

Technische Universität München
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Das humane Apolipoprotein D als Gerüststruktur
für neuartige Bindungsproteine mit Affinität zu
Protein-Antigenen**

Dipl.-Ing. Martin Vogt

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. J. Friedrich
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra
	2. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

Die Dissertation wurde am 24. Juni 2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 8. September 2003 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Technischen Universität Darmstadt begonnen und am Lehrstuhl für Biologische Chemie des Forschungsdepartments für Biowissenschaftliche Grundlagen am Wissenschaftszentrum für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München weitergeführt und abgeschlossen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Arne Skerra möchte ich für die interessante und vielseitige Themenstellung, zahlreiche inspirierende Diskussionen sowie sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg meiner Arbeit danken.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe des Institutes für Biochemie und des Lehrstuhles für Biologische Chemie möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Markus Fiedler und Steffen Schlehuber, die immer Zeit für einen wissenschaftlichen Disput fanden. Andreas Ernst danke ich für sein Engagement während seines Fortgeschrittenenpraktikums. Ina Theobald möchte ich meinen Dank für die Konstruktion einiger Vektoren aussprechen.

Insbesondere danke ich dem Land Hessen für die Unterstützung durch ein Promotionsstipendium.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits durch folgende Veröffentlichungen der Fachwelt zugänglich gemacht:

Vogt, M. & Skerra, A. (2001) The bacterially produced Apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or *E*-3M2H. *J. Mol. Recognit.* 14, 79-86

Vogt, M. & Skerra, A. (2001) Muteins of Apolipoprotein D, Patentanmeldung, Veröffentlichungsnummer WO 03/029471 A1

Meinen Eltern

1	Einleitung	1
1.1	„Anticaline“ – künstliche Bindungsproteine auf Basis der Lipocalin-Architektur	1
1.2	Struktur und Funktion der Lipocaline	3
1.3	Das humane Apolipoprotein D als Gerüststruktur	6
1.4	Das Phagen-Präsentationssystem	12
1.5	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Bakterienstämme und Bakteriophagen	16
2.1.2	Vektoren und cDNA	16
2.1.3	Oligodesoxynukleotide	17
2.1.4	Proteinreagenzien	18
2.1.5	Chemikalien	19
2.1.6	Standards und Kits	22
2.1.7	Geräte	23
2.1.8	Sonstiges Material	25
2.1.9	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	26
2.2	Mikrobiologische und gentechnische Methoden	31
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	31
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	31
2.2.2.1	Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	32
2.2.2.2	Transformation durch Elektroporation	32
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	33
2.2.3.2	Präparation von Einzelstrang-DNA	34
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	35
2.2.5	Enzymatische Spaltung und Modifizierung von DNA	36
2.2.5.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	36
2.2.5.2	Entfernung überstehender DNA-Enden	36

2.2.5.3	Abtrennung von Enzymen	37
2.2.5.4	Ligierung von DNA-Fragmenten	37
2.2.5.5	Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA	38
2.2.5.6	Ortsgerichtete Mutagenese	38
2.2.5.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.2.6	Gelelektrophorese von DNA	41
2.2.6.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.6.2	Präparative Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	41
2.2.6.3	Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese	42
2.2.7	Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	43
2.2.8	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	44
2.2.9	Propagation von Helferphagen	45
2.2.10	Präparation und Selektion rekombinanter Phagemide	46
2.2.10.1	Produktion von Phagemiden	46
2.2.10.2	Titerbestimmung von Phagemidlösungen	47
2.2.10.3	Herstellung von Phagemidbibliotheken	47
2.2.10.4	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	48
2.2.10.5	Amplifizierung von Phagemiden	50
2.2.10.6	Nachselektion durch <i>Colony Screening</i>	51
2.2.11	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	52
2.2.11.1	Proteinproduktion im 2-l-Maßstab	53
2.2.11.2	Proteinproduktion im analytischen Maßstab	54
2.3	Proteinchemische Methoden	54
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.3.2	Chromatographische Methoden	55
2.3.2.1	Einschritt-Reinigung rekombinanter Proteine mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie	56
2.3.2.2	Einschritt-Reinigung rekombinanter Proteine mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie	56
2.3.2.3	Gelpermeationschromatographie	57

2.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	58
2.3.4	Konzentrierung von Proteinlösungen	59
2.3.5	N-terminale Proteinsequenzierung	59
2.3.6	Western-Blotting	59
2.3.7	Nachweis von Bindungsaktivität im ELISA	61
2.4	Biophysikalische Analysen	61
2.4.1	Fluoreszenztitration	61
2.4.1.1	Direkte Titration von ApoD mit Liganden	62
2.4.1.2	Kompetitions-Bindungsexperimente	66
2.4.2	CD-Spektroskopie	66
2.4.3	Nachweis von Bindungsaktivität durch Oberflächen-Plasmonresonanz	67
2.5	Verwendete Computerprogramme	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Produktion des rekombinanten ApoD	71
3.1.1	Amplifizierung des ApoD-Strukturgens aus humaner cDNA	71
3.1.2	Konstruktion bakterieller Expressionsvektoren	72
3.1.3	Expressionsversuche in <i>E. coli</i>	75
3.1.4	Isolierung des rekombinanten Proteins	77
3.2	Proteinchemische Charakterisierung des rekombinanten ApoD	79
3.2.1	N-terminale Sequenzierung	79
3.2.2	Massenspektrometrische Analyse	80
3.2.3	Untersuchung der Tertiärstruktur	80
3.2.3.1	Ausbildung der Disulfidbrücken	80
3.2.3.2	CD-Spektroskopie	80
3.2.4	Untersuchungen zum Oligomerisierungsstatus des ApoD	82
3.2.5	Liganden-Bindungsstudien	83
3.2.5.1	Effekte organischer Lösungsmittel auf die Fluoreszenzeigenschaften	84
3.2.5.2	Quantifizierung der Affinität zu potentiellen Liganden	85
3.3	Versuche zur Verbesserung der proteinchemischen Eigenschaften des ApoD	92

3.3.1	Einführung von zufälligen Mutationen	94
3.3.2	Expressionsanalyse im <i>Colony Screening</i> -Verfahren	94
3.3.3	DNA-Analyse selektierter Mutanten	97
3.3.4	Herstellung und Charakterisierung der Mutanten	97
3.3.4.1	Produktion in <i>E. coli</i>	97
3.3.4.2	Bestimmung des Retentionsverhaltens in der Gelpermeationschromatographie	100
3.4	Etablierung eines Phagemid-Präsentationssystems	101
3.4.1	Konstruktion von Vektoren	102
3.4.1.1	Einführung von <i>Bst</i> XI-Schnittstellen in das ApoD-Gen	102
3.4.1.2	Vektoren für das <i>Phage Display</i>	104
3.4.2	Studien zur Präsentation von Fusionsproteinen aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII auf der Oberfläche von Phagemiden	106
3.4.3	<i>Phage Display</i> mit dem Phasmidvektor pApoD19	111
3.5	Zufallsmutagenese der ApoD-Bindungstasche	113
3.5.1	Auswahl der Aminosäurepositionen für die Randomisierung	113
3.5.2	Strategie zur konzertierten Mutagenese der ausgewählten Aminosäuren	116
3.5.3	Synthese einer Bibliothek von ApoD-Varianten	119
3.6	Erste Zufallsbibliothek	120
3.6.1	Herstellung der ApoD-Bibliothek I	120
3.6.2	Anreicherungsversuche hinsichtlich Bindungsaktivität für Nogo-A	121
3.6.3	Analyse der angereicherten Phagemide	122
3.6.3.1	Nachweis von Bindungsaktivität durch <i>Colony Screening</i>	122
3.6.3.2	DNA-Analyse selektierter Klone	123
3.7	Zweite Zufallsbibliothek	124
3.7.1	Strategien zur Erhöhung der Diversität und Herstellung der ApoD-Bibliothek II	124
3.7.2	Anreicherungsversuche hinsichtlich Bindungsaktivität für Hämoglobin	125
3.7.3	Analyse der angereicherten Phagemide	127
3.7.3.1	Nachweis von Bindungsaktivität durch <i>Colony Screening</i>	127

3.7.3.2 Sequenz-Analyse selektierter Klone	128
3.8 Charakterisierung selektierter Varianten aus der ApoD-Bibliothek II	132
3.8.1 Gentechnische Produktion und Reinigung der selektierten Varianten	132
3.8.1.1 CD-spektroskopische Analyse der Variante HbgA	134
3.8.2 Quantifizierung der Bindungseigenschaften isolierter Varianten	135
3.8.2.1 ELISA	135
3.8.2.2 Oberflächen-Plasmonresonanz	135
4 Diskussion	140
4.1 Die bakterielle Produktion des humanen ApoD	140
4.2 Liganden-Bindungseigenschaften des ApoD: Hinweise auf die physiologische Funktion	142
4.3 Versuch der Optimierung proteinchemischer Eigenschaften des rekombinanten ApoD: Neigung zur Aggregation und Adsorption	146
4.4 Strategien zur Präsentation des ApoD auf Phagemiden	150
4.5 Herstellung von komplexen ApoD-Zufallsbibliotheken und Strategien zur Selektion von Varianten mit neuartigen Bindungseigenschaften	154
4.6 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der ApoD-Variante HbgA	159
4.7 Das humane ApoD als Gerüststruktur für künstliche Rezeptorproteine	162
5 Zusammenfassung	165
6 Literatur	167
7 Abkürzungen und Symbole	186
8 Anhang	187
8.1 Verzeichnis der Vektoren	187
8.2 Die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein OmpA-ApoD- <i>Strep</i> -tag II auf dem Plasmidvektor pApoD5	188
8.3 Die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein OmpA-ApoD- <i>Strep</i> -tag II-pIII auf dem Plasmidvektor pApoD19	190

1 Einleitung

1.1 „Anticaline“ – künstliche Bindungsproteine auf Basis der Lipocalin-Architektur

Das Phänomen der molekularen Erkennung ist in der gesamten belebten Natur von zentraler Bedeutung. So beruht die Regulation und Koordination zellulärer Vorgänge auf der spezifischen Interaktion von Rezeptormolekülen und ihren Liganden. Auch den Abwehrmechanismen von Vertebraten gegen Mikroorganismen und Viren oder deren Stoffwechselprodukte liegt das Prinzip der molekularen Erkennung zugrunde. Das zu diesem Zweck im Verlauf der Evolution entwickelte Immunsystem ist in der Lage, fast jedes pathogene Molekül – von kleinen Haptene bis zu Proteinen – durch speziell gebildete Antikörper zu komplexieren. Die Antigene werden dabei mittels nichtkovalenter Wechselwirkungen von den auch als Immunglobulinen bezeichneten Antikörpern mit hoher Affinität und Spezifität gebunden. Diese Eigenschaften machen die Antikörper sowie deren F_{ab} - und F_v -Fragmente zum Gegenstand intensiver Forschung, denn biochemische Analytik, diagnostische und therapeutische Anwendungen und in zunehmendem Maße technische Prozesse verlangen nach hochspezifischen Bindungsproteinen.

Die Darstellung von Antikörpern in homogener Form wurde durch die von Köhler und Milstein (1975) beschriebene Hybridomtechnik möglich. Die in den letzten Jahren entwickelten Verfahren zur gentechnischen Produktion funktioneller Antikörperfragmente in dem Bakterium *Escherichia coli* (Skerra & Plückthun, 1988; Übersicht in Skerra, 1993) haben die Verfügbarkeit dieser wirtschaftlich bedeutenden Bindungsproteine nochmals verbessert und zudem die Anwendung des *Protein Engineerings* (Winter *et al.*, 1982) auf die Antikörper ermöglicht. Mittels molekularbiologischer Methoden lassen sich so Affinität und Spezifität verändern oder sogar maßgeschneiderte Bindungsmoleküle mit völlig neuen Eigenschaften kreieren (Übersicht in Dall'Acqua & Carter, 1998). Zu diesem Zweck werden entweder einzelne Bereiche der Antikörper gezielt abgewandelt oder eine Bibliothek zahlreicher Antikörper-Varianten mit mutierten komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR) hergestellt. Aus dieser Bibliothek werden anschließend Moleküle mit gewünschten Eigenschaften mittels eines geeigneten Selektionssystems isoliert (McCafferty *et al.*, 1990; Chiswell & McCafferty, 1992). Um Antikörper zur Therapie des Menschen einsetzen zu können, werden, da ihnen in der Regel keine humane Struktur zugrunde liegt, große Anstrengungen unternommen, diese zu „humanisieren“, um mögliche Abstoßungsreaktionen durch den Organismus des Patienten zu verhindern (Übersicht in Vaughan *et al.*, 1998). Die kürzliche Einführung rekombinanter Antikörper-Bibliotheken auf Basis humaner CDRs (Söderlind *et al.*, 2000) oder synthetischer humaner Konsensus-Sequenzen (Knappik *et al.*, 2000) und mit Komplexitäten, die dem Umfang der menschlichen Antikörpervielfalt entsprechen, spiegelt den Stand derzeitiger Entwicklungen wieder.

Dem medizinischen und technischen Einsatz der Antikörper sind jedoch Grenzen gesetzt. Die heterodimere Organisation der Antikörper erfordert die gemeinsame Klonierung und Expression zweier Strukturgene, was ihre gentechnische Handhabbarkeit einschränkt (Skerra, 1993). Außerdem ist die proteinchemische Stabilität von F_v -Fragmenten aufgrund der nicht-kovalenten Assoziation von V_H und V_L in vielen Fällen nur gering. Hinzu kommt, daß die bindungsbestimmenden Bereiche der Immunglobuline auf sechs hypervariable Regionen (Übersicht in Padlan, 1994) verteilt sind, was deren konzertierte Manipulation und die Herstellung entsprechender genetischer Bibliotheken erschwert. Prinzipiell von Nachteil im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung ist die beträchtliche physikalische Größe von Antikörpern und sogar ihrer funktionellen Fragmente, da diese nur geringe Gewebepenetration ermöglicht (Chester & Hawkins, 1995). So besteht selbst die kleinste Antigenbindende Einheit, das F_v -Fragment, aus immerhin 250 Aminosäuren.

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob im Zeitalter des *Protein Engineerings* nicht auch andere Protein-Gerüststrukturen unter Einsatz kombinatorischer Techniken zur Generierung künstlicher Bindungsproteine benutzt werden können. Durch Anwendung eines geeigneten Selektionsverfahrens sollten sich aus entsprechenden Zufallsbibliotheken Proteine mit den gewünschten Eigenschaften als Alternative zu Antikörpern isolieren lassen. Für solche Anwendungen geeignete Proteinstrukturen sollten auf ihrer Oberfläche – ähnlich wie die Immunglobuline – Peptidschleifen präsentieren, welche zur Stabilisierung der Tertiärstruktur wenig beitragen. Diese lassen sich daher zur Generierung neuer Bindungseigenschaften mutagenisieren, ohne daß dadurch die Proteinfaltung nachteilig verändert wird. Solche Bereiche sollten als artifizielle hypervariable Regionen die Bindung zu einem „Antigen“ bewirken können. Weitere Kriterien zur Auswahl geeigneter Gerüststrukturen sind hohe proteinchemische Stabilität, eine im Vergleich zu Antikörpern geringere Größe und die leichte gentechnische Herstellbarkeit (Ku & Schultz, 1995). Erste Ansätze zur Etablierung neuer Antigen-bindender Gerüststrukturen gingen von α -helikalen Proteinen aus (Ku & Schultz, 1995; Nord *et al.*, 1995), jedoch sind mittlerweile verschiedene molekulare „Scaffolds“ auf ihre Tauglichkeit als Ausgangsstruktur für künstliche Rezeptorproteine untersucht worden (Übersichten in Nygren & Uhlén, 1997; Skerra, 2000a).

Als vielversprechende Gerüststruktur erwies sich insbesondere die Proteinarchitektur der Lipocaline. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie (siehe Abschnitt 1.2) bestehen aus nur einer einzigen Polypeptidkette und sind mit einer molekularen Masse von 20 kDa deutlich kleiner als Immunglobuline oder deren Fragmente (Übersicht in Flower, 1996). Sie besitzen eine strukturell stark konservierte Tertiärstruktur, deren zentrales Faltungsmotiv eine β -Faltstruktur darstellt. Die molekulare Oberfläche der Bindungstasche, die normalerweise zur Aufnahme eines niedermolekularen Liganden dient, wird – in ähnlicher Weise wie bei den Antikörpern – durch Peptidschleifen gebildet. Nachdem mittels *Protein Engineering* am Retinol-Bindungsprotein (RBP) die außergewöhnliche Stabilität der Lipocalin-Faltungsstruktur demonstriert

werden konnte (Müller & Skerra, 1994), gelang es Beste (1998), künstliche Bindungsproteine mit Affinität zu dem Modell-Liganden Fluorescein auf Basis der Struktur des Bilin-Bindungsproteins (BBP) zu erzeugen. Dazu wurden die bindungsbestimmenden Schleifensegmente in einem kombinatorischen Ansatz randomisiert und Varianten mit den gewünschten Eigenschaften identifiziert. In Erweiterung dieser Arbeiten konnten Schlehuber *et al.* (2000) BBP-Varianten gewinnen, die den Steroid-Liganden Digoxigenin mit hoher Affinität komplexieren. Diese neuartigen, künstlichen Rezeptormoleküle wurden als „Anticaline“ bezeichnet (Beste *et al.*, 1999; Übersichten in Weiss & Lowman, 2000; Skerra, 2001), um sowohl ihre den Antikörpern nachempfundene Funktion als auch ihre strukturelle Verwandtschaft mit den Lipocalinen zu betonen.

1.2 Struktur und Funktion der Lipocaline

Die Proteinfamilie der Lipocaline (Übersicht in Flower, 1996), zu der auch das Apolipoprotein D (ApoD) gehört, wurde von Pervaiz & Brew (1985) erstmals beschrieben. Lipocaline sind typischerweise kleine, aus 160 bis 180 Aminosäuren bestehende, extrazelluläre Proteine, die sich zusätzlich zu ihren strukturellen Gemeinsamkeiten vor allem durch ihre Fähigkeit zur molekularen Erkennung auszeichnen. Ihre Eigenschaft, meist niedermolekulare, vorwiegend hydrophobe Moleküle in einer kelchartigen Bindungstasche zu komplexieren, gab den Lipocalinen (von griechisch *calyx*, Kelch) ihren Namen (Pervaiz & Brew, 1987). Der Großteil der bis heute bekannten ungefähr 200 Lipocaline stammt aus Vertebraten. Allerdings zeigen die weite Verbreitung von Lipocalinen in unterschiedlichsten Eukaryonten wie auch die Existenz phylogenetisch entfernter prokaryontischer Lipocaline (Übersicht in Bishop, 2000), daß sich der Strukturtyp der Lipocaline bereits in einem frühen Stadium der Evolution entwickelt hat.

Die physiologischen Funktionen der bekannten Lipocaline sind so vielfältig wie ihre Verbreitung. Lipocaline dienen als Speicher- und Transportproteine, wie beispielweise das Retinol-Bindungsprotein (RBP), welches in höheren Vertebraten für den Transport von Retinol im Serum verantwortlich ist (Newcomer *et al.*, 1984; Newcomer & Ong, 2000). Das Bilin-Bindungsprotein (BBP; Kayser, 1984) aus dem Großen Kohlweißling *Pieris brassicae* und das Insecticyanin (INS; Holden *et al.*, 1986) des Nachtfalters *Manduca sexta* spielen bei der Farbgebung dieser Insekten eine Rolle, indem sie den Liganden Biliverdin IX_γ speichern. Dem BBP werden durch die Komplexbildung dieser photoprotektiven Verbindung zusätzlich noch physiologische Eigenschaften zugeschrieben (Kayser, 1985; Schmidt & Skerra, 1994).

In letzter Zeit wird zunehmend deutlich, daß Lipocaline bedeutende Funktionen in diversen biologischen Prozessen erfüllen. Das Odorant-Bindungsprotein aus Vertebraten (Pevsner *et al.*, 1985; Tegoni *et al.*, 2000) ist an der olfaktorischen Reizleitung beteiligt, während das Aphrodisin aus dem Hamster *Cricetus cricetus* wichtige Funktionen beim Transport von

Pheromonen zu übernehmen scheint oder gar selbst als Pheromon wirkt (Singer *et al.*, 1986; Mägert *et al.*, 1995). Einige Lipocaline sind an der Regulierung der Immunantwort beteiligt, wie das α_1 -Microglobulin (Åkerstrom & Lögberg, 1990; Åkerstrom *et al.*, 2000b), oder sie modulieren Zellwachstum und -metabolismus (Übersicht in Flower, 1994). Die Prostaglandin-D-Synthase, welche die vorherrschende Proteinkomponente in der Cerebrospinalflüssigkeit darstellt, besitzt sogar enzymatische Aktivität (Nagata *et al.*, 1991; Urade & Hayaishi, 2000). Dies gilt auch für erst kürzlich entdeckte pflanzliche Lipocaline (Bugos *et al.*, 1998; Hieber *et al.*, 2000). Bemerkenswerterweise gehören einige wichtige Allergene, die aus Insekten, Hunden, Nagetieren, Rindern und Pferden isoliert werden konnten, zur Proteinfamilie der Lipocaline (Virtanen *et al.*, 1999).

Manche Lipocaline binden nicht nur hydrophobe, relativ kleine Moleküle, sondern bilden auch Komplexe mit löslichen oder membranständigen Makromolekülen (Übersicht in Flower, 2000). So liegt beispielsweise das RBP im Serum mit Retinol und Transthyretin in Form eines nichtkovalenten, tertiären Komplexes vor, der nach der Abgabe des Retinols dissoziiert (Monaco *et al.*, 1995; Monaco, 2000). Das Apolipoprotein D liegt im Serum als kovalent gebundenes Heterodimer vor (siehe Abschnitt 1.3). Eine Reihe weiterer Lipocaline bildet ähnliche Komplexe aus. Für einige Lipocaline konnte die Existenz von Oligomeren nachgewiesen werden (Übersicht in Åkerstrom *et al.*, 2000a).

Alle Lipocaline mit bekannter Raumstruktur besitzen als bemerkenswert stark konserviertes Faltungsmotiv ein zentrales, hochsymmetrisches β -Faltblatt, welches aus acht antiparallelen, sich gleichsinnig in einer +1-Topologie um eine zentrale Achse windenden β -Strängen besteht (siehe Abbildung 1; siehe auch Abschnitt 1.3). An einem Ende der faßartigen Struktur sind die β -Stränge durch kurze Peptidschlaufen miteinander verbunden, und eine dichte Packung von Aminosäureseitenketten stabilisiert diesen geschlossenen Teil der Struktur. Auf der entgegengesetzten, konisch geweiteten Seite des β -Barrels sind die β -Stränge durch ausgedehnte Peptidschleifen paarweise miteinander verknüpft, wodurch eine zum Lösungsmittel geöffnete, als Bindungstasche dienende Kavität freigegeben wird. Die molekulare Oberfläche dieser Bindungstasche wird durch die beschriebenen Peptidschleifen und angrenzende Bereiche der Faltblattstruktur gebildet. Die Überlagerung sechs bekannter Lipocalin-Kristallstrukturen veranschaulicht (Abbildung 1), daß die Proteingerüste sich im Bereich der β -Faßstruktur nahezu entsprechen und die Erkennungseigenschaft für den jeweiligen Lipocalin-Liganden durch die Ausgestaltung der Schleifensegmente bestimmt wird (Skerra, 2000b).

