerdings gelang nur dann eine befriedigende Anpassung aller Kurven, wenn neben dem molaren Fluoreszenzkoeffizienten des Protein-Ligand-Komplexes f_{PL} und der Dissoziationskonstanten K_D zusätzlich die eingesetzte Proteinkonzentration $[P]_t$ als anzupassender Parameter variiert wurde (vgl. Abschnitt 2.6.1). Die dabei erhaltenen Proteinkonzentrationen

wichen zum Teil signifikant von der anhand der Absorption bei 280 nm eingestellten Konzentration von 1 μM ab (siehe Tabelle 5).

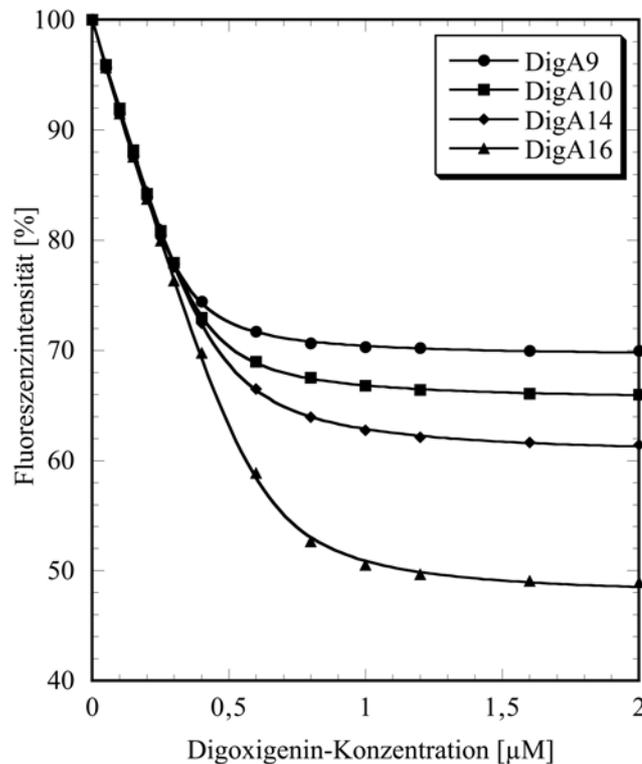


Abbildung 20: Fluoreszenztitration der DigA-Varianten DigA9, DigA10, DigA14 und DigA16 mit Digoxigenin. Die Proteine wurden in *E. coli* produziert und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Eine 1 μM Lösung der Proteine in PBS/E wurde mit einer konzentrierten Stammlösung von 0,1 mM Digoxigenin in DMF titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz wie unter Abschnitt 3.2.3 verfolgt. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte nach Skalierung der Anfangsfluoreszenz auf 100 % durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (21) unter zusätzlicher Variation der Proteinkonzentration als freiem Parameter (siehe Abschnitt 2.6.1) mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“.

Möglicherweise ist die Konzentrationsbestimmung ungenau oder eine gewisse Population des Proteins kann den eingesetzten Liganden nicht komplexieren. Die Klärung der potentiellen Ursachen für die beobachtete nicht stöchiometrische Ausbildung des Protein-Ligand Komplexes war Gegenstand weiterer Untersuchungen (siehe Abschnitt 3.8).

Die Dissoziationskonstanten des jeweiligen Protein-Ligand-Komplexes waren für die einzelnen BBP-Varianten sehr ähnlich und lagen zwischen ca. 24 nM für die Variante DigA9 und ca. 41 nM für DigA14. Verglichen mit DigA hatte sich die Affinität der Varianten zu Digoxigenin etwa um den Faktor 10 erhöht.

BBP-Variante	Q_{\max} [%]	$[P]_{t, \text{app}}$ [μM]	K_D [nM]
DigA9	$30,6 \pm 0,5$	$0,33 \pm 0,003$	$24,0 \pm 1,1$
DigA10	$34,6 \pm 0,4$	$0,39 \pm 0,003$	$27,6 \pm 1,3$
DigA14	$39,7 \pm 0,4$	$0,44 \pm 0,003$	$41,3 \pm 1,6$
DigA16	$52,6 \pm 0,6$	$0,61 \pm 0,007$	$30,2 \pm 3,6$

Tabelle 5: Ergebnis der Liganden-Bindungsstudien der DigA-Varianten DigA9, 10, 14 und 16 mit dem Steroid-Liganden Digoxigenin. Die Titrationskurven aus Abbildung 20 wurden nach Gleichung (21) durch nicht-lineare Regression mit der Proteinkonzentration als zusätzlichem variablen Parameter angepasst. Neben Q_{\max} , dem maximalen *Quenching*-Effekt unter Sättigungsbedingungen mit dem Liganden, sind die angepaßte apparente Proteinkonzentration $[P]_{t, \text{app}}$ sowie die Dissoziationskonstante K_D angegeben.

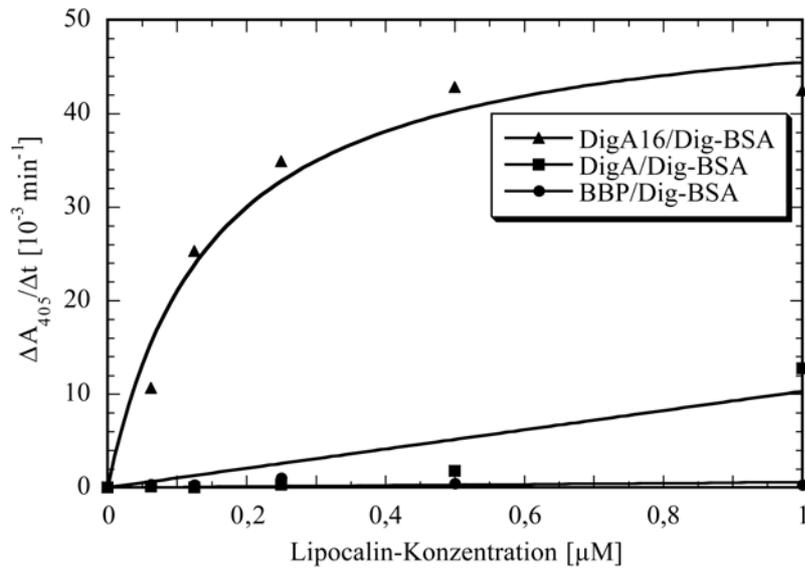
Da die BBP-Variante DigA16 mit mehr als 60 % bindungsaktivem Proteinanteil die geringste Abweichung von der eingestellten Proteinkonzentration aufwies, wurde sie für detailliertere Bindungsstudien ausgewählt. Zudem zeigte sie den stärksten Fluoreszenz-*Quenching*-Effekt.

3.3.5 Einsatz von DigA und DigA16 zur Detektion von Digoxigenin-Gruppen in einem indirekten ELISA

Um zu analysieren, ob sich die Variante DigA16 zum Nachweis mit der Digoxigenin-Gruppe markierter Proteine eignet, wurden ihre Liganden-Bindungseigenschaften in einem indirekten ELISA-Experiment untersucht und mit denen von DigA sowie mit Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen. Hierzu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit einem Digoxigenin-BSA- bzw. Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat beschichtet und mit einer Verdünnungsreihe des gereinigten Lipocalins inkubiert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde mit Hilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Nach Zugabe eines chromogenen Enzym-Substrates wurde die Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Zur Auswertung des Experimentes wurde die gemessene Absorptionsänderung gegen die Konzentration der jeweils eingesetzten BBP-Variante aufgetragen (Abbildung 21).

Durch Bestimmung derjenigen Proteinkonzentration, bei der die halbmaximale Bindungsaktivität beobachtet wird, können aus solchen ELISA-Experimenten Dissoziationskonstanten für Protein-Ligand-Komplexe abgeschätzt werden (Beatty *et al.*, 1987).

(A)



(B)

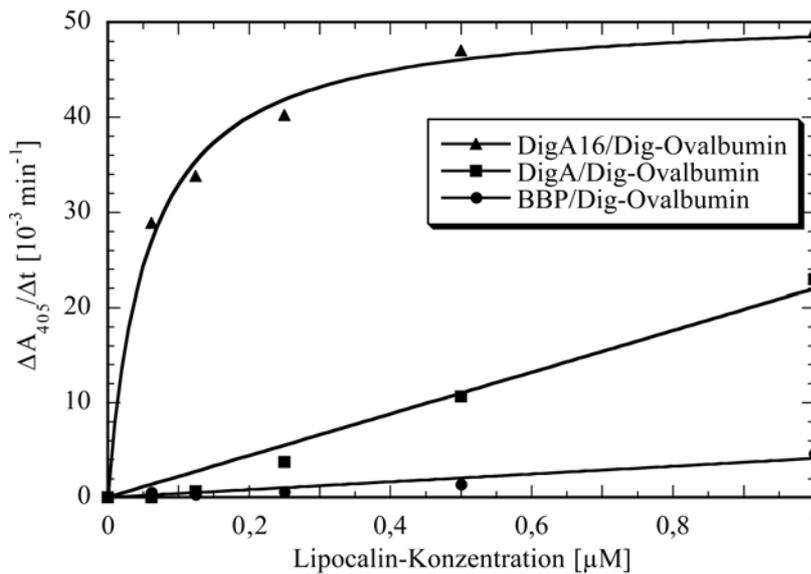


Abbildung 21: ELISA-Experimente zur Untersuchung der Digoxigenin-Bindungsaffinität der Varianten DigA und DigA16 im Vergleich zum Wildtyp-BBP. (A) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit Digoxigenin-BSA-Konjugat beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 produzierten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Lipocalins appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mit Hilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Lipocalins aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (7). (B) Wie (A) unter Verwendung von Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat.

Bei Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Digoxigenin-BSA-Konjugat konnte für die Variante DigA16 ein starkes konzentrationsabhängiges Bindungssignal mit einem Sättigungsverhalten bei hoher Konzentration des rekombinanten Proteins beobachtet werden (Abbildung 21A). Eine annähernd gleiche Adsorptionsisotherme wurde unter Verwendung des Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugates erhalten, was darauf hindeutet, daß die Digoxigenin-Gruppe unabhängig vom verwendeten makromolekularen Träger gebunden wird (Abbildung 21B). Die nach Anpassung der Meßwerte abgeschätzten Dissoziationskonstanten der Protein-Ligand-Komplexe stimmten mit $0,15 \pm 0,04 \mu\text{M}$ unter Verwendung des Digoxigenin-BSA-Konjugates als Trägerprotein bzw. $0,055 \pm 0,008 \mu\text{M}$ mit Ovalbumin als Trägerprotein im Rahmen der Meßgenauigkeit fast überein.

Für die Variante DigA waren die Bindungsaktivitäten unter Verwendung beider Trägerproteine jeweils deutlich geringer als für DigA16, und es konnten bei versuchter Anpassung der Meßwerte keine sinnvollen Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Keinerlei signifikante Bindungsaktivität konnte im Falle des BBP-Wildtyps für die eingesetzten digoxigenierten Proteine beobachtet werden. Wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit BSA beschichtet, wurde für keines der drei Lipocaline ein Bindungssignal detektiert (Daten nicht gezeigt). DigA16 eignete sich demzufolge zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe in einem indirekten ELISA.

3.3.6 Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften der Variante DigA16 mittels Fluoreszenztitration

Da es bei ELISA-Experimenten zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichtes zwischen dem in Lösung vorliegenden Rezeptorprotein und einem an der festen Phase immobilisierten Liganden kommt, können sich die auf diese Weise bestimmten Dissoziationskonstanten zum Teil erheblich von den thermodynamischen Dissoziationskonstanten des Komplexes in Lösung unterscheiden (Goldberg & Djavadi-Ohanian, 1993). Eine genauere Analyse der Liganden-Bindungseigenschaften von DigA16 mit einer Reihe anderer, zum Teil strukturell zum Digoxigenin homologer Substanzen wurde daher mit Hilfe von Fluoreszenztitrations-Experimenten durchgeführt.

Insgesamt acht potentielle Liganden mit teilweise sehr ähnlichen chemischen Strukturen wurden für die Bindungsstudien eingesetzt (siehe Abbildung 22). Die hydrophilen, aber ungeladenen Steroide Digoxigenin und Digitoxigenin unterscheiden sich von Digoxin und Digitoxin durch das Fehlen von drei Zuckerresten an der Position C-3 des Steroid-Gerüsts, die für die pflanzlichen Herzglycoside charakteristisch sind. Digitoxigenin zeichnet sich dabei durch das Fehlen der Hydroxylgruppe an Position C-12 im Vergleich zu seinem Analogon Digoxigenin aus.

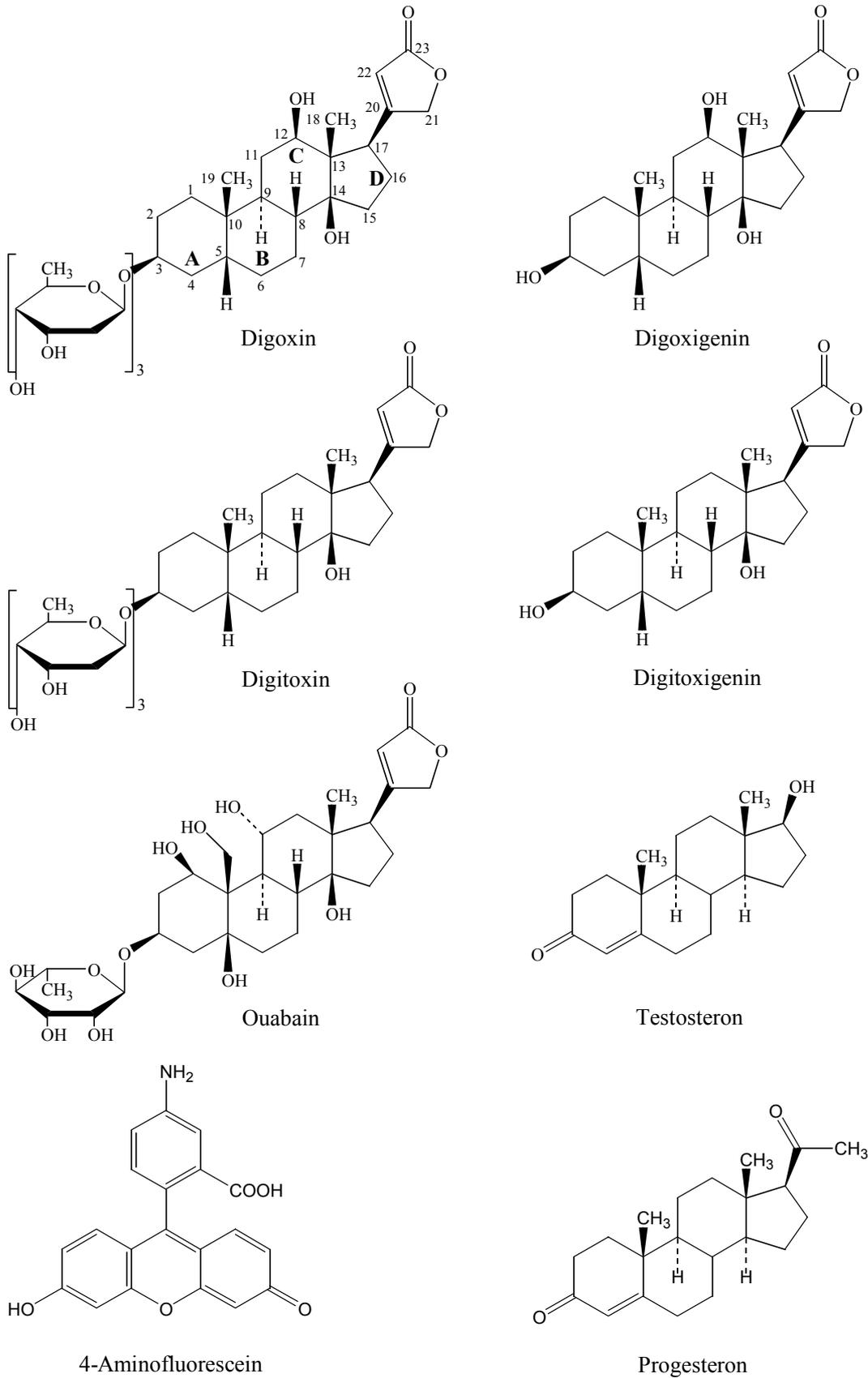


Abbildung 22: Konstitutionsformeln der für die Liganden-Bindungsstudien eingesetzten Verbindungen (Nummerierung der C-Positionen nach Mühlenbruch *et al.*, 1986).

Das ebenfalls hydrophile und ungeladene Steroid Ouabain trägt im Vergleich zum Digoxigenin drei zusätzliche Hydroxyl-Substituenten an Ring A sowie lediglich eine Kohlenhydrat-Gruppe an Position C-3. Zusätzlich ist die Hydroxylgruppe an Ring C mit dem benachbarten Kohlenstoff-Atom verknüpft und liegt daher – verglichen mit Digoxigenin – auf der anderen Seite der Steroidebene. Testosteron bzw. Progesteron unterscheiden sich vom Digoxigenin im wesentlichen durch eine Konformationsänderung im Steroid-Ring A, die durch die Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 hervorgerufen wird sowie durch eine Hydroxylgruppe bzw. einen Acetylrest anstelle der Lactongruppe an Position C-17. Zusätzlich wurde 4-Aminofluorescein für die Bindungsstudien eingesetzt. Diese, mit ihrem System aus drei kondensierten aromatischen Ringen und einem dazu orthogonal angeordneten Carboxyaminophenylring ansonsten chemisch unverwandte Substanz, hatte in einer vorangegangenen Studie als Modellligand für die Selektion eines Anticalins mit artifizieller Bindungsaktivität gedient (Beste *et al.*, 1999) und wurde hier zur Kontrolle der Bindungsselektivität eingesetzt.

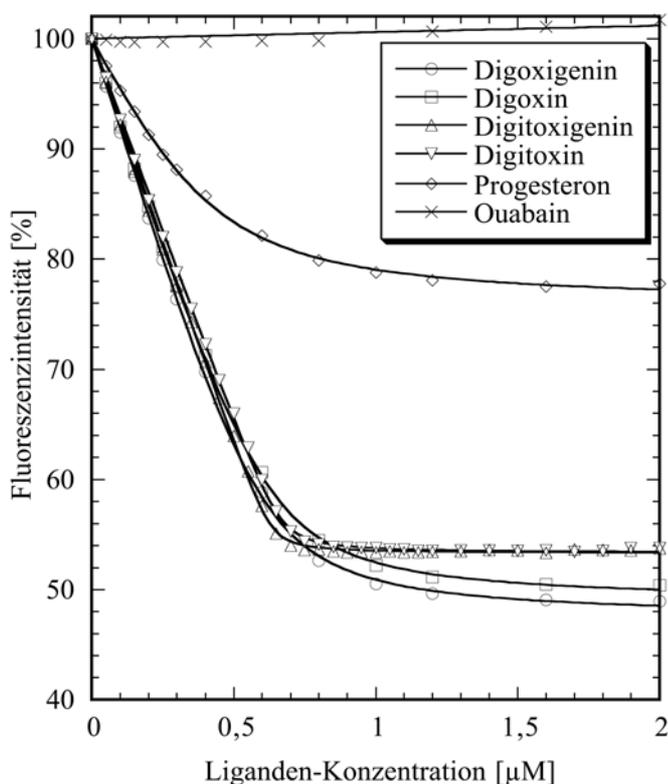


Abbildung 23: Fluoreszenztitrationskurven der BBP-Variante DigA16 mit unterschiedlichen Liganden. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse repräsentativer Bindungsstudien. Eine $1 \mu\text{M}$ Lösung des in *E. coli* produzierten und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteins in PBS/E wurde mit einer Lösung des Liganden in DMF titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration gemessen. Die Anpassung der Titrationskurven erfolgte entsprechend Abschnitt 3.3.4.

Die Dissoziationskonstanten zwischen DigA16 und den unterschiedlichen Liganden wurden durch Titration des gereinigten rekombinanten Proteins mit einer Lösung der jeweiligen Substanz in DMF ermittelt. Die im Titrationsexperiment gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Proteinlösung wurden in Abhängigkeit von der Menge des zugegebenen Liganden aufgetragen und, wie unter Abschnitt 3.3.4 beschrieben, angepaßt (Abbildung 23). Eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse ist in Tabelle 6 gezeigt.

Die Bindungsstudien zeigten, daß die Dissoziationskonstanten des Komplexes aus DigA16 und Digoxigenin bzw. Digoxin mit $30,2 \pm 3,6$ nM bzw. $31,1 \pm 3,2$ nM praktisch identisch sind. Ebenfalls praktisch gleich waren die beobachteten maximalen *Quenching*-Effekte. Somit wird die Bindungsaffinität von DigA16 zum Steroid durch die Kohlenhydrat-Substitution an Position C-3 nicht signifikant beeinflusst.

Das strukturell homologe Steroid Digitoxigenin und dessen Glycosid Digitoxin wurden mit Dissoziationskonstanten von $2,0 \pm 0,52$ nM für den DigA16 Digitoxigenin-Komplex und $3,2 \pm 0,54$ nM für den DigA16-Digitoxin-Komplex und daher ebenfalls praktisch unabhängig vom Substituenten an Position C-3 gebunden. Die gemessenen maximalen *Quenching*-Effekte waren mit jeweils ca. 47 % für die beiden Liganden ununterscheidbar.

Ligand	Q_{\max} [%]	$[P]_{t, \text{app}}$ [μM]	K_D [nM]
Digoxigenin	$52,6 \pm 0,6$	$0,61 \pm 0,007$	$30,2 \pm 3,6$
Digoxin	$51,1 \pm 0,5$	$0,63 \pm 0,007$	$31,1 \pm 3,2$
Digitoxigenin	$46,9 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,003$	$2,0 \pm 0,52$
Digitoxin	$46,7 \pm 0,3$	$0,67 \pm 0,003$	$3,2 \pm 0,54$
Progesteron	$24,0 \pm 3,8$	$0,41 \pm 0,022$	97 ± 15
Testosteron	—*	—*	—*
Ouabain	—*	—*	—*
4-Aminofluorescein	—*	—*	—*

Tabelle 6: Ergebnis der Bindungsstudien von DigA16 mit verschiedenen Liganden (Abbildung 23). Angegeben sind die durch Anpassung der Titrationskurven gemäß Gleichung (21) ermittelten Werte für den maximalen *Quenching*-Effekt (Q_{\max}), die apparente Proteinkonzentration $[P]_{t, \text{app}}$ und die Dissoziationskonstante (K_D).
* Nicht meßbar.

Progesteron wurde mit einer Dissoziationskonstante von ca. 0,1 μM komplexiert. Dabei betrug der apparente bindungsaktive Proteinanteil jedoch nur 0,41 μM und war somit deutlich geringer als bei der Komplexierung der übrigen Liganden. Eine Ursache für den beobachteten niedrigeren funktionellen Proteinanteil könnte in der fehlerhaften Anpassung der gemessenen Datenpunkte begründet sein. Durch den schwächer ausgeprägten *Quenching*-Effekt könnten geringe Unregelmäßigkeiten bei der Bestimmung der Proteinfluoreszenz im Titrationsexperiment zu signifikanten Fehlern bei der Anpassung der apparenten funktionellen Proteinkonzentration führen.

Für das strukturell dem Progesteron relativ ähnliche Testosteron wie auch für Ouabain und das zur Kontrolle eingesetzte 4-Aminofluorescein konnte keine Bindung detektiert werden. Somit war die molekulare Erkennung der Steroid-Gruppe durch DigA16 spezifisch. Dabei zeichnete sich der Trend ab, daß der Anteil an bindungsaktivem und funktionellem DigA16 zwischen ca. 61 und 67 % des eingesetzten rekombinanten Proteins betrug.

3.4 Versuche zur weiteren Verbesserung der Bindungseigenschaften durch Affinitätsmaturierung von DigA16

Die BBP-Mutante DigA16 war aus einer Bibliothek von DigA-Varianten selektiert worden, die durch die Randomisierung des ersten Schleifenbereichs von DigA generiert worden war. Die übrigen Peptidschleifen waren bei der gerichteten Zufallsmutagenese unverändert belassen worden (vgl. Abschnitt 3.3.1). In einem Versuch zur weiteren Verbesserung der Digoxigenin-Affinität – ausgehend von der Variante DigA16 – wurde nun eine Bibliothek aus DigA16-Mutanten mit Zufallsmutationen in den Schleifenbereichen 3 oder 4 einem erneuten Selektionsprozeß unterworfen und die Bindungseigenschaften der gefundenen Varianten analysiert.

3.4.1 Parallele Randomisierung der Schleifenbereiche Nr. 3 und 4

Innerhalb der Schleifenbereiche 3 und 4 wurden diejenigen Aminosäurepositionen ausgewählt, die bereits für die Herstellung der ursprünglichen BBP-Bibliothek Nr. 1 randomisiert worden waren, da sie den größten Anteil an der molekularen Kontaktfläche zum natürlichen Liganden des Bilin-Bindungsproteins, Biliverdin IX γ , haben (Abschnitt 1.5). Postuliert man eine ähnliche Orientierung des in der Bindungstasche von DigA16 gebundenen Digoxigenins, so sollte sich durch eine Optimierung der Bindungsbeiträge der einzelnen Aminosäure-Reste innerhalb dieser Peptidschleifen die Affinität zum Steroid-Liganden maximieren lassen, wobei es keinen Hinweis darauf gab, welcher der Schleifen bei einer erneuten Randomisierung der Vorzug zu geben war. Im Fall der Schleifenregion 2 liegen nur zwei der insgesamt drei randomisierten Reste der Bibliothek Nr. 1 tief in der Bindungstasche des DigA16. Ihr

Bindungsbeitrag zur Komplexbildung des Digoxigenins ist daher vermutlich weniger ausgeprägt.

Bei konzentrierter Mutagenese aller in den beiden Schleifenbereichen ausgewählten Aminosäure-Reste hätte sich aufgrund der Limitierungen beim Transformationsschritt im Verlauf der Herstellung der Bibliothek eine praktisch nicht zu realisierende Komplexität ergeben. Diese hätte bei insgesamt neun Positionen ca. 32^9 (ca. $4 \cdot 10^{13}$) Mutanten mit unterschiedlicher Basensequenz umfaßt (vgl. Abschnitt 1.5). Demgegenüber lassen sich alle theoretisch möglichen Varianten, die bei der Zufallsmutagenese nur einer Peptidschleife entstehen (ca. 32^5 bzw. 32^4 verschiedene Mutanten bei Randomisierung von Schleife Nr. 3 bzw. 4), in jeweils einer Bibliothek darstellen. Um alle Varianten innerhalb der ausgewählten Schleifenbereiche durchmustern zu können, ohne sich im Selektionsprozess auf eine der Schleifen festlegen zu müssen, wurden zur Beschleunigung des Experimentes zunächst parallel zwei jeweils redundante Teilbibliotheken hergestellt, die vor dem ersten Selektionszyklus vereinigt wurden.

Für die Herstellung der Teilbibliothek zur Randomisierung des Schleifenbereichs 3 wurde die kodierende DNA von DigA16 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 zusammen mit den flankierenden Oligodesoxynukleotiden GB-2 und GB-11 (siehe Abbildung 24) in einer PCR-Reaktion eingesetzt und das erhaltene Genfragment isoliert. Der degenerierte *Primer* GB-11, der die zu mutierende Gensequenz überspannte, wies dabei eine Mischung der entsprechenden Basen an den zu randomisierenden Positionen auf. Parallel dazu wurde in einer weiteren PCR-Reaktion mit der kodierenden DNA von DigA16 als Matrix sowie den *Primern* STS12 und FS-18 ein zweites teilweise überlappendes Fragment amplifiziert und ebenfalls isoliert. Zur Assemblierung des vollständigen randomisierten DigA16-Genfragmentes wurden die beiden erhaltenen Genfragmente zusammen mit den flankierenden *Primern* STS12 und GB-2 in einer zweiten Stufe der PCR-Reaktion eingesetzt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde einer *Bst*XI-Hydrolyse unterworfen und mit einem analog verdauten Vektorfragment des Plasmides pBBP24 (Abschnitt 3.3.1) ligiert.

Die zweite Teilbibliothek zur Randomisierung der 4. Peptidschleife wurde ebenfalls durch eine zweistufige PCR präpariert. In einer ersten PCR-Reaktion wurde mit der kodierenden Sequenz von DigA16 als Matrix und dem Oligodesoxynukleotid STS12 sowie dem degenerierten *Primer* GB-4 ein randomisiertes Genfragment erhalten. Dieses wurde isoliert und diente in einer zweiten PCR-Reaktion mit den *Primern* STS12 und GB-2 als Matrize, wobei der fehlende Abschnitt ergänzt wurde. Das erhaltene Produkt dieser PCR-Reaktion wurde ebenfalls mit *Bst*XI verdaut und auf dem Plasmid pBBP24 subkloniert.

STS12: CTTTCGACTGGTCCAGTACCATGGTAAATGGTGGCA
 GB-1: CTTTCGACTGGTCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGA
 STS5: CTGGTCCAGTACCATGGTAAATGGTGGNNKGTCCGNNKTAACCCNNKNNKNNKNNK
 GB-3: CCATGGTAAATGGTGGGAAGTCCCAAATACCCNNKMSNNNSNNK
 GCGAGCGCGACGTGTACCAACGACGGTCCCTGTCCGAAAGTCAAGCCAGTCGACAACTTCGACTGGTCCAGTACCAATGGTGGAAATCCCAAATACCCAACTCAGTTGAG
 CGCGTCCGGCTGCACATGGTGTCCACGGACAGGGCTTCAGTTCGGTCCAGCTGTGAAGCTGACCAGGGTCAATTTACCACCCCTTCAGCGGTTTATGGGGTTTGGTCAACTC
 320
 AlaGlnAlaAspValTyrHisAspGlyAlaCysProGluValLysProValAspAsnPheAspTrpSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGlnValAlaLysTyrProAsnSerValGlu
 OmpA 1 10 20 30
 AAGTACCGAAAGTGCCGGA
 AAGTACCGAAAGTGCCGGA
 AAGTACCGAAAGTGCCGATGGCTGAGTACACTCCTGAAAGCAAGAGTTCAAAAGTTCGAACCTACACGTAATCCACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAACGTCCCTACCCAGTTGGT
 TTCAATGCCTTTCACGCCCTACCCGACTCATGTGAGGACTTCGGTTCACAGTTTTCAAAGCTTGAATGGTGCATTAAGTGCCTTCCCTTATGAAATAACTTCCTTCACGGATGGTCAACCA
 440
 TTCTCACAGTTTTCAAAGCNSATGNNMCATTAGGTCCGTTCCCTTATGAAANNNSCTTCCATGCGGATGGG :FS-15
 CTTCCATGGCGGATGGTCAACCA
 LysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAsnTyrHisValIleHisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGly
 40 50 60 70
 GB-11: CCAAGATTGGAAGATCTACCACAGCNSACTNNKGGAGTNNSCCVVSGAGNNKGTATTCAACGTACTCTCC
 GACTCCAAGATTGGAAGATCTACCACAGCCTGACTTACGGAGGTGTACCAAGGAACGATTTCAACGTAATCCCAAGTACGACAAAGAACTACTCGGATACTTGCAAATAAC
 CTGAGGTCTAAACCTTTCTAGATGGTGTCCGACTGAAATGCCTCCACAGTGGTTCCTTTCATATAAGTTGCATGAGAGGTGACTGTGTCTTGTGATGTAGTAGCCCTATGATGACGTTTATG
 CTGAGGTTCTAACCTTTCTAGATGGTGTCCGACTGAAATGCCTCCACAGTGGTTCCTTTCATATAAGTTGCATGAGAGGTGACTGTGTCTTGTGATGTAGTAGCCCTATGATGACGTTTATG
 CTGAGGTTCTAACCTTTCTAGATGGTGTCCGACTGAAATGCCTCCACAGTGGTTCCTTTCATATAAGTTGCATGAGAGGTGACTGTGTCTTGTGATGTAGTAGCCCTATGATGACGTTTATG
 TTGATGTAGTAGCCCTATGNNMACGNNNSATG
 AspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnValLeuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyr
 80 90 100 110
 GACGAGGACAAGAAAGGACACCAAGACTTCGTCTGGGTCTCTCCAAGCAATGGTCTCTTACTGGTGAAGCCAAAGCCGCTGTCCGAGAACTACCTTATCGGCTCCCCAGTAGTCGACTCC
 CTGCTCCTGTCTTCCCTGTGGTTCTGAAAGCAGACCACGAGAGGTCTTCTGACAGGAATGACCACCTCGGTTCTGGCCGACAGCTCTGATGGAATAGCCGAGGGTTCATCAGCTGAGG
 CTGCTCCTGTCTTCCCTGTGNNSCITGNNMCAGACCCACGAGAGGTTCT :GB-4
 CAGACCCACGAGAGGTTCTCGTACCAGGAATGACCAC :GB-2
 AspGluAspLysLysGlyHisGlnAspPheValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThrGlyGluAlaLysThrAlaValGluAsnTyrLeuIleGlySerProValValAspSer
 120 130 140 150
 CAGAAACTGGGTATACAGTGACTTCTCTGAAGCCGCTGCAAGGTCAACAATAGCAACTGGTCTCACCCCGCAGTTTCGAAAAATAG
 GTCTTTGACCATAATGTCACCTGAAGAGACTTCGGCGGAGTTCCAGTTGTATCGTTTGACCAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTATC

Abbildung 24: Für die Synthese der Bibliotheken Nr. 1 bis 3 eingesetzte Oligodesoxynukleotide zusammen mit der Sequenz des BBP-Strukturgens. Der Ausschnitt der Gensequenz aus dem Phasmidvektor pBBP20 beginnt kurz vor dem Ende der OmpA-Signalsequenz und endet mit dem *Amber*-Stoppkodon, das sich an die Sequenz des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels anschließt. Die Zahlen am Zeilenende entsprechen der Numerierung der Basen im Vektor pBBP20. Die kodierte Aminosäuresequenz ist unterhalb der entsprechenden DNA-Sequenz angegeben, mit fortlaufender Numerierung der Aminosäuresequenz des maturen Bilin-Bindungsproteins (beginnend mit dem N-terminalen Asp). Unterstrichene Aminosäuren bezeichnen Reste des OmpA-Signalpeptids bzw. das *Strep*-tag II. Die für die Zufallsmutagenese verwendeten Oligodesoxynukleotide sind je nach Orientierung oberhalb (5'-3'-Orientierung) oder unterhalb (3'-5'-Orientierung) der Gensequenz angegeben. Die Bereiche der *Primer*, die komplementär zur Gensequenz des Bilin-Bindungsproteins sind, sind dunkelblau, nicht-komplementäre Basen oder Zufallskodons mit den dazugehörigen Aminosäuren rot dargestellt. Der Basenaustausch des Oligodesoxynukleotides STS12, das für die Synthese der Bibliothek Nr. 3 eingesetzt worden war, trägt der Mutation Glu28Gln in der Sequenz des DigA16 Rechnung. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Bst*XI und *Kpn*I sind hellblau wiedergegeben; letztere entsteht allerdings erst durch die Einführung der grün markierten stillen Mutationen mittels der *Primer* FS-15 bzw. FS-18. Diejenigen vier Aminosäuresubstitutionen, die gezielt in das BBP eingeführt worden waren (Asp1, Gln21, Ser 87 und Met135), sind ebenfalls hellblau markiert (Abschnitt 1.5).

3.4.2 Selektion von Mutanten mittels *Phage Display* und Kolonie-Filterstapel-Test

Die Ligierungsansätze beider Teilbibliotheken wurden unabhängig voneinander für die Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen eingesetzt und die Kulturen nach vollzogener Phagemidproduktion (vgl. Abschnitt 2.2.2.2) vereinigt. Für beide Teilbibliotheken wurden auf diese Weise jeweils ca. $2,2 \cdot 10^8$ unabhängige Transformanten erhalten. Die Phagemide der so gewonnenen redundanten Bibliothek (Bibliothek Nr. 3) wurden schließlich der Affinitätsanreicherung durch *Phage Display* zugeführt.

Wie schon bei der Durchmusterung der Bibliothek Nr. 2 auf DigA-Mutanten mit höherer Digoxigenin-Affinität (siehe Abschnitt 3.3.2), wurde auch für die Selektion aus Bibliothek Nr. 3 die Ausbildung eines vorgelagerten Protein-Ligand-Komplexes in Lösung favorisiert. Aus diesem Grund wurden die hier präparierten Phagemide zunächst mit Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugat in einer Endkonzentration von 7 nM inkubiert und anschließend die komplexierten Phagemide durch Zugabe Streptavidin-beschichteter paramagnetischer Partikel abgefangen. Die Konzentration des Doppelkonjugates betrug somit nur 1:10 der zuvor in den Anreicherungszyklen zur Selektion der DigA-Mutanten eingesetzten Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 3.3.2). Phagemide, die unter diesen Bedingungen kein Digoxigenin gebunden hatten, wurden durch wiederholtes Waschen der paramagnetischen Partikel mit Puffer entfernt. Gebundene Phagemide wurden schließlich durch Absenken des pH-Wertes auf 2,2 im Waschpuffer eluiert und vor einem neuerlichen Selektionszyklus amplifiziert. Der Phagemidtiter verschiedener Waschlösungen sowie der Phagemidgehalt der Elutionslösung wurden bestimmt und der relative Titer – bezogen auf die Anzahl der jeweils eingesetzten Phagemide – gegen den jeweiligen Schritt aufgetragen (Abbildung 25).

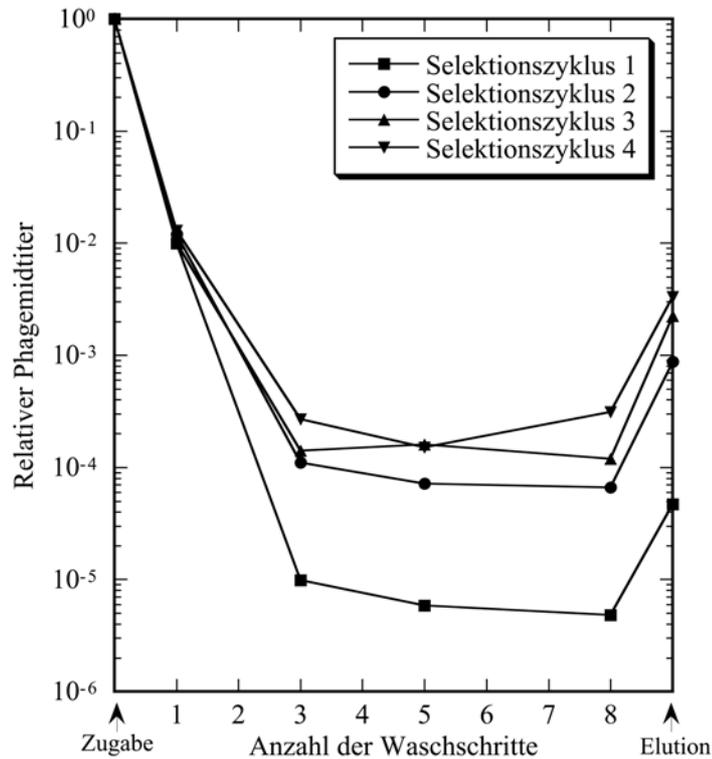


Abbildung 25: Überlagerung der Elutionsprofile im Verlauf der Durchmusterung von Bibliothek Nr. 3 zur Affinitätsmaturierung von DigA16. Gezeigt ist der relative Phagemidtitel ausgewählter Waschlösungen sowie der Elutionslösung bezogen auf die Anzahl eingesetzter Phagemide. Hierbei wurde eine redundante Zufallsbibliothek mit randomisierten Aminosäurepositionen in den Schleifenbereichen 3 und 4 zur Präparation der Phagemid-Bibliothek eingesetzt. Die frische Phagemidlösung ($4,0 \cdot 10^{11}$ bis $1,3 \cdot 10^{12}$ cfu) wurde zunächst mit 2 pmol eines Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugates in 300 μ l inkubiert und komplexierte Phagemide durch Zugabe Streptavidin-beschichteter paramagnetischer Partikel abgetrennt. Die Partikel wurden gewaschen und denaturierend, d. h. bei saurem pH-Wert eluierte Phagemide vor einem neuen Anreicherungszyklus amplifiziert.

Das beobachtete Elutionsprofil zeigte, ähnlich wie bei der vorangegangenen Selektion der DigA-Varianten, eine Abnahme des Phagemidtiters bis zur dritten Waschfraktion. Die Anzahl ausgewaschener Phagemide blieb daraufhin bis zur selektiven Elution der gebundenen Phagemide auf einem annähernd konstanten Niveau. Der Phagemidtitel der Elutionsfraktion erhöhte sich von Selektionszyklus 1 zu Zyklus 2 um den Faktor 18,5. Im 3. Selektionszyklus erhöhte sich die Anzahl der eluierten Phagemide nur um den Faktor 2,5, in Runde 4 lediglich noch um den Faktor 1,5. Dies deutete darauf hin, daß der Selektionsprozeß konvergiert hatte. Im 4. Anreicherungszyklus wurden so insgesamt 0,33 % der eingesetzten Phagemide selektiv eluiert.

Die DNA der im vierten Anreicherungszyklus selektierten Phagemide wurde präpariert und einem Kolonie-Filterstapel-Test zugeführt (vgl. Abschnitt 3.1.3 und 3.3.2). Um selektiv die Varianten mit der niedrigsten Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) zu detektieren, wurden parallel drei Bindungstests unter verschiedenen stringenten Bedingungen auf drei unterschiedlichen hydrophoben Membranen durchgeführt. Bei einer der Membranen wurden

komplexierte BBP-Varianten nach der Behandlung mit einer 0,15 μM Lösung von Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugat wie bereits unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben durch Farbreaktion nachgewiesen. Die beiden anderen Membranen wurden nach Inkubation mit dem Doppelkonjugat zunächst für eine bzw. für zehn Minuten mit der einer 2 mM Digoxigenin-Lösung gewaschen. Dadurch sollte erreicht werden, daß der im Überschuß vorliegende freie Ligand mit dem Doppelkonjugat um die BBP-Varianten kompetiert. Bei Varianten mit einer schnellen Dissoziationskinetik sollte somit der zunächst gebildete Komplex mit dem Protein-Doppelkonjugat durch einen Komplex mit freiem Digoxigenin aus dem Waschpuffer ersetzt werden.

In allen drei Fällen wurden die zu jeweils mehr als 90 % der Kolonien gehörenden sekretierten DigA16-Varianten angefärbt (siehe Abbildung 26). Es war jedoch auffällig, daß sich durch Verlängerung der Inkubationsdauer mit dem freien Liganden der Kontrast zwischen nur wenig und stärker intensiven Farbspots erhöhte. Die gewählten Inkubationszeiten waren aber offensichtlich nicht ausreichend, um einmal gebildete Komplexe mit dem Konjugat trotz des erheblichen ca. 10^5 -fachen Überschusses an freiem Digoxigenin zu dissoziieren und die Signale der weniger affinen BBP-Varianten auf diese Weise zu unterbinden.

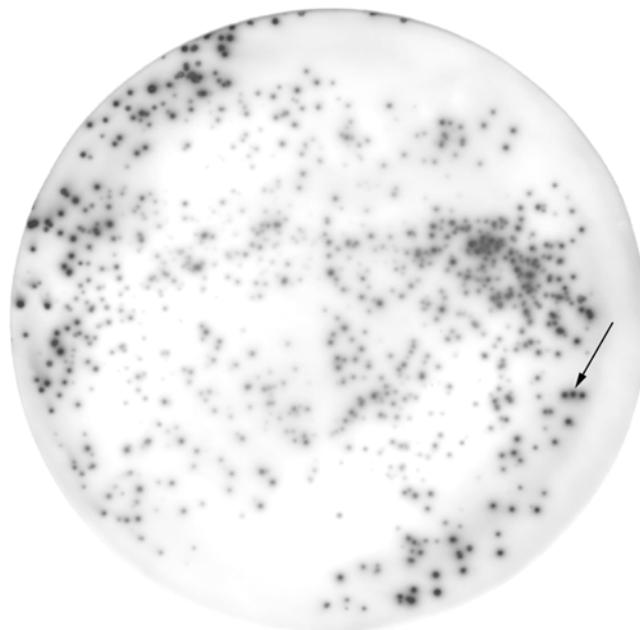


Abbildung 26: Ergebnis des Kolonie-Filterstapel-Tests zur Selektion von DigA16-Varianten mit erhöhter Digoxigenin-Affinität. Die Phasmid-DNA aus dem Elutionsschritt des vierten Anreicherungszyklus wurde präpariert und die mutierte Genkassette auf dem Vektor pBBP22 subkloniert. Nach der funktionellen Immobilisierung der BBP-Varianten auf einer hydrophoben Membran wurden diese unter verschiedenen stringenten Bedingungen auf ihre individuellen Digoxigenin-Bindungseigenschaften untersucht. Die Abbildung zeigt denjenigen Membranfilter, der nach der Behandlung mit Digoxigenin-BSA-Biotin-Doppelkonjugat für zwei Minuten mit einer 2 mM Digoxigenin-Lösung inkubiert worden war. Der Pfeil deutet auf den Farbspot, der zur Isolierung der Variante DigA16/19 führte.

Insgesamt neun Kolonien, die die intensivsten Farbspots auf den drei Filtermembranen hervorgerufen hatten, wurden ausgewählt, ihre Phasmid-DNA isoliert und ihre DNA-Sequenz ermittelt. Die kodierten Varianten wurden als DigA16/15, DigA16/16, sowie DigA16/18 bis DigA16/24 bezeichnet.

3.4.3 Sequenzanalyse der selektierten DigA16-Varianten

Die DNA-Sequenzierung ergab, daß acht der neun analysierten Phasmide für unterschiedliche DigA16-Mutanten kodierten (Abbildung 27). Lediglich die Varianten DigA16/16 und DigA16/21 waren identisch. Dabei war auffällig, daß alle selektierten Varianten bis auf DigA16/24 aus demjenigen Teil der Bibliothek stammten, bei der die Schleifenregion 4 randomisiert worden war.

Im Fall dieser sieben Mutanten war Phe114 von DigA16 sechsmal unverändert geblieben und einmal durch die ebenfalls aromatische Aminosäure Trp ersetzt. Ser116 war hingegen sechsmal durch Arg und ebenfalls einmal durch Trp ersetzt. Die Aminosäure Met125 war dreimal durch Leu, zweimal durch Gln, einmal durch Gly und wiederum einmal durch Trp substituiert worden. An Aminosäureposition 127 schließlich war der Leucin-Rest von DigA16 dreimal durch Tyr, dreimal durch Leu und einmal durch Ala ausgetauscht. Bei fünf der sieben Varianten wurden weitere Mutationen außerhalb des randomisierten Bereiches gefunden.

Drei dieser zusätzlichen Substitutionen waren stille Mutationen, während insgesamt acht Punktmutationen zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten. Bemerkenswerterweise waren davon hauptsächlich die Positionen Glu96 sowie Phe99 betroffen. Glu96 war dreimal durch Gly und einmal durch Val, Phe99 dreimal durch Ser substituiert. Möglicherweise wurde die auffällig hohe Fehlerrate an diesen Positionen durch eine besondere Tertiärstruktur hervorgerufen. Bei einer Variante wurde zusätzlich ein durch eine Punktmutation hervorgerufener Austausch der Aminosäure Glu119 gegen Lys gefunden. Damit trugen alle Mutanten eine zusätzliche positive Ladung im Bereich der 4. Peptidschleife, entweder Arg116 oder Lys119 – verglichen mit der Primärstruktur von DigA16. Bei fünf der Varianten war die Anzahl der negativen Ladungen zusätzlich durch den Verlust des Glu-Restes an Position 96 bzw. an Position 119 reduziert worden.

Auch bei der Variante, die aus dem Teil der Bibliothek mit der mutagenisierten Schleifenregion Nr. 3 stammte, kam es zu einer Reduzierung der negativen Nettoladung des Proteins, da an Aminosäureposition 96 ebenfalls der Glutaminsäure-Rest durch ein Glycin ausgetauscht worden war. Innerhalb der randomisierten Positionen waren Tyr88 sowie Val93 und Gly97 unverändert geblieben, während Ile90 konservativ durch Leu und Gln95 durch den wiederum hydrophilen Rest Thr substituiert war. Bei allen Digoxigenin bindenden Varianten,

die aus den verschiedenen Zufallsbibliotheken selektiert worden waren, war demzufolge der Rest Val93 des Bilin-Bindungsproteins unverändert geblieben.

20	30	40	50	
<p><i>TyrSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGlnValAlaAlaTyrProAspHisIleThrLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerArg</i> <u>TGTC</u><u>CCAGTACCA</u><u>TGGTAAATGGTGGCAGGTC</u><u>CGCCGCTACCCCGATCATATTACGAAGTACGGAAAGTGGCGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTC</u><u>CGCC</u></p>				DigA16
.....				Bibliothek 3
.....				DigA16/15
.....				DigA16/16,21
.....				DigA16/18
.....C.....				DigA16/19
.....				DigA16/20
.....				DigA16/22
.....				DigA16/23
.....				DigA16/24
60	70	80	90	
<p><i>TyrSerValIleHisGlyLysGluTyrPheSerGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerTyrThrIleGlyGlyValThrGlnGluGlyVal</i> <u>TACTCTGTAATCCACGGCAAGGAATACTTTTCCGAAGGTACCC</u><u>TACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCACAGCTACACTATTGGAGGTGTGACCCAGGAGGGTGTGA</u></p>				DigA16
.....				Bibliothek 3
.....				DigA16/15
.....G.....				DigA16/16,21
.....Gly.....				DigA16/18
.....T.....				DigA16/19
.....Val.....				DigA16/20
.....A.....G.....				DigA16/22
.....Gly.....				DigA16/23
.....G.....				DigA16/24
.....TAC...TTG...GTG...ACC.G.GGG...				DigA16/24
.....Tyr Leu Val ThrGlyGly.....				
100	110	120	130	
<p><i>PheAsnValLeuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrPheCysSerTyrAspGluAspLysLysGlyHisMetAspLeuValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThr</i> <u>TTCAACGTACTCTCCACTGACAACAAGAACTACATCATCGGATACTTTTGTCTCGTACGACGAGGACAAGAAGGACACATGGACTTGGTCTGGGTGCTCTCCGAAGCATG</u><u>TCCTTACT</u></p>				DigA16
.....				Bibliothek 3
.....				DigA16/15
.....TGG...TGG...A...TTG...TAT.....				DigA16/16,21
.....Trp Trp Lys Leu Tyr.....				DigA16/18
.C.....TTT...CGG...TTG...TAT.....				DigA16/19
Ser Phe Arg Leu Tyr.....				DigA16/20
.C.....TTT...CGC...CTG...TAT.....				DigA16/22
Ser Phe Arg Leu Tyr.....				DigA16/23
.C.....TTT...CGG...TGG...GCG.....				DigA16/24
Ser Phe Arg Trp Ala.....				
.....TTT...CGC...CAG...CTT.....				DigA16/15
Phe Arg Gln Leu.....				DigA16/22
.....TTT...AGG...GGG...CTT.....				DigA16/23
Phe Arg Gly Leu.....				DigA16/24
.....TTT...CGC...CAG...CTG.....				
Phe Arg Gln Leu.....				

Abbildung 27: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der selektierten DigA16-Varianten aus der Bibliothek Nr. 3 im Vergleich zur Sequenz von DigA16. Gezeigt sind die Aminosäurepositionen 19 bis 138 (vgl. Abbildung 24) des DigA16 und der entsprechenden Varianten. Diejenigen Aminosäurepositionen des DigA16, die zur Herstellung von Bibliothek Nr. 3 (Abschnitt 3.4.1) randomisiert wurden, sind unterstrichen (88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127). Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek Nr. 3 randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz von DigA16 angegeben (mit Punkten für unveränderte Basen). Innerhalb der Varianten, die aus dieser Bibliothek selektiert wurden, sind ebenfalls nur die mutierten Nukleotide und die jeweils kodierten Aminosäuren angegeben. Unveränderte Basen sind als Punkte wiedergegeben. Unterstreichungen in der Gensequenz von DigA16 kennzeichnen die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bst*XI (CCAN₆TGG) und *Kpn*I (GGTACC).

3.4.4 Produktion in *E. coli* und Liganden-Bindungsstudien

Zur bakteriellen Produktion der selektierten DigA16-Varianten wurden die randomisierten Gensegmente aller acht Mutanten wie schon in Abschnitt 3.2.2 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Die Ausbeuten für die einzelnen Varianten lagen zwischen 0,1 mg und 0,8 mg/l Kulturmedium bei einer Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte von ca. $OD_{550} = 1,0$. Die mittels *Strep*-tag II gereinigten DigA16-Varianten wurden zur Bestimmung ihrer Digoxigenin-Affinität in Fluoreszenztitrations-Experimenten eingesetzt (Abbildung 28).

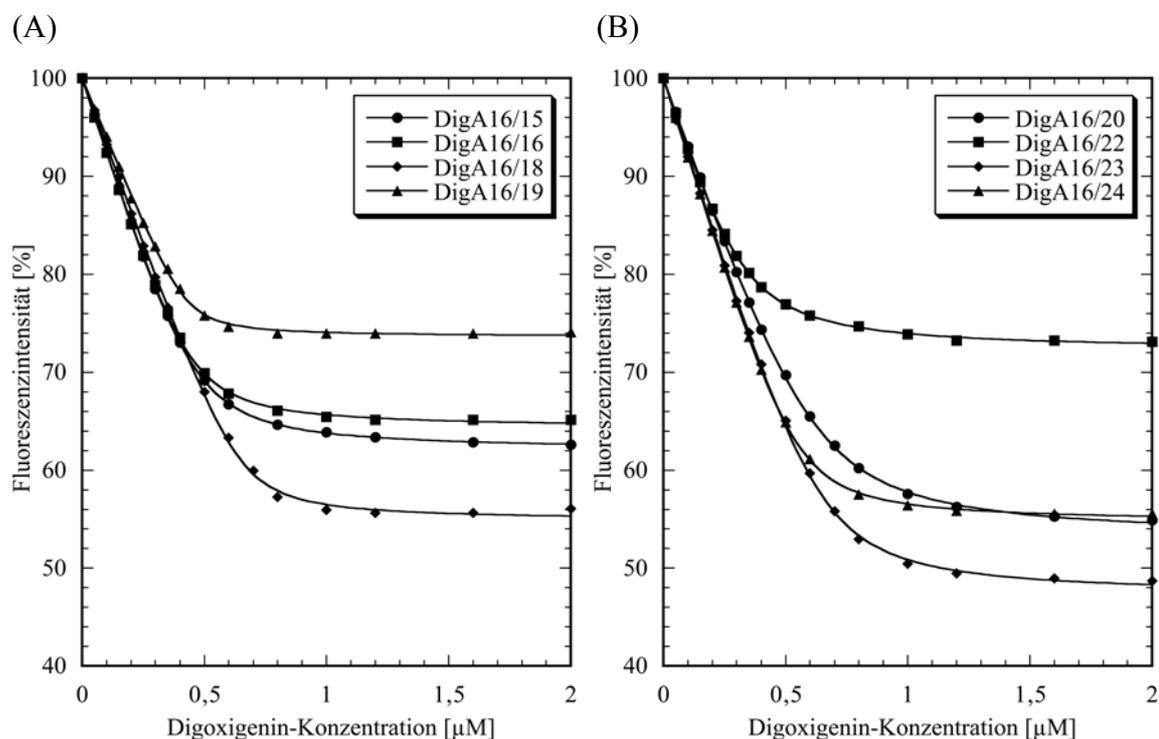


Abbildung 28: Fluoreszenztitration (A) der Varianten DigA16/15, 16, 18 und 19 und (B) der Varianten DigA16/20, 22, 23 und 24 mit Digoxigenin. Die rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Eine 1 μ M Lösung der Proteine in PBS/E wurde mit einer 0,1 mM Digoxigenin-Lösung in DMF titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden gemessen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte entsprechend Abschnitt 3.3.4.

Bei der Anpassung der gemessenen Titrationskurven zeigte sich, daß sechs der acht untersuchten Varianten eine höhere Digoxigenin-Affinität aufwiesen als DigA16 (vgl. Tabelle 7). Unter ihnen war auch diejenige Variante, bei der die Schleifenregion Nr. 3 randomisiert worden war. Die maximalen *Quenching*-Effekte lagen für die einzelnen Varianten auf recht unterschiedlichem Niveau und differierten zwischen ca. 28 % und 53 %.

BBP-Variante	Q_{\max} [%]	$[P]_{t, \text{app}}$ [μM]	K_D [nM]
DigA16/15	$38,0 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,002$	$27,2 \pm 0,8$
DigA16/16	$35,7 \pm 0,6$	$0,45 \pm 0,005$	$22,5 \pm 2,0$
DigA16/18	$45,2 \pm 0,6$	$0,65 \pm 0,007$	$13,9 \pm 2,3$
DigA16/19	$28,7 \pm 0,5$	$0,52 \pm 0,004$	$12,4 \pm 1,3$
DigA16/20	$47,0 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,004$	$48,2 \pm 2,3$
DigA16/22	$27,8 \pm 1,1$	$0,33 \pm 0,005$	$47,0 \pm 2,6$
DigA16/23	$52,8 \pm 0,5$	$0,65 \pm 0,006$	$29,2 \pm 3,0$
DigA16/24	$45,3 \pm 0,2$	$0,55 \pm 0,003$	$20,3 \pm 1,1$

Tabelle 7: Ergebnis der Liganden-Bindungsstudien der DigA16-Varianten mit Digoxigenin. Die Titrationskurven (aus Abbildung 28) wurden nach Gleichung (21) durch nicht-lineare Regression unter Variation der eingesetzten Proteinkonzentration als freiem Parameter angepaßt. Neben dem maximalen *Quenching*-Effekt Q_{\max} sind die apparente Proteinkonzentration $[P]_{t, \text{app}}$ sowie die Dissoziationskonstante K_D angegeben.

Die erneute Affinitätsmaturierung hatte also bei den meisten isolierten DigA16-Varianten zu einer weiteren Verbesserung der Digoxigenin-Bindung geführt. Gleichzeitig zeigten aber auch die Abkömmlinge von DigA16 wiederum keine stöchiometrische Bindung des Digoxigenins. Da DigA16/19 von allen selektierten Varianten die höchste Affinität zu Digoxigenin aufwies, wurde sie detaillierteren Bindungsstudien durch Fluoreszenztitration unterzogen. Hierzu wurde eine Auswahl der schon in Abschnitt 3.3.6 beschriebenen Liganden eingesetzt (Abbildung 29, Tabelle 8).

Die Experimente ergaben, daß sich die Affinität von DigA16/19 zu Digoxigenin durch die Affinitätsmaturierung mit einer Dissoziationskonstante von 12,4 nM, verglichen mit 30,2 nM für den DigA16-Digoxigenin-Komplex, mehr als verdoppelt hatte. Demgegenüber war die Bindungsaffinität zum glycosylierten Digoxin von $K_D = 31,1$ nM auf $K_D = 54,9$ nM um nahezu die Hälfte zurückgegangen. Die Dissoziationskonstante des DigA16/19-Digitoxigenin-Komplexes war im Vergleich zum DigA16 mit 2,3 nM demgegenüber fast unverändert geblieben. Das glycosylierte Digitoxin wurde von DigA16/19 jedoch mit einer um mehr als den Faktor zwei erhöhten Dissoziationskonstante von 8,4 nM ebenfalls schlechter komplexiert. Die beobachteten *Quenching*-Effekte waren für die verschiedenen eingesetzten Herzglycoside mit etwa 30 % fast gleich (siehe Tabelle 8), unterschieden sich jedoch etwas von der gefundenen Fluoreszenzlöschung bei sättigenden Testosteron- bzw. Progesteron-Konzentrationen (23,5 % bzw. 46,4 %).

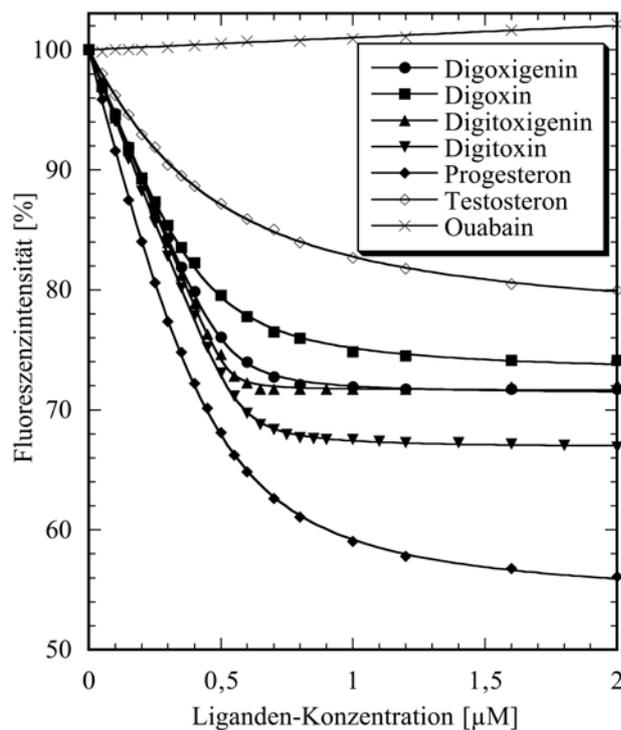


Abbildung 29: Fluoreszenz-Bindungsstudien mit der BBP-Variante DigA16/19 und unterschiedlichen Liganden. Eine $1 \mu\text{M}$ Proteinlösung in PBS/E wurde mit einer Lösung des jeweiligen Liganden in DMF titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration gemessen. Die Titrationskurven wurden durch nicht-lineare Regression entsprechend Abschnitt 3.3.4 angepasst.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten, daß die Affinität von DigA16 zu dem vorgegebenen Liganden Digoxigenin durch *in vitro* Affinitätsmaturierung erneut gesteigert werden konnte. Die Variante DigA16/19 besitzt allerdings im Vergleich zu DigA und DigA16 differenzierte Bindungseigenschaften bezüglich des Substituenten an der Position C-3 der Steroid-Gruppe, da für die Trisaccharid-substituierten Liganden Digoxin und Digitoxin jeweils deutlich niedrigere Affinitäten gefunden wurden als beim unsubstituierten Steroid.

Die Affinität von DigA16/19 zum Progesteron war mit einer Dissoziationskonstante von ca. 81 nM im Vergleich zu DigA16 nicht wesentlich erhöht. Testosteron hingegen wurde von DigA16/19, im Gegensatz zu DigA16, mit einer gut nachweisbaren K_D von ca. 290 nM komplexiert. Analog zum DigA16 konnte allerdings auch für DigA16/19 keine Affinität zu dem Steroid-Glycosid Ouabain festgestellt werden. Das engineerete Lipocalin DigA16/19 erwies sich aufgrund seiner im Vergleich zu DigA16 erstmals erkennbaren Bindungseigenschaften für Testosteron als diesbezüglich weniger selektiv hinsichtlich der Komplexierung der Digoxigenin-Gruppe.

Ligand	Q_{\max} [%]	$[P]_{t, \text{app}}$ [μM]	K_D [nM]
Digoxigenin	$28,7 \pm 0,5$	$0,52 \pm 0,004$	$12,4 \pm 1,3$
Digoxin	$27,1 \pm 1,6$	$0,43 \pm 0,010$	$54,9 \pm 5,6$
Digitoxigenin	$28,4 \pm 0,5$	$0,52 \pm 0,004$	$2,3 \pm 0,59$
Digitoxin	$33,2 \pm 0,4$	$0,57 \pm 0,003$	$8,4 \pm 0,87$
Progesteron	$46,4 \pm 0,6$	$0,46 \pm 0,006$	$80,6 \pm 3,5$
Testosteron	$23,5 \pm 5,8$	$0,27 \pm 0,02$	289 ± 18
Ouabain	—*	—*	—*

Tabelle 8: Ergebnis der Bindungsstudien von DigA16/19 mit verschiedenen Liganden (Abbildung 28). Angegeben sind die durch Anpassung der Titrationskurven nach Gleichung (21) ermittelten Werte für den maximalen *Quenching*-Effekt (Q_{\max}), die apparente Proteinkonzentration $[P]_{t, \text{app}}$ und die Dissoziationskonstante (K_D). * Nicht bestimmbar.

3.4.5 SDS-PAGE-Analyse von BBP, DigA und weiteren Digoxigenin bindenden Lipocalin-Varianten

Zur Analyse der bakteriellen Produktion der selektierten Digoxigenin bindenden BBP-Varianten wurden die Protein-Präparationen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Proben der mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden hierfür jeweils unter reduzierenden sowie nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und angefärbt (Abbildung 30).