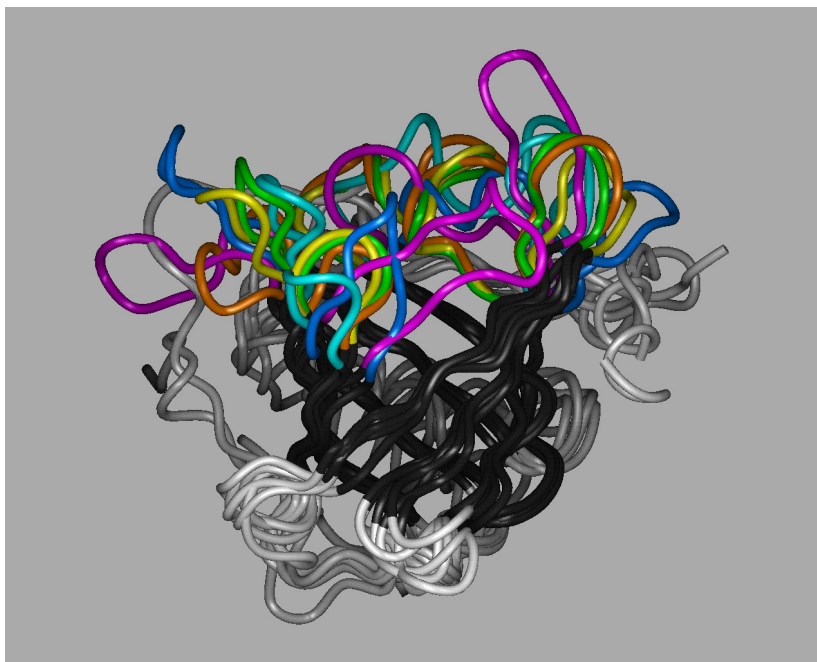


Abbildung 1. Überlagerung der Kristallstrukturen von sechs unterschiedlichen Lipocalinen. Die Proteine sind als Bändermodelle dargestellt, wobei die strukturell konservierten Bereiche der β -Fassstruktur schwarz gezeichnet sind. Die Peptidschleifen, welche die β -Stränge verbinden und die molekulare Oberfläche der Bindungstasche bilden, sind farblich hervorgehoben (Bilin-Bindungsprotein, PDB-Eintrag: 1BBP, blau; β -Lactoglobulin, 1BEB, orange; Lipocalin-Allergen Bos d2, 1BJ7, grün; Major Urinary Protein, 1MUP, gelb; Retinol-Bindungsprotein, 1RBP, magenta; epididymales Retinsäure-Bindungspottein, PDB: 1EPA, cyan). Die restlichen Bereiche der Proteinstrukturen sind grau dargestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der Software „Insight II“ erstellt (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. A. Skerra).

Bemerkenswerterweise zeigen die Primärstrukturen der Lipocaline nur geringe Sequenzhomologie, die für manche Paarungen im Bereich von nur 10 % liegt. Die Zugehörigkeit zu der gemeinsamen Proteinfamilie äußert sich aber in einer hohen Konservierung einzelner kurzer Sequenzbereiche (Flower *et al.*, 1993), die auch strukturell eine gemeinsame Rolle spielen. Das erste dieser Sequenzelemente besteht aus einer sich nahe des Aminoterminus befindlichen 3_{10} -Helix und dem sich anschließenden β -Strang A (siehe auch Abschnitt 1.3). Die β -Stränge F und G und die sie verbindende Peptidschleife bilden die zweite konservierte Einheit. Weiterhin sind der β -Strang H und die Schleifenregion, die den Strang mit der sich anschließenden α -Helix verknüpft, zu nennen. Die meisten bekannten Lipocaline haben alle drei Sequenzmotive gemeinsam und werden als *Kernel lipocalins* (innere Lipocaline) bezeichnet. Zu den bekanntesten *Kernel*-Lipocalinen gehören das RBP, das β -Lactoglobulin (Blg; Sawyer & Kontopidis, 2000), das Insecticyanin, das Major Urinary Protein (MUP; Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000), das BBP und auch das ApoD. Die *Outlier lipocalins* (äußeren Lipocaline) bilden dagegen eine eher heterogene Gruppe. Sie weisen meist nur eines oder zwei der genannten Sequenzmotive auf und lassen sich in vier Untergruppen aufteilen, die Odorant-Bindungsproteine (Übersicht in Tegoni *et al.*, 2000), die im Speichel auftretenden Von-Ebner's-Gland-Proteine (Vanthof *et al.*, 1997), die Nitrophorine (Andersen *et al.* 1998; Montfort *et al.*, 2000) und die Tick-Histamin-bindenden Proteine (Paesen *et al.*,

1999). Interessanterweise liegt das bovine Odorant-Bindungsprotein als Homodimer vor, wobei die C-terminale α -helikale Domäne je eines Monomeren am β -Barrel des anderen Monomeren anliegt und die Untereinheiten so kreuzweise verknüpft sind (Tegoni *et al.*, 1996; Bianchet *et al.*, 1996).

Die Lipocaline gehören mit den Fettsäure-Bindungsproteinen (FABP; Übersicht in Banaszak *et al.*, 1994) und den Avidinen (Übersicht in Green, 1990) zur Proteinsuperfamilie der Calycine (Flower *et al.*, 1993). Auch eine Gruppe von Metalloprotease-Inhibitoren (MPI; Baumann *et al.*, 1995) sowie das Triabin (Fuentes-Prior *et al.*, 1997) zählen zu den Calycinen. Die FABPs, die als intrazelluläre Proteine in den Lipidstoffwechsel eingebunden sind, und die Biotin-bindenden Avidine haben wie die Lipocaline selbst die Komplexbildung vorwiegend hydrophober Liganden zur Aufgabe. Die MPIs sowie das Triabin besitzen dagegen inhibitorische Wirkung auf bestimmte Proteasen und zeigen damit eine funktionelle Gemeinsamkeit zu dem Von-Ebner's-Gland-Protein. Alle Calycine weisen als strukturell kennzeichnendes Merkmal ein β -Barrel auf, wenn auch teilweise mit lokalen Abweichungen, wie beispielsweise im Falle des Triabins (Fuentes-Prior *et al.*, 1997). Dabei lassen sich die Calycine in zwei Klassen unterteilen. Die Avidine und die MPIs besitzen wie die Lipocaline ein achtsträngiges β -Barrel als zentrales Faltungsmotiv, wohingegen die FABPs eine zehnbältrige Faltblattstruktur aufweisen. Im Laufe der Evolution scheint sich demnach das Strukturmotiv des β -Barrels als besonders geeignet zur Bindung diverser Liganden erwiesen zu haben, wie die weite Verbreitung der Calycine in der belebten Natur deutlich macht. Besondere Variabilität in Bezug auf die komplexierten Liganden zeigen die Lipocaline mit ihrer achtsträngigen β -Faltstruktur. Ihre universelle Faltungsarchitektur wird hauptsächlich durch die Modifizierung der Peptidschleifenregionen zur spezifischen Bindung unterschiedlicher Moleküle befähigt.

1.3 Das humane Apolipoprotein D als Gerüststruktur

Das humane ApoD (Übersichten in Milne *et al.*, 1993; Rassart *et al.*, 2000), ein physiologisch bedeutsamer Vertreter der Lipocaline, ist ein sekretorisches Glykoprotein aus 169 Aminosäuren. Es wurde bereits in den sechziger Jahren mit Hilfe eines Antiserums gegen das *High Density Lipoprotein* (HDL) des menschlichen Plasmas entdeckt (Ayrault-Jarrier *et al.*, 1963) und konnte zusätzlich im *Very High Density Lipoprotein* (VHDL) wie auch im *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) nachgewiesen werden. Zunächst als *Thin Line Protein* bezeichnet, wurde es im Jahre 1973 schließlich aus dem HDL des Plasmas isoliert (McConathy & Alaupovic).

Die cDNA-Sequenz des ApoD konnte von Drayna *et al.* (1986) ermittelt werden. Hybridisierungsexperimente ergaben, daß die für das ApoD kodierende mRNA in zahlreichen menschlichen Geweben präsent ist. Sie konnte vor allem in Nieren und Nebennierendrüsen,

aber auch in Pankreas, Plazenta, Dünndarm, Leber, Milz, Lunge und dem Zentralen Nervensystem (Drayna *et al.*, 1986), später auch in peripherem Nervengewebe und Cerebrospinalflüssigkeit (Borghini *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. Interessanterweise ist das Expressionsniveau in Leber und Darm, jenen Organen, in denen andere Apolipoproteine vorwiegend synthetisiert werden (Mahley *et al.*, 1984), vergleichsweise gering. Induzierbare Genexpression der mRNA des ApoD wurde in quieszenten Fibroblasten (Provost *et al.*, 1991) und – für das entsprechende Protein der Ratte – in regenerierendem Nervengewebe detektiert (Boyles *et al.*, 1990; Spreyer *et al.*, 1990).

Das ApoD erlangte zusätzliches medizinisches Interesse, da es im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen auftritt und nachgewiesen werden konnte. So wurde es bei bestimmten Brustkrebserkrankungen der Frau als Progesteron-bindender Bestandteil der Zystenflüssigkeit identifiziert (Pearlman *et al.*, 1973) und deswegen als *Progesterone Binding Cyst Protein* (PBCP) bezeichnet (Lea *et al.*, 1987). Haagensen *et al.* (1979) entdeckten das *Gross Cystic Disease Fluid Protein 24* (GCDFP-24) und identifizierten es später als Sekretionsprodukt der die Zysten umgebenden Epithelzellen (Haagensen & Mazoujian, 1986). Durch tryptischen Verdau und Aminosäuresequenzierung des GCDFP-24 konnte dessen Identität mit dem ApoD gezeigt werden (Balbín *et al.*, 1990). Bei Brustkrebserkrankungen des Mannes (Diaz *et al.*, 1999) sowie bei fortgeschrittenen Karzinomen der Prostata (Aspinall *et al.*, 1995) wurde ApoD ebenfalls nachgewiesen.

Ferner findet sich ApoD auch im Verlauf der Alzheimerschen Krankheit und anderen Erkrankungen des ZNS in erhöhter Konzentration in den betroffenen Geweben oder entsprechenden Gewebsflüssigkeiten (Salen *et al.*, 1987; Terrisse *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001). Kürzlich konnte ApoD sogar als Bestandteil des menschlichen Achselschweißes identifiziert werden, aus dem es als *Apocrine Secretion Odor Binding Protein 2* (ASOB2) zusammen mit dem Geruchsstoff *E-3-Methyl-2-hexensäure* (*E-3M2H*) isoliert wurde (Zeng *et al.*, 1996). Schließlich findet sich ApoD im menschlichen Urin, wo es in erhöhter Konzentration bei Nierenfehlfunktionen auftritt und deshalb als Markerprotein herangezogen werden kann (Holmquist *et al.*, 1993).

Die physiologische Funktion des ApoD ist bis heute weitgehend ungeklärt geblieben. Aufgrund einer Assoziation des ApoD mit der Lecithin:Cholesterin-Acetyltransferase im HDL wurde ursprünglich angenommen, daß ApoD für den Transport von Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber verantwortlich ist (Fielding & Fielding, 1980; Drayna *et al.*, 1986). Liganden-Bindungsstudien mit GCDFP-24 ergaben jedoch keine meßbare Affinität von ApoD zu diesem Steroid (Lea 1988; Dilley *et al.*, 1990). Trotzdem scheint ein Zusammenhang zwischen dem Cholesterinhaushalt und ApoD zu bestehen. So konnte bei einem Mausmodell für erbliche Cholesterinstoffwechselstörung in den Astrocyten eine erhöhte Expression von ApoD festgestellt werden (Suresh *et al.*, 1998).

Bindungsstudien mit GCDFP-24 erwiesen eine Affinität von ApoD zu den Steroidhormonen Progesteron und Pregnenolon mit Komplex-Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich (Lea 1988; Dilley *et al.*, 1990). Dies stützte die Vermutung, ApoD könnte am Lipoprotein-assoziierten Transport oder der Speicherung dieser essentiellen Steroide beteiligt sein. Fluoreszenzbindungsstudien mit GCDFP-24 (Morais Cabral *et al.*, 1995) identifizierten Arachidonsäure als weiteren Liganden. Als Transportprotein dieser vierfach ungesättigten C₂₀-Fettsäure, die ein wichtiges Zwischenprodukt der Prostaglandin- und Leukotrienbiosynthese ist, könnte ApoD eine wichtige Funktion in der Regulation zellulärer Vorgänge innehaben.

Aufgrund theoretischer Betrachtungen durch Sequenzvergleich mit dem Bilin-Bindungsprotein und dem Insecticyanin vermuteten Peitsch & Boguski (1990), daß ApoD möglicherweise den Häm-Metaboliten Bilirubin als natürlichen Liganden komplexiert und eventuell aus verletztem Gewebe abtransportiert. Hinweise auf eine solche Funktion gibt das Auftreten des ApoD im Zusammenhang mit *Acute phase*-Situationen (Boyles *et al.*, 1990); der experimentelle Nachweis für die Bindung von Bilirubin konnte aber noch nicht erbracht werden. Die Präsenz des ApoD in separaten Geweben beziehungsweise Körperflüssigkeiten läßt vermuten, daß dieses Protein unterschiedliche physiologische Funktionen übernimmt.

Schon bei der Ermittlung der cDNA-Sequenz (Drayna *et al.*, 1986) war deutlich geworden, daß sich das ApoD strukturell deutlich von anderen Proteinkomponenten des HDL, wie den Apolipoproteinen A-I, A-II (ApoA-II), C-I, C-II, C-III oder E, unterscheidet. Diese Apolipoproteine besitzen als charakteristisches Merkmal jeweils ausgeprägte amphipatisch-helikale Strukturelemente (Elshourbagy *et al.*, 1986), welche die Löslichkeit der Komplexe im Serum gewährleisten. Dagegen zeigt das ApoD eine signifikante Sequenzhomologie zu Proteinen der Lipocalinfamilie (Drayna *et al.*, 1986).

Der Vergleich der Primärstruktur des ApoD mit den Sequenzen von INS und BBP, zweier Insektenlipocaline, deren Kristallstrukturen bekannt sind (Huber *et al.*, 1987a,b; Holden *et al.*, 1987) ergibt eine für Lipocaline vergleichsweise hohe Homologie von 30 % bis 40 % (Peitsch & Boguski, 1990). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, daß besonders Reste im Bereich der β -Faltblattstränge stark konserviert sind. Sequenzabschnitte, in denen Lücken auftreten, fallen fast ausnahmslos in die Peptidschleifen, welche die β -Faltblattstränge miteinander verbinden (siehe Abbildung 2). Die Überlagerung der Primärsequenzen zeigt außerdem die analoge Anordnung der jeweils vier Cysteinreste in BBP, INS und ApoD. In Analogie zum BBP sollte das am Aminoterminal des ApoD gelegene Cys8 eine Disulfidbrücke zu dem im Strang H gelegenen Cys114 ausbilden. Eine zweite Disulfidbindung wurde zwischen Cys41 und dem sich nahe des Carboxyterminus befindenden Rest Cys165 postuliert. Die tatsächliche Ausbildung der Disulfidbrücken nach dem vorhergesagten Muster konnte später experimentell bestätigt werden (Yang *et al.*, 1994).

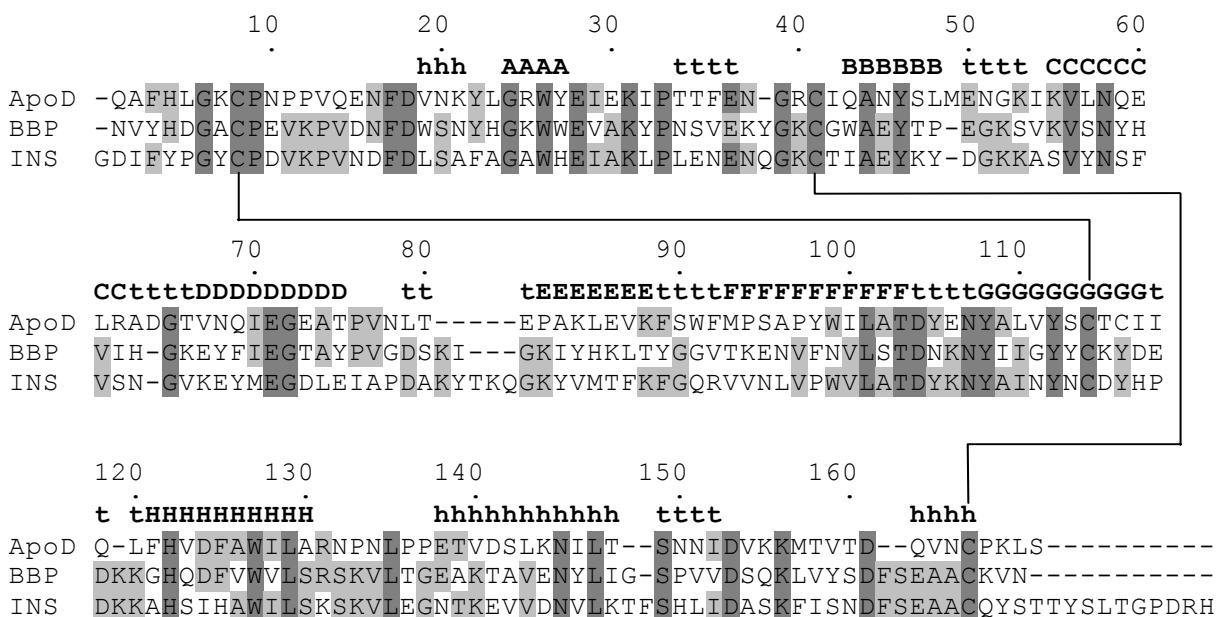


Abbildung 2. Vergleich der Primärstrukturen von ApoD, BBP und INS. Die Anpassung der ApoD-Primärstruktur an die Sequenzen der beiden anderen Lipocaline wurde von Peitsch & Boguski (1990) durchgeführt. Die Aminosäuren des ApoD sind ausgehend vom N-Terminus des maturen Proteins numeriert. In allen drei Lipocalinen konservierte Aminosäurereste sind dunkelgrau unterlegt, Positionen, die in nur zwei Proteinen übereinstimmen, hellgrau. Die Zuordnung der Aminosäuren des ApoD zu Sekundärstrukturelementen ist über der Sequenz angegeben und entspricht einem verbesserten Modell des ApoD (PDB-Datenbankeintrag: 2APD, 1992), welches basierend auf den Kristallstrukturen des BBP (Huber *et al.*, 1987) und INS (Holden *et al.*, 1987) erhalten wurde (Peitsch & Boguski, 1990). Die acht β -Stränge des ApoD sind mit den Buchstaben A bis H, α -helikale Bereiche mit h und Peptidschleifenbereiche mit t bezeichnet. Die zwei intramolekularen Disulfidbindungen, die in allen drei Lipocalinen vorliegen, sind durch Linien angedeutet, welche die beteiligten Cysteinreste verbinden.

Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen ApoD und BBP konstruierten Peitsch und Boguski (1990) unter Verwendung der Atomkoordinaten aus der Kristallstruktur des BBP ein hypothetisches dreidimensionales Strukturmodell für das ApoD. Dabei wurden die Geometrien der Peptidbindungen sowie intramolekulare Kontaktstellen durch Energieminimierung optimiert. Das erhaltene Modell (siehe Abbildung 3) zeigt das für die Lipocaline typische Faltungsmuster (siehe Abschnitt 1.2) eines zylindrisch geschlossenen β -Faltblatts. Eine genauere Betrachtung ergibt, daß zahlreiche Reste, die im BBP elektrostatisch wechselwirken oder Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und dadurch zur Stabilität der β -Faßstruktur beitragen, beim ApoD konserviert sind (Peitsch & Boguski, 1990).

Mittlerweile unterstützen verschiedene experimentelle Befunde das theoretische Modell des ApoD. So ist ein fünfter Cysteinrest, für den sich beim BBP kein Analogon findet, nach dem ApoD-Modell frei zugänglich und solvensexponiert. Benachbart zu diesem auf dem β -Strang G gelegenen Rest Cys116 befindet sich ein ausgedehnter hydrophober Bereich auf der Oberfläche des β -Barrels. Die Vermutung, daß diese Region auf der Außenseite der Hohlstruktur des Lipocalins durch hydrophobe Wechselwirkungen die Bindung des ApoD an die HDL-Partikel fördert, konnte durch experimentelle Ergebnisse gestützt werden. Yang *et al.* (1994)

gelang es, die schon früher beobachtete kovalente Verknüpfung (Blanco-Vaca *et al.*, 1992) des ApoD mit dem HDL-assoziierten ApoA-II auf die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys116 des ApoD und Cys6 des ApoA-II zurückzuführen.

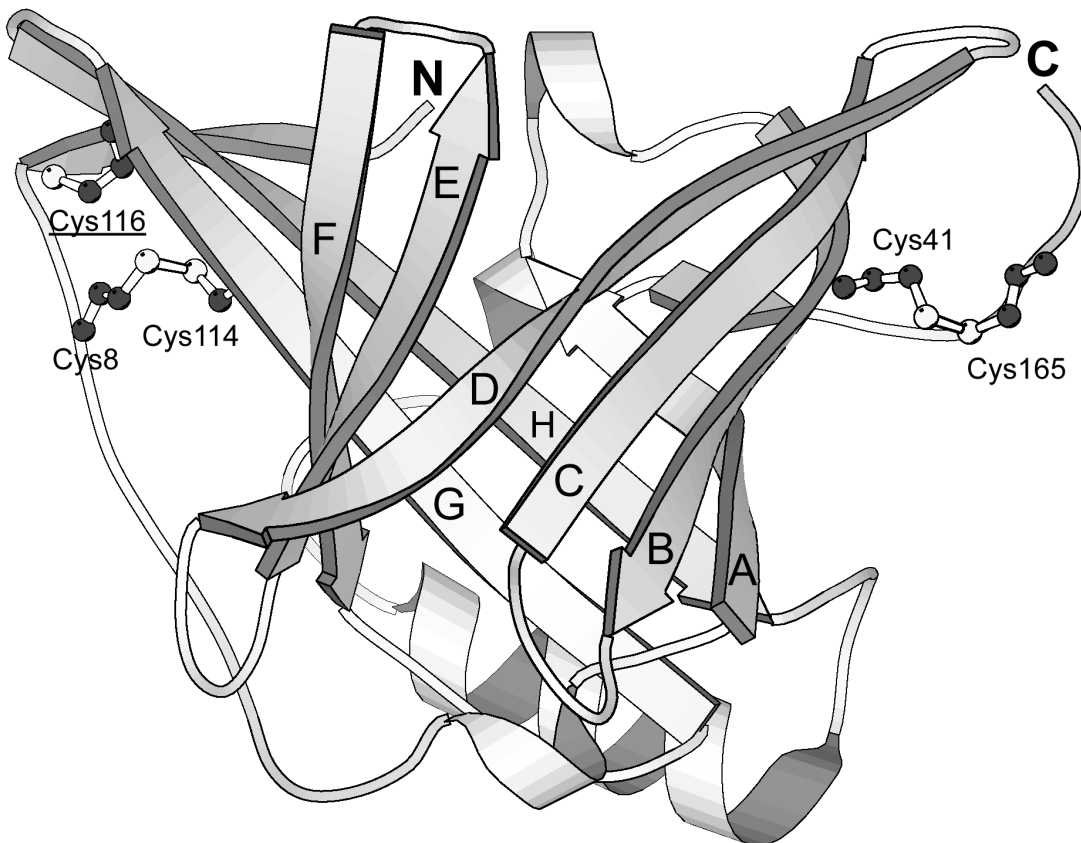


Abbildung 3. Das Strukturmodell des humanen ApoD. Die Darstellung zeigt ein Bändermodell des ApoD, das mit Hilfe des Programms „Molscript“ (Kraulis, 1991) unter Verwendung der von Peitsch & Boguski (1990) auf Basis der Kristallstrukturen des BBP (Huber *et al.*, 1987a,b) und des INS (Holden *et al.*, 1997) konstruierten Atomkoordinaten (PDB-Eintrag: 2APD, 1992) erstellt wurde. Die β -Stränge der Faltblattstruktur sind mit den Buchstaben A bis H gekennzeichnet. Bezeichnet sind außerdem die N- und C-Termini der Polypeptidkette (fettgedruckt) sowie die fünf Cysteinreste des ApoD, von denen Cys8 mit Cys114 und Cys41 mit Cys165 Disulfidbrücken ausbilden. Der Rest Cys116 (unterstrichen) ist im Serum an einer Disulfidbrücke zu ApoA-II beteiligt (Yang *et al.*, 1994) und liegt im monomeren Protein ungepaart vor.