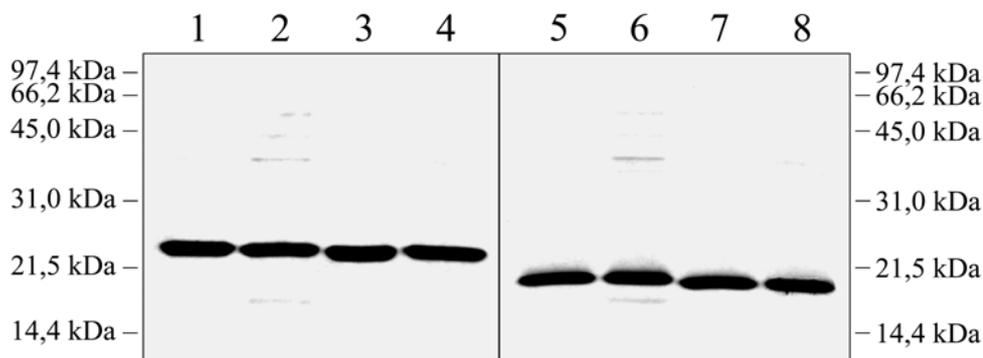


Abbildung 30: Analyse des gereinigten Bilin-Bindungsproteins sowie seiner Varianten DigA, DigA16 und DigA16/19. Die Proteinproben der Spuren 1 bis 4 wurden vor der Elektrophorese mit Mercaptoethanol behandelt, die Proben der Spuren 5 bis 8 wurden nicht reduziert. BBP (Spuren 1 und 5), DigA (Spuren 2 und 6), DigA16 (Spuren 3 und 7) sowie DigA16/19 (Spuren 4 und 8) wurden durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli* produziert und mit Hilfe des *Strep*-tag II gereinigt. Jeweils 2 μg der Proteine wurden auf das Gel aufgetragen. Dargestellt sind zwei 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele nach Anfärbung der Protein-Banden mit Coomassie Brilliant Blau.

Die SDS-PAGE-Analyse ergab, daß alle gentechnisch produzierten Protein-Varianten durch Streptavidin-Affinitätschromatographie in einem Schritt und nahezu ohne Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen gereinigt werden konnten. Lediglich die Variante DigA hatte einen geringfügigen Anteil periplasmatischer Protein-Kontaminationen.

Die drei BBP-Varianten DigA, DigA16 und DigA16/19 zeigten eine zum BBP nahezu identische elektrophoretische Mobilität. Dabei wiesen alle nicht reduzierten Proteinproben eine im Vergleich zum reduzierten Zustand deutlich erhöhte Mobilität auf, was auf die kompaktere Form der Polypeptidkette bei Anwesenheit der beiden Disulfidbrücken zurückzuführen ist (vgl. Schmidt & Skerra, 1994). Das Vorliegen einer diskreten Proteinbande unter nicht-reduzierenden Bedingungen deutete auf die Abwesenheit potentieller nicht nativer Disulfidisomere.

3.5 Physikochemische Analyse von BBP und seinen Digoxigenin bindenden Varianten

3.5.1 Vergleich des Sekundärstrukturgehaltes mittels CD

Um eine qualitative Aussage über etwaige strukturelle Veränderungen der selektierten Varianten DigA, DigA16 und DigA16/19 im Vergleich zum Wildtyp-BBP treffen zu können, wurden CD-Spektren der Proteine im Fern-UV-Bereich zwischen 190 und 250 nm aufgenommen. Nach Johnson (1988) werden in diesem Wellenlängenbereich die spektralen Eigenschaften eines Proteins vorwiegend durch dessen Sekundärstrukturelemente bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Spektren für α -Helix, β -Faltblatt und *Random Coil*-Strukturen kann der jeweilige Anteil in einem Protein aus dessen CD-Spektrum abgeschätzt werden. Die gemessenen Werte für die Elliptizität Θ wurden für jedes Protein nach Gleichung (22) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet (Abschnitt 2.6.2) und gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abbildung 31).

Der Vergleich der CD-Spektren für die einzelnen BBP-Varianten zeigte keine signifikanten Unterschiede zum rekombinanten Wildtyp-BBP. Im Einklang mit der bekannten Kristallstruktur des Bilin-Bindungsproteins (Huber *et al.*, 1987b) entsprach dessen Spektrum dem eines Proteins mit β -Faltblatt-Struktur. Ein geringer α -helikaler Anteil äußerte sich durch das verbreiterte Minimum bei ca. 210 nm und das von 195 nm zu etwas kürzeren Wellenlängen verschobene Maximum.

Die Circular dichroismus-Messungen deuteten darauf hin, daß die β -Barrel-Gerüststruktur in allen hier untersuchten BBP-Varianten erhalten geblieben war. Die Proteinarchitektur des BBP hatte demzufolge den Austausch von insgesamt 15 Aminosäuren im DigA sowie von 17 Resten in der Variante DigA16 und von 19 Resten in DigA16/19 toleriert.

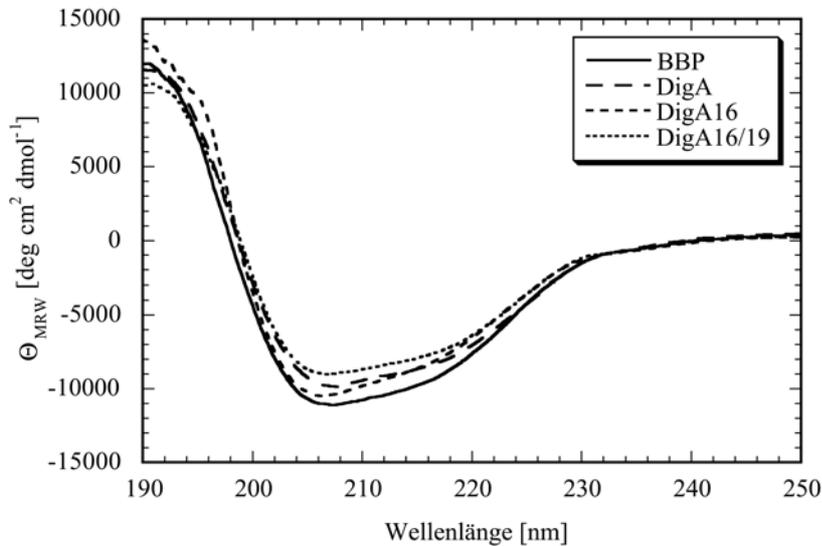


Abbildung 31: Überlagerung der CD-Spektren für BBP und seine Varianten DigA, DigA16 sowie DigA16/19. Die CD-Spektren wurden bei 22 °C in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke mit Hilfe eines Jasco J-810 Spektropolarimeters durch Akkumulation von bis zu 20 Einzelspektren gemessen. Die Proteinlösungen lagen hierzu bei einer Konzentration von 100 bis 350 µg/ml in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 vor. Die experimentell ermittelte Meßgröße der Elliptizität Θ in Grad wurde zum Vergleich der Einzelspektren, wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben, in die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet.

3.5.2 Stabilität der BBP-Varianten gegenüber thermischer Denaturierung

Die Bestimmung der thermodynamischen Faltungstabilität der einzelnen BBP-Varianten erfolgte durch Messung der Übergangstemperaturen vom nativen zum vollständig denaturierten Zustand mit Hilfe der CD-Spektroskopie. Hierzu wurde die Veränderung des Sekundärstrukturgehaltes mit Hilfe von Elliptizitätsmessungen im Fern-UV-Bereich bei 212 bzw. 213 nm untersucht (vgl. Abschnitt 2.6.2). Durch kontrolliertes kontinuierliches Erhitzen der Proteine und gleichzeitiges Messen des CD-Signales wurden Denaturierungskurven erhalten, die schließlich nach der Methode von Cohen & Pielak (1994) ausgewertet wurden. Dabei wird ein Zwei-Zustand-Modell des Überganges vom nativen zum denaturierten Protein zugrundegelegt (Lumry *et al.*, 1966).

Eine typische Übergangskurve zeigt Abbildung 32A für die Messung der thermischen Denaturierung des Bilin-Bindungsproteins. Die Rohdaten der Elliptizitätsmessungen wurden hierfür in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Die Elliptizität der Proteinprobe wurde zunächst linear mit steigender Temperatur positiver. Bei ca. 52 °C (325 K) nahm das CD-Signal sprunghaft zu und blieb ab ca. 77 °C (350 K) nahezu konstant. Das BBP zeigte somit – wie auch seine Varianten DigA, DigA16 und DigA16/19 – einen offenbar einstufigen Übergang mit einem stark kooperativen Denaturierungsverhalten. Zusätzlich war eine lineare Abhängigkeit des gemessenen CD-Signals vor bzw. nach der Transition gegeben.

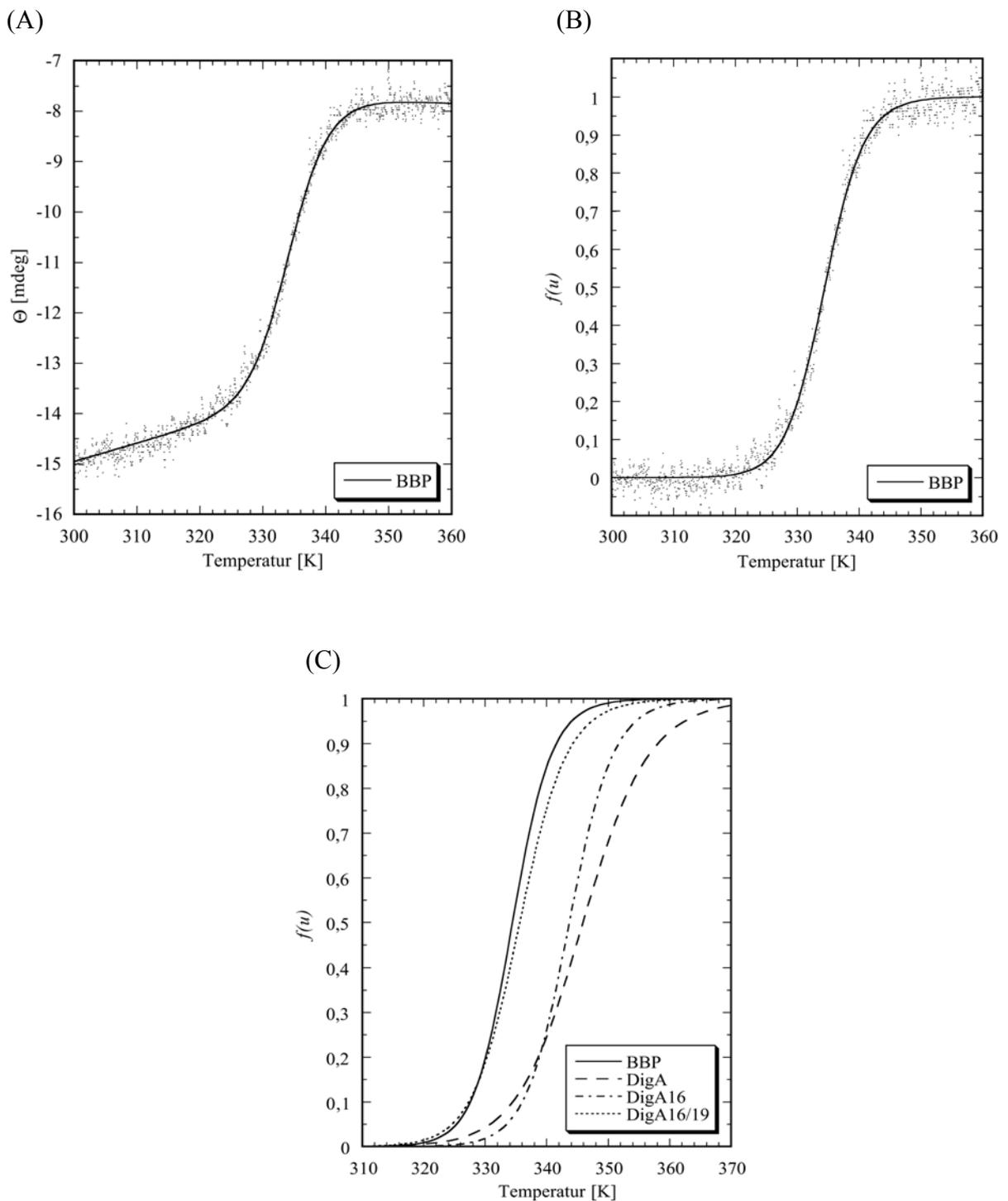


Abbildung 32: Vergleich der Ergebnisse aus den thermischen Denaturierungsstudien mit BBP und seinen Varianten DigA, DigA16 sowie DigA16/19. Die gereinigten Varianten (100 bis 350 $\mu\text{g/ml}$) in 20 mM Natriumphosphat pH 7,5 wurden in einem Jasco J-810 Spektropolarimeter kontrolliert erhitzt und die Elliptizität von BBP, DigA16 und DigA16/19 bei 212 nm sowie von DigA bei 213 nm in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet. (A) Ergebnis eines typischen Denaturierungsexperimentes mit rekombinantem BBP. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurve entsprechend eines Zwei-Zustand-Modells gemäß Gleichung (30) angepaßt. (B) Mit Hilfe der so ermittelten Parameter wurde gemäß Gleichung (25) der apparente Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ für BBP bestimmt. (C) Überlagerung der normierten Entfaltungskurven für die untersuchten Protein-Varianten.

Die Denaturierungskurven wurden gemäß dem Formalismus in Abschnitt 2.6.2 angepaßt und auf diese Weise die Übergangstemperatur und die freie Enthalpie der Denaturierung, extrapoliert auf Standardbedingungen, für die einzelnen BBP-Varianten bestimmt (Tabelle 9). Zusätzlich wurde aus den ermittelten Parametern der Anteil des denaturierten Proteins ($f(u)$) in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt, um die Denaturierungskurven der einzelnen Proteine unter normierten Bedingungen miteinander vergleichen zu können (Abbildung 32B und 32C).

Das BBP zeigte im thermischen Denaturierungsexperiment eine Schmelztemperatur (T_m) von 61,3 °C. Die freie Enthalpie der Entfaltungsreaktion $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ wurde für das BBP zu 31,7 kJ mol⁻¹ bestimmt. Die Mutante DigA zeigte demgegenüber einen deutlich höheren Schmelzpunkt von 72,8 °C. Aufgrund der verminderten Kooperativität des Entfaltungsüberganges, die sich in der Enthalpie des Denaturierungsüberganges ΔH_m ausdrückt, betrug die freie Denaturierungsenthalpie jedoch lediglich 25,0 kJ mol⁻¹. Die Denaturierung von DigA16 wies mit einem T_m von 70,6 °C einen vergleichbaren ΔH_m -Wert wie das BBP auf und besaß demzufolge eine freie Entfaltungsenthalpie von 36,3 kJ mol⁻¹. DigA16/19 schließlich zeigte mit einer Übergangstemperatur von 62,5 °C eine Denaturierungs-Enthalpie, die zwischen der des BBP und der Variante DigA lag. Die freie Entfaltungsenthalpie wurde in diesem Fall zu 26,8 kJ mol⁻¹ bestimmt (Tabelle 9).

BBP-Variante	ΔH_m [kJ mol ⁻¹]	T_m [°C]	$\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ [kJ mol ⁻¹]
BBP	291,9 ± 4,8	61,31 ± 0,03	31,7 ± 0,5
DigA	181,2 ± 13,4	72,78 ± 0,09	25,0 ± 1,9
DigA16	273,8 ± 17,3	70,56 ± 0,06	36,3 ± 2,3
DigA16/19	240,0 ± 8,4	62,47 ± 0,06	26,8 ± 0,9

Tabelle 9: Ergebnisse der thermischen Denaturierungsstudien für BBP und seine Varianten DigA, DigA16 sowie DigA16/19. Die Entfaltungsübergänge für die einzelnen Proteine wurden im Spektropolarimeter gemessen (siehe Abbildung 32) und die Rohdaten nach Gleichung (30) durch nicht-lineare Regression angepaßt (Abschnitt 2.6.2). Angegeben sind die Werte für die Enthalpie des Entfaltungsüberganges ΔH_m , die Übergangstemperaturen (T_m) und die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen ($\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$).

Durch langsames Abkühlen der denaturierten Proteinproben und Bestimmung der temperaturabhängigen Elliptizität wurde untersucht, inwieweit es sich bei der Entfaltung um einen reversiblen Prozeß handelte. Dabei wurde bei allen Varianten ein Renaturierungsübergang beobachtet, der im wesentlichen (± 2 °C) die gleiche Übergangstemperatur wie die Denaturierung besaß. Allerdings zeigte sich, daß die Elliptizität bei Erreichen der Anfangstemperatur nicht

mehr vollständig auf den Ausgangswert zurückging sondern – z. B. für das BBP – einen um ca. 10 % erhöhten Wert aufwies. Ein kleiner Anteil des Proteins wurde daher vermutlich irreversibel denaturiert und konnte durch langsames Abkühlen seinen nativen Zustand nicht wieder erlangen. Dieser Anteil erhöhte sich bei Verlängerung der Inkubationszeit oberhalb der Denaturierungstemperatur und war höchstwahrscheinlich auf eine Aggregatbildung zwischen den entfaltenen Proteinmolekülen oder Adsorption an die Küvettenwand zurückzuführen.

Die durchgeführten Stabilitätsmessungen ergaben, daß die Variante DigA16 eine um etwa 5 kJ mol^{-1} höhere extrapolierte Stabilität als das BBP aufwies, wohingegen sowohl DigA als auch DigA16/19 eine um 7 bzw. 5 kJ mol^{-1} geringere Denaturierungsenthalpie besaßen. Die gemessenen Schmelztemperaturen lagen dagegen bei allen drei Varianten über der des Bilin-Bindungsproteins, im Fall von DigA und DigA16 sogar um ca. $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

Der exzessive Aminosäure-Austausch in den BBP-Varianten hatte somit – abhängig von der physikochemischen Methode der Denaturierung – in zwei Fällen zu einer schwachen Destabilisierung und in einem Fall sogar zu einer leichten Stabilisierung der Proteinfaltung geführt. Die β -Barrel-Gerüststruktur tolerierte somit die eingeführten Mutationen ohne generelle signifikante Einbußen bezüglich der Proteinstabilität.

3.5.3 Stabilität der BBP-Varianten gegenüber chemischer Denaturierung

Zusätzlich zur Bestimmung der Faltungsstabilität durch thermische Denaturierungsstudien wurde die thermodynamische Stabilität von BBP und seinen Varianten DigA und DigA16 durch Denaturierung mit Guanidiniumchlorid (GdnHCl) untersucht (vgl. Abschnitt 2.6.3). Hierzu wurde die Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an GdnHCl gemessen und die erhaltenen Entfaltungskurven nach der Methode von Pace (1986) ausgewertet (Abbildung 33). Die Ergebnisse der Anpassung sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Die Denaturierungskurven aller BBP-Varianten zeigten jeweils einen einstufigen und gleichzeitig vollständig reversiblen Übergang, der sowohl für DigA als auch für DigA16 zu etwas höheren GdnHCl-Konzentrationen verschoben war. Die Kooperativität des Entfaltungsüberganges war für DigA ca. doppelt so hoch und für DigA16 etwa genauso wie für das Wildtyp-BBP. Sowohl DigA als auch DigA16 zeigten dementsprechend mit $18,6 \text{ kJ/mol}^{-1}$ bzw. $11,5 \text{ kJ/mol}^{-1}$ eine erhöhte Faltungsstabilität gegenüber chemischer Denaturierung im Vergleich zum BBP, welches eine Entfaltungsenthalpie von $8,3 \text{ kJ/mol}^{-1}$ aufwies.

Die Ergebnisse bezüglich der Entfaltungsstabilität der Variante DigA stehen somit nicht im Einklang mit den Daten der thermischen Denaturierungsversuche, bei denen für DigA im Vergleich zum BBP eine verringerte Stabilität beobachtet wurde. Dies könnte allerdings auf die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Bedingungen zurückzuführen sein, die zur

Denaturierung der Proteine verwendet wurden und unterstreicht die prinzipiellen Unsicherheiten, die mit der Extrapolation der unter Entfaltungsbedingungen gemessenen Denaturierungsenthalpie auf die biochemischen Standardbedingungen verbunden sind. Insgesamt bestätigen jedoch die Ergebnisse der chemischen Denaturierung, daß die Aminosäure-Austausche in den BBP-Varianten nicht mit einer Destabilisierung der β -Barrel-Gerüststruktur einhergehen.

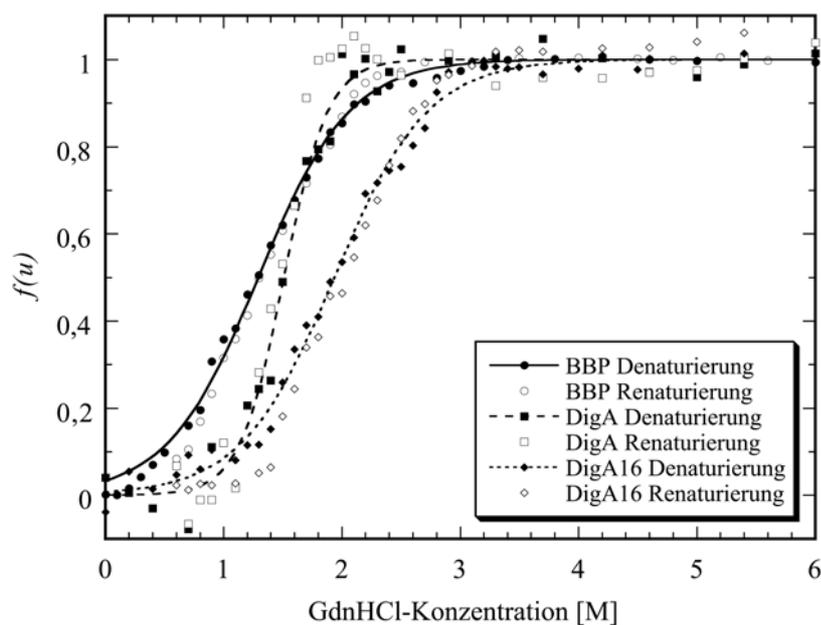


Abbildung 33: Messung der Faltungsstabilität von BBP und seinen Varianten DigA und DigA16 durch reversible Entfaltung in GdnHCl bei 22 °C. Die Fluoreszenzänderung der einzelnen in *E. coli* produzierten und mittels *Strep*-tag II gereinigten Varianten wurde nach Normierung auf den Anteil ungefalteten Proteins jeweils gegen die Konzentration an GdnHCl aufgetragen und gemäß Gleichung (34) angepaßt. Gezeigt sind jeweils sowohl die Denaturierung (mit Kurvenanpassung) als auch die Renaturierung (Abschnitt 2.6.3).

BBP-Variante	m [kJ/mol ⁻¹ M ⁻¹]	$[D]_{1/2}$ [M]	$\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O}$ [kJ/mol ⁻¹]
BBP	$6,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,04$	$8,3 \pm 0,2$
DigA	$13,2 \pm 1,1$	$1,4 \pm 0,11$	$18,6 \pm 1,6$
DigA16	$6,2 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,05$	$11,5 \pm 0,4$

Tabelle 10: Ergebnisse der chemischen Denaturierungsstudien für BBP und seine Varianten DigA und DigA16. Angegeben sind die durch Anpassung der Denaturierungskurven in Abbildung 33 gemäß Gleichung (35) ermittelten Werte für die Kooperativität des Entfaltungsüberganges m , die Konzentration, bei der 50 % des Proteins ungefaltet vorliegen $[D]_{1/2}$, sowie die extrapolierte thermodynamische Entfaltungsenthalpie $\Delta G_{N \rightarrow D}^{H_2O}$.

3.6 „Duocaline“: Konstruktion bispezifischer Lipocalin-Varianten

Mit den BBP-Varianten DigA16 und DigA16/19 waren durch Kombination von *Phage Display* mit einem Kolonie-Filterstapel-Test und einer Randomisierungsstrategie zwei neuartige Proteine generiert worden, die als molekulare Werkzeuge zur hochaffinen und selektiven Bindung der Digoxigenin-Gruppe dienen konnten. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich diese Fähigkeit zur molekularen Erkennung eines Liganden auf Fusionsproteine aus zwei Lipocalin-Varianten mit unterschiedlichen Liganden-Spezifitäten übertragen ließe. Diese bispezifischen Anticaline werden hier als „Duocaline“ bezeichnet. Als Anticalin mit einer zweiten Spezifität diente dabei das aus früheren Arbeiten von Beste (1998) in derselben Forschungsgruppe stammende FluA. Dieses war ebenfalls durch Einsatz der *Phage Display*-Technik ausgehend von Bibliothek Nr. 1 selektiert worden, aus der auch die BBP-Variante DigA stammte. FluA wurde ausgewählt, da es neben seiner hohen Fluorescein-Affinität von $35,2 \pm 3,2$ nM die interessante Eigenschaft besaß, die Eigenfluoreszenz dieses Liganden im Komplex praktisch vollständig zu löschen.

3.6.1 Konstruktion des Vektors pBBP31 zur Fusion von DigA16 bzw. DigA16/19 mit der Fluorescein bindenden BBP-Variante FluA

Als Grundlage zur Konstruktion des Duocalin-Expressionsphasmides pBBP31 diente die kodierende Sequenz für DigA16, die auf dem Vektor pBBP21 subkloniert war. Mit Hilfe des Oligodesoxynukleotides STS9 wurde durch ortsgerichtete Mutagenese vor dem letzten Kodon der OmpA-Signalsequenz, die dem Lipocalin vorangestellt war, eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Eco47III* eingeführt. Nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *Eco47III* wurde das 4387 bp große Vektorfragment mit der kodierenden Sequenz für DigA16 isoliert. Parallel wurden in die kodierende Sequenz von FluA auf dem Vektor pBBP21 mit Hilfe des Oligodesoxynukleotides STS11 nach dem ersten Kodon des C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels drei Glycin-Kodons sowie ebenfalls eine *Eco47III*-Erkennungssequenz eingeführt. Anschließend wurde das Phasmid mit *XbaI* und *Eco47III* geschnitten und das 617 bp große DNA-Fragment mit dem Genabschnitt für FluA isoliert. Durch Ligierung der beiden erhaltenen DNA-Fragmente wurde der Vektor pBBP31 gewonnen, dessen korrekte Basenabfolge im Bereich der Strukturgene der Anticaline durch Sequenzierung bestätigt wurde.

Das Phasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, dem Anticalin FluA, einer *Linker*-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren Gly-Gly-Gly-Ser-Ala gefolgt von DigA16 mit dem C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel. Zusätzlich kodiert es für die Protein-Disulfidisomerase *DsbC* auf einem zweiten Cistron (Abbildung 34). Das Phasmid pBBP31-DigA16/19, welches für das entsprechende Fusionsprotein aus FluA und der BBP-

Variante DigA16/19 kodiert, wurde ausgehend von der auf pBBP21 klonierten Gensequenz des DigA16/19 in analoger Weise konstruiert.

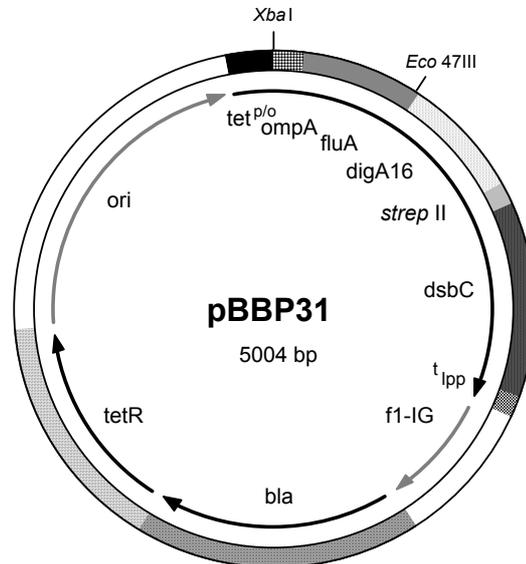


Abbildung 34: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pBBP31. Das Plasmid kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem Anticalin FluA, einem Peptid-*Linker* aus den Aminosäuren Gly-Gly-Gly-Ser-Ala, dem Anticalin DigA16 und dem C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhänger. Der Vektor trägt zusätzlich die Gensequenz der *E. coli*-eigenen Protein-Disulfidisomerase *DsbC* auf einem zweiten Cistron zur gemeinsamen Überexpression (vgl. Abbildung 14). *XbaI* und *Eco47III* bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonucleasen, die Abkürzungen sind der Legende zu Abbildung 6 zu entnehmen.

Die Vektoren pBBP31 und pBBP31-DigA16/19 wurden zur Transformation kompetenter *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt, die Fusionsproteine im präparativen Maßstab produziert und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie entsprechend gereinigt. Die Ausbeuten der Proteine wurden mit einer optischen Dichte der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von ca. $OD_{550} = 1,1$ zu ca. 80 $\mu\text{g/l}$ Kulturvolumen für FluA-DigA16 und ca. 50 $\mu\text{g/l}$ für FluA-DigA16/19 bestimmt. Die gereinigten Fusionsproteine wurden anschließend einer Analyse durch SDS-PAGE unterzogen (Abbildung 35).

Bei der Auftrennung der rekombinanten Proteine unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich, daß sie frei von jeglichen nachweisbaren Verunreinigungen waren. Allerdings wiesen die Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel kein einheitliches Laufverhalten, sondern mehrere diffuse Banden auf. Offensichtlich war es bei der Produktion der aus zwei Anticalinen mit jeweils zwei Disulfidbindungen zusammengesetzten Fusionsproteine trotz der Überexpression des *DsbC*-Enzyms zur Ausbildung mehrerer Disulfidisomere gekommen.

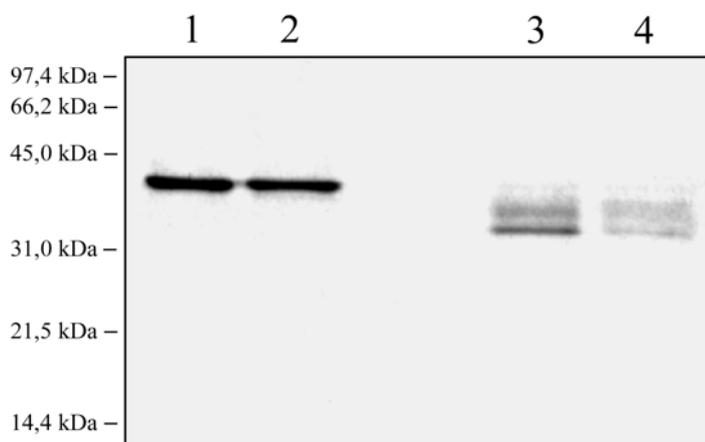


Abbildung 35: SDS-PAGE-Analyse der Fusionsproteine FluA-DigA16 sowie FluA-DigA16/19. Die Proteinproben der Spuren 1 und 2 wurden vor der Auftrennung durch Behandlung mit Mercaptoethanol reduziert, die Proben der Spuren 3 und 4 wurden nicht reduzierend behandelt. FluA-DigA16 (Spuren 1 und 3) und FluA-DigA16/19 (Spuren 2 und 4) wurden in *E. coli* produziert, durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt und gegen PBS/E dialysiert. Jeweils ca. 2 µg der Proteine wurden auf das Gel aufgetragen und die Proteinbanden schließlich mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt.

3.6.2 Nachweis des bispezifischen Bindungsverhaltens im ELISA

Um zu analysieren, ob die Fusionsproteine aus den Anticalinen FluA und DigA16 bzw. DigA16/19 tatsächlich über Bindungsaktivität für beide Liganden – Fluorescein und Digoxigenin – verfügen, wurden sie in einem ELISA-Experiment eingesetzt. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte zunächst mit einem Konjugat von Digoxigenin und RNase A als Trägerprotein beschichtet. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von FluA-DigA16 bzw. FluA-DigA16/19 zupipettiert. Die durch Komplexbildung mit Digoxigenin auf der Oberfläche der Mikrotiterplatte immobilisierten Fusionsproteine wurden anschließend anhand ihrer Fluorescein-Bindungsfunktion mit einem Konjugat aus Fluorescein und Alkalischer Phosphatase als Reporterenzym detektiert (Abbildung 36).

Bei Verwendung des bispezifischen Fusionsproteins FluA-DigA16 konnte ein konzentrationsabhängiges Bindungssignal beobachtet werden. Der Einsatz des Fusionsproteins bestehend aus FluA und DigA16/19 führte demgegenüber sogar zu deutlich höheren Signalintensitäten, während das als Kontrolle zur Beschichtung der Matrix eingesetzte BSA mit diesem Duocalin keinerlei Wechselwirkung zeigte. Durch dieses Experiment konnte somit nachgewiesen werden, daß die beiden Fusionsproteine FluA-DigA16 und FluA-DigA16/19 funktionell bispezifisch in Bezug auf die Ligandenbindung sind, so daß hiermit die neu gewählte Bezeichnung „Duocaline“ für diese Proteinklasse gerechtfertigt ist.

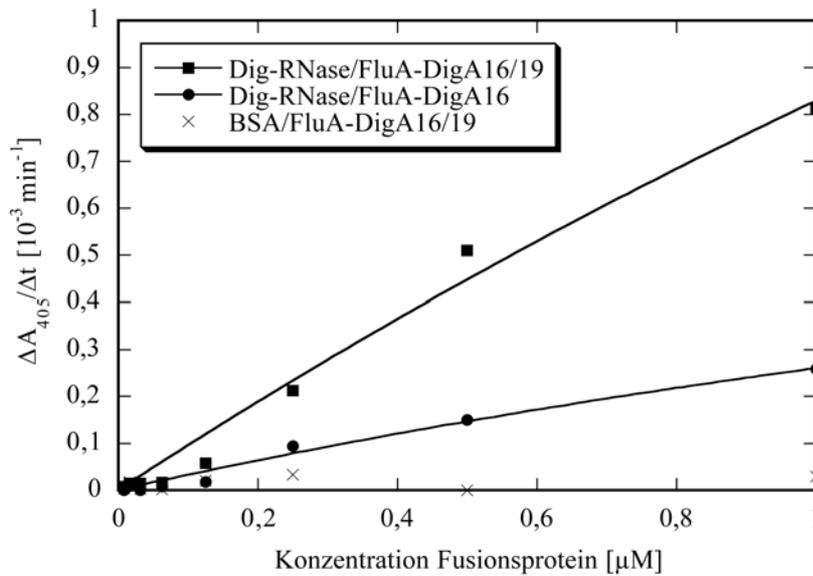


Abbildung 36: ELISA-Experiment zur Untersuchung der doppelten Liganden-Spezifität der Fusionsproteine FluA-DigA16 und FluA-DigA16/19. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit Digoxigenin-RNase A-Konjugat bzw., zur Kontrolle, mit BSA beschichtet. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der bispezifischen Fusionsproteine appliziert. Zum Nachweis des an die Digoxigenin-Gruppen funktionell gebundenen Fusionsproteins wurde schließlich Fluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugat zugegeben. Die Aktivität des Reporterenzyms wurde anhand der chromogenen Reaktion mit p-Nitrophenylphosphat gemessen und gegen die Konzentration des eingesetzten bispezifischen Fusionsproteins aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte nach Gleichung (7).

3.6.3 Untersuchung der zweifachen Liganden-Bindungseigenschaft mittels Fluoreszenztitration

Neben dem Nachweis der Bispezifität im ELISA wurden die Fusionsproteine FluA-DigA16 und FluA-DigA16/19 zur Analyse ihrer doppelten Liganden-Bindungseigenschaft in Fluoreszenztitrations-Experimenten eingesetzt. Hierzu wurden die Duocaline zunächst bis zur Sättigung mit einer Digoxigenin-Lösung titriert und die Änderung der Proteinfluoreszenz verfolgt. Anschließend wurde mit Fluorescein weitertitriert und dabei wiederum die Fluoreszenzänderung gemessen. Abbildung 37 zeigt ein typisches Ergebnis eines solchen Experimentes.

Bei Zugabe von Digoxigenin zu einer 1 μM Lösung von FluA-DigA16 wie auch von FluA-DigA16/19 konnte eine Abnahme der Proteinfluoreszenz bis zu einer Digoxigenin-Konzentration von ca. 0,5 μM auf ca. 90 % des ursprünglichen Wertes beobachtet werden. Eine weitere Zugabe des Liganden führte zu keinem weiteren *Quenching*-Effekt mehr. Nachdem jedoch Fluorescein zur Proteinlösung gegeben wurde, konnte eine erneute starke Abnahme der Proteinfluoreszenz auf ca. 53 % des Wertes ohne Liganden beobachtet werden, die bei Fluorescein-Konzentrationen ab ca. 3 μM abermals Sättigung zeigte.

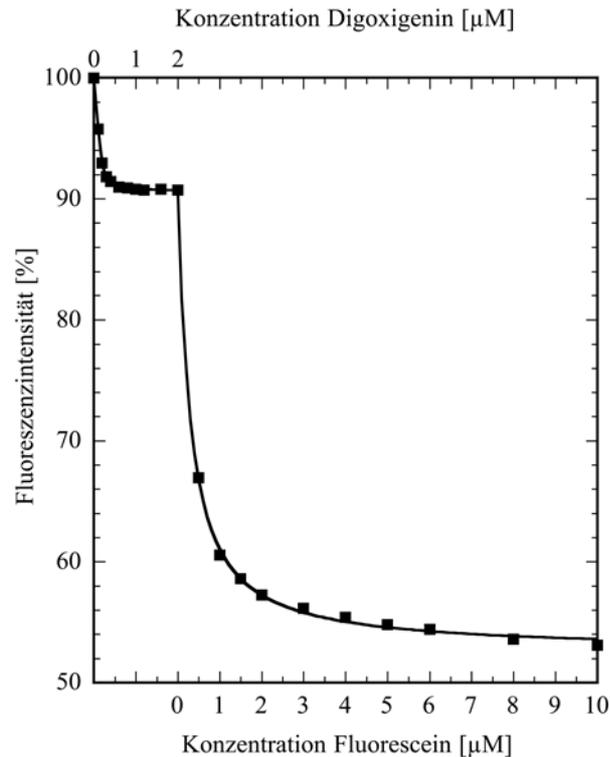


Abbildung 37: Fluoreszenztitrationskurve des Duocalins FluA-DigA16 mit Digoxigenin und Fluorescein. Eine 1 µM Lösung des Proteins in PBS/E wurde bis zur Sättigung mit einer 0,2 mM Lösung von Digoxigenin in DMF titriert und die Abnahme der bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregten Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration bei 345 nm gemessen. Anschließend wurde dieselbe Lösung mit einer 1 mM Fluorescein-Lösung in PBS erneut bis zur Sättigung titriert. Die Anpassung der normierten Titrationskurve erfolgte getrennt für die aufeinanderfolgenden Titrationsexperimente durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (21).

Geht man davon aus, daß z. B. im Fall des Fusionsproteins bestehend aus den Anticalinen DigA16 und FluA näherungsweise jeweils die Hälfte der beobachteten Proteinfluoreszenz auf die einzelnen BBP-Varianten entfällt, so konnte die Fluoreszenz des DigA16 durch Zugabe von Digoxigenin bis zur Sättigung um ca. 20 % *gequencht* werden. Bezogen auf den maximalen *Quenching*-Effekt von 52,6 %, der bei Titration des Anticalins DigA16 mit Digoxigenin und einer apparenten Proteinkonzentration von 61 % beobachtet wurde (Abschnitt 3.3.6), sind daher vermutlich ca. 25 % des eingesetzten Fusionsproteins in Bezug auf die Digoxigenin-Komplexierung bindungsaktiv. Diese Einschätzung steht im Einklang mit der beobachteten Sättigungskonzentration für Digoxigenin, die im Vergleich zum Titrationsexperiment mit rekombinantem DigA16 mit 0,5 µM im Vergleich zu ca. 1,2 µM ebenfalls niedriger ist. Bezogen auf die anteilige Proteinfluoreszenz des Fusionsproteins, die auf das Anticalin FluA entfällt, wurde durch Fluorescein-Zugabe bis zur Sättigung eine Fluoreszenz-Löschung von ca. 75 % beobachtet. Gemessen am maximalen *Quenching*-Effekt von 93,1 %, der bei Titration von rekombinantem FluA mit Fluorescein gemessen werden konnte (Beste, 1998), sind vermutlich mehr als 80 % des eingesetzten Fusionsproteins an der Komplexierung

von Fluorescein beteiligt. Auch diese Abschätzung korreliert gut mit der beobachteten Sättigungs-Konzentration für Fluorescein im Titrationsexperiment mit rekombinantem FluA von ca. 4 μM (Beste *et al.*, 1999). Die im Vergleich zur Bildung des DigA16/Digoxigenin-Komplexes beobachtete stärkere Fluoreszenz-Löschung bei der Bildung des Komplexes aus FluA und Fluorescein kann mit einem Resonanzenergie-Transfer erklärt werden, der aufgrund der Absorption des Fluorescein-Chromophors bei Wellenlängen unterhalb von 330 nm auftritt (Voss, 1984).

Durch Anpassung der Titrationskurve gemäß Gleichung (21) konnte für das Fusionsprotein aus DigA16 und FluA eine K_D von $15,5 \pm 2,7$ nM für die Komplexbildung von Digoxigenin bzw. 273 ± 25 nM für die Komplexbildung des Fluoresceins gemessen werden. Diese waren vergleichbar mit den gemessenen Dissoziationskonstanten der entsprechenden monomeren Anticaline von $30,2 \pm 3,6$ nM bzw. 152 ± 24 nM (Abschnitt 3.3.6 bzw. Beste *et al.*, 1999). Die beobachteten Abweichungen in den gemessenen Affinitäten sind dabei vermutlich auf die geringeren *Quenching*-Effekte für die einzelnen Anticaline im Fusionsprotein und eine damit verbundene weniger genaue Anpassung der Meßwerte zurückzuführen.

Die Titrationsexperimente zeigten, daß die eingesetzten Fusionsproteine sowohl Digoxigenin als auch Fluorescein als Liganden binden können.

3.7 Konstruktion von bifunktionellen Fusionsproteinen aus den Digoxigenin bindenden BBP-Varianten und der Alkalischen Phosphatase

In einem zur Generierung der Duocaline (Abschnitt 3.6) vergleichbaren Ansatz sollten weiterführende Experimente zeigen, inwieweit sich die BBP-Varianten DigA16 und DigA16/19 zur Produktion eines Nachweisreagenzes für die Digoxigenin-Gruppe eignen. Zu diesem Zweck wurden die Vektoren pBBP27 und pBBP29 konstruiert, die für zwei Fusionsproteine mit der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA), einmal am N- und einmal am C-Terminus des Anticalins, kodierten.

3.7.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pBBP27 und pBBP29

Zur Konstruktion des Phasmidvektors pBBP27 (Abbildung 38) wurde ausgehend von dem Phasmid pASK75-phoA-strepII (Voss & Skerra, 1997) durch Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Eco*47III ein 1443 bp großes Gensegment isoliert. Dieses kodiert für die PhoA zusammen mit deren Signalsequenz und wurde mit dem bereits in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen, 4387 bp großen Vektorfragment mit der kodierenden Sequenz für DigA16 ligiert. Das erhaltene Phasmid kodiert somit für ein Fusionsprotein aus PhoA mit ihrem Präpeptid, einem Peptid-*Linker* aus vier Aminosäuren (Pro-Pro-Ser-Ala) und dem murenen DigA16, gefolgt vom

Strep-tag II-Affinitätsanhängsel. Zusätzlich ist das *DsbC*-Strukturgen auf einem zweiten Cistron vorhanden (vgl. Abschnitt 3.6.1).

Der Vektor pBBP29 (Abbildung 38) wurde ebenfalls unter Verwendung des auf dem Expressionsplasmid pBBP21 klonierten Strukturgens von DigA16 konstruiert. Nach Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Bst*BI wurde ein 628 bp großes Fragment, kodierend für die OmpA-Signalsequenz, DigA16 sowie einen Teil des *Strep*-tag II, isoliert. Parallel dazu wurde durch Hydrolyse des Vektors pASK83, der unter der Kontrolle des *lac*-Promotors für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, dem Protease-Inhibitor Cystatin, dem *Strep*-tag II und der PhoA kodiert, mit *Bst*BI und *Hind*III ein 1371 bp Fragment gewonnen. Dieses umfaßte die Gensequenz für den C-terminalen Teil des *Strep*-tag II sowie die Alkalische Phosphatase. Die Gensegmente wurde schließlich mit einem 3827 bp großen Vektorfragment, beginnend mit dem *DsbC*-Strukturgen bis hin zum Tetracyclin-Promotor/Operator ligiert, das nach Verdau von pBBP27 mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III erhalten worden war. Das resultierende Plasmid pBBP29 kodiert für ein Fusionsprotein aus dem Anticalin DigA16 mit N-terminaler OmpA-Signalsequenz, dem *Strep*-tag II gefolgt von fünf Glycin-Resten und dem murenen Teil der PhoA ohne ihren N-terminalen Arginin-Rest.

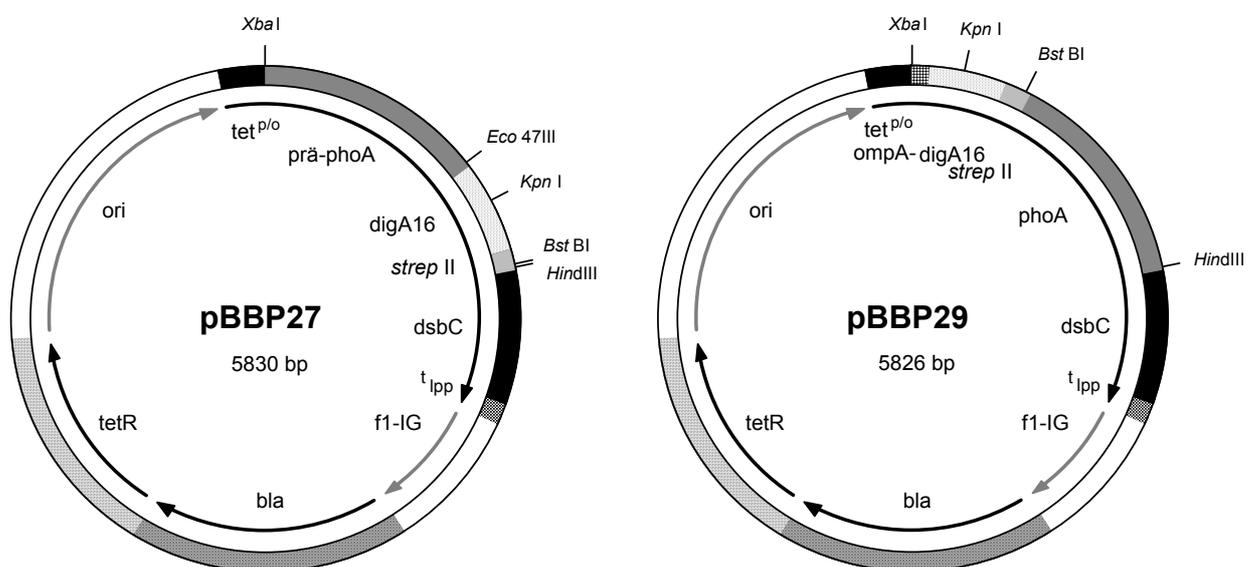


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Vektoren pBBP27 und pBBP29. Das Plasmid pBBP27 kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet*^{p/o}) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) mit ihrer Signalsequenz, einem Pro-Pro-Ser-Ala-Peptid-Linker, dem Anticalin DigA16 und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel. Zusätzlich ist das *DsbC*-Strukturgen auf einem zweiten Cistron vorhanden. Das Plasmid pBBP29 kodiert für eine Proteinfusion aus DigA16 mit der N-terminalen OmpA-Signalsequenz, dem *Strep*-tag II, einem Peptid-Linker aus fünf Glycin-Resten und dem murenen Teil der PhoA ohne ihren N-terminalen Arginin-Rest. *Bst*BI, *Eco*47III, *Hind*III, *Kpn*I, und *Xba*I bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Alle übrigen Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 6.

Da das Strukturgen der Alkalischen Phosphatase eine interne *Bst*XI-Erkennungssequenz besitzt, konnte die kodierende Region für das Anticalin DigA16/19 nicht einfach in Form der von zwei *Bst*XI-Schnittstellen flankierten Genkassette auf den Vektoren pBBP27 und pBBP29 gegen die von DigA16 ausgetauscht werden. Die Sequenzen von DigA16 und DigA16/19 unterscheiden sich jedoch, abgesehen von einer stillen Mutation an Basenposition 369, lediglich innerhalb der zweiten Hälfte des Strukturgens. Durch Restriktionsverdau des auf dem Phasmid pBBP21 klonierten DigA16/19 mit den Endonukleasen *Kpn*I und *Bst*BI wurde daher der entsprechende 330 bp umfassende Genabschnitt isoliert. Dieser wurde schließlich mit den 5500 bp bzw. 5496 bp großen Vektorfragmenten der analog geschnittenen Phasmide pBBP27 und pBBP29 ligiert. Auf diese Weise wurden die Phasmide pBBP27-DigA16/19 bzw. pBBP29-DigA16/19 erhalten.

3.7.2 Produktion der Fusionsproteine in *E. coli*

Die rekombinanten Genprodukte der vier Expressionsphasamide pBBP27, pBBP27-DigA16/19, pBBP29 und pBBP29-DigA16/19 wurden in *E. coli* JM83 produziert (Abschnitt 2.4). Bei der Präparation des periplasmatischen Proteinextraktes wurde zur Destabilisierung der äußeren *E. coli*-Membran in diesen Fällen Polymyxin B sulfat anstelle von EDTA eingesetzt, um die katalytische Aktivität der PhoA als Metalloenzym nicht zu beeinträchtigen (Dixon & Chopra, 1986). Die Ausbeuten der gegen PBS dialysierten Fusionsproteine betragen typischerweise 0,1 mg/l Kulturvolumen bei einer Zelldichte der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von $OD_{550} = 1,1$. Zur Analyse wurden die gereinigten Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 39).

Alle Fusionsproteine zeigten eine einheitliche Bande mit der erwarteten Größe von ca. 68 kDa. Zusätzlich war jeweils eine Kontamination mit kleineren Proteinen zu beobachten. Solche Verunreinigungen waren auch bei der gentechnischen Produktion von Fusionsproteinen aus der PhoA und Antikörperfragmenten beobachtet worden (Suzuki *et al.*, 1999) und resultierten vermutlich als Folge eines proteolytischen Abbaus durch Metalloproteasen, die in Abwesenheit von EDTA nicht inaktiviert waren. Für eine Proteolyse auch im Falle der Fusionsproteine aus Anticalin und PhoA sprach die Tatsache, daß der Anteil kontaminierender Protein-Banden – je nach Präparation – variierte. Bei einer SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten keine Hinweise entnommen werden, daß es bei einem der untersuchten Fusionsproteine zur Ausbildung von Disulfidisomeren kommt (Daten nicht gezeigt).

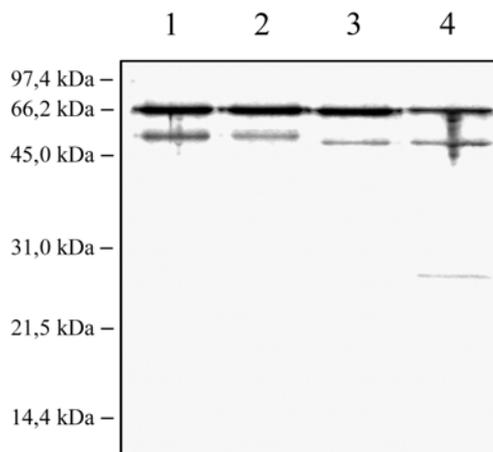


Abbildung 39: SDS-PAGE der Fusionsproteine PhoA-DigA16, PhoA-DigA16/19, DigA16-PhoA und DigA16/19-PhoA unter reduzierenden Bedingungen. Alle Proteine wurden in *E. coli* JM83 in einem Kulturvolumen von 2 l bei 22 °C für 3 h produziert. Nach Freisetzung der Fusionsproteine aus dem bakteriellen Periplasma wurden sie durch Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und gegen PBS dialysiert. Jeweils ca. 1,5 µg jeden Fusionsproteins wurden auf das Gel aufgetragen. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.

3.7.3 Einsatz der Fusionsproteine zum direkten Nachweis von Digoxigenin-Gruppen im *Western Blot*

Eine Zielsetzung dieser Arbeiten war die Generierung eines immunchemischen Nachweisreagenzes zur Anwendung in medizinisch-diagnostischen oder biochemisch-analytischen Fragestellungen. Daher sollte die Eignung der konstruierten Fusionsproteine zur Detektion der Digoxigenin-Gruppe in der Art eines immunchemischen Verfahrens überprüft werden.

Die gereinigten Fusionsproteine PhoA-DigA16 und DigA16-PhoA wurden daher in einem *Western Blot*-Experiment eingesetzt. Hierzu wurde ein Proteingemisch aus verschiedenen mit Digoxigenin markierten Trägerproteinen, BSA, Ovalbumin sowie RNase A, auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Als Kontrollexperiment wurde ein Gemisch der nicht-derivatisierten Trägerproteine in separater Spur mitgeführt. Einzelne Streifen der Membran mit jeweils denselben Proben wurden anschließend mit PhoA-DigA16 oder DigA16-PhoA inkubiert und gewaschen. Das an die Digoxigenin-Gruppen gebundene Fusionsprotein wurde schließlich über seine katalytische Aktivität, vermittelt durch die Alkalische Phosphatase, unter Zugabe üblicher chromogener Reagenzien sichtbar gemacht (Abbildung 40).

Das Experiment ergab, daß alle drei Proteinkonjugate mit vergleichbarer Intensität angefärbt wurden. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Reaktivität der eingesetzten unterschiedlichen Fusionsproteine PhoA-DigA16 und DigA16-PhoA beobachtet werden. Die underivatisierten Trägerproteine dagegen wurden durch keines der beiden eingesetzten Fusionsproteine angefärbt.

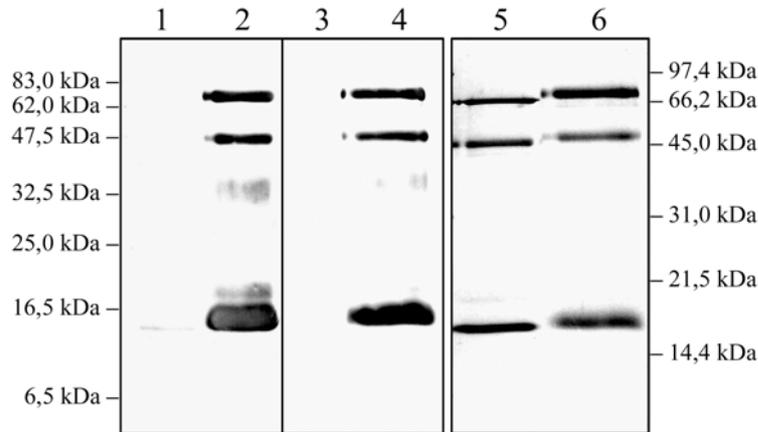


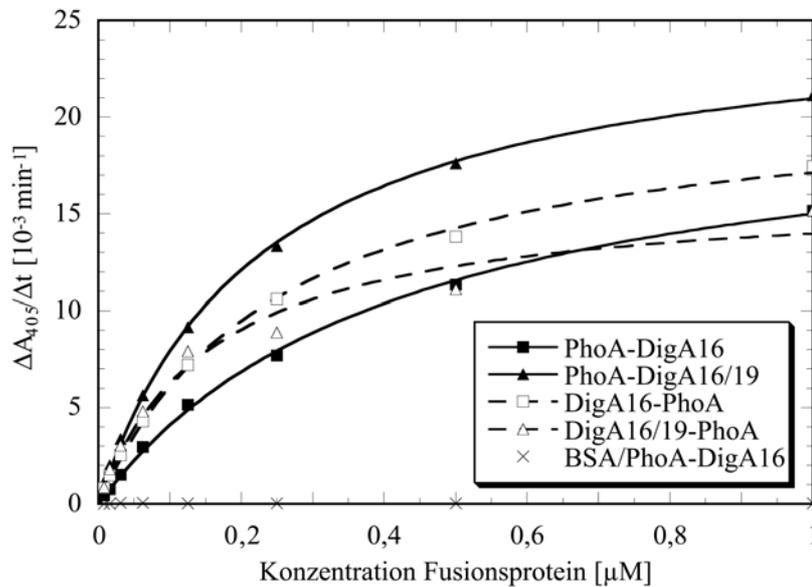
Abbildung 40: Nachweis der Digoxigenin-Gruppe mit Hilfe von Fusionsproteinen aus Anticalinen und PhoA im *Western Blot*. Ein Gemisch von Digoxigenin-markiertem BSA, Ovalbumin und markierter RNase A wurde auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Spuren 2, 4 und 6). Zur Kontrolle wurden außerdem die nicht-derivatisierten Trägerproteine BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und RNase A (13,7 kDa) aufgetragen (Spuren 1, 3 und 5). Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese in zwei Streifen geschnitten (linker Teil der Abbildung, Spuren 1/2 bzw. 3/4). Einer der Streifen (Spuren 1 und 2) wurde mit einer 0,5 μ M Lösung von PhoA-DigA16 in PBS inkubiert. Der andere Membranstreifen (Spuren 3 und 4) wurde mit einer 0,5 μ M Lösung von DigA16-PhoA (ebenfalls in PBS) behandelt. Nach Waschen der Membranstreifen mit Puffer wurde gebundenes Fusionsprotein, mittels seiner katalytischen Aktivität durch Zugabe von NBT und BCIP angefärbt (Abschnitt 2.5.8). Zum Vergleich ist im rechten Teil der Abbildung ein Stück eines entsprechenden SDS-Polyacrylamidgels, das mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt wurde, abgebildet (Spuren 5 und 6).

Das gegen Digoxigenin gerichtete Anticalin DigA16 ist daher zur funktionellen Kopplung an ein Reporterenzym und somit zum direkten Nachweis entsprechend markierter Biomoleküle geeignet. Dabei diskriminieren die Fusionsproteine aus dem Anticalin und PhoA nicht zwischen den verschiedenen Digoxigenin-präsentierenden Trägerproteinen und zeigen demzufolge im *Western Blot* ein kontextunabhängiges Bindungsverhalten (vgl. Abschnitt 3.3.6).

3.7.4 Anwendung zur Bestimmung von Digoxigenin-Gruppen im ELISA

Die von den Vektoren pBBP27, pBBP27-DigA16/19, pBBP29 und pBBP29-DigA16/19 kodierten Fusionsproteine wurden schließlich eingesetzt, um deren Fähigkeit zur Erkennung der Digoxigenin-Gruppe im ELISA zu überprüfen. Hierzu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Digoxigenin-BSA- bzw. Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat beschichtet und anschließend unbelegte Bindungsstellen der Matrix mit BSA abgesättigt. Die derivatisierten Vertiefungen wurden daraufhin mit Verdünnungsreihen der Fusionsproteine PhoA-DigA16, PhoA-DigA16/19, DigA16-PhoA und DigA16/19-PhoA inkubiert, gewaschen und gebundenes Fusionsprotein durch Zugabe eines chromogenen Substrates nachgewiesen (Abbildung 41).

(A)



(B)

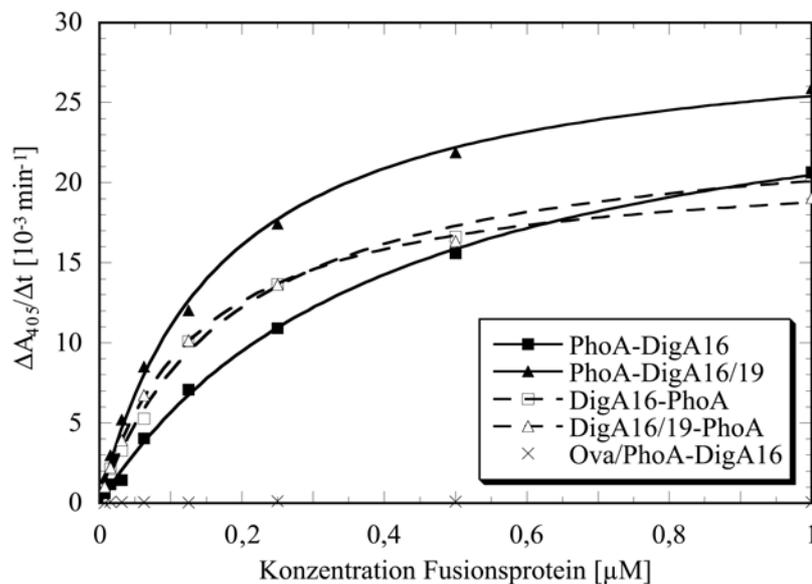


Abbildung 41: Nachweis von Digoxigenin-Gruppen im ELISA mit Hilfe der Fusionsproteine PhoA-DigA16, PhoA-DigA16/19, DigA16-PhoA und DigA16/19-PhoA. (A) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit Digoxigenin-BSA-Konjugat bzw. mit BSA als Kontrolle beschichtet und die Matrixoberfläche mit BSA abgesättigt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der gemäß Abschnitt 3.7.2 produzierten und gereinigten Fusionsproteine appliziert. Gebundenes Fusionsprotein wurde schließlich anhand der katalytischen Aktivität der PhoA in einer chromogenen Reaktion nachgewiesen. Die gemessene Aktivität wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Fusionsproteins aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte nach Gleichung (7). (B) Wie (A), jedoch unter Verwendung von Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat bzw. unmarkiertem Ovalbumin.

Alle Fusionsproteine zeigten sowohl bei der Verwendung von Digoxigenin-BSA- als auch von Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat konzentrationsabhängige Adsorptionsisothermen mit einem Sättigungsverhalten bei hohen Konzentrationen an Fusionsprotein. Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem Digoxigenin-BSA-Konjugat konnten für die bereits im *Western Blot* eingesetzten Fusionsproteine PhoA-DigA16 und DigA16-PhoA wiederum sehr ähnliche Bindungssignale beobachtet werden. Ein vergleichbares Signal zeigte auch das Fusionsprotein DigA16/19-PhoA. Lediglich für PhoA-DigA16/19 konnte eine Adsorptionsisotherme mit höheren Signalintensitäten und damit etwas stärkerer Bindung an Digoxigenin beobachtet werden. Möglicherweise führt die Fusion der dimeren PhoA an den C-Terminus von DigA16/19 zu sterischen Problemen und beeinträchtigt dadurch die höhere intrinsische Affinität von DigA16/19 für Digoxigenin im Vergleich zu DigA16.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit dem Digoxigenin-Ovalbumin-Konjugat lieferte analoge Ergebnisse, was auch hier auf ein kontextunabhängiges Bindungsverhalten deutete. Wurde die Matrix zur Kontrolle mit den nicht-derivatisierten Trägerproteinen beschichtet, so konnte zumindest beim Einsatz von PhoA-DigA16 keinerlei Bindungssignal detektiert werden.

Die eingesetzten Fusionsproteine waren somit alle sowohl bezüglich ihrer Bindungsaffinität zu Digoxigenin als auch hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität funktionell. Sie eignen sich deshalb zum immunchemischen Nachweis der Digoxigenin-Gruppe im ELISA auch für praktische Anwendungen.

3.8 Untersuchungen zur Stöchiometrie der Komplexbildung zwischen den hergestellten BBP-Varianten und Digoxigenin am Beispiel von DigA16

Bei der Auswertung der Daten aus Fluoreszenztitrations-Experimenten mit einigen der hier beschriebenen Anticaline war beobachtet worden, daß die erhaltenen Meßkurven nur dann sinnvoll angepaßt werden konnten (siehe Abschnitt 3.3.4; 3.3.6; 3.4.4), wenn ein niedrigerer Wert als die zuvor eingestellte Konzentration der Proteinlösung angenommen wurde. Davon betroffen waren alle Anticaline, die aus der Affinitätsmaturierung der BBP-Varianten DigA bzw. DigA16 hervorgegangen waren. Ein analoges Phänomen konnte bereits von Beste (1998) bei der Untersuchung der Bindungseigenschaften eines der Fluorescein bindenden Anticaline (FluC*) beobachtet werden. Die Gründe für dieses Verhalten ließen sich durch dessen Experimente jedoch nicht schlüssig klären.

Es existieren mehrere mögliche Ursachen für die nicht-stöchiometrische Bildung des Protein-Ligand-Komplexes, die hier geprüft werden sollten:

- a) eine starke Abweichung des tatsächlichen Extinktionskoeffizienten des nativen Proteins vom jeweils für die Einstellung der Proteinkonzentrationen verwendeten kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten,
- b) die Beladung der Bindungstasche mit endogenen Verbindungen aus *E. coli* bzw. aus dem Kulturmedium,
- c) eine chemische Modifizierung des Anticalins, hervorgerufen beispielsweise durch Oxidation von Cystein- oder Methionin-Resten oder die Deamidierung von Asparagin,
- d) eine Aggregatbildung im Verlauf der heterologen Produktion oder
- e) eine Subpopulation des Anticalins, die aufgrund der Ausbildung von Konformationsisomeren und einer damit verbundenen nicht nativen Proteinfaltung keine oder lediglich geringe Affinität zum Hapten besitzt.