Weiter untermauert wird das theoretische Modell des ApoD durch die solvensexponierte Lage der Aminosäuren Asn45 und Asn78 auf der Außenseite der β -Faltstruktur. Hier findet die N-Glykosylierung des Proteins statt (Schindler *et al.*, 1995), deren Ausmaß in Abhängigkeit vom synthetisierenden Gewebe variiert (Zeng *et al.*, 1996).

Nachdem die Gerüststruktur des Insektenproteins BBP erfolgreich eingesetzt worden war, um Anticaline mit Bindungsaffinität zu Hapten-Liganden zu generieren (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber *et al.*, 2000), erschien es naheliegend, das Konzept der Anticaline auf humane Lipocalingerüste als molekulare Basis zu übertragen. Auf diesem Wege konstruierte Anticaline sollten eine vergleichsweise geringe immunogene Wirkung bei einem möglichem

Einsatz als Therapeutikum am Menschen zeigen und damit hinsichtlich ihrer Verträglichkeit beispielsweise Antikörpern nichthumanen Ursprungs überlegen sein. Weitere Vorteile, die von humanen Anticalinen im Vergleich zu Antikörpern und deren Fragmenten zu erwarten sind, rühren von der geringen Größe der Lipocaline her. Bei kleineren Proteinen ist im allgemeinen mit einer höheren Gewebepenetration zu rechnen (Chester & Hawkins, 1995). Die für eine therapeutische Verwendung entscheidende Verweilzeit im Körper kann bei kleineren Proteinen leichter als bei größeren Molekülen auf die jeweiligen Anforderungen angepaßt werden, indem das Molekül mit Polymeren derivatisiert (Harris *et al.*, 2001) oder kovalent mit anderen Proteinen verknüpft und so die Halbwertszeit verlängert wird (Dennis *et al.*, 2002). Außerdem ist davon auszugehen, daß ein kleineres Protein aufgrund seiner geringeren Oberfläche zu weniger unerwünschten Interaktionen mit Rezeptoren oder anderen Komponenten in einem komplexen Organismus führt.

Zur Verwendung als humanes Lipocalingerüst schien das ApoD besonders geeignet, da dieses extrazelluläre Protein im menschlichen Organismus weit verbreitet auftritt und zudem vermutlich kein spezifischer Rezeptor für das ApoD existiert. Zu einer zielgerichteten Veränderung der bindungsbestimmenden Bereiche sollte im Idealfall die dreidimensionale Struktur des Proteins bekannt sein. Das bei Beginn der vorliegenden Arbeit einzige humane Lipocalin mit bekannter Kristallstruktur war das humane RBP (Cowan *et al.*, 1990), dessen enge und tief in die Kavität hineinreichende Ligandenbindungstasche zur Bindung größerer Liganden wenig geeignet schien. Das theoretische Strukturmodell (Peitsch & Boguski, 1990) des ApoD zeigte dagegen eine dem BBP vergleichbare, weit geöffnete Bindungstasche, welche sich mit den Mitteln des *Protein Engineerings* zur Erzeugung neuer Spezifitäten umgestalten lassen sollte, ohne daß dabei die Faltungseigenschaften des Proteins wesentlich beeinträchtigt werden. Aufgrund der ausgedehnten und vermutlich flexiblen Schleifenbereiche schien die β -Faltstruktur des ApoD im Prinzip nicht nur zur Komplexierung von Haptenen sondern auch von makromolekularen Liganden geeignet.

Neue Bindungsspezifitäten auf der Grundlage einer stabilen Gerüststruktur lassen sich prinzipiell auf zwei Wegen generieren. In einem rationalen Ansatz können mit Hilfe der molekularen Modellierung *in silico* die Einflüsse einzelner Aminosäuren beziehungsweise deren Substitution auf eine potentielle Interaktion mit dem Zielmolekül vorhergesagt werden. Solche computergestützten Berechnungen sind allerdings mit den heute zur Verfügung stehenden technischen Hilfsmitteln noch schwierig durchzuführen (Essen & Skerra, 1994; Schiweck & Skerra, 1997). Vielversprechender ist dagegen ein evolutiver Ansatz. Mittels gezielter Zufallsmutagenese werden Aminosäurepositionen der bindungsbestimmenden Bereiche experimentell randomisiert, so daß eine „Bibliothek“ von Proteinvarianten mit unterschiedlichen Bindungstaschen entsteht. Mittels eines geeigneten Selektionsverfahrens werden aus dieser Bibliothek solche Varianten isoliert, welche die gesuchten Bindungsspezifitäten aufweisen. Die Wahrscheinlichkeit für die Präsenz von Proteinen mit den gewünschten Eigen-

schaften kann in einer kombinierten Vorgehensweise zudem erhöht werden, wenn mittels *Molecular Modelling* diejenigen Aminosäurepositionen, welche an einem Bindungsereignis am ehesten funktionell beteiligt sind, für die Randomisierung ausgewählt werden.

1.4 Das Phagen-Präsentationssystem

Die effiziente Durchmusterung großer Proteinbibliotheken verlangt ein leistungsfähiges Selektionssystem. Ein solches Verfahren sollte zudem die kodierende Information für die selektierten Proteine liefern, da diese dann auf einfache Weise identifiziert werden können. Dies wird durch die physikalische Kopplung von Genotyp und Phänotyp bewerkstelligt. Heutzutage stehen zu diesem Zweck verschiedene Verfahren zur Verfügung. Beim *Phage Display* (Übersichten in Wells & Lowman, 1992; Kay *et al.*, 1996; Barbas *et al.*, 2001) werden Fremdproteine auf der Oberfläche von Phagenpartikeln präsentiert, die im Innern die kodierende Sequenz für das Protein verpackt enthalten. Bei *in vitro*-Selektionssystemen (Übersicht in Amstutz *et al.*, 2001) wie dem *Ribosome Display* wird ein kovalent (Roberts *et al.*, 1997) oder nichtkovalent (Mattheakis *et al.*, 1994; Hanes & Plückthun, 1997) verknüpfter Komplex aus zellfrei synthetisiertem Protein mit der kodierenden RNA – und gegebenenfalls dem Ribosom – zur Selektion verwendet. Auch Konstrukte aus Plasmid-gekoppelten Proteinen konnten erfolgreich in Anreicherungsexperimenten eingesetzt werden (Cull *et al.*, 1992).

Bei zellbasierten Protein-Präsentationssystemen wird dagegen die Wirtszelle benutzt, um die gewünschte Verknüpfung von DNA und Protein zu erreichen. Dabei ist die pro- oder eukaryontische Zelle Träger der genetischen Information für eine Proteinvariante und präsentiert diese zugleich auf ihrer Oberfläche (Übersicht in Ståhl & Uhlén, 1997; Boder & Wittrup, 1997). Von den genannten Protein-Präsentationssystemen hat allerdings das *Phage Display* aufgrund des relativ einfachen aber robusten Aufbaus der filamentösen Bakteriophagen und ihrer einfachen genetischen Handhabbarkeit die weiteste Verbreitung gefunden.

Smith (1985) gelang erstmals die Präsentation von Proteinfragmenten auf der Oberfläche filamentöser Phagen der fd/M13 Familie (Übersicht in Model & Russel, 1988). Die Proteinfragmente waren dazu mit dem Aminoterminus des Phagenhüllproteins pIII gentechnisch fusioniert worden, wobei die ursprüngliche Bezeichnung „Fusionsphage“ die chimäre Struktur des Peptid-präsentierenden Phagen zum Ausdruck bringt. Das pIII ist als ein minores Oberflächenprotein des Phagen ($M_R = 42$ kDa) für dessen Infektiosität verantwortlich, indem es dessen Anheftung an die F-Pili der bakteriellen Wirtszelle vermittelt (Gray *et al.*, 1981; Deng *et al.*, 1999).

Bald darauf wurden die ersten *Phage Display*-Zufallsbibliotheken durch Fusion von Peptiden mit dem pIII erzeugt (Scott & Smith, 1990; Devlin *et al.*, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Smith,

1991). Zudem gelang es, vollständige Proteine auf Phagen zu präsentieren, insbesondere humanes Wachstumshormon (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991) und scF_v-Fragmente von Antikörpern (McCafferty *et al.*, 1990), und durch geeignete Techniken wie beispielsweise chromatographische Methoden Proteine mit gewünschten Eigenschaften aus dem in solchen Bibliotheken repräsentierten Ensemble zu isolieren (Parmley & Smith, 1988; Clackson & Wells, 1994; Übersicht in Hoogenboom, 1997). Neben der Strategie, Fremdproteine mit dem pIII zu fusionieren, wurden Versuche unternommen, Fusionen mit den Phagenhüllproteinen pVIII (Felici *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991), pVI oder dem pIX (Gao *et al.*, 1999) zu verknüpfen und so ebenfalls Präsentation auf der Phagenoberfläche zu erreichen. Das majore Phagenprotein pVIII umhüllt die Phagen-DNA, während pVI Funktionen bei der Assemblierung des Phagen übernimmt und pIX für die Phagenstabilität Bedeutung hat.

Zur Präsentation auf dem Phagen werden die Strukturgene der Proteinvarianten heute meist auf einem sogenannten Phasmidvektor kloniert, der für das entsprechende Fusionsprotein mit pIII in genetisch regulierbarer Weise kodiert und außerdem die intergenische Region des Phagen fl enthält (Lowman & Wells, 1991). F-Pili tragende *E. coli*-Zellen werden mit solchen Phasmiden transformiert und anschließend mit einem Helferphagen (Vieira & Messing, 1987) infiziert – unter gleichzeitiger Induktion der Genexpression für das Fusionsprotein –, was zur Verpackung einzelsträngiger Phasmid-DNA in sogenannte Phagemide führt. Diese Partikel sind natürlichen Phagen sehr ähnlich und können Bakterienzellen infizieren. Durch die Koinfektion mit dem Helferphagen werden die Hüllproteine des nativen Phagens produziert. Durch eine entsprechende Genregulation kann dabei die Produktion des Fusionsproteins so eingestellt werden, daß bei etwa 10 % der Phagemide eine der insgesamt fünf Kopien des pIII durch das Fusionsprotein ersetzt wird.

Diese funktionelle, monovalente Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche erlaubt die Trennung unterschiedlicher Phagemide anhand der Bindungseigenschaften des präsentierten Fremdproteins zu einem gegebenen Zielmolekül. Bindende Phagemide werden isoliert und amplifiziert, indem Bakterienzellen infiziert und damit erneut Phagemide produziert werden. Diese können nun wieder einem Zyklus zugeführt werden, in welchem die Phagemide mit Affinität zum vorgegebenen Liganden weiter angereichert werden.

Anschließend werden die selektierten Proteine in der Regel auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften getestet, indem beispielsweise die Phagemide direkt in einem Assay analysiert werden (Clackson *et al.*, 1991). Alternativ dazu können die Varianten in Form löslichen Proteins unter Verwendung der genetischen Information der Phagemide hergestellt und in einem Bindungsassay (Wells & Lowman, 1992) untersucht werden. Da die selektierte Phagemidpopulation meist heterogen ist und auch Partikel mit nicht-spezifischen Bindungseigenschaften enthält, empfiehlt sich die Analyse zahlreicher Varianten. Dazu eignet sich im Besonderen die Methode des *Colony Screenings* (Skerra *et al.*, 1991), mit der mehrere hundert isolierte Varianten gleichzeitig untersucht werden können. Bei diesem sogenannten

„Filter-Sandwich“-Verfahren werden die zu untersuchenden Varianten von auf einer Membran kultivierten *E. coli*-Kolonien sekretiert und auf der Oberfläche einer zweiten, darunter liegenden Membran gebunden. Um dort eine effiziente und funktionelle Fixierung zu erreichen, werden die Varianten vorzugsweise als Fusion mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998), die Affinität zum humanen Serum-Albumin (HSA) besitzt, produziert, und die „Fangmembran“ wird dementsprechend mit HSA beschichtet. Die Liganden-Bindungseigenschaften der durch die Komplexbildung zwischen ABD und HSA auf der Membran immobilisierten Fusionsproteine können anschließend durch ein chromogenes Nachweisverfahren ermittelt werden. Dazu wird die Membran mit einem beispielsweise durch vorangegangene Kopplung mit Biotin markiertem Liganden inkubiert und gebundener Ligand mittels eines Streptavidin-gekoppelten Reporterenzym nachgewiesen. Die Zuordnung einzelner Farbpunkte auf der Fangmembran zu den entsprechenden Kolonien erlaubt schließlich die gentechnische Isolierung von Varianten mit definierter Bindungsaffinität. Durch den Einsatz von *Phage Display* und anschließende Analyse selektierter Varianten durch *Colony Screening* gelang es unter anderem, Anticaline auf Grundlage des BBP mit Affinität zum Hapten-Liganden Digoxigenin zu gewinnen (Schlehuber *et al.*, 2000).

Mittlerweile konnte die Leistungsfähigkeit des *Phage Display* in zahlreichen Anwendungen gezeigt werden. Besonders weite Verbreitung hat dieses Verfahren bislang bei der Isolierung von Antikörperfragmenten mit definierten Bindungsspezifitäten gefunden (Vaughan *et al.*, 1996; Übersichten in Hoogenboom *et al.*, 1998; Jones, 1998). Peptid-Zufallsbibliotheken konnten mittels *Phage Display* erfolgreich auf Vertreter mit inhibitorischer Wirkung durchmustert werden (Sato *et al.*, 1996). Neuerdings wird das *Phage Display* auch eingesetzt, um auf Struktur- beziehungsweise Faltungseigenschaften von Proteinen zu selektieren. So konnten erfolgreich Proteinvarianten von Subtilisin (Ruan *et al.*, 1998) und Ribonuclease T1 (Sieber *et al.*, 1998) mit erhöhter thermodynamischer Stabilität gewonnen werden. Selbst die Eigenschaften bestimmter Enzyme konnten durch die Anwendung des *Phage Display* verändert werden (Soumillion *et al.*, 1994; Widersten & Mannervik, 1995, Pedersen *et al.*, 1998). Ferner wurden neuartige Antikörper mit katalytischen Eigenschaften generiert, indem eine Phagenbibliothek auf Varianten mit Affinität zu einem Übergangszustands-Analogen durchmustert wurde (Fujii *et al.*, 1998).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung eines humanen Lipocalins, des ApoD, als Gerüststruktur zur Entwicklung künstlicher Bindungsproteine, sogenannter Anticaline, untersucht werden. Gleichzeitig sollte das Anwendungsspektrum der Anticaline als universelle, maßgeschneiderte Bindungsproteine erweitert werden, indem erstmals Lipocalin-Varianten mit Affinität zu Protein-Antigenen generiert werden sollten. Als molekulares Gerüst wurde das

humane ApoD ausgewählt, für dessen Tertiärstruktur aufgrund von Homologiebetrachtungen mit dem BBP ein theoretisches Modell bekannt war.

Um die beabsichtigte Umgestaltung der Ligandenbindungstasche durchführen zu können, sollte zunächst die gentechnische Produktion des ApoD etabliert und das Protein charakterisiert werden. Mit dem rekombinanten ApoD sollten Bindungsversuche mit verschiedenen niedermolekularen Substanzen durchgeführt werden, um einerseits die biochemische Aktivität des ApoD nachzuweisen und andererseits Aufschluß über die noch weitgehend unklare physiologische Funktion dieses bedeutsamen Lipocalins zu gewinnen.

Anschließend sollte die Bindungsspezifität des ApoD mit Hilfe eines evolutiven Verfahrens verändert werden. Mittels einer geeigneten Strategie sollte dazu eine möglichst komplexe Bibliothek von Varianten des ApoD generiert werden, aus welcher sich anschließend mit Hilfe des *Phage Display* in Verbindung mit dem *Colony Screening*-Verfahren bindungsaktive Varianten isolieren lassen sollten. Deshalb sollte ein System zur Phagemid-Präsentation dieses Lipocalins entwickelt werden. Mit der erzeugten ApoD-Variantenbibliothek sollten Anreicherungsversuche in Bezug auf Muteine mit Bindungsaffinität zu Proteinliganden durchgeführt werden. Schließlich sollten mittels der Selektionssysteme isolierte Varianten charakterisiert und ihre molekularen Erkennungseigenschaften analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Escherichia coli-Stämme

CJ236i	<i>dut, ung, thi, relA1</i> [F', <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)</i> (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987)
JM83	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
JM83-F'	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15 [pCJ105(Cam^r)]</i> (Schmidt, 1995)
KS272	F' <i>ΔlacX74, galE, galK, thi, rpsL (= strA), ΔphoA (pvuII)</i> (Meerman & Georgiou, 1994)
TG1-F'	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB)</i> (Gibson, 1984)
W3110	F' (Bachmann, 1972)
XL1-Blue	<i>endA1, hsdR17(r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, λ⁻, recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169 [F': <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)</i>]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

Alle Stämme waren aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München.

Bakteriophagen

VCS-M13 (Helferphage)	Stratagene, Heidelberg (Vieira & Messing, 1987)
-----------------------	--

2.1.2 Vektoren und cDNA

„Human liver matchmaker cDNA library“ (kloniert im Vektor pGAD10)	Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA
pASK111	von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK60-His	von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pBBP22	(Schlehuber, 2001), von S. Schlehuber, TU München
pASK75-strepII	(Voss & Skerra, 1997), von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide zur Amplifizierung des ApoD-Gens

MV-1 5' – CCC AAG CAT TTC ATC TTG GGA AGT GC*C –3'

MV-2 5' – GCT GAG CTT GGG GCA GTT CAC CTG *G –3'

An den mit Stern gekennzeichneten Stellen befand sich anstelle der Phosphodiester-Bindung eine Phosphothioat-Bindung (Skerra, 1992).

Oligodesoxynukleotide zur Herstellung der Zufallsbibliothek

MV-4 5' – GAT GGT ACG AAA TTG AGA AGA TCC CAN NKN NKN NKN
NKN NKG GAC GCT GCA TCC AGG –3'

MV-5 5' – GGC TTC ACC TTC GAT TTG MNN CAC MNN MNN MNN MNN
MNN CAA MNN CTG GTT TAA CAC TTT GAT C –3'

MV-6 5' – GAG CCT GCC AAG CTC GAG GTT AAG NNK NNK NNK NNK
NNK CCA TCG GCA CCG TAC TG –3'

MV-7 5' – CCA AGA TCC AAG CAA AAT CMN NGT GMN NMN NMN NMN
NMN NAC TMN NAC AGG AAT ACA CGA GGG C –3'

MV-8 5' – GTG AAT AAG TAT CCA GGA AGA TGG TAC GAA ATT GAG
AAG –3'

MV-9 5' – CCT CGA GCT TGG CAG GCT CAG TGA GGT TAA CTG GGG
TGG CTT CAC CTT CGA TTT G –3'

MV-10 5' – CTG GAG GGA GAG CCA CGT TTC TGG CCA AGA TCC AAG
CAA AAT C –3'

(M = A/C; N = A/C/G/T; K = G/T)

Oligodesoxynukleotide für die *in vitro* Mutagenese

MV-3 5' – AAG TTG GAT ACT AGT ACA GGA ATA –3'

MV-20 5' – CCG AAC TAC TCT GAC AGG AAT ACA CG –3'

MV-21 5' – CCC ATC CAA ACA AAC TGT GGG ATC TTC T –3'

MV-22 5' – GTC CAA ACG AAA TCT GCC GTG GGA TCT T –3'

MV-23 5' – GTC CCA AAG AAA CCT GAA ATG GGA TCT T –3'

MV-24 5' – TCA AGC AAA ATC AGA GTG AAG AAC CG –3'

MV-25 5' – GTC CAT AAA GAA ACT GAA TTG GGA TCT T –3'

MV-26 5' – GCA GCG TCC CAC CTG AAA CAT AGT TGG G –3'

askD21 5' – TAC GGT AGC GAA GCC AGC CAG AGC CAC TGC AAT –3'

askD27 5' – TTC GTA CCA TCT TCC TGG ATA CTT ATT CAC GT –3'

askD28 5' - GTT TCT GGA GGG AGA GCC ACG TTT CTG GCC AAG ATC
CAA -3'

askD36 5' - CTC AGA GCC ACC ACC TCG CTG AGC TTG GGG CAG TT -3'

askD37 5' - CAA CAG TCT AGG CCC CAC CAG CGC TGA GCT TGG GGC
A -3'

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

F-83 5' - AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA -3'

PR-1 5' - CGC AGT AGC GGT AAA CG -3'

askD20 5' - CCA CTC CCT ATC AGT GAT -3'

Die Oligodesoxynukleotide MV-1, MV-2 und MV-3 wurden von der Firma NAPS, Göttingen, synthetisiert und mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.7) gereinigt. Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid Interaktiva, Ulm, in HPLC-gereinigter Form bezogen.

2.1.4 Proteinreagenzien

Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (außer <i>Bst</i> XI und <i>Eco</i> 47III)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bst</i> XI	Thermo-Hybaid, Heidelberg
<i>Eco</i> 47III	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

DNA-modifizierende Proteine

Alkalische Phosphatase aus arktischen Shrimps	United States Biochemical, Bad Homburg
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 units/ μ l)	Stratagene, Heidelberg
T4-DNA-Ligase (3 Weiss units/ μ l)	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase (6 Weiss units/ μ l)	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Polymerase (3 units/ μ l)	New England Biolabs, Frankfurt
T4-Polynukleotidkinase (10 units/ μ l)	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 units/ μ l)	Promega, Mannheim

Andere Proteine

anti-Digoxigenin-F _{ab} /Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics, Mannheim
anti-Maus-IgG/Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie, Deisenhofen
anti-pIII IgG, monoklonaler Antikörper, Maus	MoBiTec, Göttingen
Benzonase	E. Merck, Darmstadt
Extravidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie, Deisenhofen
Hämoglobin, human	Sigma Chemie, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie, Deisenhofen
Myoglobin aus Rinderskelettmuskel	Sigma Chemie, Deisenhofen
Nickel-NTA/Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Qiagen, Hilden
Rinder-Serum-Albumin, Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Serum-Albumin, human (HSA)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.5 Chemikalien

Aceton	E. Merck, Darmstadt
Acetonitril	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
N-Acetyl-L-tryptophanamid	Sigma Chemie, Deisenhofen
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 0,8 % Bisacrylamid („Rotiphorese-Gel 30“)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Fertiglösung für Harnstoffgele („Sequagel concentrate, diluent“)	National Diagnostics, Atlanta, GA, USA
Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Agarose für die Gelelektrophorese	Boehringer Mannheim, Mannheim
Agarose, niedrigschmelzend (<i>Low Melting Point</i>)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Ammoniumacetat	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck, Darmstadt
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS)	Sigma Chemie, Deisenhofen

Arachidonsäure (100 mg/ml in Ethanol)	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bilirubin	Sigma Chemie, Deisenhofen
D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	E. Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck, Darmstadt
1-Butanol	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid, Dihydrat	Applichem, Darmstadt
Citronensäure, Trinatriumsalz	Sigma Chemie, Deisenhofen
Chloramphenicol (Cam)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Chloroform	E. Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$, 37-55 TBq/mmol	NEN Life Science Products, Belgien
2'-Desoxyinosin-5'-triphosphat (dTTP, 100 mM)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Desoxynukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Dichlordimethylsilan („Silanization Solution II“)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -amino- caprinsäure-N-hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylformamid (DMF)	E. Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Dioxan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Essigsäure	Riedel-de Haën, Seelze
N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbo- diimid (EDC)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 1 % w/v in Wasser	Sigma Chemie, Deisenhofen

Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Gelatine (aus 60 % Schwein, 40 % Rind) 253 Bloom	Deutsche Gelatine-Fabriken Stoess, Eberbach/Baden
D(+)-Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	E. Merck, Darmstadt
Guanidiniumchlorid	Amresco, Solon, OH, USA
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan- sulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie, Deisenhofen
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Imidazol	E. Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Sigma Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumsulfat	Riedel-de Haën, Seelze
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoethanol	E. Merck, Darmstadt
γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan	E. Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
<i>E</i> -3-Methyl-2-hexensäure	Narchem Corporation, Chicago, IL, USA
Mineralöl für die PCR	Sigma Chemie, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	E. Merck, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat	Amresco, Solon, OH, USA

P20, Detergenz	Biacore, Uppsala, Schweden
Phenol, redestilliert (> 99 %)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Dr. Th. Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Pregnenolon (5-Pregnen-3- β -ol-20-on)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Progesteron	Sigma Chemie, Deisenhofen
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, konzentriert	Riedel-de Haën, Seelze
Testosteron	Sigma Chemie, Deisenhofen
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
tRNA (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Boehringer Mannheim AG, Mannheim
Xylencyanol	Sigma Chemie, Deisenhofen
Zinksulfat	E. Merck, Darmstadt

2.1.6 Standards und Kits

DNA-Größen-Standards:

100 bp-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
1 kbp-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt
λ /BstEII-Verdau	New England Biolabs, Frankfurt
ϕ X174/HaeIII-Verdau	New England Biolabs, Frankfurt

Kits zur Isolierung von DNA:

EZNA Cycle Pure Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Jetsorb Gel Extraction Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Qiagen Plasmid Kit Midi	Qiagen, Hilden

Kits für die Sequenzierung von DNA:

BigDye Terminator Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
T7-Sequencing Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Protein-Größen-Standards:

SDS-PAGE Standard, Low range	Bio-Rad Laboratories, München
SDS-PAGE Standard, Low range, vorgefärbt	Bio-Rad Laboratories, München

2.1.7 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Autoklav „Varioklav Typ 500“	H & P Labortechnik, Oberschleißheim
BIACORE X, Gerät zur Messung der Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR)	Biacore, Uppsala, Schweden
Brutschränke:	
B 5060 EK	Heraeus Christ, Osterode
BM 800	Memmert, Schwabach
Pelion	Bayer, Frankfurt am Main
Drehtisch zum Ausplattieren	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Durchflußdetektoren:	
Variable Wavelength Monitor	Knauer, Berlin
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau
Elektrophoresekammern	Eigenbau
Elektroporator MicroPulser	Bio-Rad Laboratories, München
ELISA-Photometer Spectra-Max 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Fluoreszenzspektrometer LS 50 B	Perkin-Elmer, Langen
Fraktionssammler:	
Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superrac 2211	LKB Instrument, Gräfelfing
Gelfiltrationssäulen:	
PD-10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superdex 75 HR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
G-3000 PW XL	TosoHaas, Stuttgart
G-3000 SW XL	TosoHaas, Stuttgart
Geltrockner 2003 Slab Gel Dryer	LKB Instrument, Gräfelfing
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer IKA-Combimag	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau
HPLC-Pumpe Dynamax SD-300 mit Detektor Dynamax UV-1	Rainin, Woburn, MA, USA
Metallblockthermostat Techne Dri-Block 2A	Thermodux, Göttingen

Netzgeräte:

Power Pack 25

Biometra, Göttingen

Power Supply 500/500

Renner, Dannstadt

Peristaltische Pumpe P1

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

pH-Meter:

E512

Metrohm, Herisau

pH 526

Wissenschaftlich Technische Werkstätten,
Weilheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P200, P1000

Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich

Multipette 4780 mit Pipettenaufsätzen

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Pipettierhilfe accu-jet

Brand, Wertheim

Rollenmischer IDL TRM-V

Kühn & Bayer, Nidderau

Schüttelgerät Vortex-Genie 2

Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Schüttelinkubatoren:

G25 und R25

New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA

TR-125/ITE-K

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Schwenkinkubator WT12

Biometra, Göttingen

Signalschreiber:

2210 2-channel

LKB Instrument, Gräfelfing

REC 112

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sofortbildkamera Polaroid MP4, Filme 667

Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA

Speed-Vac-Konzentrator Univapo UVC 150H

UniEquip, Martinsried

Spektropolarimeter J-810

Jasco, Groß-Umstadt

Trockenschrank

Heraeus Christ, Osterode

UV/VIS-Spektralphotometer

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Ultrospec 2000 und Ultrospec 3000

UV-Handlampe VL-4LC (254 nm / 365 nm)

Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg

UV-Transilluminator TI-3

Biometra, Göttingen

Vakuumpumpen:

Drehschieberpumpe RD4

Vacuubrand, Wertheim

Membranpumpe MZ2C

Vacuubrand, Wertheim

Waagen U5000D, R160P

Sartorius, Göttingen

Wasserbad Haake F6 C25

Thermo Haake, Karlsruhe

Zentrifugen:

5414 C	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sigma 4K10	Sigma, Osterode
Sorvall RC5B mit Rotoren SS34 und SLA3000, Sorvall RC3B mit Rotor H-6000A/HBB-6, Sorvall RMC14	Kendro Laboratory Products, München
Zentrifugenbecher	Nalgene, New York, NY, USA

2.1.8 Sonstiges Material

Chromatographie-Säulen 0,7 cm x 10 cm und 1,0 cm x 10 cm	Sigma Chemie, Deisenhofen
Chromatographie-Säulenmaterialen	
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Phenylsepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Q-Sepharose High Performance	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sepharose CL4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Streptavidin-Sepharose	hergestellt am Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München
Dialyseschläuche:	
Spectra/Por, Ausschlußgröße 6-8 kDa	Spectrum Medical, Houston, TX, USA
Typ 27, Ausschlußgröße 12-16 kDa	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
DC-Glasplatten Kieselgel 60 F254	E. Merck, Darmstadt
Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal Biotech, Hamburg
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories, München
Elektrodenabstand 2 mm	
Einmal-Kanüle 0,9 mm · 70 mm	Kühn & Bayer, Nidderau
Einweg-Spritzen 1, 2, 5, 10, 20, 50 ml, steril	Henke-Sass-Wolf, Tuttlingen
Drygalski-Spatel (Glas)	Eigenbau
ELISA-Mikrotiterplatten „Falcon Flexible Assay-Plates Micro Test III“	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Filterpapier Whatman 3MM	Bender & Hobein, München
Konzentratoren 4 ml bzw. 15 ml	Millipore, Eschborn
Ultrafree, Ausschlußgröße 10 kDa	
Kunststoffolie aus Polypropylen	Schwan-Stabilo, Heroldsberg
Kunststoffröhrchen	
15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Cellstar PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Membranfilter:

Immobilon P (0,45 µm)	Millipore, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
Nunc „Cryo-Tubes“ und „Immunosticks“	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen, 94 mm bzw. 140 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim/Baden
Typ 108.002 QS (Absorption)	
Typ 102-QS (Fluoreszenz)	
Typ 110 QS (CD)	
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röntgenfilm X-OMAT DS	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Sterilfilter	
Filtropur 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Millex HV 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Spin X, 0,45 µM	Costar, Corning, NY, USA
Zellschaber 3010	Costar, Corning, NY, USA

2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer (Sambrook et al., 1989) wurden mit bidestilliertem oder Milli-Q⁵⁰-entmineralisiertem Wasser angesetzt. Für Arbeiten mit Bakterien, Bakteriophagen und Nukleinsäuren benutzte Lösungen wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Medien für die Anzucht von Bakterien wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Kulturplatten wurden bei 4 °C gelagert. Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Medien**2xYT-Medium**

Bacto Trypton	16 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
NaCl	10 g/l
Bacto Agar (nur für Kulturplatten/Weichagar) mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt	15 g/l bzw. 6 g/l

GYT-Medium

Bacto Trypton	0,25 %
Bacto Yeast Extract	0,125 %
Glycerin	10 %
mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt	

LB-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar (nur für Kulturplatten)	15 g/l
mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt	

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 eingestellt, im Autoklav sterilisiert; zu 1 l wurden je 10 ml 1 M MgCl ₂ , 1 M MgSO ₄ sowie 20 ml 20 % w/v Glucose als sterile Lösung gegeben	

Antibiotika-Lösungen

Antibiotika wurden als sterile Stammlösungen bei -20 °C aufbewahrt und dem autoklavierten Medium erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung	Zugabe im Verhältnis
Ampicillin	100 mg/ml in Wasser	1:1000
Chloramphenicol	35 mg/ml in 70 % v/v Ethanol	1:1000
Kanamycin	35 mg/ml in Wasser	1:500
Tetracyclin	10 mg/ml in 70 % v/v Ethanol	1:1000

Anhydrotetracyclin-Lösung

Stammlösungen zu 50 µg/ml und 2 mg/ml in DMF

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer

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

Puffer für die SDS-PAGE

Fling & Gregerson Laufpuffer

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l
pH 8,8 stellt sich ein	

4x Lower Tris

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

4x Upper Tris

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

5x Auftragspuffer

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 %
Glycerin	25 %
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
2-Mercaptoethanol (reduzierender Puffer)	12,5 % v/v

Färbelösung

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

Entfärbelösung

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v

Aufbewahrungslösung

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v

Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion

Chloroform/Isoamylalkohol Mischung 24:1 v/v

wassergesättigtes Phenol: Phenol bei 65 °C aufschmelzen, mit ½ Volumen Wasser mischen und Phasentrennung abwarten

Phenol/Chloroform: wassergesättigtes Phenol mit Chloroform/Isoamylalkohol mischen Mischung 1:1 v/v

Sonstige Puffer

AP-Puffer (Reaktionspuffer für die Alkalische

Phosphatase)	
Tris/HCl pH 8,8	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Benzonase-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Chromatographie-Puffer für IMAC (CP)

Na ₂ HPO ₄	40 mM
NaCl	1 M
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

HBS

NaCl	150 mM
HEPES	10 mM
EDTA	3,4 mM
mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt	

KSH-Puffer

K ₂ SO ₄	50 mM
HEPES	20 mM
mit KOH auf pH 7,5 eingestellt	

PBS

NaCl	115 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
KH ₂ PO ₄	4 mM

PBS/T 0,1 und PBS/T 0,5

PBS mit 0,1 % bzw. 0,5 % v/v Tween 20

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer)

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

Saccharose-Aufschlußpuffer

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

TE-Puffer

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

2.2 Mikrobiologische und gentechnische Methoden

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Zur Selektion auf Plasmide oder Episome wurden den Agar-Kulturplatten vor dem Erkalten entsprechende Antibiotika zugesetzt. Die Agar-Platten mit den Bakterienkolonien wurden bis zu vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt. Kolonien einer Platte wurden bis zu zweimal auf frischen Platten ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten.

Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurde, sofern nicht anders erwähnt, LB-Medium mit dem für den jeweiligen Bakterienstamm geeigneten Antibiotikum versetzt. Für Kulturen im 4-ml-Maßstab wurden 15-ml-Kunststoffkulturröhrchen, für größere Ansätze Erlenmeyerkolben mit dem 2,5-fachen Gefäßvolumen verwendet.

Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 100 ml wurden direkt mit Einzelkolonien angeimpft, größere Kulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur angeimpft und bei 200 rpm im temperierten Schüttelinkubator kultiviert.

Das Wachstum der Zellen wurde durch Messen der Optischen Dichte bei 550 nm (OD_{550}) bestimmt. Dabei entspricht eine Optische Dichte von $OD_{550} = 0,26$ einer Zelldichte von etwa $1,6 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Skerra, 1989).

Transformierte *E. coli*-Zellen wurden als Glycerinkultur konserviert, indem 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1 ml sterilisiertem 87 % v/v Glycerin gemischt und bei -20 °C gelagert wurden.

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

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen zunächst in eine transformationskompetente Form überführt. Neben der klassischen $CaCl_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) wurde auch die Methode der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt. Mit der $CaCl_2$ -Methode können je nach verwendetem *E. coli*-Stamm und eingesetzter Plasmid-DNA 10^5 bis 10^6 Transformanden pro μg DNA erhalten werden. Für die Herstellung komplexer Zufallsbibliotheken wurde die Methode der Elektroporation benutzt, mit der eine deutlich höhere Transformationseffizienz erreichbar ist. Abhängig von der verwendeten Plasmid-DNA gelingt es damit, zwischen 10^8 und 10^{10} Zellen pro μg eingesetzter DNA zu transformieren.

2.2.2.1 Transformation nach der CaCl_2 -Methode

Für die Herstellung kompetenter Zellen (Sambrook *et al.*, 1989) wurden 50 ml LB-Medium (bei Verwendung der Stämme XL1-Blue und CJ236i unter Zusatz von Tetracyclin) mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer Optischen Dichte von $\text{OD}_{550} = 0,5$ inkubiert. Die Zellen wurden in ein 50-ml-Kunststoffröhrchen überführt und durch Zentrifugation (4100 g, 4 °C, 10 min) vom Medium getrennt. Das Sediment wurde in 40 ml einer eiskalten Lösung von 100 mM MgCl_2 aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (4100 g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen mit 20 ml eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in 2 ml 50 mM CaCl_2 mit 15 % v/v Glycerin aufgenommen. Nach Aliquotierung der Suspension à 200 µl wurden die Zellen transformiert oder bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die eigentliche Transformation wurden 200 µl der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1 bis 5 µl der Plasmid-DNA-Lösung (ca. 5 ng Plasmid-DNA) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Wärmeschock für 5 min bei 37 °C wurde die gesamte Suspension in ein mit 2 ml LB-Medium gefülltes 15-ml-Kulturröhrchen gegeben und bei 37 °C im Inkubator geschüttelt. Nach 45 min wurden zwecks Selektion auf Transformanden 100 µl der Bakterienkultur auf einer Antibiotikum enthaltenden LB-Agar-Kulturplatte ausplattiert. Wenn eine niedrige Transformationsausbeute zu erwarten war, wurden die restlichen Zellen nach Zentrifugation (4100 g, 4 °C, 5 min) und Dekantieren des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit aufgenommen und vollständig ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden Einzelkolonien transformierter Zellen erhalten.

2.2.2.2 Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen des Stammes *E. coli* XL1-Blue wurden in Anlehnung an die Vorschriften von Tung & Chow (1995) und Hengen (1996) hergestellt.

Dazu wurde 1 l LB-Medium, dem für einzelne Experimente (siehe Abschnitt 3.7.1) Tetracyclin zugesetzt worden war, im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur von XL1-Blue, die in LB/Tet bei 37 °C und 200 rpm kultiviert worden war, angeimpft und bei 26 °C und 200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend in sterilen SLA3000-Bechern zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 15 min). Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen durch Resuspendieren in je 500 ml sterilem, eiskaltem 10 % v/v Glycerin und anschließendes Zentrifugieren zweimal gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in eiskaltem GYT-Medium zu einem Gesamtvolumen von 2 ml aufgenommen, zu je 200 µl aliquotiert und entweder sofort transformiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurde das Elektroporationssystem „MicroPulser“ der Firma Bio-Rad eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt und die verwendeten Geräte, Pipettenspitzen und Küvetten vorgekühlt. Zu 40 µl bis 200 µl der Suspension frisch präparierter oder auf Eis aufgetauter elektrokompetenter Zellen wurden 3 bis 25 µl der Plasmid-DNA-Lösung in TE/10-Puffer (TE 1:10 mit Wasser verdünnt) gegeben und durch Pipettieren vermischt. Während einminütiger Inkubation wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt, bevor für eine Dauer von ca. 5 ms eine Spannung von 2,5 kV angelegt wurde, entsprechend einer Feldstärke von 12,5 kV/cm.

In die Küvette wurde sofort 1 ml eiskaltes SOC-Medium pipettiert, die Zellsuspension in ein Kulturröhrchen oder, bei mehreren identischen Ansätzen, in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und die Küvette mit 1 ml SOC nachgespült. Anschließend wurde die vereinigte Zellsuspension für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Zur Ermittlung der Transformationskompetenz der Zellen wurden daraufhin Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt und auf LB-Agar, dem zur Selektion auf Plasmidmarker das entsprechende Antibiotikum zugesetzt worden war, ausplattiert.

Zur Herstellung von Zufallsbibliotheken wurde der gesamte Ansatz zu 1 bis 1,5 l 2xYT/Cam-Medium (auf 37 °C temperiert) gegeben und bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde das Volumen so gewählt, daß sich eine Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ einstellte (siehe Abschnitt 2.2.10.3). Diesem Ansatz wurden schließlich Zellen zur Phagemidproduktion sowie zur Konservierung der Bibliothek entnommen (siehe Abschnitt 2.2.10).

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

2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse von Transformanten, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden, nach ortsgerichteter Mutagenese oder durch Infektion mit Phagemiden nach einer Affinitätsanreicherung erhalten worden waren, wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone im analytischen Maßstab präpariert. Für umfangreichere DNA-Arbeiten sowie zur Konservierung der ApoD-Zufallsbibliotheken nach der Elektroporation wurde Plasmid-DNA im präparativen Maßstab isoliert.

Analytischer Maßstab. Die Plasmid-DNA wurde mit dem „Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit“ der Firma Genomed nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge sedimentiert (Sigma 4K10, 4400 g, 4 °C, 10 min) und der Überstand abgezogen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt mit 75 µl TE-Puffer eluiert, wobei typischerweise 10 bis 20 µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

Präparativer Maßstab. Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Dazu wurden 50 ml einer stationären Übernachtskultur, die in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C im Schüttler inkubiert worden war, zentrifugiert (Sigma 4K10, 4400 g, 4 °C, 10 min) und anschließend die Plasmid-DNA gemäß den Herstellerangaben präpariert. Im letzten Schritt wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer aufgenommen, wobei ca. 100 µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde direkt zur Hydrolyse mit Restriktionsenzymen im analytischen und präparativen Maßstab eingesetzt. Bis zur Verwendung wurde sie bei 4 °C gelagert.

2.2.3.2 Präparation von Einzelstrang-DNA

Für die ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel *et al.* (1987) wurde einzelsträngige DNA (ssDNA) der zu mutagenisierenden Plasmide präpariert. Dazu wurden mit diesen Plasmiden, welche jeweils die intergenische Region des Phagen ϕ 1 trugen (Skerra, 1989), Zellen des Stammes *E. coli* CJ236i transformiert. Durch Infektion dieser Zellen mit dem Helferphagen VCS-M13 wurde der kodierende Strang der Plasmide in einzelsträngiger Form in Phagemide verpackt. Aus den sezernierten Phagemid-Partikeln wurde die ssDNA isoliert (Vieira & Messing, 1987; Geisselsoder *et al.*, 1987).

Durchführung. Zellen des Stammes *E. coli* CJ236i wurden mit dem zu mutagenisierenden Plasmid transformiert (Abschnitt 2.2.2.1). Mit einer Einzelkolonie wurde eine 4-ml-Kultur in LB-Medium, dem je nach auf dem Plasmid kodierter Resistenz Ampicillin oder Chloramphenicol zugesetzt worden war, angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden im Verhältnis 1:100 20 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,26$ (entsprechend ca. $1,6 \cdot 10^8$ Zellen/ml) geschüttelt. Der Kultur wurde 1 ml entnommen, in ein steriles Kulturröhrchen überführt und mit VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer *moi* (*Multiplicity of Infection*) von 10 infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde die 1-ml-Kultur zu 20 ml LB-Medium gegeben. Diesem Medium wurde zur Selektion auf das Plasmid Ampicillin oder Chloramphenicol und zur Selektion auf Infektion durch den Helferphagen das Antibiotikum Kanamycin zugesetzt.

Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 rpm wurde die Kultur in ein steriles SS34-Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen abgetrennt, anschließend der die Phagemide enthaltende Überstand in ein zweites SS34-Röhrchen überführt und für 30 min bei RT mit 40 µl einer 10 mg/ml Lösung von RNase A

inkubiert. Die Phagemidpartikel wurden durch Zugabe von 5 ml 3,5 M NH_4OAc , 20 % w/v PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt. Das durch anschließende Zentrifugation (18000 g, 4 °C, 15 min) erhaltene Präzipitat wurde in 200 μl Hochsalzpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Nach Überführen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (18500 g, 4 °C, 2 min) abgetrennt wurden. Der die Phagemide enthaltende Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Zur Abtrennung der Phagenproteine von der ssDNA wurde die Lösung zweimal mit 200 μl wassergesättigtem Phenol und je einmal mit 200 μl Phenol/Chloroform und 200 μl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur Minimierung des Verlustes an DNA wurden die organischen Phasen mit 100 μl TE-Puffer in der gleichen Reihenfolge rückextrahiert. Die wäßrigen Phasen (300 μl) wurden vereinigt und die ssDNA nach Zugabe von 30 μl 7,8 M NH_4OAc und 750 μl Ethanol bei -20 °C für 1 h gefällt. Das nach Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C, 15 min) erhaltene Präzipitat wurde nach vorsichtigem Abziehen des Überstandes mit 500 μl 70 % v/v vorgekühltem (-20 °C) Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 μl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Um die Menge sowie den Reinheitsgrad der ssDNA abzuschätzen, wurde 1 μl einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Mit der beschriebenen Methode konnten bis zu 50 μg Einzelstrang-DNA isoliert werden.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde absorptionsspektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption = 1 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die Abwesenheit kontaminierender Proteine in der zu untersuchenden DNA-Lösung, die ebenfalls zur Absorption bei 260 nm beitragen, wurde mittels des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) überprüft. Laut Glasel (1995) kann bei einem Quotienten A_{260}/A_{280} größer 1,9 der Proteingehalt zur Konzentrationsbestimmung der DNA vernachlässigt werden. Bei mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.5.3) gereinigter Plasmid-DNA wurde regelmäßig ein Quotient größer 2 ermittelt.

Die Konzentration von Oligodesoxynukleotiden wurde ebenfalls durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dazu wurde der Extinktionskoeffizient ϵ_{260} jedes Oligodesoxynukleotides näherungsweise aus den Inkrementen der einzelnen Basen (A: $15,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; C: $7,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; G: $11,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; T: $8,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet. Für gereinigte Oligodesoxynukleotide erwies sich zur Extinktionsmessung eine Verdünnung der erhaltenen Lösung von 1:200 in TE als geeignet.

DNA-Fragmente wurden vor der Ligierung durch analytische Agarose-Gelelektrophorese grob quantifiziert. Zur Mengenabschätzung wurden DNA-Größenstandards benutzt.

2.2.5 Enzymatische Spaltung und Modifizierung von DNA

2.2.5.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse (Sambrook *et al.*, 1989) von Plasmiden und die Präparation von DNA-Fragmenten wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion wurde jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur durchgeführt. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, so wurde ein Puffer gewählt, in dem möglichst alle Enzyme maximale Aktivität besaßen. Unterschieden sich die Reaktionsbedingungen der einzelnen Restriktionsendonukleasen stark voneinander, so wurden die Reaktionen nacheinander entweder unter schrittweiser Erhöhung der Salzkonzentration oder nach zeitlicher Entfernung der Puffersalze durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung der DNA durchgeführt.

Analytische Spaltungen wurden typischerweise mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und je 2 bis 5 u einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsvolumen von 10 µl vorgenommen. Puffer und BSA wurden jeweils als zehnfach konzentrierte Stammlösungen eingesetzt. Die Inkubationszeit bei der vom Hersteller empfohlenen optimalen Reaktionstemperatur betrug in der Regel 1 h. Spaltungen im präparativen Maßstab wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl bis 100 µl durchgeführt. Dabei wurden Plasmid-DNA-Mengen zwischen 2 und 20 µg eingesetzt und mit jeweils 10 bis 60 u der entsprechenden Restriktionsendonukleasen für 2 h inkubiert. Zuvor schon isolierte und gereinigte PCR-Fragmente wurden mit ca. 60 u pro µg DNA gespalten. Nach der Umsetzung wurden die DNA-Fragmente mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese getrennt (siehe Abschnitt 2.2.6.2).

2.2.5.2 Entfernung überstehender DNA-Enden

Zur Überführung eines durch Verdau eines DNA-Fragmentes mit einem Restriktionsenzym erhaltenen überstehenden 3'-DNA-Endes in ein glattes Ende wurde die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase ausgenutzt. Dazu wurde zunächst die Spaltung im präparativen Maßstab (50 µl) in dem Puffer 4 (New England Biolabs) durchgeführt. Anschließend wurden 2 µl dNTP-Lösung (je 2,5 mM) und 3 u T4-DNA-Polymerase zugesetzt und für 20 min bei 12 °C inkubiert. Von dem erhaltenen DNA-Fragment wurden die Enzyme durch Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung (Abschnitt 2.2.5.3) abgetrennt.