Für den Versuch zur Klärung der möglichen Ursache wurde die BBP-Variante DigA16 ausgewählt. Diese war durch Affinitätsmaturierung ausgehend von DigA erhalten worden, wobei der Effekt der nicht-stöchiometrischen Liganden-Bindung erstmals beobachtet wurde (Abschnitt 3.3.4). Zudem waren die Liganden-Bindungseigenschaften dieser BBP-Variante mit am gründlichsten charakterisiert worden. Dabei zeichnete sich ab, daß bezogen auf unterschiedliche Proteinchargen reproduzierbar jeweils ca. 61 bis 67 % des eingesetzten Proteins an der Komplexbildung der Digoxigenin-Gruppe beteiligt waren (Abschnitt 3.3.6).

3.8.1 Experimentelle Überprüfung des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten

Nach Gill & von Hippel (1989) kann der molare Extinktionskoeffizient eines denaturierten Proteins durch Addition experimentell bestimmter Koeffizienten aller enthaltenen Tryptophan-, Tyrosin- und Cystein-Reste errechnet werden. Da dieser kalkulatorische Koeffizient mitunter erheblich von dem molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins im nativen Zustand abweichen kann (Gill & von Hippel, 1989), wurde er für DigA16 experimentell überprüft (siehe Abschnitt 2.5.6). Hierfür wurde der Absorptionswert einer nativen und einer in 6 M Guanidiniumchlorid denaturierten Proteinprobe derselben Konzentration bei 280 nm gemessen. Durch Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes konnte dann aus dem kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten des denaturierten Proteins und dem Quotienten der gemessenen Absorptionswerte nach Gleichung (2) der Koeffizient für das native DigA16 errechnet werden. Dabei zeigte sich, daß der kalkulatorische Extinktionskoeffizient des denaturierten Proteins von $\epsilon_{denat} = 53.580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ innerhalb der Meßgenauigkeit exakt mit dem Wert für das gefaltete Protein ϵ_{nativ} übereinstimmte.

Bei der alternativ vorgenommenen Bestimmung nach der Methode von Scopes (1974) wird die weitgehend von der Aminosäurezusammensetzung unabhängige Protein-Absorption der Peptid-Bindung bei 205 nm zur Abschätzung des Extinktionskoeffizienten herangezogen und zusätzlich um den Beitrag einzelner Aminosäure-Seitenketten bei dieser Wellenlänge korri-

giert. Die Absorption einer nativen Proteinprobe des in *E. coli* produzierten und mittels des *Strep*-tag II gereinigten DigA16 wurde hierfür bei 280 nm und, entsprechend verdünnt, bei 205 nm gemessen. Aus dem Quotienten der Absorptionswerte konnte dann mit Hilfe von Gleichung (3) (Abschnitt 2.5.6) der Extinktionskoeffizient des DigA16 bei 205 nm errechnet werden, der schließlich durch Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes auf den molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm umgerechnet wurde. Hierbei ergab sich für die BBP-Variante DigA16 ein Wert, der mit ca. $46.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ um etwa 14 % unter dem kalkulatorischen Koeffizienten des denaturierten Proteins nach der oben beschriebenen Methode nach Gill & von Hippel (1989) lag. Proteinlösungen, die unter Zugrundelegung dieses Koeffizienten für Titrationsexperimente auf eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ eingestellt werden (vgl. Abschnitt 2.6.1), sind daher weniger konzentriert als Lösungen, deren Konzentration anhand des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten von $53.580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zu $1 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Die Diskrepanz zwischen der im Bindungsexperiment eingesetzten Proteinkonzentration und funktionell bindungsaktiver Proteinfraction ist somit entsprechend größer.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten bei 280 nm nach der Methode von Scopes (1974) für zwei weitere BBP-Varianten mit nicht-stöchiometrischem Bindungsverhalten, DigA16/18 und DigA16/19, bestätigte hingegen nahezu fast exakt die kalkulatorischen Koeffizienten nach Gill & von Hippel (1989; Daten nicht gezeigt). Aufgrund der gefundenen inkonsistenten Ergebnisse für die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten nach dem Verfahren von Scopes (1974), wurden für die Einstellung von Proteinkonzentrationen somit generell die kalkulatorischen Koeffizienten nach Gill & von Hippel (1989) verwendet. Die experimentelle Überprüfung des inkrementell bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten lieferte daher keine Erklärung für das beobachtete Phänomen nicht stöchiometrischer Bindung.

3.8.2 Massenspektrometrische Untersuchungen an der BBP-Variante DigA16

Ein möglicherweise in der Bindungstasche (kovalent) gebundener Ligand sollte sich aufgrund der Massendifferenz des komplexierten Proteins zum Apo-Protein nachweisen lassen. Die BBP-Variante DigA16 wurde deshalb auch zu massenspektrometrischen Untersuchungen mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (MALDI-TOF = *Matrix Assisted Laser Dissociation/Ionisation - Time of Flight*) eingesetzt. Darüber hinaus könnte auch eine potentielle chemische Modifizierung des Proteins anhand einer präzisen Bestimmung der Molekülmasse nachgewiesen werden.

Die durch Massenspektrometrie bestimmte Molekülmasse von $20.806 \pm 5 \text{ g/mol}$ bestätigte allerdings die berechnete Masse von 20.804 g/mol innerhalb der Meßgenauigkeit. Somit konnten weder Anhaltspunkte für eine irreversible Komplexierung der BBP-Variante DigA16 mit einem potentiellen niedermolekularen Liganden noch für eine chemische Modifikation

des rekombinanten Proteins erhalten werden. Vermutlich handelte es sich bei einem solchen Komplex nicht um eine kovalente Bindung zwischen Protein und potentiellm Liganden. Ein nicht-kovalenter Komplex hingegen sollte bei der Ionisierung dissoziieren und demzufolge kein Signal mit erhöhter Molekülmasse hervorrufen.

3.8.3 Versuche zur Entfernung potentieller endogener Liganden aus dem bakteriell produzierten Protein

Da durch die massenspektrometrischen Untersuchungen eine nicht-kovalente Komplexierung der Bindungstasche mit einem potentiellen Liganden nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde in weiteren Versuchen die Abtrennung einer solchen Substanz durch zusätzliche Reinigungsschritte bei der Proteinproduktion angestrebt. Während der Dialyseschritte im Verlauf der Proteinreinigung sollten alle Moleküle, die möglicherweise die Bindungstasche des Anticalins komplexieren, aufgrund ihrer geringen Größe abgetrennt werden. Aus der Laborpraxis sind jedoch Fälle bekannt, bei denen sich kleine hydrophobe Moleküle – vermutlich aus kinetischen Gründen – nicht effizient durch konventionelle Dialyseverfahren abtrennen lassen.

3.8.3.1 Einsatz der Metallchelate-Affinitätschromatographie als alternative Methode zur Reinigung des rekombinanten Proteins

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Streptavidin-Affinitätschromatographie erlaubt eine Einzschrittreinigung rekombinanter Proteine unter sehr schonenden Bedingungen. Dies könnte allerdings zur Folge haben, daß ein potentiell gebildeter schwacher Komplex aus Ligand und Anticalin im Verlauf der Reinigung nicht aufgetrennt werden kann. Daher wurde DigA16 alternativ mit Hilfe der unter Hochsalzbedingungen betriebenen und somit deutlich härteren Metallchelate-Affinitätschromatographie aus dem bakteriellen Zellextrakt isoliert (Porath *et al.*, 1975). Hierzu wurde das Expressionsplasmid pBBP25 konstruiert, bei dem das *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel durch ein *His*₆-Affinitätspeptid ersetzt war (Hochuli *et al.*, 1988).

Für die Konstruktion wurde das Plasmid pASK60-his (Skerra, unveröffentlicht) zunächst durch Restriktionsverdau mit der Endonuklease *Aat*II linearisiert und die dabei entstandenen 3'-überhängenden DNA-Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase entfernt. Nach einem zweiten Schnitt mit der Restriktionsendonuklease *Bgl*I wurde schließlich ein 1365 bp großes DNA-Fragment isoliert, das für das *His*₆-Peptid, die intergenische Region des Phagen *fl* sowie das 5'-terminale Segment des β -Lactamasegens kodierte. Gleichzeitig wurde ausgehend von dem Strukturgen der BBP-Variante DigA16 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 durch ortsgerichtete Mutagenese eine *Eco*47III-Erkennungssequenz nach dem ersten Kodon des *Strep*-tag II-Anhängsels inseriert. Hierzu fand das Oligodesoxynukleotid STS8 Verwendung. Nach Verdau des mutierten Plasmides mit *Eco*47III und *Bgl*I wurde ein 2359 bp großes

Vektorfragment isoliert und mit dem zuvor isolierten Genfragment ligiert. Das erhaltene Expressionsplasmid pBBP25 kodiert somit für ein Fusionsprotein aus der BBP-Variante DigA16 mit N-terminaler OmpA-Signalsequenz und dem *His*₆-Anhängsel am C-Terminus (Abbildung 42).

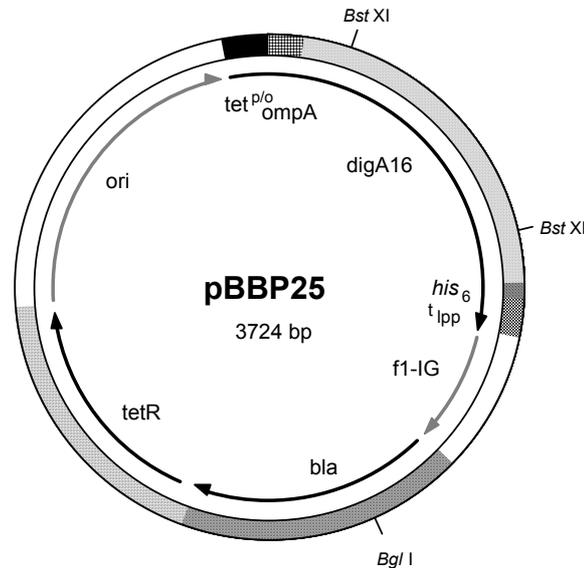


Abbildung 42: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pBBP25. Das Plasmid kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet^{b/o} ompA*) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem Anticalin DigA16 sowie dem *His*₆ Affinitäts-Peptid. *Bgl*I und *Bst*XI bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, die Abkürzungen sind der Legende zu Abbildung 6 zu entnehmen.

Das Plasmid wurde zur Transformation kompetenter *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt und entsprechend transformierte Zellen zur Produktion des rekombinanten Proteins verwendet. Die BBP-Variante wurde anschließend durch Metallchelate-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraction an Zn²⁺/IDA-Sepharose durch Anlegen eines linearen Imidazol-Gradienten isoliert (Abschnitt 2.5.2) und der Verlauf der Reinigung durch SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigte sich, daß durch diese Reinigungsprozedur alle periplasmatischen Proteine in einem Schritt abgetrennt werden konnten und somit reines Protein erhalten wurde. Auch ohne Überexpression der Proteindisulfidisomerase *DsbC* wie auf dem Plasmid pBBP21 konnten in diesem Fall auf dem SDS-Polyacrylamidgel keine Verunreinigungen durch Disulfidisomere des DigA16 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei Zugrundelegung des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten von 47.890 M⁻¹cm⁻¹ betrug die Ausbeute 0,2 mg/l Kulturvolumen (mit einer optischen Dichte der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von OD₅₅₀ = 1,1). Sie entsprach somit etwa der Hälfte der Proteinmenge, die bei der

gentechnischen Produktion des Anticalins DigA16 mit C-terminalem *Strep*-tag II erhalten wurde (vgl. Abschnitt 3.3.4).

Zur Bestimmung des bindungsaktiven Proteinanteils wurde das so gereinigte Protein in einem Fluoreszenztitrations-Experiment eingesetzt. Dafür wurde eine 1 μM Lösung von DigA16-*His*₆ in PBS/E mit einer 0,1 mM Digoxigenin-Lösung in DMF titriert und die bei 295 nm angeregte Proteinfluoreszenz bei 345 nm in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen Liganden verfolgt. Die erhaltene Titrationskurve zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme des gemessenen Fluoreszenzsignals und wurde nach Gleichung (21) unter gleichzeitiger Variation der Proteinkonzentration angepaßt. Dabei zeigte sich, daß insgesamt nur $31,9 \pm 4,1$ % des eingesetzten Proteins zur Bindung des Digoxigenins beitrugen (im Vergleich zu $61,3 \pm 0,7$ % im Fall des Anticalins DigA16 mit C-terminalem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel). Durch Reinigung der Digoxigenin bindenden BBP-Variante DigA16 mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie hatte sich der Anteil des bindungsaktiven Proteins somit sogar verringert. Diese Beobachtung könnte allerdings, wie bereits unter Abschnitt 3.3.6 beschrieben, auf eine fehlerhafte Anpassung der apparenten Proteinkonzentration aufgrund des geringeren beobachteten *Quenching*-Effektes zurückzuführen sein. Dieser betrug nur $36,6 \pm 0,8$ % im Vergleich zu $52,6 \pm 0,6$ % für DigA16 mit dem *Strep*-tag II-Reinigungsanhängsel. Die Affinität des rekombinanten Proteins zu Digoxigenin wurde zu $28,8 \pm 1,9$ nM bestimmt und war somit vergleichbar mit der Dissoziationskonstanten von $30,2 \pm 3,6$ nM, die für den Komplex aus DigA16 mit C-terminalem *Strep*-tag II-Affinitätspeptid und dem Steroid beobachtet wurde (Abschnitt 3.3.4).

Die Ergebnisse zeigten, daß sich auch diese unabhängige Reinigungsmethode nicht zur Abtrennung eines potentiellen nicht kovalent gebundenen Liganden eignet. Demzufolge konnte ein solcher Ligand weder durch Dialyse noch durch eines der verwendeten chromatographischen Reinigungsverfahren vom Protein abgetrennt werden.

3.8.3.2 Gelfiltrationsexperimente mit nativem und denaturiertem DigA16

Die Methode der Gelpermeations-Chromatographie wurde eingesetzt, um Proteinpräparationen von zuvor mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigtem DigA16 auf eventuell vorhandene Proteinaggregate bzw. -oligomere zu untersuchen und von einem möglicherweise nicht dialysierbaren potentiellen Liganden zu befreien. Für eine Analyse wurden 100 μl einer 4 μM Lösung von DigA16 bzw. von Wildtyp-BBP als Kontrolle, jeweils in PBS/E, auf eine analytische Superdex 75 HR-Gelpermeationssäule aufgetragen (Abbildung 43).

Bei diesem Experiment zeigte sich, daß die Retentionszeit der rekombinanten Variante DigA16 exakt mit der Verweildauer des Bilin-Bindungsproteins übereinstimmte. Eine Aggregatbildung bzw. Oligomerisierung des rekombinanten Proteins war somit auszuschließen.

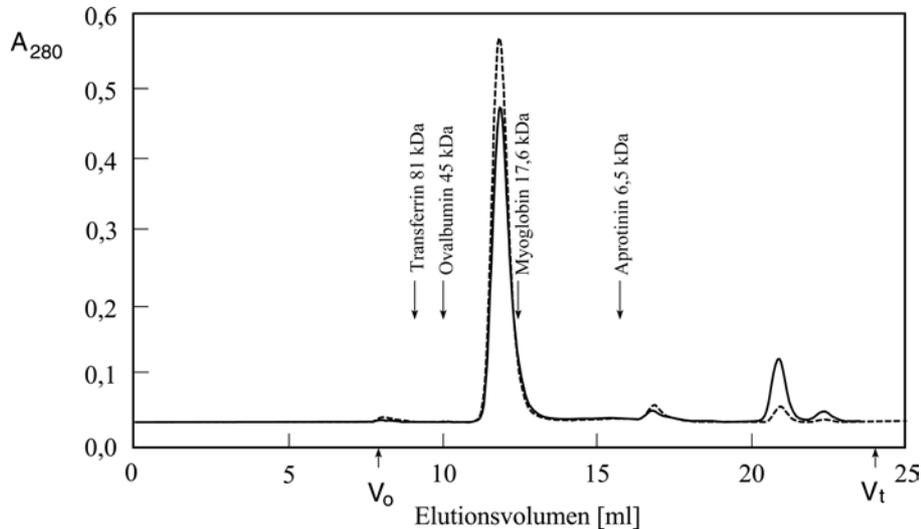


Abbildung 43: Überlagerung der Elutionsprofile von Gelfiltrationsanalysen mit rekombinantem BBP (gestrichelte Linie) und dessen Variante DigA16 (durchgezogene Linie). Je 100 μ l der in *E. coli* produzierten und gereinigten ca. 4 μ M Proteinlösungen in PBS/E wurden auf eine analytische Superdex 75 HR-Gelpermeationssäule mit einem Bettvolumen von 24 ml aufgetragen und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit PBS als Laufpuffer aufgetrennt. Gleichzeitig wurde die Absorption der eluierten Lösung bei 280 nm in einem Durchflußphotometer gemessen. V_0 und V_t bezeichnen das Ausschluß- bzw. Bettvolumen der Säule. Die Pfeile bezeichnen das jeweilige Elutionsvolumen der entsprechenden Markerproteine.

Für eine funktionelle Analyse von DigA16 wurden 100 μ l einer 20 μ M Proteinlösung in PBS/E entsprechend aufgetrennt und das in einem scharfen Peak eluierte Protein isoliert. Die erhaltene, ca. 0,3 μ M Proteinlösung in PBS wurde direkt in einem Fluoreszenztitrations-Experiment eingesetzt und hierfür wiederum mit einer 0,1 mM Lösung des Liganden in DMF (wie unter Abschnitt 3.8.3.1 beschrieben) titriert. Nach Auswertung der erhaltenen Titrationskurven konnte der Anteil des bindungsaktiven Proteins wiederum zu ca. 65 % bestimmt werden. Dieser Wert war somit nicht von dem für das ausschließlich mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten DigA16 ermittelten zu unterscheiden (Abschnitt 3.3.6).

Da ein potentieller, nicht dialysierbarer Ligand demnach durch Gelfiltration nicht vom nativen DigA16 abgetrennt werden konnte, wurde das Protein zunächst mittels Dialyse gegen 6 M Guanidiniumchlorid in KSH-Puffer denaturiert und wiederum der Gelpermeations-Chromatographie unterzogen. Dabei diente die Denaturierungs-Lösung auch als Laufpuffer. Insgesamt wurden 1,4 ml einer 16,6 μ M Proteinlösung in Aliquots von bis zu 250 μ l auf die Säule aufgetragen und das in einem scharfen Peak eluierte Protein aufgefangen (Abbildung 44).

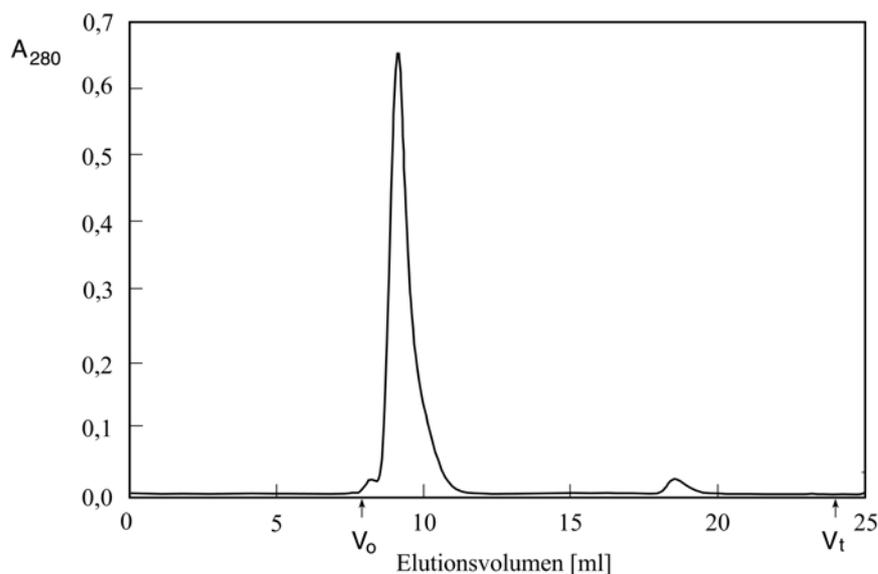


Abbildung 44: Elutionsprofil einer Gelfiltrationsanalyse mit rekombinantem DigA16 unter denaturierenden Bedingungen. 250 μ l der in *E. coli* produzierten und gereinigten 16,6 μ M Proteinlösung in KSH-Puffer mit 6 M Guanidiniumchlorid wurden auf eine analytische Superdex 75 HR-Gelpermeationssäule aufgetragen und bei einer Flußrate von 0,5 ml/min mit 6 M GdnHCl in KSH als Laufpuffer aufgetrennt. Gleichzeitig wurde die Absorption der eluierten Lösung bei 280 nm gemessen. V_0 und V_t bezeichnen das Ausschluß- bzw. Bettvolumen der Säule.

Die erhaltenen Lösungen der rekombinanten BBP-Variante wurden vereinigt und DigA16 durch wiederholte Dialyse gegen PBS/E renaturiert. Diese Proteinlösung (ca. 10 ml) wurde durch Verdünnen auf eine Konzentration von 1 μ M eingestellt und der Fluoreszenztitration mit einer 0,1 mM Digoxigenin-Lösung unterzogen.

Die Anpassung der erhaltenen Titrationskurve ergab, daß nach der Gelfiltrations-Chromatographie und anschließenden Rückfaltung des Proteins nurmehr ca. 44 % des eingesetzten Proteins zur Bindung des Liganden befähigt waren. Offensichtlich hatte ein signifikanter Anteil des denaturierten Proteins trotz andauernder Inkubation in physiologischem Puffer nicht mehr die korrekte Proteinkonformation eingenommen oder es war zu einer Aggregation des denaturierten Proteins nach der Gelfiltration gekommen. Möglicherweise hätte durch eine erneute Gelfiltration der renaturierten Proteinlösung eine Abtrennung solcher Aggregate erzielt werden können. Das Experiment zeigte, daß durch Abtrennung eines potentiellen Liganden mittels Gelpermeations-Chromatographie mit denaturiertem Protein und anschließende Rückfaltung keine Erhöhung des bindungsaktiven Proteinanteils erreicht werden konnte.

3.8.3.3 Bakterielle Produktion von DigA16 in Minimalmedium

Um die Beladung der Bindungstasche mit einem potentiellen Liganden, der aus einem komplexen Kulturmedium stammen könnte, von vorneherein auszuschließen, wurde die BBP-

Variante DigA16 in Glucose-Minimalmedium produziert. Das üblicherweise zur Produktion eingesetzte LB-Vollmedium enthält Hefe-Extrakt und Proteinhydrolysate und stellte somit eine reichhaltige Quelle für niedermolekulare Verunreinigungen dar.

Zur Protein-Produktion wurden *E. coli*-Zellen des Stammes JM83pro eingesetzt, die mit dem Expressionsphasmid pBBP21-DigA16 transformiert worden waren. Die Prolin-Auxotrophie von JM83 war durch Transformation mit dem *proAB*-Operon und Rekombination komplementiert worden und ermöglichte die Kultivierung in Minimalmedium (Fiedler & Skerra, unveröffentlicht). Die Ausbeute des während einer Induktionsphase von 3 h bei 22 °C produzierten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteins wurde zu ca. 0,1 mg/l Kulturmedium bestimmt und lag somit um den Faktor vier niedriger als bei der Verwendung von Zellen des Stammes JM83.

Durch anschließende Fluoreszenztitrations-Experimente einer 1 µM Lösung des rekombinanten Proteins in PBS/E mit Digoxigenin wurde festgestellt, daß nur ca. 37 % des eingesetzten Proteins den Liganden komplexierten. Durch keine der eingesetzten Methoden konnte also ein potentieller endogener Ligand entfernt bzw. dessen Existenz nachgewiesen werden.

3.8.4 Wiederherstellung der Salzbrücke zwischen Glu28 und Lys31 in der BBP-Variante DigA16

Der Effekt einer nicht-stöchiometrischen Digoxigenin-Bindung wurde erstmals bei denjenigen BBP-Varianten beobachtet, die durch *in vitro*-Affinitätsmaturierung des Anticalins DigA hergestellt worden waren. Für die Affinitätsmaturierung wurden insgesamt sechs Aminosäurepositionen des ersten Peptid-Schleifenbereiches einer gerichteten Zufallsmutagenese unterworfen und die auf diese Weise generierte Bibliothek von Lipocalin-Varianten zur *Phage Display*-Selektion eingesetzt (Abschnitt 3.3.1). Zwei der randomisierten Positionen, Glu28 und Lys31, bildeten im Wildtypprotein eine intramolekulare Salzbrücke in direkter Nähe zur Bindungstasche des BBP aus (Huber *et al.*, 1987b). Sie waren jedoch in der BBP-Variante DigA16 durch die Reste Gln28 und Ala31 ersetzt worden.

Durch eine Wiederherstellung der Salzbrücke sollte untersucht werden, ob die Deletion der Salzbrücke möglicherweise für das beobachtete nicht-stöchiometrische Bindungsverhalten verantwortlich war. Eventuell führte die fehlende Salzbrücke zur Destabilisierung der β -Barrel-Gerüststruktur und dadurch zur Ausbildung von Konformationsisomeren, die den Liganden Digoxigenin nicht mehr komplexieren konnten.

Durch ortsgerichtete Mutagenese mit dem Oligodesoxynukleotid STS10 wurde die Salzbrücke innerhalb des Strukturgens von DigA16 auf dem Expressionsphasmid pBBP21 wiederhergestellt. Nach Kultivierung von *E. coli* JM83-Zellen, die das resultierende Phasmid

trugen, und Produktion des rekombinanten Proteins (Abschnitt 2.4) wurde die DigA16-Mutante schließlich mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus dem periplasmatischen Proteinextrakt mit einer Ausbeute von ca. 0,3 mg/l Kulturvolumen (bei einer OD_{550} der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von 1,1) isoliert.

Eine 1 μ M Lösung des Proteins in PBS/E wurde (wie unter Abschnitt 3.8.3.1 beschrieben) mit einer 0,1 mM Lösung von Digoxigenin in DMF titriert und die Änderung der bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregten Proteinfluoreszenz bei 345 nm verfolgt. Durch Anpassung der erhaltenen Titrationskurven konnte der apparente Anteil an bindungsaktivem Protein zu ca. 37 % bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante betrug 48 nM und war somit etwas höher als für DigA16 ohne Salzbrücke.

Die Wiedereinführung der Salzbrücke hatte somit nicht zum gewünschten Effekt geführt. Das Experiment lieferte somit keinen Hinweis auf die Existenz potentieller Konformationsisomere aufgrund der fehlenden Salzbrücke.

3.8.5 Versuche zur Quantifizierung des funktionellen Gehaltes in der Präparation der rekombinanten BBP-Variante durch *Batch*-Chromatographie an Digoxigenin-Sepharose

In einem Versuch zur Abtrennung der bindungsinaktiven Proteinpopulation des DigA16 wurden mit dem Liganden derivatisierte Säulenmaterialien auf ihre Eignung als Affinitätsmatrix für chromatographische Verfahren getestet. Hierbei fanden sowohl Digoxigenin als auch Pregnenolon, ein dem Progesteron strukturell verwandtes Steroid, Verwendung (vgl. Abbildung 9).

Da funktionelles DigA16 Digoxigenin mit einem niedrigen K_D -Wert von ca. 30 nM komplexiert, wurde untersucht, ob die Isolierung des bindungsaktiven Proteinanteils am entsprechenden immobilisierten Liganden möglich war. 20 μ l Digoxigenin-Sepharose, die durch Umsetzung von insgesamt 1 ml Aminoethyl-Sepharose mit 7,6 μ mol Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester hergestellt worden war (Abschnitt 2.7.1), wurde hierfür mit 80 μ l einer 10 μ M Lösung des in JM83 produzierten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteins inkubiert. Anschließend wurde die Matrix zur Entfernung der bindungsinaktiven Proteinpopulation mehrfach gewaschen. Durch Inkubation mit 80 μ l einer 2 mM Digoxigenin-Lösung wurde zunächst versucht, gebundenes rekombinantes Protein spezifisch zu eluieren. Verbliebenes gebundenes Protein wurde schließlich unter denaturierenden Bedingungen durch fünfminütiges Erhitzen des Säulenmaterials auf 95 °C mit 80 μ l Mercaptoethanol-haltigem Auftragspuffer für SDS PAGE entfernt. Zur Analyse der chromatographischen Trennung wurden Proben der Wasch-

fraktionen sowie der Elutionsschritte auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abbildung 45).

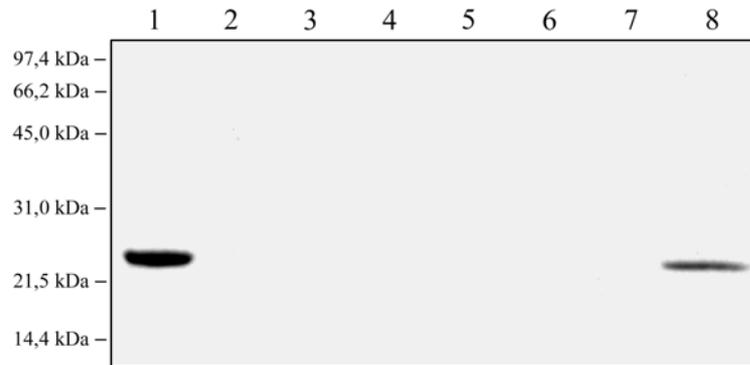


Abbildung 45: SDS-PAGE-Analyse der *Batch*-Chromatographie von DigA16 an Digoxigenin-Sepharose. 80 μ l einer 10 μ M Lösung des gereinigten Proteins wurden zu 20 μ l des Digoxigenin-Säulenmaterials gegeben und bei RT inkubiert. Das Säulenmaterial wurde viermal mit je 80 μ l KSH-Puffer gewaschen und gebundenes Protein zunächst mit einer 2 mM Lösung von Digoxigenin in 80 μ l KSH-Puffer und anschließend denaturierend durch Erhitzen der Matrix mit 80 μ l reduzierendem SDS-PAGE-Auftragspuffer eluiert. Spur 1: 20 μ l 10 μ M gereinigtes DigA16 in KSH-Puffer; Spur 2: 20 μ l des Überstandes nach der Inkubation der Proteinlösung mit dem Säulenmaterial; Spuren 3 bis 6: 20 μ l der Lösungen der Waschschrte 1 bis 4; Spur 7: 20 μ l der Elutionslösung mit 2 mM Digoxigenin in KSH-Puffer; Spur 8: 20 μ l des Überstandes nach Behandlung des Säulenmaterials mit reduzierendem SDS-PAGE-Auftragspuffer. Die Anfärbung des Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.

Die SDS-PAGE-Analyse ergab, daß das eingesetzte Protein durch das derivatisierte Säulenmaterial vollständig aus der Lösung entfernt wurde, da sich nach der Inkubation kein nachweisbares DigA16 mehr im Überstand befand (Abbildung 45, Spur 2). Durch anschließendes mehrmaliges Waschen der Digoxigenin-Sepharose (Spuren 3 bis 6) wie auch durch kompetitive Elution mit einer Lösung des freien Liganden konnte kein Protein eluiert werden (Spur 7). Erst unter denaturierenden Bedingungen ließ sich das gebundene Protein wieder von der Affinitätsmatrix entfernen (Spur 8).

Das Experiment zeigte, daß durch den Einsatz der Digoxigenin-Sepharose eine Subpopulation bindungsinaktiven Proteins von funktionellem DigA16 nicht abgetrennt werden konnte. Den Anteil des eingesetzten Proteins, der Digoxigenin nicht komplexieren konnte, hätte man nach der Inkubation mit dem Säulenmaterial im Überstand oder zumindest in den Waschfraktionen erwartet. Das Experiment lieferte somit keinen Hinweis auf die Existenz eines nicht funktionellen Anteils in der Proteinpräparation. Darüber hinaus zeigte sich, daß das eingesetzte Säulenmaterial aufgrund der hohen Affinität des DigA16 zum Digoxigenin zur reversiblen Bindung des rekombinanten Proteins nicht befähigt und daher für die chromatographische Reinigung unter nativen Bedingungen leider wenig geeignet war.