2.2.5.3 Abtrennung von Enzymen

Um Proteine aus DNA-Lösungen zu entfernen – z. B. verbliebene Exonukleasen nach Plasmidpräparationen oder Restriktionsenzyme – wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8 versetzt und das Volumen mit H₂O auf 400 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und nach Zentrifugation die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Nach Ausschütteln mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol wurde nochmals zentrifugiert und die obere Phase isoliert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1 ml Ethanol gemischt und für mindestens 30 min bei –20 °C inkubiert. Das nach Zentrifugation (18500 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Je nach weiterem Verwendungszweck wurde die DNA in 20 bis 100 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Für die Herstellung der ApoD-Bibliotheken (siehe Abschnitt 3.6.1) war es nötig, den Ligierungsansatz, in welchen das Vektorfragment und das randomisierte PCR-Fragment eingesetzt worden waren, vor der Elektroporation zu entsalzen und im Volumen zu reduzieren. Der Ansatz wurde zu 120 µl (à 3 µg DNA) auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt, je Aliquot mit 5 µl tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (10 mg/ml) versetzt und nach Zugabe von 125 µl 5 M NH₄OAc sowie 500 µl Ethanol für 24 h bei –20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (18500 g, 4 °C, 30 min) wurde das Präzipitat mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde schließlich zu einer Konzentration von 300 ng/µl in H₂O aufgenommen.

2.2.5.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

Für die Konstruktion von Plasmiden wurden DNA-Fragmente, die durch PCR oder durch Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erhalten worden waren, mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Ligierungsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden je 50 fmol der zu ligierenden Genfragmente zu 2 µl 10x Ligase-Puffer (300 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 10 mM ATP) gegeben und mit 1,5 Weiss-Units T4-DNA-Ligase (Promega, 3 Weiss-Units/µl) für 2 bis 24 h bei 16 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden 50 fmol des Fragmentes, welches den Replikationsursprung sowie das Antibiotikaresistenzgen trug, allein der Ligierungsreaktion unterworfen. Die Reaktion wurde gegebenenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, bevor 5 µl des Ansatzes für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet wurden.

Zur Herstellung der ApoD-Zufallsbibliotheken wurden das Vektorfragment und das PCR-Fragment, welches die randomisierten Bereiche des ApoD-Genes enthielt, miteinander ligiert.

Dazu wurden beide Fragmente in äquimolarem Verhältnis in einer Konzentration von 25 ng/µl eingesetzt und mit 1/10 Volumen 10x T4-DNA-Ligasepuffer (500 mM Tris/HCl pH 7,8; 100 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 10 mM ATP; 0,5 mg/ml BSA) sowie 0,2 Weiss-Units/µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, 6 Weiss-Units/µl) für 48 h bei 16 °C inkubiert. Nach Abtrennung der Salze durch Ethanol-Fällung (Abschnitt 2.2.5.3) wurde *E. coli* XL1-Blue mit dem Ligierungsprodukt elektrotransformiert.

2.2.5.5 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden wurde zur Verhinderung intramolekularer Rezirkularisierung das Vektorfragment dephosphoryliert und das zu inserierende Genfragment phosphoryliert. Zur Dephosphorylierung wurde das Vektorfragment mit Alkalischer Phosphatase aus arktischen Garnelen behandelt. Dazu wurde der präparative Restriktionsansatz, der ca. 5 µg des geschnittenen Fragmentes enthielt, mit 5 u Alkalischer Phosphatase versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase durch fünfzehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und das dephosphorylierte Vektorfragment mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.6.2) isoliert.

Das zu inserierende PCR-Fragment wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Dazu wurde das isolierte Genfragment in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 3 µl 10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer (1 M Tris/HCl pH 8,0; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 4,3 mM ATP), 3 µl 10 mM ATP sowie 5 u T4-Polynukleotid-Kinase versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 15 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung abgetrennt (Abschnitt 2.2.5.3).

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

2.2.5.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach dem von Kunkel *et al.* (1987) beschriebenen Verfahren nach der Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) durchgeführt. Dabei werden

zunächst Zellen des Stammes *E. coli* CJ236i, der aufgrund der Mutationen *dut*⁻ und *ung*⁻ zum Teil Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in neusynthetisierte DNA einbaut, mit der zu mutagenisierenden Plasmid-DNA transformiert. Nach Infektion mit einem Helferphagen kann aus diesen Zellen der kodierende Strang der DNA in Form von Phagemidpartikeln isoliert werden (Abschnitt 2.2.3.2). Diese zirkuläre, einzelsträngige DNA wird dann mit einem Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschte Mutation trägt, hybridisiert. In der anschließenden Polymerasereaktion dient dieses Oligodesoxynukleotid als *Primer* für die Zweitstrangsynthese. Der vollständig synthetisierte Zweitstrang wird durch T4-DNA-Ligase kovalent zirkularisiert. Mit der entstandenen doppelsträngigen Hybrid-DNA wurden Zellen eines *E. coli* *ung*⁺-Stammes, wie z. B. JM83, transformiert. Durch die zelleigenen Reparatursysteme werden dann die Desoxyuridin-Bausteine entfernt und dabei der parentale Strang bevorzugt repariert. Dadurch kommt es zur Selektion auf den *in vitro* synthetisierten Strang mit seiner Mutation.

Die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA (Abschnitt 2.2.3.2) und phosphoryliertem Oligodesoxynukleotid (Abschnitt 2.2.5.5) wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Dazu wurden ca. 250 ng ssDNA und 0,5 µl der Lösung des Oligodesoxynukleotids (ca. 3,3 pmol) mit 1 µl Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 20 mM MgCl₂) gemischt und für 5 min im Metallheizblock auf 80 °C erwärmt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 3 h langsam auf RT abgekühlt. Zur *in vitro* Synthese des Zweitstranges wurde der Ansatz auf Eis gestellt und mit 1 µl Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4; 50 mM MgCl₂; 20 mM DTT; 10 mM ATP; 5 mM dATP; 5 mM dCTP; 5 mM dGTP; 5 mM dTTP), 1 µl T4-DNA-Ligase (3 u) sowie 1 µl T4-DNA-Polymerase (3 Weiss unit/µl) versetzt. Nach 5 min auf Eis und anschließend 5 min bei RT wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde *E. coli* JM83 oder XL1-Blue mit 5 µl einer 1:10-Verdünnung des Ansatzes transformiert. Zur Kontrolle der *in vitro* Reaktion wurden 8 µl des unverdünnten Reaktionsansatzes auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

2.2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von cDNA, die Konstruktion von Zufallsbibliotheken sowie die Herstellung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente für die nichtradioaktive Sequenzierung wurde mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.*, 1988) durchgeführt. Die dafür als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Von der Matrizen-DNA abweichende Sequenzen konnten gezielt erzeugt werden, indem Oligodesoxynukleotide verwendet wurden, die an definierten Positionen andere Basen, gegebenenfalls sogar als statistische Mischung, aufwiesen. Um zufällige Mutationen im ApoD-Gen hervorzurufen, wurde zudem eine PCR unter fehlererzeugenden Bedingungen (*Error Prone PCR*) durchgeführt.

Für die PCR wurde entweder die *Taq*- oder die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die *Pfu*-DNA-Polymerase synthetisiert aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*Proof Reading Activity*) den Zweitstrang mit einer weitaus geringeren Fehlerrate als die *Taq*-DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991). Aufgrund der teilweisen Hydrolyse des Primers am 3'-Ende war es allerdings nötig, die verwendeten Oligodesoxynukleotide dort durch eine Phosphothioat-Bindung zu schützen (Skerra, 1992).

Die PCR mit der *Pfu*- oder *Taq*-DNA-Polymerase wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Dazu wurden ca. 10 ng Plasmid-DNA als Matrize und je 25 pmol zweier Oligodesoxynukleotide als *Primer* eingesetzt und mit 5 µl 10x *Pfu*-Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8,75; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 20 mM MgSO₄; 1 % v/v Triton X-100; 1 mg/ml BSA) oder 5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0; 500 mM KCl; 1 % v/v Triton X-100; 15 mM MgCl₂) sowie 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) versetzt. Der Ansatz wurde auf 50 µl mit H₂O aufgefüllt und mit Mineralöl überschichtet. Nach Temperieren auf 94 °C im Thermocycler wurden 2,5 units der entsprechenden Polymerase zugegeben (*Hot Start* PCR). Für die Amplifizierung des ApoD-Genes wurden 30 Zyklen von 1 min bei 94 °C (Denaturierung der DNA), 1 min bei 65 °C (Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide mit der einzelsträngigen Plasmid-DNA) und 1,5 min bei 72 °C (Polymerasereaktion) durchgeführt, gefolgt von 5 min bei 60 °C (Vervollständigung der Syntheseprodukte).

Zur Herstellung der PCR-Produkte A und B der ApoD-Bibliotheken wurden 20 Zyklen unter Verwendung der *Taq*-Polymerase durchgeführt, wobei die Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide mit der Matrizen-DNA bei 60 °C erfolgte. Die *Assembly*-PCR zur Herstellung der ApoD-Bibliotheken wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Dazu wurden je 3 ng der PCR-Produkte A und B als Matrize und je 50 pmol der flankierenden Oligodesoxynukleotide sowie 1 pmol des vermittelnden Oligodesoxynukleotids eingesetzt. Die anderen Komponenten wurden in den gleichen Konzentrationen wie in einem 50-µl-PCR-Ansatz zugesetzt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in 20 Zyklen mit Hilfe der *Taq*-Polymerase bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C. Als Kontrollreaktion wurde ein identischer Ansatz ohne das vermittelnde Oligodesoxynukleotid angesetzt.

Um statistisch verteilt Mutationen in das ApoD-Gen einzuführen, wurde eine fehlererzeugende PCR (Leung *et al.*, 1989) durchgeführt. Dazu wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Casson & Manser (1995) die Desoxynukleosidtriphosphate in nichtstöchiometrischem Verhältnis eingesetzt und weiterhin das Nukleotidanalogen 2'-Desoxyinosin-5'-triphosphat (dITP) sowie MnCl₂ zugesetzt. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden 0,2 fmol Plasmid-DNA als Matrize sowie je 50 pmol der beiden Oligodesoxynukleotide als *Primer* eingesetzt und mit 10 µl 10x *Taq*-Puffer, 16 µl 25 mM MgCl₂, 10 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, je 50 mM dCTP, dTTP, dITP) und 10 µl 10 mM MnCl₂ versetzt. Nach Zugabe von 5 units *Taq*-DNA-Polymerase wurden 20 Zyklen (unter *Hot Start* Bedingungen;

Hybridisierungstemperatur 65 °C) durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz zur Komplexierung der Mn^{2+} -Ionen auf eine Konzentration von 5 mM EDTA eingestellt. Nach Phenol/ Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurde das Produkt in einer Standard-PCR in 20 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C unter normalen Bedingungen mit der *Taq*-DNA-Polymerase reamplifiziert. Im Anschluß wurde das PCR-Produkt mit dem „EZNA Cycle-Pure“-Kit der Firma Peqlab nach Anleitung des Herstellers gereinigt.

2.2.6 Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde zur Auftrennung von Restriktionsprodukten sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab verwendet.

2.2.6.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Gelelektrophorese wurden je nach Größe der DNA-Fragmente Gele mit einem Agarosegehalt von 1 % bis 1,5 % w/v eingesetzt. Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose in 50 ml TBE-Puffer suspendiert und zum Sieden erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden war. Nach Abkühlen wurde 1/10000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung zugegeben, die Agarose in die horizontale Gelkammer gegossen und ein Taschenformer eingesetzt. Typische Abmessung des Geles waren eine Breite von 7,5 cm und eine Lauflänge von 10,5 cm bei einer Dicke von 0,5 cm. Das erstarrte Agarosegel wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Agarosegelkammer gelegt und nach Entfernen des Taschenformers mit 10 µl der DNA-Lösung, der vorher 1/10 Volumen 10x Agarose-Auftragspuffer zugesetzt worden war, beladen. Die Elektrophorese wurde für 50 min bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Nach Ende der elektrophoretischen Auftrennung wurden die durch Interkalation des Ethidiumbromids angefärbten DNA-Fragmente unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm zur Fluoreszenz angeregt und unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

2.2.6.2 Präparative Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab durchgeführt. Zur Herstellung des Gels wurden 0,6 g niedrigschmelzende Agarose und 60 ml TAE-Puffer zum Sieden erhitzt und bei 4 °C nach Zugabe von 1/10000 Volumen 1 % w/v Ethidiumbromid-Lösung in die Gelform gegossen. Durch Einsetzen eines speziellen Taschenformers wurde das Gel mit breiteren Taschen versehen, um diese jeweils mit dem

gesamten präparativen Restriktionsansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen 10x Agarose-Auftragspuffer beladen zu können. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 Volt für 80 min durchgeführt. Um Strahlenschäden der DNA zu vermeiden, wurden die Genfragmente in UV-Licht bei verminderter Intensität (312 nm) sichtbar gemacht. Das Gelstück, in dem sich das zu isolierende Genfragment befand, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der Plasmid-DNA-Fragmente aus den Gelstücken wurde mit Hilfe des „JetSorb Gel Extraction Kits“ nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und schließlich die DNA mit 25 bis 40 µl TE-Puffer eluiert.

2.2.6.3 Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Lineare einzelsträngige DNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamid/Harnstoffgelen in Abhängigkeit ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Mit dieser Methode konnten Oligodesoxynukleotide als Rohprodukte aus der DNA-Synthese gereinigt und DNA-Sequenzierungsansätze (siehe Abschnitt 2.2.8) analysiert werden. Die verwendeten Harnstoffgele wurden durch Polymerisation eines Gemisches erhalten, welches zur Auftrennung von Oligodesoxynukleotiden 12 % beziehungsweise bei Sequenzierungsansätzen 6 % w/v Acrylamid enthielt. Zur Herstellung von 100 ml wurden 48 ml beziehungsweise 24 ml einer 25 % w/v Acrylamid/Bisacrylamid-Fertiglösung (19:1, mit 8,3 M Harnstoff) mit 42 ml beziehungsweise 66 ml Fertiggel-Verdünnung (8,3 M Harnstoff) sowie 10 ml 10x TBE-Puffer auf Eis vermischt, bevor die Polymerisation nach Zugabe von 40 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin und 1 ml 10 % w/v Ammoniumperoxodisulfat ausgelöst wurde.

Zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurden zwei Glasplatten (20 cm x 40 cm) mit Abstandshaltern (1,5 mm Dicke) zusammengeklammert, die gekühlte, polymerisierende Acrylamidlösung (12 % w/v Acrylamid) in die entstandene Kammer gefüllt und ein Taschenformer eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde die Gelkammer in die vertikale Halterung eingespannt und nach Auftragen der Proben die Elektrophorese für 4 h bei einer konstanten Leistung von 40 W durchgeführt.

Zur DNA-Sequenzanalyse wurden keilförmige Gele hergestellt. Dazu wurden zwei Glasplatten (20 cm x 60 cm) so vorbehandelt, daß das Gel bei der Trennung der Platten nach der Elektrophorese auf einer Platte haften blieb, aber sich leicht von der anderen lösen ließ (Heinrich, 1987). Dazu wurde die erstgenannte Platte zweimal zunächst mit 5 ml Ethanol gesäubert und anschließend mit einer Mischung aus 5 ml Ethanol, 150 µl Wasser, 17,5 µl Essigsäure und 17,5 µl γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan behandelt. Die zweite Platte wurde hingegen wiederholt mit 5 ml Ethanol und anschließend mit 5 ml Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlormethan präpariert. Die Platten wurden mit überlappenden Abstandshaltern von 0,2 mm Dicke (60 cm, 40 cm, 12,5 cm Länge) versehen und so zusammengeklammert, daß die Gelkammer im Bereich des später eingesetzten Taschenformers eine Weite von 0,2 mm

besaß, wohingegen im unteren Bereich eine Weite von 0,6 mm entstand. Die Kammer wurde mit der gekühlten, polymerisierenden Acrylamidlösung (6 %) befüllt und ein Taschenformer mit 36 Taschen eingesetzt. Dieser war vorher mit einer Mercaptoethanol-haltigen Lösung getränkt worden, um die Polymerisation im Kontaktbereich zu unterdrücken und so das Entfernen des Kammes nach der Aushärtung des Geles zu erleichtern.

Nach Einspannen des Geles in die vertikale Elektrophoreseapparatur erfolgte eine einstündige Vorelektrophorese bei einer konstanten Leistung von 60 W. Nach dem Auftragen der radioaktiv markierten Sequenzierproben (siehe Abschnitt 2.2.8) wurde die eigentliche Auftrennung für ca. 2,5 h ebenfalls bei einer Leistung von 60 W durchgeführt. Anschließend wurden die Glasplatten vorsichtig getrennt und die Platte mit dem anhaftenden Gel zur Entfernung des Harnstoffes für 20 min in 10 % Essigsäure geschwenkt. Nach Spülen in Wasser wurde das Gel auf der Platte für 1 h bei 80 °C getrocknet. Durch Auflegen eines photographischen Films konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente autoradiographisch nachgewiesen werden.

2.2.7 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide, die nach ihrer Synthese als lyophilisiertes Rohprodukt erhalten worden waren, wurden vor ihrer Verwendung mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese nach einem von Skerra (1989) ausgearbeiteten Protokoll gereinigt.

Das Rohprodukt eines Syntheseansatzes von 40 nmol wurde in 40 µl Wasser gelöst und davon 20 µl mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer (98 % entionisiertes Formamid, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % v/v Bromphenolblau) versetzt. Die restlichen 20 µl wurden bei -20 °C gelagert. Nach Erhitzen auf 80 °C für 5 min wurde die Lösung auf Eis gestellt, zu je 20 µl in zwei Taschen des 12 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgels (Abschnitt 2.2.6.3) als möglichst schmale Schicht pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde das Gel auf eine UV-durchlässige Kunststoffolie gelegt, unter der eine mit Fluoreszenzindikator beschichtete Dünnschichtchromatographie-Glasplatte lag. Die Oligodesoxynukleotide konnten durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm indirekt sichtbar gemacht werden, weil jene das UV-Licht absorbierten und somit die DC-Platte an diesen Stellen nicht fluoreszierte.

Die entsprechenden Gelbereiche wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Um die Oligodesoxynukleotide aus dem Gel zu extrahieren, wurde dieses in eine Kunststoffspritze gefüllt, deren Spitze zunächst über der Flamme zugeschmolzen und anschließend mit einer Kanüle durchstoßen worden war. Durch schnelles Drücken durch diese Öffnung wurde das Gel zerkleinert. Die Spritze wurde anschließend mit 1 ml TE-Puffer nachgespült und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Polyacrylamidstücke wurden mittels eines Mikrozentrifugenfilters (Spin X) abgetrennt (18500 g, RT, 5 min) und das Filtrat (ca. 900 µl)

dreimal mit je 1 ml 1-Butanol extrahiert, wobei das Volumen der wäßrigen Phase auf ca. 400 µl reduziert wurde. Nach Zugabe von 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8, 4 µl 1 M MgCl₂ und 1 ml Ethanol wurden die Oligodesoxynukleotide für 1 h bei -20 °C gefällt. Das durch Zentrifugation (18500 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Die Konzentration der Oligodesoxynukleotidlösung wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben bestimmt.

2.2.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die DNA-Sequenzierungen wurde nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung von doppelsträngiger zirkulärer DNA (Chen & Seeburg, 1985) aus Plasmid-Präparationen durchgeführt. Dabei kamen zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde das „T7 Sequencing Kit“ der Firma Pharmacia verwendet, wobei mit Hilfe der T7-DNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1987) radioaktiv markierte DNA-Fragmente entstehen. Dazu wurden gemäß der Anleitung des Herstellers ca. 2 µg Plasmid-DNA und 1 pmol eines als *Primer* geeigneten Oligodesoxynukleotides eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.6.3) aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

Weiterhin wurde der „ABI Prism 310 Genetic Analyzer“ der Firma Applied Biosystems verwendet. Bei diesem Verfahren werden basenspezifisch fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente erzeugt, die automatisiert durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden. Zur Herstellung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wird eine lineare PCR (siehe Abschnitt 2.2.5.7) unter Verwendung der *AmpliTaq*-DNA-Polymerase FS durchgeführt. Dieses Enzym ist eine Variante der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*), bei welcher einerseits die Punktmutation F667Y im aktiven Zentrum zu einer geringeren Diskriminierung von Didesoxynukleotiden führt (Tabor & Richardson, 1995) und zum anderen die Mutation G46D die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hemmt.

Als Terminatoren kommen Didesoxynukleosidtriphosphate zum Einsatz, die basenspezifisch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (*BigDye Terminators*; Rosenblum *et al.*, 1997). Dadurch entstehen während der linearen PCR unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die je nach ihrer 3'-terminalen Base unterschiedlich farbstoffmarkiert sind.

Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, wobei ca. 200 ng Plasmid-DNA und 2 pmol eines als *Primer* benutzten Oligodesoxynukleotides mit 4 µl der Reaktionsmischung „Ready Reaction Mix“ (Applied Biosystems) vereinigt wurden. Diese Mischung enthielt Puffersubstanzen, DNA-Polymerase, Desoxynukleotide sowie fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in geeigneten Konzentrationen. Nach Überschichtung mit Mineralöl wurden 25 Zyklen von 30 s bei 96 °C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C durch-

geführt. Anschließend mußten nicht umgesetzte Desoxynukleotide, Didesoxynukleotide, Oligodesoxynukleotide, Enzyme sowie Salze abgetrennt werden. Dazu wurde der Ansatz mit 1 µl 3 M NaOAc pH 4,6 und 25 µl Ethanol versetzt und zur Fällung für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (18500 g, RT, 30 min) wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und schließlich in 12 µl Wasser aufgenommen. Die erhaltene DNA-Lösung wurde für maximal 30 s bei 95 °C denaturiert, anschließend in ein durch ein Septum verschlossenes 0,5-ml-Gefäß überführt und zur Analyse in dem Sequenzierungsautomaten eingesetzt, der die im folgenden beschriebenen Schritte durchführt.

Die Größenauftrennung der DNA-Fragmente findet mittels Kapillarelektrophorese in Glaskapillaren eines Innendurchmessers von 50 µm und einer Länge von 47 oder 60 cm statt. Dazu werden die DNA-Fragmente zunächst elektrokinetisch in die vorher mit frischem Trennpolymer („POP6“, Applied Biosystems) befüllte Kapillare bei einer Spannung von 2 kV für 10 bis 30 s injiziert. Anschließend wird die Auftrennung bei einer Spannung von 12 bis 15 kV durchgeführt.

Die der Größe nach separierten, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wandern nacheinander an einem transparenten Fenster der Kapillare vorbei und werden dabei von einem Laser angeregt. Das emittierte Licht wird von einer CCD-Kamera bei vier verschiedenen Wellenlängen detektiert. Die ermittelten Signalintensitäten werden an einen Rechner übertragen und können mit Hilfe des Computerprogramms „ABI Collection Software“ ausgewertet werden. Dabei werden für jeden Meßpunkt die Intensitäten bei allen vier Wellenlängen mit den Fluoreszenzspektren der vier Fluoreszenzfarbstoffe korreliert und den einzelnen Basen zugeordnet. Bei Verwendung der kürzeren Kapillare betrug die Leseweite bis zu 600 Basen, bei Benutzung der längeren konnten bis zu 900 Basen pro Sequenzierungsansatz gelesen werden.

2.2.9 Propagation von Helferphagen

50 ml 2xYT/Tet-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer bei 37 °C in 4 ml LB/Tet gewachsenen stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,3$ kultiviert. Von dieser Kultur wurden 10 ml in einen auf 37 °C vorgewärmten, sterilen 100-ml-Erlenmeyerkolben überführt und mit $4 \cdot 10^{10}$ pfu VCS-M13 Helferphagen-Stammlösung entsprechend einer *moi* von 20 infiziert.

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C geschüttelt, mit Kan zu einer Konzentration von 25 µg/ml versetzt und für weitere 8 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Durch zehnmütiges Erhitzen auf 65 °C wurden die Zellen anschließend abgetötet und im sterilen SS34-Becher

durch Zentrifugation (12000 g, 4 °C, 15 min) abgetrennt. Der klare, die Phagen enthaltende Überstand wurde nach Sterilfiltration bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Der Titer der Helferphagenlösung wurde bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe bis zu einer maximalen Verdünnung von 10^{-9} in 2xYT-Medium hergestellt wurde. Dazu wurden zunächst 50 ml 2xYT/Tet-Medium mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in LB/Tet im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ kultiviert. 3 ml 2xYT-Weichagar wurden aufgeschmolzen und im Kulturröhrchen im Wasserbad auf 48 °C temperiert. Dazu wurden 100 µl der exponentiell wachsenden Kultur sowie 100 µl der Phagenverdünnung pipettiert und durch Schwenken mit dem Agar vermischt. Diese Mischung wurde vollständig auf im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmte 2xYT/Tet-Agar-Platten gegossen. Nach Erstarren des Agars bei RT wurde zunächst für 8 h bei 37 °C und dann 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die weniger dicht bewachsenen Bereiche des Weichagars, die durch das verlangsamte Zellwachstum phageninfizierter Zellen entstanden, werden als Plaques bezeichnet und wurden zwecks Titerbestimmung gezählt. Der Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lag typischerweise zwischen $8 \cdot 10^{11}$ und $2 \cdot 10^{12}$ pfu/ml.

2.2.10 Präparation und Selektion rekombinanter Phagemide

2.2.10.1 Produktion von Phagemiden

Für die Herstellung von Phagemiden zu analytischen Zwecken wurden Zellen der Stämme *E. coli* XL1-Blue oder JM83-F' verwendet und mit dem entsprechenden Phasmid-Vektor (siehe Abschnitt 3.4) transformiert. Als Vorkultur wurden 4 ml LB/Cam mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden mit 100 bis 1000 µl dieser Kultur 50 ml 2xYT/Cam zu einer $OD_{550} = 0,05$ angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu $OD_{550} = 0,5$ inkubiert.

Anschließend wurde mit $1,5 \cdot 10^{11}$ pfu des Helferphagen VCS-M13, entsprechend einer *moi* von 10, infiziert und für 30 min bei 37 °C und 160 rpm inkubiert, dann Kanamycin zu einer Endkonzentration von 70 µg/ml zugegeben und die Kultur bei 30 °C weitergeschüttelt. Nach 10 min wurde durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml oder 200 µg/ml (siehe Abschnitt 3.4.2) der *tet*-Promotor induziert und für 7 h bei 26 °C oder 30 °C inkubiert.

Zur Isolierung der Phagemide wurden 50 ml Zellsuspension auf zwei sterile Zentrifugenbecher verteilt, die Zellen sedimentiert (SS34, 12100 g, 4 °C, 15 min) und der Überstand sterilfiltriert (0,45 µm) auf zwei weitere sterile Zentrifugenbecher verteilt. Durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen eisgekühltem, sterilem 20 % w/v PEG 8000 mit 15 % w/v NaCl erfolgte die Fällung der Phagemide über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C. Die deutlich sichtbaren Phagemid-Präzipitate wurden durch Zentrifugation (18000 g, 4 °C, 20 min) sedimentiert und nach vollständigem Abziehen des Überstandes in je 1 ml PBS gelöst.

Nach Überführen in zwei Reaktionsgefäße à 1,5 ml und 30 min Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (14000 rpm, 4 °C, 5 min). Die Überstände wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die Phagemid-Partikel erneut mit ¼ Volumen sterilem 20 % w/v PEG 8000 mit 15 % w/v NaCl für 30 min auf Eis zur Fällung gebracht. Anschließend wurde sedimentiert (14000 rpm, 4 °C, 20 min), der Überstand entfernt und die Phagemide in insgesamt 1 ml PBS gelöst und für 30 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.10.2 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

Um den Phagemidtitert zu bestimmen, wurde eine in 2xYT/Tet-Medium angesetzte Kultur von *E. coli* XL1-Blue über Nacht bei 30 °C kultiviert. Die Zellen wurden zunächst durch zweimaliges Waschen mittels Sedimentierung und anschließender Resuspendierung in 2xYT-Medium von Tetracyclin befreit. Mit 100 bis 300 µl der Zellsuspension wurden 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes 2xYT-Medium so angeimpft, daß die OD₅₅₀ zwischen 0,03 und 0,05 betrug. Anschließend wurde bei einer Temperatur von 37 °C im Schüttler bei 140 rpm bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert. Während des Zellwachstums wurden Verdünnungsreihen der zu titierenden Phagemid-Lösungen in PBS erstellt. Jeweils 20 µl Phagemidverdünnung mit einem typischen Phagemidgehalt von 100 bis 1000 cfu wurden im 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, kurz im Heizblock auf 37 °C erwärmt und mit 180 µl der exponentiell wachsenden Bakterienkultur vermischt. Nach 30 min bei 37 °C im Heizblock wurden die Infektionsansätze auf Eis gestellt und davon jeweils 100 µl auf LB/Cam-Platten verteilt. Zur Kontrolle auf potentielle Kontamination durch Phagemide wurde zusätzlich ein Ansatz mit PBS anstelle der Phagemid-Verdünnung ausplattiert. Nach Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtitert durch Auszählen der Kolonien bestimmt. Zur graphischen Darstellung der Affinitätsanreicherungen wurden die erhaltenen Titer in relative Titer, entsprechend dem Verhältnis von Phagemiden je Fraktion zu der Adsorption an den Flügelstift eingesetzten Phagemiden, umgerechnet.

2.2.10.3 Herstellung von Phagemidbibliotheken

E. coli XL1-Blue wurde mit einer Bibliothek der Phasmid-Vektoren, die für ApoD-Varianten mit randomisierten Bereichen kodierten, mittels Elektroporation (Abschnitt 2.2.2.2) transformiert. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen und Induktion der Genexpression der ApoD-pIII-Fusionsproteine kam es zur Produktion von Phagemiden, welche die ApoD-Varianten auf ihrer Oberfläche präsentierten.

Nach der Elektroporation (Abschnitt 2.2.2.2) wurde der Ansatz bei 37 °C kultiviert, wobei die Zelldichte für ca. 1 h geringfügig abnahm, um anschließend zuzunehmen. Bei einer Zelldichte von $\Delta\text{OD}_{550} = 0,5$ (ausgehend vom Minimalwert) wurden 200 ml der Kultur zur Phagemidproduktion in einen sterilen 500-ml-Kolben überführt, mit $6 \cdot 10^{11}$ pfu VCS-M13 Helferphagen infiziert ($\text{moi} = 10$) und für 30 min inkubiert (37 °C, 160 rpm). Anschließend wurde Kanamycin zu einer Endkonzentration von 70 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und die Kultur bei 26 °C oder 30 °C (siehe Abschnitt 3.7.1) 10 min geschüttelt. Nach Addition von aTc zur Induktion der Genexpression des ApoD-pIII-Fusionsproteins (Endkonzentration 25 $\mu\text{g/l}$ oder 200 $\mu\text{g/l}$; vgl. Abschnitte 3.6.1 und 3.7.1) wurde für 7 h inkubiert. Die Isolierung der Phagemide aus einem Kulturvolumen von 200 ml wurde analog zu Abschnitt 2.2.10.1 durchgeführt.

Zur Konservierung der Bibliothek wurden dem Ansatz vor der Zugabe des Helferphagen 50 ml zur Isolierung der Plasmid-DNA (Abschnitt 2.2.3.1) sowie zur Herstellung einer Glycerinkultur (Abschnitt 2.2.1) entnommen.

2.2.10.4 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

Anreicherung an mit Streptavidin gekoppelten magnetischen Partikeln. Zur Anreicherung von ApoD-präsentierenden Phagemiden mit Bindungsaffinität zum neuronalen Inhibitorprotein Nogo (siehe Abschnitt 3.6.2) wurden Streptavidin-gekoppelte paramagnetische Partikel (Dynabeads M-280 Streptavidin) verwendet und zusammen mit einem Biotin-Konjugat des rekombinanten NiFr2-Fragmentes des Nogo-Proteins eingesetzt.

Die Streptavidin-Partikel besaßen pro 1 mg laut Hersteller eine Bindungskapazität für 33 pmol biotinylierten Antikörper. Bei den Anreicherungsversuchen wurden 33 pmol (entsprechend $2 \cdot 10^{13}$ Moleküle) des potentiellen Liganden als Biotin-Konjugat eingesetzt, was während des Selektionsprozesses (s. u.) einer Konzentration von 82 nM entsprach.

Das Biotin-Konjugat des NiFr2 wurde hergestellt, indem 0,4 mg des rekombinanten Proteins (freundlicherweise hergestellt von S. Münkler) zunächst mittels Gelfiltration (PD-10) gegen 5 % NaHCO_3 pH 8,3 umgepuffert wurden. Die erhaltenen 3,5 ml Proteinlösung wurden unter Rühren bei RT langsam mit einem zehnfachen molaren Überschuß von D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester ($M_R = 454,4$ g/mol) in 10 μl DMSO versetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden überschüssige Reagenzien mittels Gelfiltration (PD-10) abgetrennt und dabei gleichzeitig der Puffer gegen PBS ausgetauscht.

Zur Affinitätsanreicherung wurden zunächst 100 μl der Partikelsuspension (10 mg/ml) dreimal mit 100 μl PBS/T 0,1 in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß gewaschen, indem die Partikel durch einminütige Rotation um eine um 45 ° geneigte Achse in Lösung gehalten und anschließend mittels eines Magneten für 1 min am Gefäßrand gesammelt wurden. Nach Abziehen des Überstandes wurden die Partikel in der neu zugegebenen Flüssigkeit resus-

pendiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Partikel für 1 h mit 100 μl PBS/T 0,1 mit 2 % w/v BSA unter Mischen auf dem Drehrührer bei RT blockiert. Gleichzeitig wurden 260 μl der in PBS gelösten Phagemide (zwischen $1,5 \cdot 10^{11}$ und $9,3 \cdot 10^{11}$ cfu amplifizierter Phagemide) für 1 h mit 40 μl 70 $\mu\text{g/ml}$ NiFr2-Biotin-Konjugat inkubiert, um Komplexbildung mit den bindungsaktiven ApoD-Varianten zu erreichen. Anschließend wurden zu der Phagemidlösung 100 μl PBS mit 8 % w/v BSA und 0,4 % Tween 20 gegeben.

Die nach dem letzten Waschschrift sedimentierten Streptavidin-Partikel wurden in dieser Lösung resuspendiert und für 10 min unter Rotation inkubiert, wobei sowohl die mit dem biotinylierten Targetprotein komplexierten Phagemide als auch das überschüssige freie Targetprotein gebunden wurden. Die Partikel wurden mit dem Magneten abgetrennt und die überstehende Lösung, die die ungebundenen Phagemide enthielt, abgezogen. Daraufhin wurden die Partikel insgesamt achtmal für je 1 min mit 1 ml PBS/T 0,1 gewaschen und für 2 min durch den Magneten von der Waschlösung separiert. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte anschließend durch Inkubation mit 950 μl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 für 13 min. Nach Sammeln der paramagnetischen Partikel wurde der Überstand unmittelbar abgezogen und sein pH-Wert durch Zugabe von 140 μl 0,5 M Tris-Base auf pH 7,3 gebracht.

Anreicherung durch Adsorption an beschichtete Polystyrolstifte. Zur Anreicherung ApoD-präsentierender Phagemide mit Bindungsaffinität zu Hämoglobin wurden „Immunosticks“ (Nunc) eingesetzt. Diese bestehen aus Polypropylen-Röhrchen (38 mm Höhe, 12 mm Durchmesser) mit Innengewinde, an deren abschraubbarer Kappe ein in das Innere des Röhrchens ragender Flügelstift befestigt ist, der fast bis zum Boden des Röhrchens reicht. Die 5,2 cm^2 große Polystyrol-Oberfläche des Flügelstiftes („MaxiSorp“-Qualität) zeigt hohe Affinität zu polaren Gruppen und eignet sich insbesondere zur Physisorption von Proteinen. Das den Flügelstift umgebende Polypropylen-Röhrchen hat dagegen eine geringe Affinität zu Proteinen, so daß die Beschichtung bei der Inkubation mit proteinhaltiger Lösung selektiv für die Oberfläche des Flügelstiftes erfolgt.

Bei allen Inkubations- und Waschschriften wurde sorgfältig darauf geachtet, das Innengewinde der Röhrchen nicht zu benetzen und einen Kontakt zwischen Flügelstift und Gewinde zu vermeiden. Zum Wechsel der Inkubationslösungen wurde jeweils ein neues Polypropylen-Röhrchen verwendet. Alle Inkubationsschritte wurden mit sterilfiltrierten (0,45 μm) Lösungen bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei das Röhrchen in einem Winkel von 45° mit ca. 60 rpm gedreht wurde.

Zur Beschichtung der Polystyrol-Oberfläche wurde der Flügelstift über Nacht mit 800 μl einer Lösung von 500 $\mu\text{g/ml}$ Hämoglobin in PBS inkubiert. Unbelegte Bindungsstellen wurden anschließend durch zweistündige Inkubation mit 1,2 ml einer sterilfiltrierten Lösung von 2 % w/v BSA in PBS/T 0,1 abgesättigt. Zur Phagemid-Adsorption wurde der Flügelstift für 1 h mit einer Mischung von 500 μl 3 % w/v BSA in PBS/T 0,1 und 250 μl der Phagemid-Lösung

inkubiert. Die Anzahl der im initialen Anreicherungszyklus eingesetzten Phagemide betrug $3 \cdot 10^{12}$ cfu, für die nachfolgenden Anreicherungszyklen wurden zwischen $7 \cdot 10^{11}$ cfu und $7 \cdot 10^{12}$ cfu eingesetzt.

Der Inkubationslösung wurde das BSA zugesetzt, um Phagemide, die gegebenenfalls Bindungsaktivität zu dem als Blockierungsreagenz verwendeten BSA zeigten, abzufangen. Zur Entfernung nicht an das Targetprotein gebundener Phagemide wurde insgesamt achtmal mit jeweils 950 μ l PBS/T 0,1 für 2 min gewaschen. Zur Elution der adsorbierten Phagemide wurde der Flügelstift schließlich mit 950 μ l Glycin/HCl pH 2,2 inkubiert und das Eluat sofort mit 150 μ l 0,5 M Tris-Base auf pH 7,3 gebracht.

Im Anschluß an die Anreicherungsexperimente wurden die Titer ausgewählter Wasch- sowie der Elutionsfraktionen bestimmt (Abschnitt 2.2.10.2) und noch an dem selben Tag die eluierten Phagemide zur Infektion von Zellen verwendet (Abschnitt 2.2.10.5).

2.2.10.5 Amplifizierung von Phagemiden

Die bei der Affinitätsanreicherung durch Elution gewonnenen Phagemide wurden amplifiziert, bevor sie einem erneuten Selektionszyklus zugeführt wurden. Dazu wurde die exponentiell wachsende Kultur von *E. coli* XL1-Blue verwendet, die auch zur Titerbestimmung der einzelnen Fraktionen des Anreicherungsverfahrens hergestellt worden war (Abschnitt 2.2.10.2).

Von dieser Kultur wurden 3 ml abgenommen und zu der kurz vorher auf 37 °C temperierten Phagemidlösung (1090 μ l), die bei der Elution erhalten wurde, gegeben. Nach 30 min Inkubation im Schüttler (37 °C, 160 rpm) wurden die Zellen sedimentiert (4420 g, 4 °C, 2 min) und nach Abziehen des Überstandes in 800 μ l LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf vier LB/Cam-Agarplatten ($\varnothing = 14$ cm) gleichmäßig verteilt, welche anschließend für 16 h bei 32 °C inkubiert wurden.

Auf den erhaltenen Zellrasen wurden jeweils 10 ml 2xYT/Cam pipettiert und die Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers von der Agarplatte gelöst. Die erhaltene Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 40 ml wurde benutzt, um zwecks Konservierung der genetischen Information der eluierten Phagemide einerseits eine Glycerinkultur (Abschnitt 2.2.1) herzustellen; andererseits wurde 1 ml eingesetzt, um eine 50-ml-Kultur zur Herstellung einer Plasmid-Midipräparation (Abschnitt 2.2.3.1) anzuimpfen.

Zur erneuten Produktion von Phagemiden wurden mit 100 bis 1000 μ l der Suspension 50 ml 2xYT/Cam zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,08$ angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer $OD_{550} = 0,5$ inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und das weitere Vorgehen zur Produktion und Aufarbeitung der Phagemide erfolgten wie in Abschnitt 2.2.10.1 beschrieben.

2.2.10.6 Nachselektion durch *Colony Screening*

Nach der Affinitätsanreicherung von Phagemiden und auch zur Identifizierung von ApoD-Varianten mit veränderten Eigenschaften (siehe Abschnitt 3.3) wurde das *Colony Screening*-Verfahren angewandt (Skerra *et al.*, 1991; Schlehuber *et al.*, 2000). Dazu wurden die ApoD-Varianten als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996) und der Albumin-Bindungsdomäne produziert. Letztere diente zur funktionellen Immobilisierung der Variante auf einer mit humanem Serum-Albumin (HSA) beschichteten Oberfläche (König & Skerra, 1998).

Zur Herstellung dieser Fusionsproteine wurde die genetische Information für die ApoD-Varianten auf Plasmide des Typs pApoD12 übertragen. Die Klonierung von Varianten, die aus Zufallsbibliotheken mittels Affinitätsanreicherung isoliert worden waren, wurde unter Verwendung der die Genkassette flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen durchgeführt. Zur Klonierung der mittels fehlererzeugender PCR generierten Mutanten wurden Fragmente mittels der Schnittstellen *Xba*I und *Bst*BI isoliert und ligiert, um so die genetische Information des gesamten mutierten Bereichs auf den Vektor pApoD12 zu übertragen.

Der Ligierungsansatz wurde verwendet, um *E. coli* TG1-F⁻ nach der CaCl₂-Methode (Abschnitt 2.2.2.1) zu transformieren. Dieser *Amber*-Suppressorstamm wurde eingesetzt, damit ApoD-Varianten, die ein internes *Amber*-Stoppkodon besaßen, auch in der vollen Länge produziert werden konnten. 150 µl der transformierten Zellsuspension wurden vorsichtig auf einer hydrophilen Membran (PVDF, 0,22 µm Porengröße), die auf einer LB/Amp-Agarplatte (Ø = 82 mm) plaziert war, ausplattiert. Nach 7 h Inkubation bei 37 °C hatten sich ungefähr 500 Kolonien von ca. 0,5 mm Größe gebildet.

In der Zwischenzeit wurde eine hydrophobe Membran (Immobilon P, 0,45 µm Porengröße) nacheinander für je 5 min bei RT in Methanol, Wasser und PBS geschwenkt, bevor sie für 4 h mit 15 ml einer Lösung von 10 mg/ml HSA in PBS inkubiert wurde. Im Anschluß wurden verbliebene Bindungsstellen auf der Membran durch zweistündige Inkubation mit 3 % w/v BSA, 0,5 % Tween 20 in PBS abgesättigt. Anschließend wurde zweimal für je 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und die Membran in 10 ml LB/Amp mit 200 µg/l aTc geschwenkt. Nun wurde die Membran auf eine LB/Amp-Agarplatte, die 200 µg/l aTc enthielt, gelegt. Die hydrophile, mit Kolonien bewachsene Membran wurde vorsichtig auf die mit HSA beschichtete Membran überführt und die Position der beiden Membranen zueinander durch das Durchstechen mit einer feinen Nadel gekennzeichnet. Die Agarplatte mit den beiden aufliegenden Membranen wurde anschließend bei 22 °C für 15 h inkubiert. In dieser Zeit wurden die jeweiligen ApoD-Varianten von den Zellen produziert, sekretiert und partiell von den Kolonien freigesetzt. Mittels der ABD wurde das Fusionsprotein auf der mit HSA beschichteten Membran durch Komplexbildung immobilisiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Platte transferiert und bei

4 °C konserviert. Die hydrophobe untere Membran wurde von der Platte abgehoben und dreimal für 5 min mit je 20 ml PBS/T 0,1 gewaschen.

Zum Nachweis der ApoD-Varianten, die veränderte Eigenschaften hinsichtlich ihrer Genexpression besitzen sollten, anhand ihres *Strep*-tag II wurde die hydrophobe Membran für 1 h mit einem Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase inkubiert (Verdünnung 1:10000 in PBS/T 0,1). Zur Anfärbung wurde wie unten beschrieben verfahren.

Zum Nachweis von Bindungsereignissen erfolgte die Inkubation für 1 h mit einem Konjugat aus dem Proteintarget und Biotin oder Digoxigenin. Im Fall des Neuronalen Inhibitorproteins Nogo wurde die hydrophobe Membran mit 6 ml eines Konjugats (0,1 mg/ml) aus NiFr2 und Biotin inkubiert, das wie in Abschnitt 2.2.10.4 beschrieben hergestellt wurde.

Zum Nachweis von ApoD-Varianten mit Bindungsaffinität zu Hämoglobin wurde ein Konjugat aus Hämoglobin und Digoxigenin hergestellt. Dazu wurde eine Lösung von 3,25 mg Hämoglobin in 5 ml 5 % w/v NaHCO₃ mit 25 µl einer Lösung von 13 µg/µl Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (M_R = 658,8 g/mol; zehnfacher molarer Überschuß) in DMSO unter Rühren versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde der Puffer samt nicht umgesetztem Reagenz mittels einer Gelpermeationssäule (PD-10) gegen PBS ausgetauscht. Die erhaltene Lösung wurde auf eine Konzentration von 1 µM Protein in PBS/T 0,1 eingestellt und zur Inkubation mit der Membran eingesetzt.

Die hydrophobe Membran wurde für 1 h mit dem entsprechenden Konjugat inkubiert und dann dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen. Anschließend wurde mit einem Konjugat aus Alkalischer Phosphatase inkubiert. Zum Nachweis des NiFr2-Biotin-Konjugats wurde Extravidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Verdünnung 1:10000 in PBS/T 0,1) eingesetzt. Um das Hämoglobin-Digoxigenin-Konjugat zu detektieren, kam ein Anti-Digoxigenin-F_{ab}/Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Verdünnung 1:1000 in PBS/T 0,1) zum Einsatz.

Die Membran wurde nach einstündiger Inkubation für je 5 min zweimal mit 20 ml PBS/T 0,1 gewaschen, einmal mit PBS und schließlich mit AP-Puffer inkubiert. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran mit 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl BCIP-Lösung (50 µg/ml in DMF) und 5 µl NBT-Lösung (75 mg/ml in 70 % v/v DMF) zugesetzt worden waren, inkubiert, bis deutliche Farbsignale an den Positionen einiger Kolonien zu sehen waren. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt und die Membran getrocknet. Kolonien, die Farbsignale auf der hydrophoben Membran hervorriefen, wurden ausgewählt, kultiviert und ihre Plasmid-DNA isoliert und analysiert.

2.2.11 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Produktion von ApoD, ApoD-Varianten oder ApoD-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden Expressionsvektoren verwendet, welche jeweils für eine Fusion des muren Proteins

mit der bakteriellen Signalsequenz OmpA (siehe Abschnitt 3.1.2) kodieren. Dabei vermittelt die OmpA-Signalsequenz die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum von *E. coli*, in dem sich die Disulfidbrücken ausbilden können. Das rekombinante Protein kann aus diesem Zellkompartiment in prozessierter und gefalteter Form isoliert werden. Dazu wird das Periplasma selektiv unter Erhalt der Sphäroplasten aufgeschlossen (Witholt *et al.*, 1976). Dabei wird die äußere Membran von *E. coli* durch die Komplexbildung zweiwertiger Ionen destabilisiert, wodurch die periplasmatischen Proteine in das Aufschlußmedium gelangen (Skerra, 1989). Gleichzeitig werden durch die hypertonen Bedingungen – eingestellt durch eine hohe Konzentration an Saccharose – die Sphäroplasten stabilisiert.