Angesichts dessen wurde ein Ligand zur Kopplung an die Säulenmatrix ausgewählt, der durch DigA16 deutlich schlechter gebunden werden sollte. Pregnenolon unterscheidet sich vom Progesteron, welches eine K_D von 97 μM für DigA16 aufweist (siehe Abschnitt 3.3.6), lediglich durch die Verschiebung der Doppelbindung von Steroid-Ring A in den Ring B. Durch die vom Progesteron abweichende Struktur des Pregnenolons konnte man mit einer verringerten Affinität zu DigA16 rechnen, so daß die Verwendung einer entsprechend derivatisierten Säulenmatrix (Abschnitt 2.7.2) für eine affinitätschromatographische Reinigung von DigA16 möglich sein sollte. Ein analog zur oben beschriebenen *Batch*-Chromatographie mit Pregnenolon-Sepharose durchgeführtes Experiment zeigte jedoch, daß sich die Matrix aufgrund ihrer fehlenden Bindungswechselwirkung mit DigA16 nicht für chromatographische Zwecke eignete (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war der zur Immobilisierung des Steroids an der Säulenmatrix verwendete – und verglichen mit Digoxigenin-Sepharose kürzere – *Spacer* nicht ausreichend lang und verhinderte so eine Komplexierung des Liganden in der Bindungstasche von DigA16. Weitere synthetische Arbeiten sind daher vonnöten, um gegebenenfalls einen für die reversible Affinitätschromatographie geeigneten Liganden zu identifizieren.

4 Diskussion

4.1 Selektion Digoxigenin bindender Anticaline durch Kombination von *Phage Display* mit einem Kolonie-Filterstapel-Test

Die Selektion hochaffiner Bindungsmoleküle aus einer Proteinbibliothek setzt voraus, daß sich das eingesetzte Molekülensemble durch eine große Diversität auszeichnet. Theoretische Analysen am Beispiel von Antikörper-Bibliotheken haben ergeben, daß die maximal selektierbare Affinität mit der Komplexität des eingesetzten Molekülrepertoires korreliert (Perelson & Oster, 1979; Waterhouse *et al.*, 1993). Diese Untersuchungen werden durch frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe im Prinzip belegt. Während es nicht gelang, Fluorescein-bindende Varianten des Bilin-Bindungsproteins aus einer Bibliothek mit $3 \cdot 10^6$ unterschiedlichen Vertretern zu selektieren, konnten sogar mehrere bindungsaktive Mutanten aus einer größeren Bibliothek mit einer Komplexität von $3,7 \cdot 10^8$ verschiedenen Vertretern isoliert werden (Schmidt, 1995; Beste *et al.*, 1999).

Diese größere Bibliothek, die durch die Randomisierung von insgesamt 16 Aminosäure-Res-ten innerhalb der Liganden-Bindungstasche des Bilin-Bindungsproteins erzeugt worden war (Abschnitt 1.5), wurde im Rahmen dieser Arbeit auch für die Selektion Digoxigenin bindender BBP-Varianten mittels *Phage Display* eingesetzt. Es war daher von zentraler Bedeutung, die ursprüngliche Diversität der als DNA-Lösung konservierten Bibliothek (Beste, 1998) bei ihrer Reamplifizierung möglichst zu erhalten. Zur Herstellung einer Phagemid-Bibliothek für den Einsatz im Selektionsprozeß wurden *E. coli*-Zellen zunächst mit der konservierten Phas- mid-DNA transformiert. Um dabei mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 90 % alle Ver- treter der Bibliothek mit der gegebenen Diversität von $3,7 \cdot 10^8$ unterschiedlichen Molekülen nach dem Transformationsschritt in der resultierenden *E. coli*-Kultur abzubilden, mußten aufgrund von stochastischen Überlegungen mindestens $7,4 \cdot 10^9$ Transformationsereignisse stattfinden (Schreiber, 1988).

Diese erhebliche Anzahl an Transformanden kann nur mit einer leistungsfähigen Transforma- tionsmethode wie der Elektroporation erzielt werden (Dower *et al.*, 1988). Während durch Transformation nach der CaCl_2 -Methode (Sambrook *et al.*, 1989) nur ca. 10^4 bis 10^6 Trans- formanden pro μg eingesetzter Plasmid-DNA erhalten werden, erweist sich die Elektropo- ration als bis zu tausendmal effizienter. Durch Einsatz von insgesamt 26 μg DNA konnten so $1,1 \cdot 10^{10}$ Transformanden erhalten werden. Die auf diese Weise produzierte Bibliothek (hier Bibliothek Nr. 1) repräsentierte daher mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,98 % alle ihrer ursprünglichen Vertreter (Schreiber, 1988) und bot demzufolge günstige Ausgangsbeding- ungen für die Selektion Digoxigenin bindender BBP-Varianten.

Zur Durchmusterung der Bibliothek auf die gewünschte Ligandenbindungseigenschaft wurde das *Phage Display*-Verfahren eingesetzt (Wells & Lowman, 1992; Hoess, 1993), das die phy-

sikalische Kopplung des Phänotyps eines Vertreters der Bibliothek mit dessen Genotyp erlaubt (Abschnitt 1.4). Digoxigenin wurde für den Selektionsprozeß in Form eines aktivierten Esters mit einer ϵ -Aminocaprinsäure-Gruppe als molekularem Abstandshalter kovalent an die Lysin-Seitenketten von RNase A gekoppelt. Die Länge dieses *Spacers* ermöglichte den Zugang des immobilisierten Liganden zur Bindungstasche des Anticalins, die deutlich tiefer ist als vergleichbare Hapten-Bindungsstellen von Antikörpern (Weiss & Lowman, 2000).

Das alternativ als Trägerprotein eingesetzte BSA erwies sich zur Selektion einer Digoxigenin bindenden Variante aus der Bibliothek Nr. 1 als nicht geeignet (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war der Ligand aufgrund der allgemeinen Affinität des BSA zu einer ganzen Reihe hydrophober Moleküle (He and Carter, 1992) an der Oberfläche nicht ausreichend zugänglich.

Die Anreicherung der Vertreter mit der höchsten Affinität durch *Phage Display* kann mittels verschiedener Verfahren erfolgen, wie z. B. durch Adsorptionsverfahren an funktionalisierten Mikrotiterplatten (Barbas *et al.*, 1992; Widersten & Mannervik, 1995) oder Polystyrol-Stiften (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996) oder durch Adsorption an biotinyliertes Antigen in Lösung und anschließende Isolierung der komplexierten Varianten durch Zugabe Streptavidin-beschichteter Oberflächen (Hawkins *et al.*, 1992; Low *et al.*, 1996). Für den Selektionsprozeß wurde das Digoxigenin-RNase A-Konjugat zur Beschichtung einer Polystyroloberfläche eingesetzt, die im Anschluß mit einer Phagemidpräparation von Bibliothek Nr. 1 inkubiert und schließlich gewaschen wurde (Abschnitt 3.1.2). Die Elution gebundener Phagemide konnte daraufhin prinzipiell unter kompetitiven oder unter denaturierenden Bedingungen erfolgen.

Durch kompetitive Elution mit freiem Liganden sollten im Idealfall nur diejenigen Phagemide von der Affinitätsmatrix desorbiert werden, die reversibel und spezifisch an den immobilisierten Liganden gebunden waren. Allerdings ist die Elution im Falle langsamer Dissoziationsraten des Protein-Ligand-Komplexes unter kompetitiven Bedingungen nicht mehr effizient. Aufgrund der langsamen Einstellung des Bindungsgleichgewichtes können im Verlauf der kompetitiven Elution Phagemide mit hoher Bindungsaffinität im Extremfall nicht eluiert werden. Unter diesen Umständen ist der Elution unter denaturierenden Bedingungen der Vorzug zu geben (Bass *et al.*, 1992). Diese wird durch die Verwendung von Puffern mit extremen pH-Werten (z. B. pH 2 oder pH 11) oder mit einer hohen Konzentration an Denaturierungsmitteln (z. B. 6 M Harnstoff) erreicht und führt zu einer unselektiven Ablösung aller an die Affinitätsmatrix adsorbierter Phagemide. Die Elution verläuft somit unabhängig von der jeweiligen Bindungsaffinität.

Die Wahrscheinlichkeit, in der reamplifizierten Bibliothek Nr. 1 Vertreter mit hoher Affinität zu Digoxigenin zu finden, war bedingt durch die begrenzte experimentell realisierte Kom-

plexität von $3,7 \cdot 10^8$ verschiedenen Vertretern eher gering. Daher fand in den ersten Anreicherungszyklen das kompetitive Elutionsverfahren Anwendung. Gleichzeitig wurde dabei die spezifische Elution Digoxigenin bindender Varianten begünstigt.

Die Selektion bindungsaktiver Proteinvarianten aus einer Zufallsbibliothek mit Hilfe der *Phage Display*-Technik führt in der Regel zur Anreicherung einer bestimmten Subpopulation aus dem ursprünglichen Genpool. Auch nachdem der Selektionsprozeß Konvergenz erreicht hat, d. h. sich durch weitere Anreicherungszyklen keine weitere Reduzierung des Anteils unspezifisch an die Affinitätsmatrix gebundener Phagemide mehr erreichen läßt, kann die erhaltene Population noch immer eine bemerkenswerte Größe aufweisen. Die Anzahl unterschiedlicher Vertreter ist dabei sowohl von der ursprünglichen Größe der Zufallsbibliothek als auch von den gewählten Selektionsbedingungen abhängig. Die individuellen Bindungseigenschaften können dann durch die separate Kultivierung von hunderten oder tausenden der selektierten Varianten und den Einsatz des produzierten löslichen Proteins oder der Phagemide in einem ELISA untersucht werden (Marks *et al.*, 1991; Clackson *et al.* 1991; Sidhu *et al.*, 2000).

Zur Vereinfachung dieses aufwendigen Prozesses wurde im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Methode etabliert, die die schnelle und parallele Identifizierung der selektierten Varianten mit den besten Bindungseigenschaften erlaubt (Abschnitt 3.1.3). Die Basis dieses Bindungsnachweises stellt der sogenannte Kolonie-Filterstapel-Test dar (Skerra *et al.*, 1991). Zur Durchmusterung der mittels *Phage Display* angereicherten Subpopulation wurde das Ensemble der randomisierten Gen-Abschnitte aus dem für den Selektionsprozeß verwendeten Plasmidvektor isoliert und auf einem Expressionsvektor subkloniert (Abschnitt 1.4), der für ein Fusionsprotein aus der BBP-Variante und der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne kodiert (ABD, König & Skerra, 1998). Dieses molekulare Affinitätsanhängsel diente zur Immobilisierung der rekombinanten Lipocaline, die während einer Induktionsperiode partiell von den einzelnen Kolonien freigesetzt wurden, auf der Oberfläche eines mit HSA beschichteten Membranfilters. Auf diese Weise wurde ein Abbild der Kolonien in Form der durch die Ausbildung des ABD-HSA-Komplexes funktionell immobilisierten BBP-Varianten erhalten. Diese konnten dann zum Beispiel durch Behandlung des Filters mit einem digoxigenierten Trägerprotein und anschließender Detektion des Komplexes mit einem geeigneten F_{ab} -Konjugat auf ihre Liganden-Bindungsfähigkeit getestet werden. Diejenigen Kolonien, die für die Ausbildung der intensivsten Farbsignale verantwortlich waren, konnten somit auf einfache Weise identifiziert werden.

Neben der ABD wäre auch die Verwendung anderer Epitop-Peptide, wie z. B. des zur Proteinreinigung häufig eingesetzten *Strep*-tags (Skerra & Schmidt, 2000) oder des His₆-tags (Hochuli *et al.*, 1988), zur funktionellen Immobilisierung der Protein-Varianten denkbar. Das System bestehend aus HSA und der ABD bietet jedoch den Vorteil, daß HSA einen sehr

preiswerten Komplexbildungs-Partner darstellt, der darüber hinaus nur eine ausgesprochen geringe Tendenz zu unspezifischem Bindungsverhalten zeigt. HSA kann daher auch in hohen Konzentrationen eingesetzt werden und ggf. gleichzeitig zur Absättigung freier Bindungsstellen der Membran dienen. Die hier etablierte Methode kann somit nicht nur zur Durchmusterung von Populationen unterschiedlicher Lipocaline oder rekombinanter Antikörper-Fragmente (König & Skerra, 1998) angewendet werden, sondern sie könnte auch zur Detektion anderer Bindungsproteine oder sogar enzymatisch aktiver Proteine dienen.

Ausgehend von der Bibliothek Nr. 1 konnte durch die Kombination von *Phage Display* und dem Kolonie-Filterstapel-Test die Variante DigA selektiert werden, die Digoxin und dessen Aglycon Digoxigenin mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante zu komplexieren vermag. Es war dennoch von großem Interesse zu untersuchen, ob sich die erreichte Affinität durch Zufallsmutagenese weiter verbessern läßt.

4.2 Verbesserung der Digoxigenin-Bindung durch *in vitro*-Affinitätsmaturierung und Charakterisierung der Bindungseigenschaften

Nach Ladner (1996) lassen sich im Prinzip zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Generierung und anschließenden Durchmusterung von Proteinbibliotheken unterscheiden. Beim sogenannten *Minority Sampling* kann aufgrund der großen Anzahl der für die Mutagenese ausgewählten Aminosäurepositionen – und der daraus resultierenden theoretischen Diversität – die Bibliothek mit einer gewöhnlich erreichbaren Anzahl von 10^7 bis 10^9 unabhängigen Transformanten experimentell nicht dargestellt werden. Die hier für den ersten Selektionsprozeß eingesetzte Bibliothek Nr. 1 stellte daher mit $3,7 \cdot 10^8$ Vertretern lediglich einen sehr begrenzten Ausschnitt des bei der konzertierten Mutagenese von 16 Aminosäurepositionen aufgespannten Sequenzraumes von insgesamt ca. 32^{16} möglichen Mutanten dar. Die daraus selektierte Variante DigA war somit höchstwahrscheinlich nicht optimal zur Bindung des vorgegebenen Liganden befähigt.

Das *Majority Sampling* hingegen dient der Durchmusterung aller theoretisch möglichen Varianten einer Bibliothek. Die Beschränkung der Zufallspositionen einer solchen Bibliothek auf insgesamt sechs Aminosäure-Reste macht mit einer kombinatorischen Komplexität von ca. 32^6 (ca. 10^9) Varianten in der Regel die vollständige Darstellung des Sequenzraumes möglich und bietet sich vor allem für die Affinitätsoptimierung von Proteinvarianten an, deren bindungsaktive Aminosäurepositionen bekannt sind (Yang *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996).

Ausgehend von der Variante DigA wurde daher nach der Strategie des *Majority Sampling* in einem als *in vitro*-Affinitätsmaturierung bezeichneten Prozeß (Hawkins *et al.*, 1992; Hoogenboom, 1997) eine Zufallsbibliothek generiert (Bibliothek Nr. 2) und auf höher affine Mutan-

ten durchgemustert (Abschnitt 3.3). Für die Synthese der Bibliothek wurden sechs Aminosäurepositionen innerhalb des Schleifenbereiches Nr. 1 ausgewählt, die aufgrund ihres geladenen Charakters noch nicht optimal zur Bindung des ungeladenen Digoxigenins geeignet schienen, und einer gerichteten Zufallsmutagenese unterworfen. Durch die Beibehaltung der selektierten Aminosäuren in den übrigen drei Schleifenbereichen war der so erhaltenen nahezu redundanten Bibliothek Nr. 2 die Erkennungseigenschaft für Digoxigenin bereits aufgeprägt.

Untersuchungen mit rekombinanten Antikörper-Bibliotheken haben gezeigt, daß eine Selektion hochaffiner Vertreter mittels *Phage Display* durch Komplexierung von biotinyliertem Antigen in Lösung und darauffolgende Isolierung des gebildeten Komplexes mit Hilfe von mit Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikeln möglich ist (Hawkins *et al.*, 1992). Durch Verwendung einer limitierenden Antigen-Konzentration während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes, die unterhalb der gewünschten Dissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes liegt, kann selektive Komplexierung und so die Anreicherung der Varianten mit der größten Affinität erreicht werden.

Zur Selektion von DigA-Varianten mit der maximalen Affinität zu Digoxigenin wurde diese Strategie adaptiert und in den *Phage Display*-Anreicherungszyklen eine limitierende Konzentration an mit Digoxigenin und Biotin doppelt markiertem Trägerprotein von ca. 70 nM eingesetzt. Der Erfolg dieser Selektionsstrategie für das *Phage Display* mit BBP-Varianten wurde schließlich durch die Identifizierung der Variante DigA16 bestätigt, die nach nur vier Selektionszyklen – in Verbindung mit einem Kolonie-Filterstapel-Test – aus der Bibliothek Nr. 2 isoliert werden konnte.

DigA16 zeigt im Vergleich zu DigA um eine Größenordnung verbesserte Affinität zum Digoxigenin. Mit einer Dissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes von 30,2 nM (Abschnitt 3.3.4) entspricht sie der Antigenaffinität von Antikörpern aus der zweiten Immunantwort. Diese erhöhte Bindungsaktivität führte erwartungsgemäß zu einer – verglichen mit DigA – verbesserten Empfindlichkeit für den Nachweis der Digoxigenin-Gruppe in ELISA-Experimenten (Abschnitt 3.3.5).

Zudem zeigten die ELISA-Bindungsstudien, daß die molekulare Erkennung des Digoxigenins durch DigA16 in einer kontextunabhängigen Weise erfolgt. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Steroid an BSA, Ovalbumin oder RNase A gekoppelt war. DigA16 erkennt daher nicht etwa ein zusammengesetztes Epitop aus der Digoxigenin-Gruppe und Oberflächenstrukturen der verwendeten Trägerproteine, wie es häufig bei Antikörpern beobachtet wird, sondern das Hapten alleine als Liganden.

Diese Beobachtung steht im Einklang damit, daß das Steroid bei beiden Konjugaten jeweils über einen ausgedehnten *Spacer* an Position C-3 mit dem Trägerprotein verknüpft war (vgl. Abbildung 22). Somit wird das Digoxigenin höchstwahrscheinlich in der Weise vom

Anticalin komplexiert, daß es mit der Lactongruppe voran in die Bindungstasche des Anticalins hineinreicht, während Ring A teilweise aus dem Lipocalin herausragen kann. Unterschiedliche Substituenten an Position C-3 sollten somit dem Lösungsmittel exponiert sein und keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität ausüben.

Dieses Ergebnis konnte durch Bindungsexperimente mit der Methode der Fluoreszenztitration bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.3.6). So wurde beobachtet, daß das Steroid auch dann mit ununterscheidbarer Affinität gebunden wird, wenn es, wie im Falle des Digoxins, einen sterisch anspruchsvollen Trisaccharid-Substituenten an dieser Position trägt. Das Anticalin DigA16 stellt somit ein Hapten-bindendes Protein dar. Es unterscheidet sich insofern sowohl von vielen Antikörpern, deren Liganden-Bindung häufig vom Präsentations-Kontext abhängt, als auch von anderen Protein-*Scaffolds* (Nygren & Uhlén 1997; Skerra, 2000a), die zur Generierung neuartiger Bindungsproteine eingesetzt wurden (Ku & Schultz, 1995).

Erstaunlicherweise komplexiert DigA16 Digitoxigenin und dessen Glycosid Digitoxin, die sich lediglich durch das Fehlen der Hydroxylgruppe an Position C-12 (in Ring C) von Digoxigenin bzw. Digoxin unterscheiden, mit einer nochmals um den Faktor 10 höheren Affinität von ca. 2 bzw. 3 nM. DigA16 erreicht somit bezüglich dieser Liganden beinahe pikomolare Affinität. Eine entsprechende Kreuzreaktivität wurde auch bei verschiedenen Digoxin-bindenden Antikörpern gefunden. Die monoklonalen Antikörper 26-10 bzw. 40-50 zum Beispiel, die nach der Immunisierung von Mäusen mit einem Digoxin-Protein-Konjugat isoliert wurden, zeigen dabei zwar keine unterschiedlichen Affinitäten für die entsprechend an Position C-12 OH-substituierten und nicht-substituierten Steroide (Mudgett-Hunter *et al.*, 1982; Mudgett-Hunter *et al.*, 1985). Bei einer Variante des Antikörpers 26-10 (LL2) mit einer einzelnen Aminosäuresubstitution innerhalb der V_H -Domäne ($Y_{H50} \rightarrow H$), die durch eine spontane Mutation entstanden war, konnte jedoch ein differenziertes Bindungsverhalten für die Digoxigenin-Homologen beobachtet werden. Diese Mutante zeigt im Gegensatz zu DigA16 aber eine um eine Größenordnung niedrigere Affinität für die Steroide, bei welchen die Hydroxylgruppe an Position C-12 fehlt (Schildbach *et al.*, 1991).

Im Gegensatz zu DigA16 zeigen die beschriebenen Antikörper außerdem Bindungsaffinität für das cardioaktive Steroid-Glycosid Ouabain (Jeffrey *et al.*, 1995; Schildbach *et al.*, 1991). Ouabain trägt im Vergleich zu Digoxin drei zusätzliche Hydroxylsubstituenten an Steroid-Ring A. Weiterhin ist die Hydroxylgruppe an Ring C auf ein benachbartes Kohlenstoffatom verschoben und kommt somit auf der gegenüberliegenden Seite der Steroidebene zu liegen (siehe Abbildung 22). DigA16 komplexiert weder Ouabain noch das ebenfalls dem Digoxigenin strukturell verwandte Testosteron, das sich vom zweitgenannten Steroid im wesentlichen durch eine Konformationsänderung in Ring A unterscheidet. Dieser nimmt aufgrund der Ketogruppe an Position C-3 sowie der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 eine teilweise planare Konformation ein. Weiterhin zeichnet sich das Testosteron im Vergleich zum

Digoxigenin durch fehlende Hydroxylgruppen an C-12 und C-14 sowie eine zusätzliche Hydroxylfunktion an Position C-17 anstelle eines Lactonrings aus (Abbildung 22). Lediglich Progesteron, das sich durch eine zum Testosteron analoge Konformationsänderung im Steroid-Ring A und einen Acylrest an Position C-17 vom Digoxigenin unterscheidet, wurde mit einer meßbaren Affinität von 0,1 μM komplexiert.

Die BBP-Variante DigA16 zeigt somit keine allgemeine Bindungseigenschaft für hydrophobe Verbindungen, wie sie für einige der natürlichen Lipocaline beschrieben wurde (Flower, 1996), sondern sie erweist sich im Gegensatz dazu vielmehr als ein künstliches Rezeptorprotein mit wohldifferenzierten Bindungseigenschaften. Diese Beobachtung stützt die Annahme, daß der Steroid-Ligand tiefer in die Bindungstasche des Anticalins hineinragt, als in die Antigen-Bindungsstelle im Fall des Komplexes mit einem Antikörper. Beispielsweise zeigen die Kristallstrukturen der Anti-Digoxin-Antikörper 26-10 (Jeffrey *et al.*, 1993) und 40-50 (Jeffrey *et al.*, 1995), daß im wesentlichen ein Ende des Steroid-Systems, hier also die Lactongruppe, in engem Kontakt mit der Bindungsstelle steht. Der übrige Teil des Liganden ist von einer Seite dem Lösungsmittel exponiert. Demgegenüber zeigt das Strukturmodell des Anticalins FluA mit dessen Liganden Fluorescein (Beste, 1998; Beste *et al.*, 1999) einen Bindungsmodus, bei dem der Ligand tief in der Bindungstasche des Lipocalins eingebettet liegt. Gleiches gilt sowohl für den Komplex aus BBP und Biliverdin IX γ (Huber *et al.*, 1987b) als auch für den Komplex des Retinol-Bindungsproteins mit Retinol (Cowan *et al.*, 1990). Anticaline unterscheiden sich daher insofern von Hapten-bindenden Antikörpern, als ihre Bindungstasche bis in das strukturell konservierte β -Barrel hineinreichen kann, während die hypervariablen Peptidschleifen der Antikörper keine entsprechend großen Kavitäten ausbilden können (Weiss & Lowman, 2000).

Das Anticalin DigA16 war im Verlauf der vorliegenden Arbeit auch Gegenstand für den Versuch einer weiteren Affinitätsoptimierung. Im Gegensatz zur Variante DigA, die sich durch mehrere geladene Aminosäuren in Schleifenregion Nr. 1 auszeichnet, zeigte keine der Peptidschleifen dieser BBP-Variante eine ähnliche Kumulation basischer oder saurer Aminosäure-Reste, die das Schleifensegment als nicht optimal zur Komplexierung des Digoxigenins geeignet erscheinen ließ. Daher konnte keine der Peptidschleifen als besonders vielversprechend für eine erneute Randomisierung identifiziert werden. Allerdings ist die Bindungstasche des BBP so groß, daß eine gleichzeitige Beteiligung aller vier Schleifensegmente an der Komplexierung des Liganden unwahrscheinlich ist. Auf Grund der größeren räumlichen Nähe der Zufallspositionen innerhalb der Peptidschleifen Nr. 3 und Nr. 4 zu den bereits optimierten Positionen innerhalb von *Loop* Nr. 1 wurden diese für eine erneute gerichtete Zufallsmutagenese ausgewählt und zwei entsprechende Bibliotheken präpariert.

Um den Prozeß der Affinitätsmaturierung zu beschleunigen, wurden die redundanten Teilbibliotheken vor der *Phage Display*-Selektion vereinigt. Somit war es dem System überlassen,

welche mutierte Peptidschleife den größeren Beitrag für eine verbesserte Bindung liefern würde. Die Selektion wurde nach derselben Methode durchgeführt, die auch bei der vorangegangenen Affinitätsmaturierung von DigA zur Anwendung gekommen war. Allerdings wurde zur Erhöhung der Selektionsstringenz die Konzentration des Digoxigenin/Biotin-BSA-Doppelkonjugates während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes um den Faktor zehn auf 7 nM reduziert.

Nach vier Selektionszyklen und abschließendem Kolonie-Filterstapel-Test konnte die BBP-Variante DigA16/19 isoliert werden, die, wie fast alle übrigen selektierten Mutanten, der Teilbibliothek mit randomisierter Peptidschleife Nr. 4 entstammte und zwei zusätzliche Mutationen im Bereich des *Loops* Nr. 3 aufweist. Die Affinität von DigA16/19 zu Digoxigenin hatte sich, verglichen mit DigA16, nochmals verdoppelt. Dagegen hatte sich die Affinität zum Digitoxigenin, welches keine Hydroxylgruppe an Position C-12 trägt, praktisch nicht verändert. Die entsprechenden glycosidischen Analoga der genannten Steroide wurden von DigA16/19 jeweils deutlich schwächer gebunden. Dieses Ergebnis zeigte, daß DigA16/19 im Gegensatz zu DigA16 zwischen den Substituenten an Position C-3 des Steroid-Systems diskriminieren kann. Möglicherweise bildet das Anticalin zusätzliche Kontakte zu den Steroiden aus, so daß Steroid-Ring A im Komplex ebenfalls einen Bindungsbeitrag liefern kann. Sterisch anspruchsvolle Substituenten an Position C-3 könnten dann die Bindungsaffinität für die entsprechenden Steroide negativ beeinflussen und somit die gefundenen Beobachtungen erklären.

Für einen derart veränderten Bindungsmodus spricht auch die beobachtete zusätzliche schwache Bindungsaktivität von DigA16/19 zu Testosteron, während Ouabain wiederum keine erkennbare Kreuzreaktivität mit dem Digoxigenin bindenden Anticalin zeigte. Eine genaue Klärung der molekularen Wechselwirkungen im Komplex zwischen DigA16/19 und den Steroid-Liganden kann allerdings erst nach einer Aufklärung der dreidimensionalen Proteinstruktur, z. B. durch Röntgendiffraktometrie, erfolgen.

4.3 Effekt der substöchiometrischen Komplexierung von Steroid-Liganden durch manche Anticaline

Die Raumstruktur Digoxigenin-spezifischer Anticaline könnte auch eine Erklärung für die gefundene nicht-stöchiometrische Komplexierung der Steroid-Liganden durch einige der BBP-Varianten liefern (vgl. Abschnitt 3.8). Die Auswertung von Fluoreszenztitrations-Experimenten mit Anticalinen, die aus der Affinitätsmaturierung der Varianten DigA bzw. DigA16 hervorgegangen waren, ergab, daß die gemessenen Titrationskurven nur bei einer zusätzlichen Variation der eingesetzten Proteinkonzentration sinnvoll angepaßt werden konnten. Darüberhinaus war bereits bei der Charakterisierung eines Fluorescein-bindenden Anticalins aufgefallen, daß eine gewisse Population des gentechnisch produzierten Proteins offenbar

nicht zur Bindung seines Liganden befähigt war (Beste, 1998). Prinzipiell kommen mehrere Ursachen für das beobachtete Phänomen in Betracht, wie ein fehlerhafter Extinktionskoeffizient des Anticalins für die Bestimmung von Proteinkonzentration (z. B. für Bindungsexperimente) oder eine Ausbildung von Proteinaggregaten im Verlauf der gentechnischen Produktion und Reinigung des Proteins. Auch eine Beladung der Bindungstasche mit endogenen Verbindungen aus *E. coli* während der bakteriellen Produktion, eine chemische Modifizierung der Proteine (z. B. Oxidation von Cys- oder Met-Resten oder Deamidierung von Asparagin), oder eine Subpopulation der Anticaline, bestehend aus nicht funktionellen Konformationsisomeren (Abschnitt 3.8), könnte die substöchiometrische Komplexierung der Liganden im Fluoreszenztitrations-Experiment erklären.

Zur Beleuchtung der möglichen Ursachen des beobachteten Phänomens wurde DigA16 einer näheren Charakterisierung unterzogen. Um eine mögliche Abweichung des verwendeten kalkulatorischen vom tatsächlichen Extinktionskoeffizienten und die damit verbundene fehlerhafte Einstellung der Proteinkonzentrationen in den Bindungsexperimenten auszuschließen, wurde der nach Gill & von Hippel (1989) für das denaturierte Protein berechnete Extinktionskoeffizient für natives DigA16 experimentell überprüft (siehe Abschnitt 3.8.1). Allerdings lieferte weder dieses Experiment noch eine alternative Abschätzung des Extinktionskoeffizienten nach der Methode von Scopes (1974) Hinweise auf einen fehlerhaften Extinktionskoeffizienten.

Durch massenspektrometrische Untersuchung konnte eine mögliche chemische Modifizierung des Protein (s. o.) nicht nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.8.2). Auch die Komplexierung der Bindungstasche mit einem potentiellen Liganden aus dem Wirtsorganismus *E. coli* oder dem Kulturmedium, die ursächlich für eine nicht bindungsaktive Proteinfraction sein könnte, ließ sich so nicht nachweisen.

Da sich die Massenspektroskopie jedoch nur bedingt zur Detektion eines möglicherweise nicht kovalent gebundenen Moleküls eignet, wurde versucht, eine solche Substanz durch zusätzliche Schritte bei der Reinigung des rekombinanten Proteins abzutrennen. Der Einsatz der Metallchelat- anstelle der sehr schonenden Streptavidin-Affinitätschromatographie führte jedoch zu keiner Erhöhung des bindungsaktiven Proteinanteils (Abschnitt 3.8.3.1). Eine Strategie, die Quelle eines möglichen Liganden während der gentechnischen Herstellung des Anticalins durch die Verwendung eines Minimal- anstelle eines Vollmediums von vornherein auszuschließen, führte ebenfalls nicht zu verbesserter Stöchiometrie bei der Ligandenbindung (Abschnitt 3.8.3.3). Ebenso wenig erhöhte eine Dialyse oder die Reinigung des denaturierten Anticalins durch Gelpermeations-Chromatographie (Abschnitt 3.8.3.2) den funktionellen Proteinanteil. Keines der Verfahren lieferte somit einen konkreten Hinweis auf die Existenz eines solchen Moleküls.

Die Gelpermeations-Chromatographie wurde auch zur Analyse der nativen BBP-Variante eingesetzt, um eine mögliche Aggregation oder Oligomerisierung auszuschließen. Der Vergleich der Retentionszeiten mit dem Wildtyp-BBP, welches als monomeres Apoprotein in Lösung auftritt (Schmidt & Skerra, 1994), erwies jedoch ein analoges Verhalten für die BBP-Variante DigA16.