2.2.11.1 Proteinproduktion im 2-l-Maßstab

Für die Produktion rekombinanter Proteine im 2-l-Maßstab wurden 50 ml LB-Medium, das je nach verwendetem Plasmid mit dem geeigneten Selektionsantibiotikum versetzt worden war, mit einer Einzelkolonie eines mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Stammes von *E. coli* angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Produktionskultur (2 l LB-Medium mit Antibiotikum) wurde im Verhältnis 1:50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 22 °C (bei Verwendung des Stammes *E. coli* XL1-Blue bei 26 °C) bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ im Schüttler bei 200 rpm kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 200 µg/l induziert (Skerra, 1994) und die Bakterien für weitere 3 h im Schüttler kultiviert.

Zur Präparation der periplasmatischen Fraktion der Zellen wurde die Kultur zentrifugiert (SLA3000, 4200 g, 4 °C, 15 min), der Überstand zunächst abgegossen und dann mit einer Pipette vollständig abgezogen und das Sediment in insgesamt 1/100 Kulturvolumen eiskaltem Saccharose-Aufschlußpuffer mittels einer 25-ml-Glaspipette unter Vermeidung von Schaumbildung zügig resuspendiert. Anschließend wurde für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 15 min). Nach erneuter Zentrifugation (SS34, 30000 g, 4 °C, 15 min) und abschließender Sterilfiltration (0,45 µm) wurde der erhaltene periplasmatische Extrakt über Nacht gegen das 100fache Volumen Chromatographiepuffer dialysiert. Anschließend wurde das rekombinante Protein mittels Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.3.2) isoliert.

Zur späteren Analyse der Proteinproduktion wurden Proben des Gesamtzellproteins präpariert. Dazu wurde 1 ml der Kultur entnommen, zentrifugiert (18500 g, 4 °C, 2 min) und der Überstand abgezogen. Die Zellen wurden in 80 µl Benzonase-Lösung (12,5 u/ml in Benzonase-Puffer) resuspendiert und mit 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde das Gesamtzellprotein bei -20 °C eingefroren oder nach Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) für die SDS-PAGE verwendet.

2.2.11.2 Proteinproduktion im analytischen Maßstab

Um die Produktion von Fusionsproteinen aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII zu untersuchen, wurden Experimente im analytischen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden Zellen von *E. coli* XL1-Blue mit den zu untersuchenden Plasmiden transformiert. Mit je einer Einzelkolonie wurden Vorkulturen in 4 ml LB/Cam angesetzt und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Je 50 ml LB/Cam wurden mit 100 bis 300 µl der Vorkulturen zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,05$ inokuliert und bei einer Temperatur von 26 °C oder 30 °C im Schüttler kultiviert. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde der *tet*-Promotor mit aTc induziert. Dabei wurde aTc als Stammlösung zu Endkonzentrationen von 25 µg/l und 200 µg/l zugegeben. Als Kontrolle wurde je einem Ansatz kein aTc zugesetzt. Nach drei Stunden wurde den Kulturen je 1 ml entnommen und das Gesamtzellprotein präpariert (siehe Abschnitt 2.2.11.1).

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet. Dabei kam das diskontinuierliche Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) zur Anwendung, welches als Hochsalz-Variante der Methode von Laemmli (1970) eine erhöhte Auflösung zeigt. Im Anschluß an die Auftrennung im elektrischen Feld wurden die Proteine durch Anfärbung sichtbar gemacht. Alternativ dazu wurde ein *Western Blot* (Abschnitt 2.3.6) angefertigt.

Die in der Regel 15 %igen Polyacrylamid-Gele waren 0,8 mm dick, wobei das Trenngel ein Format von 5,5 cm x 8,5 cm besaß. Zur Herstellung der Gele wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm x 8 cm) mit Abstandshaltern mittels Metallklammern zusammengeheftet und die entstandene Gelkammer mit heißem 1 % w/v Agar abgedichtet. Von einer flüssigen Trenngelmischung, bestehend aus 5 ml Acrylamid-Stammlösung, 2,5 ml 4x Lower Tris und 2,5 ml Wasser, wurden nach Polymerisationsstart durch Zugabe von 2,5 µl TEMED und 50 µl 10 % w/v APS-Lösung 3,6 ml in die vertikale Gelkammer pipettiert. Daraufhin wurde vorsichtig mit Wasser überschichtet, um eine gleichmäßige, horizontale Trenngelgrenzfläche zu erzielen. Nach abgelaufener Polymerisation wurde das Wasser abgossen und die Sammelgelmischung, zusammengesetzt aus 1 ml Acrylamid-Stammlösung, 4,5 ml 4x Upper Tris und 3,5 ml Wasser, nach Polymerisationsstart durch 3 µl TEMED und 36 µl 10 % w/v APS-Lösung in die Gelkammer pipettiert und ein Taschenformer eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Kammer gespannt, die mit Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986) gefüllt wurde.

Die Proteinproben wurden zu einem Volumen von 20 μl angesetzt, mit 5 μl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Entfernen des Taschenformers aus dem Gel konnten die Proben mit Hilfe einer 50- μl -Glasspritze aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA durchgeführt, bis der Bromphenolblaumarker nach ca. 2 h aus dem unteren Gelende herausgewandert war. Anschließend wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, das Trenngel vom Sammelgel abgeschnitten und die Proteinbanden angefärbt.

Zur Anfärbung mit Coomassie Brilliantblau wurde das Gel für 20 min in ca. 50 ml Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit mehrfach erneuerter Entfärbelösung bis zum Verblässen des Hintergrundes inkubiert. Das Gel wurde in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert.

Um geringe Proteinmengen sichtbar zu machen, wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst für 20 min in einer Fixierlösung aus 50 % v/v Methanol und 7 % v/v Eisessig inkubiert und anschließend zweimal mit Wasser gespült. Für 35 min wurde dann mit 9 % v/v Glutaraldehyd inkubiert, worauf das Gel für zweimal 30 min in Wasser gespült wurde. Es folgte eine fünfminütige Inkubation in einer sauren Oxidationslösung (1 % w/v $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,02 % v/v 65 %ige HNO_3) mit anschließendem Waschen für zweimal 5 min in Wasser. Nach zwanzigminütigem Schwenken unter Lichtausschluß in 2 % w/v AgNO_3 erfolgte die Entwicklung in einer basischen Formaldehydlösung (0,02 % v/v 37 %igem Formaldehyd mit 3 % w/v Na_2CO_3), bis sich die Proteinbanden in der gewünschten Intensität abzeichneten. Der Vorgang wurde durch Spülen mit einer 1 %igen Essigsäurelösung gestoppt.

Zur dauerhaften Lagerung wurden Proteingele im Geltrockner bei 80 °C für 1 h unter Vakuum getrocknet.

2.3.2 Chromatographische Methoden

Zur Isolierung von Proteinen aus der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* kamen zwei verschiedene Chromatographie-Verfahren zum Einsatz: die Streptavidin-Affinitätschromatographie (Skerra & Schmidt, 2000) und die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath et al., 1975). Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des rekombinanten ApoD wurde zudem die Gelpermeationschromatographie verwendet.

Das Bettvolumen der verwendeten Affinitätschromatographie-Säulen betrug 2 ml, wenn bis zu 30 ml Periplasmaextrakt aufgetragen werden sollten. Für die Isolierung des ApoD aus größeren Volumina Zellextrakt wurde eine Säule mit 4 ml Bettvolumen gewählt. Die Säulen wurden unter Gravitationsfluß mit der entsprechenden Menge des Säulenmaterials bepackt. Alle Affinitätschromatographien wurden bei 4 °C durchgeführt. Der Verlauf der Chromato-

graphie wurde jeweils anhand der Absorption des Eluates bei 280 nm verfolgt, die mit einem Signalschreiber (Empfindlichkeit: 100 mV, Papiervorschub: 3 cm/h) aufgezeichnet wurde. Die Ausgangsempfindlichkeit am Photometer (2138 Uvicord SII) betrug – je nach erwarteter Proteinmenge – 0,1 bis 0,5 Einheiten. Das Eluat, welches das gereinigte Protein enthielt, wurde mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE analysiert und entsprechend vereinigt. Die Proteinlösungen wurden je nach Verwendungszweck gegen den entsprechenden Puffer dialysiert, sterilfiltriert (Millex HV 0,45 µm) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.3.2.1 Einschritt-Reinigung rekombinanter Proteine mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie

Rekombinante Proteine, die das Affinitätsanhängsel *Strep*-tag II (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) trugen, wurden mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Bei diesem Reinigungsverfahren bindet das *Strep*-tag II an das auf der Sepharose-Säulenmatrix fixierte Streptavidin. Nach Entfernung der Wirtszellproteine durch Waschen kann das auf der Säule immobilisierte rekombinante Protein unter sehr milden Bedingungen kompetitiv mit D-Desthiobiotin eluiert werden. Hier kam das Streptavidin-Mutein 1 (Voss & Skerra, 1997) zum Einsatz, welches mit einem Beladungsgrad von 5 mg/ml an aktivierte Sepharose gekoppelt war (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Theobald und S. Münkler).

Zunächst wurde eine mit Streptavidin-Sepharose befüllte Chromatographiesäule mit SA-Puffer äquilibriert. Die Flußrate betrug das zehnfache des Säulenvolumens pro Stunde. Zur Reinigung des rekombinanten Proteins wurde der gegen SA-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie gewaschen. Die über das *Strep*-tag II gebundenen Proteine wurden mit Hilfe von SA-Puffer, dem 2,5 mM D-Desthiobiotin zugesetzt worden waren, eluiert.

Zur Regenerierung des Säulenmaterials wurde die Säule mit 5 mM HABA in SA-Puffer gespült und damit das D-Desthiobiotin verdrängt, was zu einer intensiven Orangefärbung des Säulenmaterials führte. Das an das Streptavidin gebundene HABA wurde anschließend durch Spülen mit SA-Puffer bis zum Verblässen der Farbe vollständig entfernt.

2.3.2.2 Einschritt-Reinigung rekombinanter Proteine mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Affinität funktioneller Gruppen – typischerweise Cystein- oder Histidin-Seitenketten – auf der Oberfläche von Proteinen zu Übergangsmetallionen. An eine Säulenmatrix, meist Sepharose

oder Agarose, ist kovalent eine chelatisierende Gruppe gekoppelt, die Ionen der Nebengruppenelemente Cu, Zn, Fe, Ni oder Co immobilisieren kann. Als Komplexbildner werden häufig Iminodiessigsäure (IDA) als drei- oder Nitrilotriessigsäure (NTA) als vierzähliger Ligand benutzt. Nach der Beladung des Säulenmaterials mit Übergangsmetallionen wird die zu reinigende Proteinlösung aufgetragen. Proteine, die Aminosäurereste mit metall-komplexierenden Eigenschaften präsentieren, binden bevorzugt an die Säule und können unter milden Bedingungen kompetitiv im Imidazol-Konzentrationsgradienten eluiert werden.

Um rekombinante Proteine aus einem Zellextrakt effizient zu isolieren, kann man deren Affinität zu Metallionen durch die Fusion von Hexahistidinresten an deren N- oder C-Terminus erhöhen (Hochuli *et al.*, 1988). Auch die Einführung von artifiziellen Metallbindungsstellen auf der Oberfläche rekombinanter Proteine durch *Protein Engineering* erlaubt deren Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Arnold, 1991; Arnold & Haymore, 1991; Müller & Skerra, 1994).

Rekombinantes ApoD, welches ein mit dem C-Terminus fusioniertes Hexahistidin-Anhängsel trug, wurde mittels „Chelating Sepharose Fast Flow“, einer Chromatographiematrix mit IDA als chelatisierender Gruppe, gereinigt. Zur Durchführung der Chromatographie wurde die Sepharose zunächst bei einem konstanten Fluß von 10 Säulenvolumina pro Stunde für 1 h mit bidestilliertem Wasser gespült und anschließend für 30 min mit 10 mM Zinksulfat beladen. Nicht gebundene Zn^{2+} -Ionen wurden durch erneutes Waschen mit Wasser für 30 min entfernt. Dann wurde bis zum Erreichen einer konstanten Absorption bei 280 nm mit CP äquilibriert. Nach Auftragen des Periplasmaextraktes, der zuvor gegen CP dialysiert und sterifiltriert worden war, wurden nicht an die Säule gebundene Proteine durch einstündiges Spülen mit CP entfernt. Die Elution des auf der Säule komplexierten ApoD erfolgte im Imidazol-Konzentrationsgradienten (20faches Säulenvolumen) von 0-300 mM in CP bei einem reduzierten Fluß von fünf Säulenvolumina pro Stunde. Zur Regenerierung des Säulenmaterials wurde mit 10 ml 100 mM EDTA, pH 8,0 gewaschen und anschließend mit Wasser gespült.

2.3.2.3 Gelpermeationschromatographie

Zur Untersuchung des Oligomerisierungsstatus des rekombinanten ApoD wurde die Gelpermeationschromatographie eingesetzt. Hierbei wurde das HPLC-Pumpensystem „Dynamax SD-300“ in Verbindung mit dem Detektorsystem „Dynamax UV-1“ verwendet. Zur Trennung wurden die kommerziell erhältlichen Säulen Superdex 75, Superdex 200 (Amersham Pharmacia) sowie die Säulen G-3000 SW XL und G-3000 PW XL (Tosohaas) verwendet, außerdem kam eine mit dem Trennmateriale Sepharose CL4B (Amersham Pharmacia) selbst befüllte Säule (16 mm x 400 mm) zum Einsatz.

Alle zur Chromatographie verwendeten Laufpuffer (Flußgeschwindigkeit: 0,5 ml/min bis 1 ml/min) waren vor der Benutzung unter Vakuum entgast und sterilfiltriert (0,45 µm) worden. Die Probe wurde über eine Probenschleife von 250 µl Volumen auf die Säule appliziert. Der Verlauf der Chromatographie und die Retentionszeiten wurden anhand der Absorption des Eluats bei 280 nm beobachtet und mittels eines Signalschreibers (Geschwindigkeit 1 cm/min) aufgezeichnet. Die Säulen waren zuvor mit Proteinen bekannter Molekularmasse geeicht worden.

2.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von gereinigten Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

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

Ist der Extinktionskoeffizient ε nicht bekannt, so läßt er sich für eine lineare Polypeptidkette näherungsweise kalkulatorisch bestimmen (Gill & von Hippel, 1989). Die Absorption eines Proteins bei 280 nm beruht im wesentlichen auf den aromatischen Seitenketten Trp und Tyr sowie gegebenenfalls Disulfidgruppen. Der kalkulatorische Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{denat}}$ wurde durch Addition der Absorptionsbeiträge der einzelnen Aminosäuren mit Hilfe des Programms „Peptidesort“ aus dem Programmpaket „GCG“ (Devereux *et al.*, 1984) berechnet.

Die Extinktionskoeffizienten gefalteter Proteine können von den kalkulatorischen Koeffizienten abweichen, da die molekulare Umgebung der genannten Seitenketten deren spektroskopische Eigenschaften beeinflußt. Vor der Bestimmung von Bindungsaffinitäten mittels Fluoreszenztitration wurde deshalb der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{nativ}}$ des nativen Proteins experimentell ermittelt. Unter Zugrundelegung des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\text{denat}}$ wurde aus dem Verhältnis der Extinktion von nativem Protein E_{nativ} und denaturiertem Protein E_{denat} der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{nativ}}$ wie folgt berechnet:

$$\varepsilon_{\text{nativ}} = \varepsilon_{\text{denat}} \frac{E_{\text{nativ}}}{E_{\text{denat}}} \quad (2)$$

Für diese Messungen wurden je 200 µl einer 5 bis 10 µM Proteinlösung nach dreimaliger Dialyse gegen KSH-Puffer parallel mit 600 µl KSH-Puffer sowie mit 600 µl 8 M Guanidiniumchlorid in KSH-Puffer verdünnt. Als Blindwert wurden analoge Verdünnungen mit einer Probe des letzten Dialysepuffers angesetzt. Nach Inkubation über Nacht bei RT wurden die Extinktionen der Verdünnungen bestimmt, der Blindwert abgezogen und mit Gleichung 2 der Extinktionskoeffizient des nativen Proteins berechnet.

Für die Konzentrationsbestimmung des rekombinanten ApoD wurde ein Extinktionskoeffizient $\epsilon_{\text{nativ}} = 34150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Die Konzentration des ApoD-Muteins HbgA wurde direkt anhand des kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 54600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt.

2.3.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Konzentrierte Proteinlösungen wurden für verschiedene biophysikalische Messungen benötigt. Die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinlösungen besaßen zunächst eine Konzentration zwischen 1 und 8 μM . Zur Erhöhung der Konzentration wurde die Proteinlösung nach mehrfacher Dialyse gegen den anschließend verwendeten Meßpuffer in mehreren Schritten durch Zentrifugation in einem Konzentrator eingengt, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Nach Sterilfiltration (Millex HV 0,45 μM , Millipore) wurde die exakte Konzentration durch Absorptionsmessung (Abschnitt 2.3.3) bestimmt.

2.3.5 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Abspaltung des bakteriellen OmpA-Signalpeptides wurde eine N-terminale Edman-Sequenzierung des durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten rekombinanten ApoD vorgenommen. Dazu wurden 4 μg des Proteins einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Glycin-freien Laufpuffers (100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 0,1 % SDS, pH 8,3) unterzogen. Alle anderen zur Elektrophorese verwendeten Puffer entsprachen den üblicherweise für die SDS-PAGE (Abschnitt 2.3.1) benutzten Lösungen. Nach Elektrotransfer (siehe Abschnitt 2.3.6) auf eine Immobilon-P-Membran mit dem beschriebenen Borat-Elektrophoresepuffer unter Zusatz von 20 % v/v Methanol als Transferpuffer wurde die Membran für 5 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zum Verblässen des Hintergrundes mit Entfärbelösung behandelt. Die Membran wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen, dann getrocknet und die angefärbte Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten. Die eigentliche Sequenzierung wurde in einem Sequenzierautomaten „Procise 492“ (Applied Biosystems) von Dr. S. Wolf, TU Darmstadt, durchgeführt.

2.3.6 Western-Blotting

Um Proteine immunchemisch in einem Proteingemisch nachzuweisen, wurde die Methode des *Western Blotting* benutzt. Dabei werden Proteine zunächst durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine Membran

übertragen. Anschließend wird das nachzuweisende Protein in einem immunologischen Verfahren selektiv angefärbt.

Zur Durchführung eines *Western Blots* wurde zunächst die SDS-PAGE wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Für den anschließenden Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Membran (Immobilon P oder Nitrozellulose) wurden vier Whatman-Filterpapiere (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transfer-Puffer (SDS-PAGE-Laufpuffer mit 20 % v/v Methanol) getränkt und auf die Edelstahl-Kathode der Elektroblo-Apparatur gelegt. Das für 20 min mit Blot-Puffer inkubierte Trenngel wurde auf die Filterpapiere gelegt und darauf die für 10 min in Methanol und für 5 min in Blot-Puffer getränkte Transfermembran (8,5 cm x 5,5 cm) sowie vier weitere Filterpapiere unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen gestapelt. Der Elektrottransfer wurde nach Auflegen der Graphit-Anodenplatte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (entsprechend 1 mA/cm²) durchgeführt.

Nach dem Elektrottransfer wurde die Membran entnommen. Zur Abschwächung unspezifischer Wechselwirkungen wurde im Fall von Membranen aus Immobilon P für 1 h in PBS/T 0,5 mit 3 % w/v BSA und anschließend dreimal für 5 min in PBS/T 0,1 geschwenkt (alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt); Nitrozellulose-Membranen hingegen wurden bloß dreimal für je 15 min mit PBS/T 0,1 inkubiert.

Zum immunchemischen Nachweis rekombinanter Proteine anhand des Affinitätsanhängsels *Strep*-tag II wurde die Membran für 1 h in 10 ml PBS/T 0,1 mit 5 µl Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat geschwenkt und anschließend wie unten beschrieben angefärbt. Rekombinante Proteine, die das Hexahistidin-Anhängsel trugen, wurden nachgewiesen, indem die Membran für 1 h mit 10 ml PBS/T 0,1 mit 5 µl Nickel-NTA/Alkalische-Phosphatase-Konjugat inkubiert wurde. Anschließend wurde dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen.

Sollten Proteine über die Bindung mit einem Antikörper nachgewiesen werden, der entweder als Konjugat mit der Alkalischen Phosphatase vorlag oder mit einem entsprechenden Zweitantikörperkonjugat detektiert wurde, so wurde zunächst für 1 h mit 10 ml einer Verdünnung (1:500) des Antikörpers inkubiert und anschließend dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen. Falls erforderlich, wurde daraufhin für 1 h mit 10 ml einer Verdünnung (1:500) des Zweitantikörpers in PBS/T 0,1 inkubiert und dreimal mit PBS/T 0,1 gewaschen.

Zur selektiven Anfärbung der Proteinbanden wurde die Membran im Anschluß an die Inkubation mit dem Alkalische-Phosphatase-Konjugat dreimal mit PBS und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Durch Inkubation mit 20 ml AP-Puffer mit 10 µl NBT (75 mg/ml in 70% DMF) und 60 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) wurde die Anfärbung gestartet (Blake *et al.*, 1984). Bei Erreichen des gewünschten Anfärbegrades wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran schließlich an der Luft getrocknet.

2.3.7 Nachweis von Bindungsaktivität im ELISA

Für den *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde humanes Hämoglobin als Targetprotein auf der Kunststoffoberfläche einer Mikrotiter-Platte immobilisiert und anschließend die Bindung von ApoD-Varianten anhand des am C-Terminus fusionierten *Strep*-tag II nachgewiesen. Zur Detektion des Affinitätsanhängsels wurde Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet.

Zur Durchführung eines Assays wurde zunächst jede Vertiefung der Mikrotiter-Platte für 16 h mit 50 μ l 500 μ g/ml Hämoglobin-Lösung in PBS mit 1 mM EDTA inkubiert (alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt). Freie Bindungsstellen wurden danach durch einstündige Inkubation mit je 200 μ l einer Blockierungslösung aus 2 % w/v BSA in PBS/T 0,1 abgesättigt. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS/T 0,1 gespült und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Nun wurden die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten ApoD-Varianten in Abstufungen beginnend mit einer Konzentration von 1 μ M in PBS/T 0,1 in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in die Vertiefungen pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurde dreimal mit PBS/T 0,1 gespült und ausgeklopft, bevor für 1 h mit 50 μ l einer 1:1000 Verdünnung von Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat in PBS/T 0,1 inkubiert wurde. Anschließend wurde je zweimal mit PBS/T 0,1 und PBS gespült und die Platte wiederum ausgeklopft. Nach Zugabe von je 100 μ l einer Lösung aus 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer wurde 5 min inkubiert und schließlich über einen Zeitraum von 20 min hinweg minütlich die Absorption bei 405 nm im auf 25 °C temperierten ELISA-Photometer gemessen.

2.4 Biophysikalische Analysen

2.4.1 Fluoreszenztitration

Die Fluoreszenztitration wurde eingesetzt, um die Bindungskonstante verschiedener organischer Verbindungen zu ApoD zu bestimmen. Dabei machte man sich zunutze, daß sich bei der Bildung des Protein-Liganden-Komplexes die Fluoreszenzeigenschaften mindestens eines Bindungspartners – hier nur des Proteins – veränderten. Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzen einer Konzentrationsreihe ermöglichte die Ermittlung der Komplex-Dissoziationskonstante.