Durch die Rekonstitution einer Salzbrücke in direkter Nähe zur Bindungstasche des DigA16 sollte ein etwaiger destabilisierender Effekt der Seitenkettensubstitutionen auf die Proteinstruktur und eine damit verbundene Ausbildung nicht funktioneller Konformationsisomere überprüft werden (Abschnitt 3.8.4). Dieses Ionenpaar war im Zuge der Affinitätsmaturierung der BBP-Variante DigA entfernt worden. Bindungsstudien mit der DigA16-Mutante, bei der die Salzbrücke wiederhergestellt worden war, zeigten jedoch keine Verbesserung der Bindungsstöchiometrie. Die reduzierte Affinität dieser Mutante gegenüber Digoxigenin deutete vielmehr auf einen Bindungsbeitrag der Aminosäuren Gln28 und Ala31 bei der Komplexierung des Steroids durch DigA16 hin.

Beim Versuch den Anteil der Proteinpräparation mit fehlender Affinität zum Steroid-Liganden durch Komplexierung und anschließende Abtrennung des bindungsaktiven Proteins mit Digoxigenin-Sepharose zu quantifizieren konnte beobachtet werden, daß das eingesetzte Protein quantitativ von der derivatisierten Sepharose-Matrix gebunden wurde (Abschnitt 3.8.5). Somit konnte überhaupt kein bindungsinaktives Protein nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stand im eindeutigen Gegensatz zu den Ergebnissen der Fluoreszenztitrations-Experimente, bei denen eine substantielle Fraktion des eingesetzten Proteins den zugegebenen Liganden nicht komplexieren konnte (s. o.).

Keine der angestellten Untersuchungen führte zu einem Hinweis auf Ursache für die beobachtete Subpopulation an bindungsinaktivem Protein. Somit konnte auch in dieser Arbeit die Ursache der nicht stöchiometrischen Komplexbildung nicht abschließend geklärt werden und bleibt daher Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.4 Anticaline als Reagenzien zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe

Eine zentrale Themenstellung der Arbeiten betraf die praktische Eignung Digoxigenin-spezifischer Anticaline als Nachweisreagenz für das Steroid für verschiedene biochemische Fragestellungen. Als Grundlage dafür dienten die hergestellten Anticaline DigA16 und DigA16/19, die zur Konstruktion von Fusionsproteinen mit der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) als Reporterenzym eingesetzt wurden. Durch die gentechnische Produktion derartiger Fusionsproteine kann die Bildung heterogener Nebenprodukte, die bei der chemischen Kopplung eines Bindungsproteins mit einem Reporterenzym üblicherweise auftreten, umgangen werden. Die Alkalische Phosphatase bildet als Metalloenzym – mit zwei

Zn²⁺-Kationen und einem Mg²⁺-Ion im aktiven Zentrum – ein nicht-kovalentes Homodimer mit 449 Aminosäure-Resten pro Untereinheit (Sowadski *et al.*, 1985). Dabei sind beide Polypeptid-Termini dem Lösungsmittel exponiert (Kim & Wyckoff, 1991) und eignen sich somit im Prinzip gleichermaßen für eine Proteinfusion. Auch die Anticaline präsentieren beide Enden ihrer Polypeptid-Kette an der Proteinoberfläche (Huber *et al.*, 1987b). Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Typen von Fusionsprotein konstruiert, bei denen die Alkalische Phosphatase einerseits mit dem C-Terminus und andererseits mit dem N-Terminus der Anticaline DigA16 bzw. DigA16/19 verknüpft war (Abschnitt 3.7).

Alle vier Fusionsproteine wurden bei der gentechnischen Produktion in *E. coli* unabhängig von der Anordnung der Fusionspartner in etwa gleichen Mengen in das bakterielle Periplasma sekretiert. Darüber hinaus gelang die Reinigung aller vier Proteine mit Hilfe des *Strep*-tags II mit ähnlicher Effizienz, obwohl das Affinitätsanhängsel bei einem Typ des Fusionsproteins als *Linker* zwischen den beiden Partnern diente. Schließlich zeigten die Proteinfusionen aus DigA16 und PhoA beim Versuch des Nachweises der Digoxigenin-Gruppe im *Western Blot*, daß die Bindungsaktivität für das Steroid, sowohl bei N- als auch C-terminaler Fusion der PhoA, gleichermaßen erhalten geblieben war (Abschnitt 3.7.3).

Bei der Verwendung der vier Fusionsproteine für den Nachweis des Digoxigenins im ELISA wiesen alle Proteine Bindungsaktivität auf (Abschnitt 3.7.4). Dabei konnten für das Fusionsprotein PhoA-DigA16/19 – verglichen mit den übrigen Proteinen – höhere Bindungssignale beobachtet werden. Diese spiegelte die um den Faktor zwei höhere Affinität von DigA16/19 für Digoxigenin im Vergleich zu DigA16 wieder. Ein analoger Effekt wurde im Gegensatz dazu für das Fusionsprotein DigA16/19-PhoA nicht beobachtet. Möglicherweise führte die Fusion der PhoA mit dem C-Terminus des DigA16/19 zu einer reduzierten sterischen Zugänglichkeit der Bindungstasche und kompensierte dadurch die eigentlich höhere Affinität von DigA16/19 zu Digoxigenin. Die Ergebnisse zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe im *Western Blot* und im ELISA mit den verschiedenen Typen von Fusionsproteinen demonstrieren, daß sich der N- und C-Terminus der Anticaline, abgesehen davon, praktisch gleich gut für Fusionen eignen.

Dabei erlaubte die katalytische Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowohl im *Western Blot* als auch im ELISA den direkten Nachweis des Bindungsereignisses mit herkömmlichen Reagenzien. Nichtsdestotrotz besitzt die bakterielle PhoA eine im Vergleich zur eukaryontischen CIP (engl.: *Calf Intestinal Phosphatase*), dem gebräuchlichsten Reporterenzym für die Herstellung von Proteinkonjugaten, eine um das Dreißigfache reduzierte katalytische Aktivität (Murphy & Kantrowitz, 1994). Die Sensitivität des Nachweises könnte demnach durch in der Literatur beschriebene Aminosäuresubstitutionen in der Nähe zum aktiven Zentrum des Enzyms noch verbessert werden (Mandecki *et al.*, 1991; Matlin *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1999). Abgesehen davon führt die Verwendung der homodimeren PhoA als Fusionspartner zu

einem Aviditätseffekt (Crothers & Metzger, 1972), wenn der durch das Anticalin komplexierte Ligand in multivalenter Weise auf einer Oberfläche präsentiert wird.

Somit stellen die konstruierten Fusionsproteine aus Digoxigenin bindenden Anticalinen und der PhoA neuartige und nützliche Moleküle zur spezifischen Detektion des Steroid-Systems dar. Dabei sind sie vermutlich direkt zur immunchemischen Quantifizierung cardioaktiver Substanzen geeignet und könnten daher analog zu den entsprechend durch Fusion mit Alkalischer Phosphatase oder Peroxidase funktionalisierten Digoxin-spezifischen Antikörpern bzw. ihren F_{ab}-Fragmenten eingesetzt werden.

4.5 Anticaline als Grundlage bispezifischer Rezeptorproteine: Duocaline

Antikörper wurden vor über einhundert Jahren erstmals beschrieben (Behring & Kitasato, 1890) und besitzen als therapeutische Moleküle oder Nachweisreagenzien bereits eine lange Tradition in den Biowissenschaften und der Medizin. Neben der klassischen Verwendung als selektive und nahezu universelle Bindungsmoleküle werden Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten oder deren Fragmente aber auch gekoppelt, um zu multifunktionellen Bindungsmolekülen zu gelangen. Diese Bestrebungen dienen zumeist dem Ziel, die resultierenden bispezifischen Antikörper in der Tumorthherapie einzusetzen, um Effektorzellen des Immunsystems oder Radionuklide bzw. cytotoxische Substanzen zu einem Tumor zu dirigieren (Songsivilai & Lachmann, 1990; Nolan & O’Kennedy, 1990; Fanger *et al.*, 1992; Plückthun & Pack, 1997). Durch die gezielte Adressierung kann die Konzentration der tumorbekämpfenden Agenzien am Wirkungsort erhöht werden, wodurch sich unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren lassen.

Durch die Fusion zweier engineerter BBP-Varianten mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob sich das Konzept der bispezifischen Antikörper grundsätzlich auf die Anticalin-Technologie übertragen läßt. Durch den Einsatz dieser sogenannten Duocaline in verschiedenen Bindungstest sollte gezeigt werden, daß beide Anticaline auch als Fusionsprotein ihre individuellen Bindungseigenschaften besitzen. Für diese Versuche wurde die Fluorescein bindende BBP-Variante FluA aus früheren Arbeiten (Beste *et al.*, 1999) ausgewählt, die mit den Anticalinen DigA16 bzw. DigA16/19 fusioniert wurde (Abschnitt 3.6).

Bei der gentechnischen Produktion der Duocaline FluA-DigA16 bzw. FluA-DigA16/19 zeigte sich allerdings, daß die Proteinpräparationen einen nicht unerheblichen Anteil an Disulfidisomeren aufwiesen. Dieses Verhalten, das bei der Produktion der monomeren Anticaline FluA, DigA16 und DigA16/19 nicht beobachtet wurde, war höchstwahrscheinlich auf die räumliche Nähe der Disulfidbindung am C-Terminus des Fusionspartners FluA mit der Disulfidbindung am N-Terminus des Digoxigenin bindenden Anticalins im Fusionsprotein zurückzuführen.

Dadurch bedingt war offenbar die Ausbildung unkorrekter Cystin-Brücken zwischen einigen der insgesamt acht Cystein-Reste begünstigt.

Die Bindungseigenschaften der gentechnisch produzierten Duocaline FluA-DigA16 und FluA-DigA16/19 wurden durch Fluoreszenztitrationsexperimente im Hinblick auf ihre zweifache Bindungsaktivität charakterisiert (Abschnitt 3.6.3). Hierzu wurde die Proteinfluoreszenz der bispezifischen Fusionsproteine in Abhängigkeit von der Konzentration der zugegebenen Liganden Digoxigenin sowie Fluorescein gemessen. Dabei konnte die Fluoreszenz beider Proteine durch Zugabe von Digoxigenin bis zu einem Sättigungswert gelöscht werden, der auch durch Zugabe weiteren Digoxigenins nicht unterschritten wurde. Erst nachdem Fluorescein zu den Proteinlösungen gegeben wurde, nahm die Proteinfluoreszenz erneut ab und erreichte ein zweites Fluoreszenz-Plateau. Die eingesetzten Fusionsproteine komplexierten nacheinander Digoxigenin und Fluorescein und wiesen somit beide Bindungsfunktionalitäten auf. Der Effekt könnte jedoch auch durch die mögliche Existenz zweier unterschiedlicher Populationen innerhalb der Proteinpräparation erklärt werden, von denen eine das Digoxigenin und die andere das Fluorescein als Liganden komplexiert.

Für eine nähere Charakterisierung der bispezifischen Bindungseigenschaften wurden die Fusionsproteine daher auch in ELISA-Experimenten mit immobilisiertem Digoxigenin eingesetzt (Abschnitt 3.6.2). Gebundenes Duocalin wurde hierbei mit Fluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Die beobachtete Bindungsaktivität belegte dabei, daß die eingesetzten Duocaline tatsächlich bispezifische Bindungsproteine mit unabhängigen Liganden-Bindungsfunktionen darstellen und nicht etwa zwei unterschiedliche Proteinpopulationen für die in den Fluoreszenztitrationen beobachtete doppelte Bindungsaktivität verantwortlich sind.

Ein möglicher Grund für die nur schwachen Bindungssignale in den ELISA-Experimenten könnte in der vergleichsweise geringen Affinität des Anticalins FluA zu seinem Liganden Fluorescein zu finden sein. Während die apparente Dissoziationskonstante des FluA/Fluorescein-Komplexes im ELISA – in Abhängigkeit vom verwendeten Trägerprotein – nur ca. 0,5 bis 1 μM beträgt (Beste, 1998), ist die Affinität für den DigA16/Digoxigenin-Komplex um den Faktor zehn höher (Abschnitt 3.3.5). Wegen der schwächeren Bindungswechselwirkung von FluA mit Fluorescein konnte möglicherweise an der derivatisierten Matrix immobilisiertes Duocalin durch Fluorescein-Alkalische Phosphatase-Konjugat nicht quantitativ nachgewiesen werden. Vermutlich dissoziierte der zunächst gebildete Komplex zwischen FluA und der derivatisierten Alkalischen Phosphatase im Verlauf der Waschschrte partiell, wodurch ein Teil des markierten Enzyms abgetrennt wurde und nicht mehr für die chromogene Reaktion zur Verfügung stand.

Die niedrigere Affinität des FluA zu seinem Liganden Fluorescein könnte auch die Ergebnisse, die bei der Durchführung des ELISAs mit einem invertierten Aufbau erhalten wurden,

erklären. Wurde die Mikrotiterplatte mit verschiedenen Fluorescein-derivatisierten Trägerproteinen beschichtet und gebundenes FluA-DigA16-Fusionsprotein anschließend mit digoxigener Alkalischer Phosphatase detektiert, konnte in keinem Fall ein Bindungssignal beobachtet werden. Offensichtlich wurde der zunächst gebildete schwache Komplex zwischen Fluorescein und dem bispezifischen Fusionsprotein im Verlauf des ELISAs während der Waschschrte wieder gelöst (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Ursache für die im ELISA-Experiment mit immobilisierten Digoxigenin-Gruppen beobachteten schwachen Bindungssignale ist vermutlich durch die Existenz der Disulfid-isomere in den Proteinpräparationen bedingt. Durch unkorrekte Ausbildung der Disulfidbrücken bei der Produktion der Fusionsproteine kommt es teilweise zu fehlerhafter Proteinfaltung und somit höchstwahrscheinlich zu einem Verlust der Bindungsaktivität. Aus diesem Grund ist vermutlich nur ein Teil des eingesetzten Fusionsproteins zur Komplexierung eines oder beider Liganden befähigt und daher die apparente Proteinkonzentration an funktionellem Fusionsprotein deutlich vermindert. Die im ELISA-Experiment gefundenen etwas höheren Bindungssignale von FluA-DigA16/19 im Vergleich zum FluA-DigA16 spiegelt die höhere Affinität des DigA16/19 zum Digoxigenin wieder. Möglicherweise war aber auch der Anteil an funktionellem Protein in der Proteinpräparation höher.

Somit konnte gezeigt werden, daß sich bifunktionelle Bindungsproteine prinzipiell auch durch die Fusion zweier Anticaline mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten herstellen lassen. Das hier verwendete Konstrukt ist jedoch aufgrund der Ausbildung von Disulfidisomeren im Verlauf der gentechnischen Produktion noch nicht optimal für den praktischen Einsatz geeignet. Möglicherweise läßt sich das Problem durch die Verwendung eines längeren *Spacers* anstelle des verwendeten Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-*Linkers* umgehen. Auch eine Aminosäuresequenz mit starrer Sekundärstruktur, z. B. eine α -Helix, könnte einen Kontakt zwischen den sensiblen Cystein-Resten verhindern und so die Ausbildung von Disulfidisomeren unterbinden. Darüber hinaus könnte auch die Produktion der Duocaline in eukaryontischen Expressionssystemen zu Proteinpräparationen mit einem einheitlichen Muster von Disulfidbrücken führen, da solche Systeme in dieser Hinsicht eine höhere Effizienz aufweisen (Verma *et al.*, 1998). Das Problem könnte auch auf elegante Weise durch die Eliminierung zumindest einer der beiden Cystinbrücken in jedem der Anticaline umgangen werden. Viele der natürlichen Lipocaline besitzen im Gegensatz zum BBP nur eine Disulfidbrücke, und frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, daß die Entfernung von Cystein-Resten durch ortsgerichtete Mutagenese – beispielsweise im Falle des RBP – zu funktionellen Lipocalin-Varianten führen kann (Kotischke, 1994; Skerra, 2000b).

4.6 Anticaline als Klasse neuartiger Bindungsproteine mit antikörperartigen Eigenschaften

Neben den natürlichen Antikörpern, die in der Medizin und den Biowissenschaften weite Verbreitung gefunden haben, sind mit dem Aufkommen evolutiver proteinchemischer Methoden, vor allem des *Phage Display* (Smith, 1985a; McCafferty *et al.*, 1990), auch maßgeschneiderte Bindungsproteine auf Basis rekombinanter Immunglobuline zugänglich geworden. Gleichzeitig wurden jedoch die intrinsischen Nachteile deutlich, die die Verwendung von Antikörpern und ihren Fragmenten mit sich bringen. Neben ihrer Größe – das kleinste antigenbindende Fragment, das F_v-Fragment, besteht aus immerhin ca. 250 Aminosäuren – wirkt sich in der Praxis vor allem die Zusammensetzung aus verschiedenen Polypeptidketten ungünstig aus. Sie bedingt komplizierte Klonierungsschritte, um eine gleichzeitige gentechnische Produktion der leichten und schweren Ketten in *E. coli* zu ermöglichen (Skerra, 1993). Zusätzlich sind sechs hypervariable Proteinregionen an der Ausbildung der Antigen-Spezifität beteiligt, was eine simultane Manipulation für die Herstellung künstlicher Bibliotheken erschwert.

Aus diesem Grund wurden in der jüngeren Vergangenheit eine Reihe von Proteinen und Proteindomänen auf ihre Eignung zur Herstellung künstlicher Bindungsproteine untersucht (Nygren & Uhlén, 1997; Skerra, 2000a). Prinzipiell sollten Kandidaten für die Generierung artifizierender Bindungsproteine hoch-variable Oberflächenstrukturen besitzen, deren Abwandlung nicht zu einem Verlust der Molekülstruktur oder einer wesentlichen Beeinträchtigung der Proteinfaltung führt (Ku & Schultz, 1995). Aus praktischen Erwägungen sollte es sich dabei weiterhin um kleine, robuste und monomere Polypeptide handeln, die sich auf gentechnischem Weg effizient in prokaryontischen Expressionssystemen produzieren lassen (Nord *et al.*, 1997). Neben den TIM-Barrel-Enzymen (Miles & Davies, 2000), die aus einem strukturell konservierten (β/α)₈-Supersekundär-Strukturelement bestehen, erfüllen vor allem die Mitglieder der Lipocalin-Proteinfamilie die Voraussetzung einer rigiden Gerüststruktur mit davon strukturell unabhängiger Liganden-Bindungsstelle bzw. aktivem Zentrum.

Keines der bisher eingesetzten Protein-*Scaffolds* hatte die Erzeugung von Bindungstaschen für kleine haptentartige Moleküle erlaubt. Beispielsweise hatten Ku und Schultz (1995) bei der Durchmusterung einer Zufallsbibliothek des Vier-Helix-Bündel-Proteins Cytochrom *b*₅₆₂ gegen ein Nitrobenzylamin-Derivat lediglich Protein-Varianten selektieren können, die den Liganden im Kontext mit dem Trägerprotein BSA komplexieren konnten. Voraussetzung für die Komplexierung kleiner Liganden ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Kavitäten mit geeigneten Abmessungen. Dieses Erfordernis wird sogar durch die Struktur der Immunglobuline nur teilweise erfüllt (Weiss & Lowman, 2000). Die Lipocaline hingegen besitzen natürliche Bindungstaschen, die im Verlauf der Evolution bereits für die Komplexierung kleiner Liganden optimiert wurden.

Das Bilin-Bindungsprotein bildete daher auch die Grundlage der vorliegenden Arbeit, in der die Herstellung eines künstlichen Lipocalins mit artifizieller Bindungsaktivität für Digoxigenin angestrebt wurde. Dabei sollte untersucht werden, ob sich die Bindungstasche des Lipocalins drastisch umgestalten läßt, ohne dessen Faltungseigenschaften als globuläres Protein wesentlich zu beeinträchtigen. Dazu wurde eine von Beste (1998) stammende Bibliothek, die durch die gerichtete Zufallsmutagenese an insgesamt 16 Aminosäurepositionen in der natürlichen Bindungstasche des BBP erhalten worden war, auf Digoxigenin-spezifische Varianten durchmustert. Die Tatsache, daß es in der daraufhin isolierten Variante DigA an fast allen randomisierten Positionen zu einem Aminosäureaustausch gekommen war, deutete darauf hin, daß wahrscheinlich keiner der Reste für die Proteinfaltung essentiell ist.

Dies wird durch die vorangegangene erfolgreiche Selektion von drei Fluorescein-bindenden Anticalinen aus derselben Bibliothek gestützt, die an keiner der randomisierten Positionen eine Konservierung der ursprünglichen Aminosäuren zeigten (Beste, 1998). CD-spektroskopische Untersuchungen mit BBP, DigA und den affinitätsoptimierten Varianten DigA16 und DigA16/19 ergaben zudem, daß alle BBP-Varianten eine einheitliche Sekundärstruktur besitzen und sich somit höchstwahrscheinlich durch eine stabile und korrekt gefaltete β -Barrel-Gerüststruktur auszeichnen (Abschnitt 3.5). Alle Digoxigenin bindenden Varianten besitzen eine höhere Denaturierungstemperatur als das BBP. Die gemessenen T_m -Werte der Varianten von 62,5 °C bis 72,8 °C kommen den Denaturierungstemperaturen thermophiler Proteine nahe, obgleich der natürliche Wirt des BBP ein mesophiler Organismus ist. Denaturierungsstudien zeigten darüber hinaus, daß DigA16 eine im Vergleich zum Wildtyp-BBP um 4,6 kJ mol⁻¹ (bei thermischer Denaturierung) bzw. 3,2 kJ mol⁻¹ (bei chemischer Denaturierung) erhöhte Denaturierungsenthalpie aufweist (Abschnitt 3.5.2 bzw. 3.5.3). Somit hatte der Austausch von insgesamt 15 Resten im DigA, 17 Aminosäuren in DigA16 sowie 19 Aminosäuren in DigA16/19 zu keiner Destabilisierung der nativen Proteinfaltung geführt. Die Proteinarchitektur des Bilin-Bindungsproteins liefert also ein stabiles *Scaffold* zur Erzeugung unterschiedlicher Bindungstaschen und Liganden-Erkennungsfunktionalitäten.

Neben Digoxigenin und Fluorescein bindenden Varianten konnten aus der eingesetzten Zufallsbibliothek auch Mutanten mit Affinität zu Testosteron (Keller, 1997), einem His₆/Ni(II)-Komplex (Weichel, 1997) und Koffein (Preuß, 1999) isoliert werden. Die Vielfalt der gefundenen Spezifitäten, die durch die Randomisierung der sechzehn Aminosäure-Reste generiert werden konnten, unterstreicht daher die sinnvolle Auswahl der Zufallspositionen in funktioneller Hinsicht.

Die Eigenschaft des stabilen β -Barrel Proteingerüsts als Basis für die Ausbildung unterschiedlicher molekularer Bindungstaschen ist vermutlich nicht auf die Bindung kleiner haptentartiger Moleküle beschränkt. Durch Randomisierung an der Proteinoberfläche exponierter Aminosäurepositionen könnten ausgedehnte molekulare Oberflächen generiert werden, die

auch makromolekulare Antigene komplexieren können. Auch einige natürliche Lipocaline sind in der Lage, Biomakromoleküle zu binden. Das Retinol-Bindungsprotein zum Beispiel bildet einen stabilen Komplex mit Transthyretin (Präalbumin), an dessen Ausbildung die Peptidschleifen am offenen Ende des β -Barrels involviert sind (Monaco *et al.*, 1995).

Im Bezug auf die Liganden-Bindung zeigen die Digoxigenin-spezifischen Anticaline DigA16 und DigA16/19 Eigenschaften, die zuvor in der Regel Antikörpern zugeschrieben wurden. Die nanomolaren Dissoziationskonstanten zum Modellhapten entsprechen dabei den bekannten Affinitäten von Immunglobulinen aus der zweiten Immunantwort. Demgegenüber sind die Affinitäten deutlich höher, als sie z. B. beim Retinol-Bindungsprotein für dessen natürlichen Liganden Vitamin A mit $0,21 \mu\text{M}$ gefunden wurden (Cogan *et al.*, 1976). Auch der Komplex aus dem Epididymalen Retinsäure-Bindungsprotein und Retinsäure besitzt eine deutlich höhere Dissoziationskonstante von $0,9 \mu\text{M}$ (Sundaram *et al.*, 1998). Die geringere Affinität dieser Lipocaline ist durch ihre Funktion als Transportproteine für Retinol bzw. Retinsäure bedingt und erlaubt die reversible Komplexierung der Liganden unter physiologischen Bedingungen. Die Komplexbildungskonstante zwischen BBP und Biliverdin IX γ ist aufgrund der chemischen Instabilität des Tetrapyrrols nicht bekannt.

Prinzipiell sollten sich die Affinitäten der Anticaline DigA16 und DigA16/19 zu ihren Liganden weiter bis in den pikomolaren Bereich verbessern lassen. Hierzu könnten weitere Zyklen der Affinitätsmaturierung, eventuell auch unter Einbeziehung von Aminosäurepositionen innerhalb der Bindungstasche, dienlich sein. Als alternative Methode zur Erhöhung der Affinität könnte die für die Affinitätsreifung eines Digoxin-spezifischen Antikörperfragments beschriebene *in vitro Scanning Saturation*-Mutagenese eingesetzt werden (Burks *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). Diese Methode macht durch die Kombination von PCR-Mutagenese, *in vitro*-Transkription/Translation und anschließendem ELISA die schnelle und parallele Produktion und Durchmusterung vieler Protein-Varianten möglich. Die Autoren konnten zeigen, daß auf diese Weise mit vertretbarem Aufwand alle zehn für die Digoxin-Spezifität eines F $_v$ -Fragmentes verantwortlichen Aminosäurepositionen durch die übrigen neunzehn möglichen Aminosäuren ersetzt und die resultierenden Mutanten funktionell analysiert werden konnten.

Die Anticaline besitzen antikörperartige Bindungseigenschaften sowohl in Bezug auf die Selektivität als auch auf die erreichbare Affinität. Möglicherweise könnten die Digoxigenin-spezifischen BBP-Varianten DigA16 und DigA16/19 als Kandidaten für eine Therapie akuter toxischer Überkonzentrationen an Digoxin in Betracht gezogen werden. Diese lebensbedrohliche Situation kann in Folge falscher Dosierung des Herzglycosids, z. B. im Rahmen einer Therapie von Herzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen, entstehen. Der Ursprung des Proteins aus einem Insekt und die damit einhergehende potentielle Immunogenität sollte aufgrund der üblicherweise seltenen Indikation zur Gabe eines Digoxin-neutralisierenden Therapeutikums nur eine untergeordnete Rolle spielen. Auch die zur Behandlung von Dig-

oxin-Vergiftungen eingesetzten Digoxin-spezifischen Antikörper, die die Serumkonzentration der cardioaktiven Steroide durch spezifische Komplexierung absenken, sind nicht humaner Natur, sondern wurden aus Mäusen isoliert (Mudgett-Hunter *et al.*, 1982; 1985).

Zur Vermeidung von immunogenen Nebenwirkungen im Rahmen einer wiederholten medizinischen Anwendung sollten sich Anticaline auf Grundlage humaner Lipocaline wie z. B. dem Apolipoprotein D (Rassart *et al.*, 2000), dem Tränen-Lipocalin (Redl, 2000), der Prostaglandin D Synthase (β -Trace-Protein; Urade *et al.*, 1989; Urade & Hayaishi, 2000) oder dem α_1 -Microglobulin (Protein HC; Åkerström *et al.*, 2000) einsetzen lassen. Allerdings stellt die Lösung der dreidimensionalen Protein-Struktur eine wesentliche Voraussetzung für die sinnvolle Auswahl der Zufallspositionen zur Generierung geeigneter Zufallsbibliotheken dar.

Neben den beschriebenen immunglobulinartigen Bindungseigenschaften bieten die Anticaline den Vorteil geringer Größe, der sie aufgrund der damit zu erwartenden verbesserten Gewebepenetration vor allem für die *in vivo* Diagnostik und sogar die Humantherapie als geeignet erscheinen läßt. Gerade in der Tumorthherapie ist die Verwendung möglichst kleiner Bindungsproteine für die Markierung des entarteten Gewebes und die gezielte Adressierung von Medikamenten wünschenswert (Chester & Hawkins, 1995).

Ein weiterer Vorteil gegenüber Antikörpern, deren Amino-Termini in unmittelbarer Nähe zur Antigen-Bindungsstelle liegen, ist die Möglichkeit, sowohl den N- als auch den C-Terminus der Anticaline zur Herstellung von Fusionsproteinen einsetzen zu können. Durch Kopplung mit dem Strukturgen eines Reporterenzym sind auf einfache Weise neuartige Nachweisreagenzien zugänglich, die direkt in immunchemischen Anwendungen einsetzbar sind. Darüber hinaus lassen sich Duocaline mit unterschiedlichen Bindungsfunktionalitäten elegant auf gentechnischem Weg produzieren. Die entsprechende Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente ist aufgrund der heterodimeren Protein-Organisation erheblich erschwert (Plückthun & Pack, 1997).

In der Summe ihrer Eigenschaften stellen die Anticaline eine ernstzunehmende Alternative zu den bislang als universelle Bindungsmoleküle angesehenen Antikörpern dar. In dieser Arbeit konnte die praktische Eignung der Anticaline für den Nachweis niedermolekularer Substanzen in verschiedenen biochemischen Testsystemen bewiesen und ihr Potential als nützliche Hilfsmittel in der Bioanalytik aufgezeigt werden. Basierend auf humanen Lipocalin-Strukturen könnten Anticaline zukünftig auch in der Medizin eingesetzt werden und somit das Spektrum der Antikörper-basierten Therapeutika um eine vielversprechende Molekülklasse erweitern.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Bilin-Bindungsprotein (BBP), ein Mitglied der Lipocalin-Proteinfamilie, strukturell derart umgestaltet werden kann, daß es das cardioaktive Steroid Digoxigenin, welches neuerdings zunehmend auch in der Bioanalytik zur nicht-radioaktiven Markierung von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzt wird, als Liganden erkennt.

Innerhalb der vier Peptidschleifen, die den Eingang zur Bindungstasche des BBP für seinen natürlichen Liganden, Biliverdin IX γ , ausbilden, wurden insgesamt sechzehn Aminosäuren einer Zufallsmutagenese unterworfen. Die resultierende Bibliothek wurde zur Selektion Digoxigenin bindender Varianten mittels *Phage Display* an einer mit Digoxigenin funktionalisierten Polystyroloberfläche eingesetzt. Die selektierten BBP-Varianten wurden zur Untersuchung ihrer individuellen Liganden-Bindungseigenschaften einem Kolonie-Filterstapel-Test unterzogen. Hierfür wurde ein spezialisierter Vektor konstruiert, der die Sekretion der Lipocalin-Varianten als Fusionsprotein mit einer bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD) am C-Terminus erlaubt. So ausgestattet konnten die rekombinanten Proteine – nach Exkretion aus den *E. coli*-Kolonien – auf der Oberfläche einer mit humanem Serumalbumin beschichteten Membran örtlich immobilisiert und anschließend auf ihre Affinität zu Digoxigenin funktionell untersucht werden. Auf diese Weise wurde das Anticalin DigA isoliert, welches an fünfzehn der insgesamt sechzehn randomisierten Positionen eine vom Wildtyp-BBP verschiedene Aminosäure aufwies. Das in *E. coli* löslich produzierte und gereinigte Protein komplexierte Digoxigenin selektiv mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 295 ± 37 nM.

Zum Zweck einer *In vitro*-Affinitätsmaturierung wurde ausgehend von DigA durch ortsgerichtete Randomisierung der ersten Peptidschleife eine weitere Molekülbibliothek hergestellt und mittels *Phage Display* der Selektion auf Digoxigenin-Bindung mit funktionalisierten paramagnetischen Partikeln unterworfen. Nach anschließendem Kolonie-Filterstapel-Test wurde das Anticalin DigA16 isoliert. Das in *E. coli* produzierte Protein wurde einer detaillierten Analyse der Bindungseigenschaften durch Fluoreszenztitration mit verschiedenen Liganden unterzogen. DigA16 besitzt zehnmal höhere Affinität für die Digoxigenin-Gruppe mit einer K_D von $30,2 \pm 3,6$ nM. Die molekulare Erkennung erwies sich dabei als unabhängig vom jeweiligen Substituenten an der Position C-3 des Steroid-Rings, was auch in ELISA-Experimenten bestätigt werden konnte. Digitoxigenin, das sich von Digoxigenin nur durch eine fehlende Hydroxylgruppe an der Position C-12 des Steroid-Gerüsts unterscheidet, wird mit einer K_D von $2,0 \pm 0,52$ nM, also nochmals deutlich höherer Affinität, komplexiert. Dagegen werden 4-Aminofluorescein sowie die dem Digoxigenin strukturell sehr ähnlichen Steroide Testosteron und Ouabain nicht gebunden. Lediglich Progesteron wird mit einer noch nachweisbaren K_D von ca. $0,1$ μ M komplexiert.

Für den Versuch einer weiteren Verbesserung der Affinität wurden nun ausgehend von DigA16 durch Zufallsmutagenese in den Schleifenbereichen Nr. 3 und 4 zwei weitere Molekülbibliotheken hergestellt und gemeinsam zur Affinitätsanreicherung eingesetzt. Von den acht nach dem Kolonie-Filterstapel-Test isolierten unterschiedlichen BBP-Varianten, von denen sieben aus derjenigen Bibliothek mit der randomisierten Schleifenregion Nr. 4 stammten, wurden die Bindungseigenschaften des Anticalins DigA16/19 durch Fluoreszenztitration näher untersucht. Hierbei zeigte sich, daß sich die Affinität zu Digoxigenin mit einer K_D von $12,4 \pm 1,3$ nM im Vergleich zu DigA16 nochmals mehr als verdoppelt hatte, während die K_D für Digitoxigenin nahezu unverändert geblieben war. Die Glycosid-Derivate der beiden Steroide, Digoxin bzw. Digitoxin, werden durch DigA16/19 allerdings beide etwa viermal schlechter komplexiert als die entsprechenden Aglycone, was zeigt, daß dieses Anticalin im Gegensatz zu DigA16 zwischen den Substituenten an der Position C-3 des Steroidgerüsts unterscheiden kann.

Die BBP-Varianten DigA16 und DigA16/19 wurden zusammen mit dem aus früheren Arbeiten des Labors stammenden Fluorescein-bindenden FluA für die Konstruktion sogenannter Duocaline eingesetzt, einer neuen Klasse von Fusionsproteinen, die aus zwei Anticalinen mit unterschiedlicher Liganden-Spezifität besteht. Die in *E. coli* produzierten Fusionsproteine zeigten im ELISA wie auch in Fluoreszenztitrations-Experimenten die Fähigkeit, sowohl Digoxigenin als auch Fluorescein zu komplexieren. Somit wurde gezeigt, daß Duocaline bispezifische Rezeptorproteine mit zwei unabhängigen Bindungsfunktionen darstellen.

Die Anticaline DigA16 und DigA16/19 wurden auch mit der bakteriellen Alkalischen Phosphatase (PhoA) fusioniert – sowohl am C- als auch am N-Terminus – und die gentechnisch produzierten Proteine wurden zum Nachweis der Digoxigenin-Gruppe in ELISA-Experimenten und im *Western Blot* eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die bifunktionellen Fusionsproteine zur Detektion der Digoxigenin-Gruppe mit konventionellen chromogenen Substanzen einsetzen lassen. Aus den Experimenten wurde weiterhin ersichtlich, daß sich beide Polypeptidtermini der Anticaline in vergleichbarer Weise zur Fusionierung mit anderen Proteinen eignen.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit einerseits der Einsatz der Anticaline als praktisch anwendbares Nachweisreagenz für niedermolekulare Substanzen und andererseits ihre Eignung zur Konstruktion bispezifischer Bindungsproteine demonstriert. Aufgrund ihrer gegenüber den Antikörpern vorteilhaften Eigenschaften, wie der geringeren Größe und ihrer Zusammensetzung aus nur einer einzigen Polypeptidkette, stellen die Anticaline neuartige attraktive Reagenzien vor allem für die Bioanalytik und Diagnostik dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

BBP	Bilin-Bindungsprotein
Bla	β -Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
c	Konzentration
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
CIP	<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>
$\Delta\Delta pIII$	Aminosäuren 198 bis 406 umfassendes Segment des Phagenhüllproteins pIII
DsbC	Bakterielle Disulfidisomerase C
E	Extinktion
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
F	Fluoreszenzintensität
F_{ab}	Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulins
F_v	Immunglobulinfragment bestehend aus den beiden variablen Domänen
f_x	molare Fluoreszenz eines Moleküls oder Komplexes X
g	Erdbeschleunigung
ΔG	Änderung der Freien Reaktionsenthalpie
I	Lichtintensität
K_D	Komplexdissoziationskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
moi	<i>Multiplicity of Infection</i>
M_R	Molekülmasse
MRW	<i>Mean Residue Weight</i>
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i>
pIII	Hüllprotein des filamentösen Bakteriophagen M13
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pfu	<i>Plaque Forming Units</i>
PhoA	bakterielle Alkalische Phosphatase
Θ	Elliptizität
Q_{max}	Maximale Fluoreszenzlöschung
RNase A	Ribonuclease A
rpm	<i>Rounds per Minute</i>

RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T_m	Schmelztemperatur
u	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

7 Literatur

- Åkerström, B., Nielsen, E. & Björck, L.** (1987) Definition of the IgG- and the albumin-binding regions of streptococcal protein G. *J. Biol. Chem.* **262**, 13388-13391.
- Åkerström, B., Lögdberg, L., Beggård, T., Osmark, P. & Lindqvist, A.** (2000) α_1 -Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 172-184.
- Andersen, J.F., Weichsel, A., Balfour, C.A., Champagne, D.E. & Montfort, W.R.** (1998) The crystal structure of nitrophorin 4 at 1.5 Å resolution: transport of nitric oxide by a lipocalin-based heme protein. *Structure* **6**, 1315-1327.
- Armstrong, J., Perham, R.N. & Walker, J.E.** (1981) Domain structure of bacteriophage fd adsorption protein. *FEBS Lett.* **135**, 167-172.
- Barbas, C.F., III, Bain, J.D., Hoekstra, D.M. & Lerner, R.A.** (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4457-4461.
- Bass, S., Greene, R. & Wells, J.A.** (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8**, 309-314.
- Beatty, J.D., Beatty, B.G. & Vlahos, W.G.** (1987) Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods* **100**, 173-179.
- von Behring, E. & Kitasato, S.** (1890) Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **16**, 1113-1114.
- Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R.W.** (Eds), *Circular Dichroism, Principles and Applications*, Wiley-VCH, New York 2000.
- Beste, G.** (1998) Evolutive Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β -Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. & Skerra, A.** (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1898-1903.
- Bianchet, M.A., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S.H., Monaco, H.L. & Amzel, L.M.** (1996) The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nature Struct. Biol.* **3**, 934-939.
- Bishop, R.E. & Weiner, J.H.** (1996) "Outlier" lipocalins more than peripheral. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 127.

- Bishop, R.E.** (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 73-83.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Bloch, W.** (1991) A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30**, 2735-2747.
- Böcskei, Z., Groom, C.R., Flower, D.R., Wright, C.E., Phillips, S.E.V., Cavaggioni, A., Findlay, J.B.C. & North, A.C.T.** (1992) Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* **360**, 186-189.
- Boeke, J.D., Model, P. & Zinder, N.D.** (1982) Effects of bacteriophage ϕ 1 gene III protein on the host cell membrane. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 185-192.
- Bradbury, A., Persic, L., Werge, T. & Cattaneo, A.** (1993) Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology* **11**, 1565-1569.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C. & Sawyer, L.** (1997) Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution – still an enigmatic lipocalin. *Structure* **5**, 481-495.
- Bugos, R.C., Hieber, A.D. & Yamamoto, H.Y.** (1998) Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 15321-15324.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Burks, E.A., Chen, G., Georgiou, G. & Iverson, B.L.** (1997) *In vitro* scanning saturation mutagenesis of an antibody binding pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 412-417.
- Cavaggioni, A., Sorbi, R.T., Keen, J.N., Pappin, D.J.C. & Findlay, J.B.C.** (1987) Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and *major urinary proteins*. *FEBS Lett.* **212**, 225-228.
- Chaudhuri, B.N., Kleywegt, G.J., Bjorkman, J., Lehman-Mckeeman, L.D., Oliver, J.D. & Jones, T.A.** (1999) The Crystal Structures of Alpha2U-Globulin and its Complex with a Hyaline Droplet Inducer. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 753-762.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H.** (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.

- Chen, G., Dubrawsky, I., Mendez, P., Georgiou, G. & Iverson, B.L.** (1999) *In vitro* scanning saturation mutagenesis of all the specificity determining residues in an antibody binding site. *Protein Eng.* **12**, 349-356.
- Chester, K.A. & Hawkins, R.E.** (1995) Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* **13**, 294-300.
- Chevalier, J., Yi, J., Michel, O. & Tang, X.M.** (1997) Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy *in situ* hybridization probes: where do we stand? *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 481-491.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G.** (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628.
- Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S. & Shinitzky, M.** (1976) Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **65**, 71-78.
- Cohen, D.S. & Pielak, G.J.** (1994) Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. *Protein Sci.* **3**, 1253-1260.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L.** (1972) A rapid and convenient method for the preparing and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3580.
- Coles M., Diercks T., Muehlenweg B., Bartsch, S., Zoelzer, V., Tschesche, H. & Kessler, H.** (1999) The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J. Mol. Biol.* **289**, 139-157.
- Cowan, S.W., Newcomer, M.E. & Jones, T.A.** (1990) Crystallographic refinement of human serum retinol-binding protein at 2 Å resolution. *Proteins* **8**, 44-61.
- Crothers, D.M. & Metzger, H.** (1972) The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry* **9**, 341-357.
- Cuatrecasas, P.** (1970) Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem* **245**, 3059-3065.
- Devereux, J., Haerberli, P. & Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Dixon, R.A. & Chopra, I.** (1986) Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 787-788.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127.
- Essen, L.O. & Skerra, A.** (1994) The *de novo* design of an antibody combining site: crystallographic analysis of the V_L domain confirms the structural model. *J. Mol. Biol.* **238**, 226-244.

- Evans D.J. Jr, Evans D.G., Richardson S.H. & Gorbach S.L.** (1976) Purification of the polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis. (United States)* **133**, 97-102.
- Fanger, M.W., Morganelli, P.M. & Guyre, P.M.** (1992) Bispecific antibodies. *Crit. Rev. Immunol.* **12**, 101-124.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88.
- Flower, D.R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**, 1-14.
- Flower, D.R., North, A.C.T. & Sansom, C.E.** (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9-24.
- Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W.D., Huber, R. & Bode, W.** (1997) Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11845-11850.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P.** (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *Biotechniques* **5**, 786-791.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Goetz, D.H., Willie, S.T., Armen, R.S., Bratt, T., Borregaard, N. & Strong, R.K.** (2000) Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* **39**, 1935-1941.
- Goldberg, M.E. & Djavadi-Ohanian, L.** (1993) Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 278-281.
- Griffiths, A.D., Malmquist, M., Marks, J.D., Bye, J.M., Embleton, M.J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K.P., Gorick, B.D., Hughes-Jones, N.C., Hoogenboom, H.R. & Winter, G.** (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* **12**, 725-734.
- 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., Prospero, T.D., Hoogenboom, H.R., Nissim, A., Cox, J.P.L., Harrison, J.L., Zaccolo, M., Gherardi, E. & Winter, G.** (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* **13**, 3245-3260.

- Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlén, M., Freij, A.-K., Jörnvall, H., Flock, J.-I. & Lindberg, M.** (1986) Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* **5**, 1567-1575.
- Hanes, J. & Plückthun, A.** (1997) *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4937-4942.
- Hastreiter, A.R., John, E.G. & van der Horst, R.L.** (1988) Digitalis, digitalis antibodies, digitalis-like immunoreactive substances, and sodium homeostasis: a review. *Clin. Perinatol.* **15**, 491-522.
- Hauptman, P.J. & Kelly, R.A.** (1999) Digitalis. *Circulation* **99**, 1265-70.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J. & Winter, G.** (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity: mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226**, 889-896.
- He, X.M. & Carter, D.C.** (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209-215.
- Heinrich, P.** (1987) Klonierung und Sequenzierung von Rifampicin-Resistenzgenen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hengen, P.N.** (1996) Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 75-76.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C. & Yamamoto, H.Y.** (2000) Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 84-91.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel chelate adsorbent. *Biotechnology* **6**, 1321-1325.
- Höltke, H.J., Ankenbauer, W., Mühlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R. & Walter, T.** (1995) The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids-an overview. *Cell. Mol. Biol.* **41**, 883-905.
- Hoess, R.H.** (1993) Phage display of peptides and protein domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 572-579.
- Holden, H.M., Rypniewski, W.R., Law, J.H. & Rayment, I.** (1987) The molecular structure of insecticyanin from the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. at 2.6 Å resolution. *EMBO J.* **6**, 1565-1570.
- Holden, H.M., Law, J.H. & Rayment, I.** (1986) Crystallization of insecticyanin from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. in a form suitable for a high resolution structure determination. *J. Biol. Chem.* **261**, 4217-4218.

- Hoogenboom, H.R.** (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* **15**, 62-70.
- Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. & Winter, G.** (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4133-4137.
- Huber, R., Schneider, M., Epp, O., Mayr, I., Messerschmidt, A., Pflugrath, J. & Kayser, H.** (1987a) Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*. *J. Mol. Biol.* **195**, 423-434.
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Müller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H.** (1987b) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 499-513.
- Jeffrey, P.D., Strong, R.K., Sieker, L.C., Chang, C.Y., Campbell, R.L., Petsko, G.A., Haber, E., Margolies, M.N. & Sheriff, S.** (1993) 26-10 F_{ab}-digoxin complex: Affinity and specificity due to surface complementarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10310-10314.
- Jeffrey, P.D., Schildbach, J.F., Chang, C.Y., Kussie, P.H., Margolies, M.N. & Sheriff, S.** (1995) Structure and specificity of the anti-digoxin antibody 40-50. *J. Mol. Biol.* **248**, 344-360.
- Johnson, W.C., Jr.** (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 145-166.
- Kay, B.K., Winter, J. & McCafferty, J.** (1996) Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual. Academic Press, San Diego.
- Kayser, H.** (1984) *De novo* synthesis and levels of cytochrome c and a biliprotein during pupal-adult development of a butterfly, *Pieris brassicae*. *Z. Naturforsch.* **39c**, 938-947.
- Kayser, H.** (1985) Pigments, in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Kerkut, G.A. & Glibert, L.I., eds.) vol. 10, pp. 367-415, Pergamon Press, New York.
- Keller, T.** (1997) Engineering des Bilin-Bindungsproteins für die Bindung von Testosteron. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie der Technischen Hochschule, Darmstadt.
- Kikuchi, G. & Yoshida, T.** (1980) Heme degradation by the microsomal heme oxygenase system. *Trends Biochem. Sci.* **5**, 323-325.

- Kim, E.E. & Wyckoff, H.W.** (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. *J. Mol. Biol.* **218**, 449-464.
- Knappik, A., Liming, G., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.** (2000) Fully synthetic human combinatorial libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* **296**, 57-86.
- Köhler, G. & Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- König, T. & Skerra, A.** (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83.
- Kotischke, K.** (1994) Protein Design am Retinol-Bindungsprotein. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Kraulis, P.J.** (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
- Kretzschmar, T., Zimmermann, C. & Geiser, M.** (1995) Selection procedures for non-matured phage antibodies: a quantitative comparison and optimization strategies. *Anal. Biochem.* **224**, 413-419.
- Ku, J. & Schultz, P.G.** (1995) Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6552-6556.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Ladner, R.C.** (1996) Display and selection of proteins on genetic packages. In: *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual* (Kay, B.K., Winter, J. & McCafferty, J., eds.) Academic Press, San Diego, chapter 11, 155-156.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lascombe, M.B., Grégoire, C., Poncet, P., Tavares, G.A., Rosinski-Chupin, I., Rabillon, J., Goubran-Botros, H., Mazié, J.C., David, B. & Alzari, P.M.** (2000) Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J. Biol. Chem.* **275**, 21572-21577.
- Low, N.M., Holliger, P. & Winter, G.** (1996) Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* **260**, 359-368.

- Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. & Wells, J.A.** (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* **30**, 10832-10838.
- Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J.F.** (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* **4**, 917-944.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J.** (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
- McCreery, T.** (1997) Digoxigenin labelling. *Mol. Biotechnol.* **7**, 121-124.
- McDonagh, A.F.** (1979) Bile pigments: bilatrienes and 5,15-biladienes. In: *The porphyrins* (D. Dolphin Ed.) Vol. **6**, 294-492, Academic Press, New York.
- Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J. & Virtanen, T.** (2000) Lipocalins as allergens. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 308-317.
- Mandecki, W., Shallcross, M.A., Sowadski, J. & Tomazic-Allen, S.** (1991) Mutagenesis of conserved residues within the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase yields enzymes with increased k_{cat} . *Protein Eng.* **4**, 801-804.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G.** (1991) By-passing immunization: human antibodies from V gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581-597.
- Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmquist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M. & Winter, G.** (1992) By-passing immunization: building high-affinity human antibodies by chain-shuffling. *Bio/Technology* **10**, 779-783.
- Martin, F., Toniatti, C., Salvati, A.L., Ciliberto, G., Cortese, R. & Sollazo, M.** (1996) Coupling protein design and *in vitro* selection strategies: improving specificity and affinity of a designed β -protein IL-6 antagonist. *J. Mol. Biol.* **255**, 86-97.
- Matlin, A.R., Kendall, D.A., Carano, K.S., Banzon, J.A., Klecka, S.B. & Solomon, N.M.** (1992) Enhanced catalysis by active-site mutagenesis at aspartic acid 153 in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry* **31**, 8196-8200.
- Miles, E.W. & Davies, D.R.** (2000) On the ancestry of barrels. *Science* **289**, 1490.
- Miller, J.H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Model, P. & Russel, M.** (1988) Filamentous bacteriophage. In: *The Bacteriophages*, vol. **2**, Plenum Press, New York, 375-456.
- Monaco, H.L., Rizzi, M. & Coda, A.** (1995) Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* **268**, 1039-1041.

- Montfort, R.W., Weichsel, A. & Andersen, J.F.** (2000) Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 110-118.
- 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.
- Mudgett-Hunter, M., Margolies, M.N., Ju, A. & Haber, E.** (1982) High-affinity monoclonal antibodies to the cardiac glycoside, digoxin. *J. Immunol.* **192**, 1165-1172.
- Mudgett-Hunter, M., Anderson, W., Haber, E. & Margolies, M.N.** (1985) Binding and structural diversity among high affinity monoclonal anti-digoxin antibodies. *Mol. Immunol.* **22**, 477-488.
- Mühlenbruch, B., Kirmeier, F. & Roth, H.J.** (1986) Synthese und Eigenschaften fluoreszierender Estradiol-Derivate. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **319**, 196-203.
- Müller, H.N.** (1995) Konstruktion eines Lipocalins mit neuen Eigenschaften. Dissertation, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Muller, B.H., Chevrier, D., Boulain, J-C. & Guesdon, J-L.** (1999) Recombinant single-chain F_v antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J. Immunol. Methods* **227**, 177-185.
- Murphy, J.E. & Kantrowitz, E.R.** (1994) Why are mammalian alkaline phosphatases much more active than bacterial alkaline phosphatases? *Mol. Microbiol.* **12**, 351-357.
- Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. & Hayaishi, O.** (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 4020-4024.
- Nasser Brumano, M.H., Rogana, E. & Swaisgood, H.E.** (2000) Thermodynamics of unfolding of β -trypsin at pH 2.8. *Arch. Biochem. Biophys.* **382**, 57-62.
- NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry)** (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. *Eur J. Biochem.* **150**, 1-5.
- Newcomer, M.E., Jones, T.A., Åquist, J., Sundelin, J., Eriksson, U., Rask, L. & Peterson, P.A.** (1984) The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J.* **3**, 1451-1454.
- Newcomer, M.E.** (1993) Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution. *Structure* **1**, 7-18.

- Newcomer, M.E. & Ong, D.E.** (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 57-64.
- Nolan, O. & O’Kennedy, R.** (1990) Bifunctional antibodies: concept, production and applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 1-11.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Ståhl, S., Uhlén, M. & Nygren, P.Å.** (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain. *Nature Biotechnol.* **15**, 772-777.
- Nygren, P.Å. & Uhlén, M.** (1997) Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 463-469.
- Olsson, A., Eliasson, M., Guss, B., Nilsson, B., Hellman, U., Lindberg, M. & Uhlén, M.** (1987) Structure and evolution of the repetitive gene encoding streptococcal protein G. *Eur. J. Biochem.* **168**, 319-324.
- O’Neil, K.T. & Hoess, R.H.** (1995) Phage display: protein engineering by directed evolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 443-449.
- Pace, C.N.** (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttall, P.A. & Stuart, D.L.** (1999) Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell* **3**, 661-671.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Nuttall, P.A. & Stuart, D.L.** (2000) Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 92-101.
- Pantoliano, M.W., Bird, R.E., Johnson, S., Asel, E.D., Dodd, S.W., Wood, J.F. & Hardman, K.D.** (1991) Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain F_v immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**, 10117-10125.
- Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. & Kraulis, P.J.** (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature* **324**, 383-385.
- Parmley, S.E. & Smith, G.P.** (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318.

- Perelson, A.S. & Oster, G.F.** (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J. Theor. Biol.* **81**, 645-670.
- Pevsner, J., Trifiletti, R.R., Strittmatter, S.M. & Snyder, S.H.** (1985) Isolation and characterization of an olfactory receptor protein for odorant pyrazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 3050-3054.
- Plückthun, A. & Pack, P.** (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **3**, 83-105.
- Porath, J., Carlsson, J. Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Preuß, M.** (1999) Konstruktion von „Anticalinen“ durch angewandtes Protein Design. Diplomarbeit, Lehrstuhl für Biologische Chemie des Forschungsdepartments für Biowissenschaftliche Grundlagen am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Technische Universität, München.
- Qin, B.Y., Creamer, L.K., Baker, E.N. & Jameson, G.B.** (1998a) 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* **438**, 272-278.
- Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N. & Jameson, G.B.** (1998b) Structural basis of the Tanford transition of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry* **37**, 14014-14023.
- Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, E.N. & Jameson, G.B.** (1999) Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Sci.* **8**, 75-83.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. & Milne, R.** (2000) Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 185-198.
- Redl, B.** (2000) Human tear lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 241-248.
- Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A. & Mantyjarvi, R.** (1999) Probing the molecular basis of allergy. Three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *J. Biol. Chem.* **274**, 2337-2343.
- Rüdiger, W., Klose, W., Vuillaume, M. & Barbier, M.** (1968) On the structure of pterobilin, the blue pigment of *Pieris brassicae*. *Experientia* **24**, 1000.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
- Sawyer, L.** (1987) One fold among many. *Nature* **327**, 659.
- Scheer, H. & Kayser, H.** (1988) Conformational studies of biliproteins from the insects *Pieris brassicae* and *Cerura vinula*. *Z. Naturforsch.* **43c**, 84-90.
- Schildbach, J.F., Panka, D.J., Parks, D.R., Jager, G.C., Novotny, J., Herzenberg, L.A., Mudgett-Hunter, M., Brucceroli, R.E., Haber, E. & Margolies, M.N.** (1991) Altered hapten recognition by two anti-digoxin hybridoma variants due to variable region point mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 4640-4647.
- Schmid, F.X.** (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: *Protein protein structure, a practical approach* (Creighton, T.E., ed.) TRL Press, Oxford, chapter 11, 251-286.
- Schmidt, A.M.** (1998) Untersuchungen zur Proteinfaltung durch Protein Design am Retinol-Bindungsprotein. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Schmidt, A.M., Bloß, I. & Skerra, A.** (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *E. coli*: positive influences of *dsbC* coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng.* **11**, 601-607.
- Schmidt, F.S. & Skerra, A.** (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*: cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* **219**, 855-863.
- Schmidt, F.S.** (1995) Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* – die β -Barrel Proteinarchitektur als Grundlage für die evolutive Generierung von Rezeptormolekülen mit neuen Bindungseigenschaften. Dissertation, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Schmidt, T.G.M. & Skerra, A.** (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig F_v fragment. *Prot. Eng.* **6**, 109-122.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A.** (1996) Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.

- Schneider, S., Baumann, F., Geiselhart, P., Kayser, H. & Scheer, H.** (1988) Biliproteins from the butterfly *Pieris brassicae* studied by time resolved fluorescence and coherent anti-stokes raman spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **48**, 239-242.
- Schreiber, G.** (1988) Ein kombinatorisches Problem aus der Genetik. *BioEngineering* **2**, 32-35.
- Scopes, R.K.** (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* **59**, 277-282.
- Sidhu, S.S., Weiss, G.A. & Wells, J.A.** (2000) High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J. Mol. Biol.* **296**, 487-495.
- Sinha, N.D., Biernat, J., McManus, J. & Köster, H.** (1984) Polymer support oligonucleotide synthesis. XVIII: use of β -cyanethyl-N,N-dialkylamino-N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4539-4557.
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin F_v fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Skerra, A., Dreher, M.L. & Winter, G.** (1991) Filter screening of antibody F_{ab} fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal. Biochem.* **196**, 151-155.
- Skerra, A.** (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 256-262.
- Skerra, A.** (1994) Use of the tetracycline promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A.** (2000a) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **13**, 167-187.
- Skerra, A.** (2000b) Lipocalins as a scaffold. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G.M** (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for recombinant protein purification and detection. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.
- Smith, G.P.** (1985a) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
- Smith, T.W.** (1985b) Pharmacokinetics, bioavailability and serum levels of cardiac glycosides. *J. Am. Coll. Cardiol.* **5**, 43A-50A.
- Smith, T.W.** (1988) Digitalis. Mechanisms of action and clinical use. *N. Engl. J. Med.* **318**, 358-365.

- Songsivilai, S. & Lachmann, P.J.** (1990) Bispecific antibody: a tool for diagnosis and treatment of disease. *Clin. Exp. Immunol.* **79**, 315-321.
- Sowadski, J.M., Handschumacher, M.D., Murthy, H.M., Foster, B.A. & Wyckoff, H.W.** (1985) Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2,8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **186**, 417-433.
- Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Bonicel, J., Cambillau, C. & Tegoni, M.** (1998) The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry* **37**, 7913-7918.
- Ståhl, S. & Uhlén, M.** (1997) Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol.* **15**, 185-192.
- Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. & Rasched, I.** (1990) Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J. Mol. Biol.* **212**, 143-149.
- Sundaram, M., Sivaprasadarao, A., Aalten, D.M.F. & Findlay, J.B.C.** (1998) Expression, characterization and engineered specificity of rat epididymal retinoic acid-binding protein. *Biochem. J.* **334**, 155-160.
- Suter, F., Kayser, H. & Zuber, H.** (1988) The complete amino-acid sequence of the bilin-binding protein from *Pieris brassicae* and its similarity to a family of serum transport proteins like the retinol-binding proteins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **369**, 497-505.
- Suzuki, C., Ueda, H., Tsumoto, K., Mahoney, W.C., Kumagai, I. & Nagamune, T.** (1999) Open sandwich ELISA with V_H-V_L-alkaline phosphatase fusion proteins. *J. Immunol. Methods* **224**, 171-184.
- Thompson, J., Pope, A., Tung-Chan, J.S., Hollis, G., Mark, G. & Johnson, J.S.** (1996) Affinity maturation of a high-affinity human monoclonal antibody against the third hypervariable loop of human immunodeficiency virus – use of phage display to improve affinity and broaden strain reactivity. *J. Mol. Biol.* **256**, 77-88.
- Tung, W.L. & Chow, K.C.** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* **11**, 128-129.
- Urade, Y., Nagata, A., Suzuki, Y., Fujii, Y. & Hayaishi, O.** (1989) Primary structure of rat brain prostaglandin D synthetase deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* **264**, 1041-1045.
- Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 259-271.

- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. & Johnson, K.S.** (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol.* **14**, 309-314.
- Verma, R., Boleti, E. & George, A.J.T.** (1998) Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**, 165-181.
- Vieira, J. & Messing, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Voss, E.W., Jr.** (1984) Fluorescein Hapten: An Immunological Probe. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 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.
- Vuillaume, M. & Dattée, Y.** (1980) Photostimulation de la production d'ATP dans le tégument d'un insecte: interprétation physiologique des analyses *in vivo* et *in vitro*. *Arch. Zool. Exp. Gén.* **121**, 159-172.
- Waterhouse, P., Griffiths, A.D., Johnson, K.S. & Winter, G.** (1993) Combinatorial infection and *in vivo* recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res.* **21**, 2265-2266.
- Weichel, M.** (1997) Selektion und Charakterisierung von künstlichen Varianten des Bilin-Bindungsproteins mit Affinität zur Hexahistidin-Sequenz. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie der Technischen Hochschule, Darmstadt.
- Weichsel, A., Andersen, J.F., Champagne, D.E., Walker, F.A. & Montfort, W.R.** (1998) Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 304-309.
- Weiss, G.A. & Lowman, H.B.** (2000) Anticalins versus antibodies: made-to-order binding proteins for small molecules. *Chem. Biol.* **7**, R177-R184.
- Wells, J.A. & Lowman, H.B.** (1992) Rapid evolution of peptide and protein binding properties *in vitro*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 597-604.
- Widersten, M. & Mannervik, B.** (1995) Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J. Mol. Biol.* **250**, 115-122.

- Wu, S.Y., Perez, M.D., Puyol, P. & Sawyer, L.** (1999) β -lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *J. Biol. Chem.* **274**, 170-174.
- Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T.B. & Barbas, C.F.** (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* **254**, 392-403.
- 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.
- Zanotti, G., Ottonello, S., Berni, R. & Monaco, H.L.** (1993a) Crystal structure of the trigonal form of human plasma retinol-binding protein at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **230**, 613-624.
- Zanotti, G., Berni, R. & Monaco, H.L.** (1993b) Crystal structure of liganded and unliganded forms of bovine plasma retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 10728-10738.
- Zanotti, G., Malpeli, G. & Berni, R.** (1993c) The interaction of N-ethyl retinamide with plasma retinol-binding protein (RBP) and the crystal structure of the retinoid-RBP complex at 1.9-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **268**, 24873-24879.
- Zanotti, G., Marcello, M., Malpeli, G., Folli, C., Sartori, G. & Berni, R.** (1994) Crystallographic studies on complexes between retinoids and plasma retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 29613-29620.
- Zanotti, G., Panzalorto, M., Marcato, A., Malpeli, G., Folli, C. & Berni, R.** (1998) Structure of pig plasma retinol-binding protein at 1.65 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 1049-1052.
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. & Creighton, T.E.** (1995) Structural and functional characterization of *DsbC*, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 5075-5089.
- Zeiler, T., Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J., Rytkönen-Nissinen, M., Vilja, P., Taivainen, A., Kauppinen, J. & Virtanen, T.** (1999) T cell epitopes of a lipocalin allergen colocalize with the conserved regions of the molecule. *J. Immunol.* **162**, 1415-1422.
- Zenobi, R. & Knochenmuss, R.** (1998) Ion formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 337-366.

Lebenslauf

Name: Steffen Schlehuber
Anschrift: Murstraße 21, 85356 Freising
Geburtsdatum: 20. Juli 1972
Geburtsort: Fulda

Schulbildung

1978 – 1982 Grundschole, Gersfeld/Rhön
1982 – 1988 Gymnasialer Zweig der Rhönschule Gersfeld, Gersfeld/Rhön
1988 – 1991 Freiherr-vom-Stein-Schule, Gymnasium, Fulda
06/1991 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung

10/1991 Beginn des Chemiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt
10/1993 Diplomvorprüfung
06/1996 Abschluß des mündlichen Teils der Diplomhauptprüfung in den Fächern Anorganische Chemie, Biochemie, Chemische Technologie und Organische Chemie
07/1996 – 12/1996 Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Arne Skerra in der Abteilung Proteinchemie des Institutes für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt mit dem Thema:
„Versuche zum evolutiven Design eines künstlichen Lipocalin-Proteins gegen Digoxigenin“
12/1996 Abschluß des Chemiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt mit dem Grad eines Diplom-Ingenieurs in der Diplomfachrichtung Chemie
Auszeichnung durch die Dr.-Anton-Keller-Stiftung
03/1997 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. Arne Skerra in der Abteilung Proteinchemie des Institutes für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt
10/1998 – 11/2000 Fortsetzung und Fertigstellung der Doktorarbeit bei Prof. Dr. Arne Skerra am Lehrstuhl für Biologische Chemie im Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München in Freising

Steffen Schlehuber
Murstraße 21
85356 Freising

10. Oktober 2001

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Steffen Schlehuber