Die Bindung von Hapten-Molekülen und ApoD wurde untersucht, indem die Abnahme der bei 295 nm angeregten Proteinfluoreszenz bei zunehmender Ligandenkonzentration ermittelt wurde. Die Bindung von ApoD und potentiellen Liganden, die die Proteinfluoreszenz des ApoD nicht meßbar beeinflussten, wurde untersucht, indem ApoD zunächst mit Progesteron versetzt wurde, wodurch die gemessene Intensität der Proteinfluoreszenz infolge Komplex-

bildung abnahm. Durch Zugabe des potentiellen Liganden wurde versucht, das sich in der Bindungstasche des ApoD befindende Progesteron zu verdrängen. Dabei sollte sich die gemessene Fluoreszenz verändern.

Die Bindung von *E*-3M2H an ApoD wurde außerdem mit Hilfe von 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) untersucht. Dieses selbstfluoreszierende Reagenz zeigt generell Affinität zu exponierten hydrophoben Bereichen von Proteinen. Bei der Bindung an Proteinoberflächen verschiebt sich das Maximum der Fluoreszenzemission des ANS nach Anregung bei 370 nm von 512 nm auf 470 nm (Cardamone & Puri, 1992). Die kompetitive Bindung von zugegebenem *E*-3M2H sollte sich anhand der Verschiebung des Maximums und der Intensität der Fluoreszenzemission des ANS detektieren lassen, sofern *E*-3M2H mit ANS um dieselbe Bindungsstelle auf der Proteinoberfläche konkurriert.

Proteinlösungen wurden dreimal gegen den Meßpuffer dialysiert und sterilfiltriert, bevor die Konzentration eingestellt (siehe Abschnitt 2.3.4) wurde. Auch alle weiteren verwendeten Lösungen, sofern nicht in organischen Lösungsmitteln angesetzt, wurden sterilfiltriert (Millex HV 0,45 µm). Ligandenlösungen wurden grundsätzlich frisch angesetzt und lichtgeschützt aufbewahrt. Fluoreszenzintensitäten wurden mit einem Perkin Elmer LS 50 B Fluorimeter gemessen, wobei die Spaltbreiten für die Anregung und Emission so gewählt wurden, daß die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zwischen 100 und 900 Einheiten lagen. Die Messungen wurden in einer mit einem Rührer ausgestatteten 1 cm x 1 cm Quarzküvette durchgeführt, welche mit der Proteinlösung zunächst für 15 min auf 25 °C thermostatisiert wurde und mit einem Magnetrührer ausgestattet war.

2.4.1.1 Direkte Titration von ApoD mit Liganden

Experimentelle Durchführung. 1980 µl einer 1 µM Lösung von ApoD in 50 mM Natriumphosphatpuffer, 1 mM EDTA, pH 7,5 wurden unter Rühren mit 20 µl 1 % w/v Gelatine in Puffer versetzt. Sollten Titrationsen im gleichen Puffer, aber bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt werden, so wurde ApoD zuvor gegen ein Puffersystem (Ellis & Morrison, 1982) aus 10 mM Natriumcitrat, 10 mM Natriumphosphat mit 100 mM NaCl (bei Messungen mit Arachidonsäure ohne NaCl) und 1 mM EDTA bei pH 8,0 dialysiert. 1970 µl dieser 1 µM Proteinlösung wurden in der Küvette vorgelegt, mit 20 µl Gelatinelösung sowie 10 µl einer geeignet konzentrierten Salzsäurelösung versetzt, so daß sich ein pH-Wert von 7,0, 6,0 oder 5,0 einstellte.

Die Verbindungen Progesteron, Pregnenolon und Testosteron wurden in Dioxan gelöst, wohingegen *E*-3M2H in Wasser gelöst wurde. Bilirubin wurde zunächst mit wenigen Tropfen 1 M NaOH solubilisiert, woraufhin mit 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0 verdünnt und der pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt wurde. Arachidonsäure wurde als ethanolische

Stammlösung bezogen, deren Konzentration mittels des ermittelten Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{276} = 458 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (siehe Abschnitt 3.2.5.2) mit Ethanol justiert wurde. Die Ligandenlösungen wurden jeweils auf eine für die Titration geeignete Konzentration verdünnt (typischerweise zwischen 100 μM und 5mM). War die Ligandenlösung zunächst in organischem Solvens hergerstellt worden, so wurde sie mit Wasser auf einen Anteil an organischem Lösungsmittel von 10 % eingestellt, um den Einfluß des Lösungsmittels auf die Fluoreszenz des Proteins gering zu halten (siehe Abschnitt 3.2.5.1).

Die Fluoreszenz der Tryptophanreste des ApoD wurde bei 295 nm angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 340 nm detektiert. Die Ligandenlösung wurde in Portionen von 2 μl der Proteinlösung zugesetzt und zwecks Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend gemittelt über 10 s gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (40 μl entsprechend 2 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt.

Die durch die Titration von ApoD mit dem Liganden erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerte wurden nach Abzug der Fluoreszenz des gelatinehaltigen Puffers auf 100 % skaliert, bevor durch Subtraktion der durch separate Titration gemessene Einfluß des Lösungsmittels auf die Proteinfluoreszenz berücksichtigt wurde. Ein innerer Filtereffekt, gegebenenfalls bedingt durch Absorption des Liganden bei 295 nm oder 340 nm, wurde quantifiziert, indem eine Titration von N-Acetyltryptophanamid mit dem Liganden – unter ansonsten identischen Bedingungen wie bei Titrations mit dem ApoD – durchgeführt wurde. Nur im Fall des Bilirubin lag ein solcher Effekt vor, der wie unten beschrieben korrigiert wurde.

Korrektur des inneren Filtereffektes. Aufgrund der Eigenabsorption von Bilirubin bei der für die Messung der Proteinfluoreszenz gewählten Anregungswellenlänge von 295 nm wurden die erhaltenen Meßdaten um diesen Betrag jeweils korrigiert. Die Verringerung der gemessenen Intensität der Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an Bilirubin wurde durch Fluoreszenztitration einer geeignet konzentrierten (5 μM) Lösung von N-Acetyl-L-tryptophanamid mit dem Liganden ermittelt.

Für die Fluoreszenz F eines Proteins P gilt allgemein:

$$F = f_p [P] I_{\text{Anregung}}^0 \quad (3)$$

Dabei sind f_p die molare Proteinfluoreszenz, $[P]$ die Proteinkonzentration und I_{Anregung}^0 die Intensität des ungeschwächten Anregungslichtes am Ort des Fokus für die Emission.

Durch die Eigenabsorption des Liganden in der Lösung – den sogenannten inneren Filtereffekt – wird die Intensität des Anregungslichtes am Ort des Fokus für die Emission in Abhängigkeit von dessen Konzentration vermindert. Es gilt daher für die gemessene, apparente Fluoreszenz F_{app} mit $I_{\text{Anregung}} < I_{\text{Anregung}}^0$

$$F_{\text{app}} = f_p [\text{P}] I_{\text{Anregung}} \quad (4)$$

Mit dem Lambert-Beerschen Gesetz läßt sich das Verhältnis der unterschiedlichen Anregungsintensitäten beschreiben:

$$\log \frac{I_{\text{Anregung}}^0}{I_{\text{Anregung}}} = \varepsilon_L \cdot c_L \cdot d \quad (5)$$

Dabei sind ε_L der Extinktionskoeffizient des Liganden bei der Wellenlänge des anregenden Lichtes, c_L die Ligandenkonzentration und d die in diesem Fall nicht exakt bekannte Distanz des Anregungslichtes von der Küvettenwand bis zum Fokus der Emission.

Aus Gleichung 5 erhält man durch Umformung:

$$I_{\text{Anregung}} = I_{\text{Anregung}}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (6)$$

und durch Einsetzen in Gleichung 4:

$$F_{\text{app}} = f_p [\text{P}] I_{\text{Anregung}}^0 \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (7)$$

sowie unter Verwendung von Gleichung 3:

$$F_{\text{app}} = F \cdot 10^{-\varepsilon_L \cdot c_L \cdot d} \quad (8)$$

Der apparente Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{\text{app}} = \varepsilon_L \cdot d$ kann ermittelt werden, indem die durch eine Titration des Liganden mit N-Acetyl-L-tryptophanamid erhaltenen, auf einen Anfangswert von 100 % skalierten Fluoreszenzsignale halblogarithmisch gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen werden. ε_{app} entspricht der Steigung der nach linearer Regression erhaltenen Geraden.

$$\log F_{\text{app}} = \log F - \varepsilon_{\text{app}} \cdot c_L \quad (9)$$

Die Korrektur der bei der Titration von Proteinlösungen gemessenen Fluoreszenzintensitäten erfolgt dann gemäß Gleichung 10.

$$F = F_{\text{app}} 10^{\varepsilon_{\text{app}} \cdot c_L} \quad (10)$$

Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Die Bindungspartner Protein P und Ligand L stehen bei jedem Schritt der Fluoreszenztitration miteinander im Gleichgewicht. Das Verhältnis des Produktes der Konzentrationen des unkomplexierten Proteins [P] und des unkomplexierten Liganden [L] zur Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes [P·L] wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben. Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich zu:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} \quad (11)$$

Substituiert man $[P]$ durch $[P]_t - [P \cdot L]$ und $[L]$ durch $[L]_t - [P \cdot L]$, wobei $[P]_t$ und $[L]_t$ die Gesamtkonzentrationen des eingesetzten Proteins beziehungsweise des eingesetzten Liganden bei dem jeweiligen Titrationschritt sind, so erhält man:

$$K_D = \frac{([P]_t - [P \cdot L]) ([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]} \quad (12)$$

Durch Auflösen nach $[P \cdot L]$, $[P]$ bzw. $[L]$ ergibt sich:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (13)$$

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

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

Die gemessene Fluoreszenz F setzt sich aus den Fluoreszenzbeiträgen der im Gleichgewicht vorliegenden Spezies zusammen.

$$F = f_p [P] + f_L [L] + f_{pL} [P \cdot L] \quad (16)$$

Dabei stehen f_p , f_L und f_{pL} für die jeweiligen molaren Fluoreszenzkoeffizienten. Werden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten durch die Ausdrücke rechts in den Gleichungen 13, 14 und 15 substituiert, so ergibt sich:

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

Die Verbindungen, deren Affinitäten zu ApoD gemessen wurden, zeigten unter den genannten Meßbedingungen keine Eigenfluoreszenz, weshalb Gleichung 17 durch das Einsetzen von $f_L = 0$ zu Gleichung 18 vereinfacht werden konnte.

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

Die gemessenen Fluoreszenzwerte eines Titrationsexperimentes wurden um den Einfluß des Puffers und eventuell des Liganden (bei der Titration mit Bilirubin) korrigiert, auf 100 % skaliert und gegen die Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden aufgetragen. Die Anpassung der Kurve erfolgte gemäß Gleichung 18 durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Computerprogrammes „Kaleidagraph“ unter Anpassung von f_p , f_{PL} und K_D .

2.4.1.2 Kompetitions-Bindungsexperimente

Zur Durchführung der Konkurrenzexperimente mit Testosteron, Pregnenolon, *E*-3M2H und Bilirubin gegenüber Progesteron wurden 2 ml 1 μ M ApoD in gelatinehaltigem Puffer (siehe Abschnitt 2.4.1.1) zunächst mit 5 μ M Progesteron komplexiert, indem 2 μ l einer 5 mM Stammlösung in Dioxan zugegeben wurden. Dabei nahm die bei 295 nm gemessene Fluoreszenzintensität ab. Der entstandene Komplex wurde mit der Lösung des zu untersuchenden Liganden titriert und die Fluoreszenzemission aufgezeichnet.

Zum Nachweis der Ligandenbindung an ApoD unter Verdrängung von an das Protein gebundenem ANS wurden 2 ml 1 μ M ApoD in gelatinehaltigem Puffer mit ANS komplexiert. Dazu wurden 8 μ l einer 5 mM Stammlösung von ANS in DMF – entsprechend einer Endkonzentration von 20 μ M – zugegeben und die Proteinlösung anschließend mit dem Liganden titriert. Dabei wurde die Fluoreszenz des ANS bei 370 nm angeregt und bei 470 nm gemessen.

2.4.2 CD-Spektroskopie

Zirkulardichroismus beschreibt die unterschiedlich starke Extinktion von rechts- und links-
händig zirkular polarisiertem Licht beim Durchgang eines optisch aktiven, absorbierenden Mediums, die durch verschiedene molare Extinktionskoeffizienten ϵ_R und ϵ_L für die beiden Komponenten beschrieben werden kann. Bei Proteinen betrachtet man die Absorptionseigenschaften der Peptidbindungen im fernen UV-Bereich (180 nm bis 270 nm) oder die der aromatischen Seitenketten im nahen UV-Bereich (250 nm bis 350 nm). Durch Analyse des CD-Spektrums im Absorptionsbereich der Peptidbindungen kann man Aufschluß über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins erhalten. Die Messung des Zirkulardichroismus im Absorptionsbereich der aromatischen Seitenketten ermöglicht eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt, um Information über die Sekundärstruktur des rekombinanten ApoD und seiner Varianten zu erhalten.

Zur Aufnahme der Spektren wurde das mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte ApoD konzentriert und gegen 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Die Proteinlösung (ca. 10 μ M) wurde in eine verschließbare Quarzglaszuvette mit einer Schichtdicke von 0,2 cm gefüllt und für 20 min bei 20 °C im Probenhalter des Spektrometers

(Jasco J-810) temperiert. CD-Spektren wurden im Bereich von 190 bis 240 nm aufgezeichnet, wobei bis zu 20 Spektren akkumuliert wurden (Geräteeinstellungen: *response* = 1 s, *bandwidth* = 1 nm, *data pitch* = 0,2 nm, *scan speed* = 50 nm/min).

Die in Grad gemessenen Werte für die Elliptizität θ_{Obs} wurden für jedes Protein auf die molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{MRW} mit Hilfe der folgenden Gleichung umgerechnet.

$$\theta_{\text{MRW}} = \frac{\theta_{\text{Obs}} \cdot M_{\text{R}}}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_{\text{A}}} \quad (19)$$

Dabei bezeichnet M_{R} die Molmasse des untersuchten rekombinanten Proteins, c dessen Konzentration in mg/ml, d die Schichtdicke in cm sowie N_{A} die Anzahl der Aminosäuren.

2.4.3 Nachweis von Bindungsaktivität durch Oberflächen-Plasmonresonanz

Zur Quantifizierung der Bindungsaffinität der ApoD-Variante HbgA für Hämoglobin wurde die Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz (siehe Übersichten in Jönsson *et al.*, 1991; Mullet *et al.*, 2000) in einem Biacore-System verwendet. Dieses physikalisch-optische Verfahren macht sich die Wechselwirkung von Photonen mit einem in einer dünnen Metallschicht erzeugten elektrischen Feld zunutze. Trifft monochromatisches, linear polarisiertes Licht aus einem optisch dichteren Medium auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium unter einem Winkel, der größer ist als der Winkel der Totalreflexion (β_{T}), so wird der Lichtstrahl vollständig reflektiert. Dabei ist β_{T} abhängig vom Verhältnis der Lichtgeschwindigkeiten in den beiden Medien, was auch als relativer Brechungsindex bezeichnet wird.

Trotz der Totalreflexion des Lichtes an der Phasengrenze reicht das elektrische Feld der Photonen in das optisch dünnere Medium hinein. Befindet sich an der Phasengrenze ein metallisch leitender Film, so kann das photoelektrische Feld unter bestimmten Umständen mit dem dortigen Elektronengas wechselwirken. Die Energie der dabei absorbierten Photonen wird in ein Plasmon umgewandelt, welches durch einen parallel zur Ebene des Films verlaufenden Vektor charakterisiert wird. Es kommt bei einem charakteristischen Winkel, der von dem Brechungsindex des dünneren Mediums abhängt, zu einem Intensitätsminimum des totalreflektierten Lichtes, da die Energie des Plasmons als Wärmeenergie an die Umgebung abgegeben wird.

Bei konstantem Einfallswinkel führt die Ansammlung von Molekülen innerhalb einer Zone von wenigen 100 nm zur Metalloberfläche zu einer lokalen Änderung des Brechungsindex und damit zur Verschiebung des Winkels des Intensitätsminimums (θ) der Totalreflexion. Die Messung dieses Winkels macht die Analyse von Bindungsereignissen möglich, wenn ein Bindungspartner in der Nähe der Metalloberfläche immobilisiert wird und der andere mittels

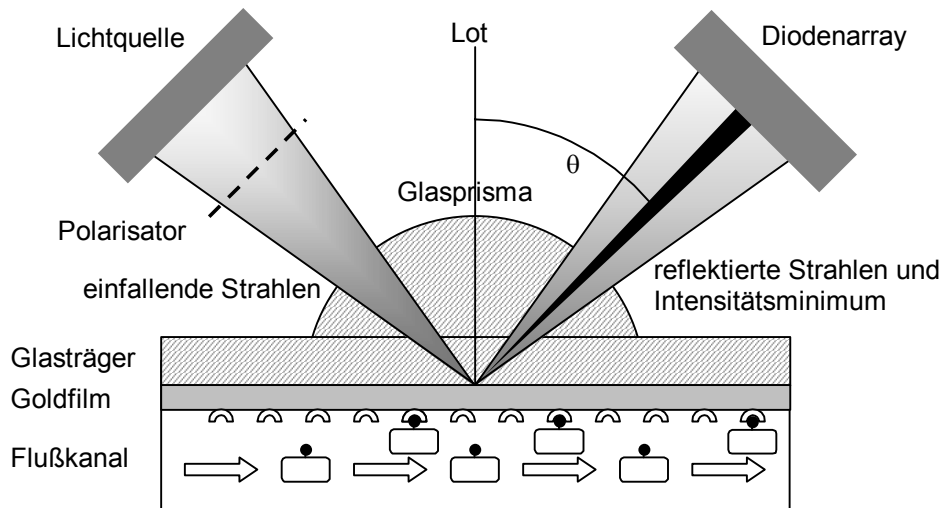


Abbildung 4. Die Lichtquelle emittiert Photonen, die in einem Winkelbereich auf die mit Gold beschichtete Grenzfläche zwischen Glasträger und Flußkanal treffen und reflektiert werden. Durch Wechselwirkung des im Goldfilm entstandenen Plasmons mit dem elektrischen Feld der einfallenden Photonen kommt es zur Energieabsorption unter der Resonanzbedingung, die durch die Eigenschaften des Goldfilmes und des angrenzenden optischen Mediums beeinflusst wird. Eine Bindung von Substanzen aus der flüssigen Phase an die Metalloberfläche oder an dort immobilisierte Moleküle verändert die Plasmonresonanz. Dies führt zu einer Verschiebung des Winkels θ des Intensitätsminimums, welche durch das Diodenarray gemessen wird.

einer kontinuierlich über die Metalloberfläche strömendem Flüssigkeit zugeführt wird. Eine Markierung des mobilen Partners ist nicht nötig, weshalb man auch von „Real Time“ Analyse spricht.

Bei dem verwendeten „Biacore X“-System wird linear polarisiertes Licht mit einer Wellenlänge von 760 nm auf ein Prisma gerichtet, welches auf einer Sensorsoberfläche aus Glas anliegt, die auf der entgegengesetzten Seite mit Gold beschichtet ist. Dabei trifft der fächerförmige Lichtstrahl mit einem Bereich definierter Einfallswinkel auf die Goldschicht (siehe Abbildung 4). Ein Photodiodenarray mißt die Intensitäten des reflektierten Lichtes, aus denen das Intensitätsminimum und der Winkel, unter dem maximale Plasmonresonanz auftritt, ermittelt werden. Die Veränderung dieses Minimums wird in ein zeitabhängiges Signal („Resonanz-Einheit“, RU) umgesetzt.

Zur Messung von Bindungsisothermen wurden „CM5“-Sensorchips (Löfås & Johnsson, 1990) benutzt. Diese bestehen aus einem 100 nm dicken, einseitig goldbeschichtem Glasplättchen. Die Goldoberfläche ist mit carboxymethylierten Dextran-Ketten derivatisiert und präsentiert so eine gelartige, poröse Matrix von 100 bis 200 nm Dicke, die zur chemischen Kopplung unterschiedlicher Substanzklassen verwendet werden kann.

Zur Durchführung von Bindungsexperimenten wurde einer der beiden Bindungspartner auf einem „CM5“-Sensorplättchen immobilisiert, wobei die Amin-Kopplungsmethode Anwendung fand.. Die beiden in Reihe geschalteten Kanäle des Chips wurden dazu zunächst mit dem Laufpuffer HBS mit 0,005 % v/v P20 bei einem konstanten Fluß von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$

gespült, bis sich das Signal stabilisiert hatte. Alle verwendeten Puffer waren zuvor sterilfiltriert (0,45 µM) und entgast worden. Für jedes zu immobilisierende Protein mußten geeignete Immobilisierungsbedingungen ermittelt werden. Dazu wurde eine Stammlösung des Proteins mit Puffern verschiedener pH-Werte (10 mM Maleat, pH 7,0; 10 mM Maleat, pH 6,0; 10 mM Acetat, pH 4,7) auf eine geeignete Konzentration (0,1 bis 0,5 mg/ml) verdünnt. Nach Injektion von 35 µl der Lösung (Flußrate bei den folgenden Schritten 5 µl/min) konnte durch das Ansteigen des Signals die Präkonzentration des positiv geladenen Proteins auf der negativ geladenen Matrix verfolgt und anhand dessen ein geeigneter Puffer-pH ausgewählt werden.

Zur kovalenten Immobilisierung wurden die Carboxymethylgruppen der Dextran-Matrix schließlich in beiden Flußkanälen mit 35 µl einer Lösung von 37 mg/ml N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und 58 mg/ml N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Nach Absinken des Signals auf einen konstanten Wert wurde eine Lösung des zu immobilisierenden Proteins durch einen Kanal geleitet, bis das zunehmende Resonanzsignal den gewünschten Wert erreicht hatte. Die Menge des tatsächlich kovalent immobilisierten Proteins betrug zwischen 30 % und 50 % der zu diesem Zeitpunkt gemessenen Resonanzeinheiten. Dabei entspricht ein Anstieg von 1000 RU einer Beladung der Sensoroberfläche mit 1 ng/mm². Nach Spülen mit Laufpuffer und Absinken des Signals wurden nicht derivatisierte Bindungsstellen mit 35 µl 1 M Ethanolamin blockiert.

Bindungsisothermen wurden bei 25 °C und einer Flußrate von 10 µl/min HBS mit 0,005 % v/v Detergenz P20 als Laufpuffer aufgenommen. Zur Quantifizierung der Bindung von ApoD oder seiner Variante HbgA (siehe Abschnitt 3.8.2.2) an immobilisiertes Hämoglobin, Myoglobin oder BSA waren 5000 ± 300 RU des Proteinliganden auf der Dextranoberfläche in Kanal 2 eines Sensors kovalent fixiert worden. Je 75 µl einer Lösung von ApoD oder HbgA wurden in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 5 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM) durch beide Kanäle (in Reihe) geleitet und anschließend wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Laufpuffer gespült. Die erhaltene Bindungskurve (Kanal 2) wurde mittels der „Biacore Evaluation Software 3.0“ um das Hintergrundsignal in Kanal 1 korrigiert und die erhaltenen Maximalwerte (in RU) in der Nähe des Plateaus bei der Assoziationsphase wurde gegen die Konzentration der ApoD-Variante aufgetragen.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten. Die Dissoziationskonstante wurde aus den erhaltenen Meßpunkten durch Anpassung mittels nichtlinearer Regression ermittelt (Voss & Skerra, 1997). Im Gleichgewicht kann die Dissoziationskonstante K_D wiederum durch Gleichung 12 beschrieben werden (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

$$K_D = \frac{([P]_t - [P \cdot L]) ([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]} \quad (12)$$

Nimmt man an, daß $[P]_t \gg [P \cdot L]$, so ergibt sich aus Gleichung 12 durch Auflösen nach $[P \cdot L]$:

$$[P \cdot L] = \frac{[L]_t [P]_t}{[P]_t + K_D} \quad (20)$$

Dabei entspricht $[P]_t$ der bekannten Proteinkonzentration der ApoD-Variante. Die Konzentration des Protein-Ligandenkomplexes $[P \cdot L]$ korreliert direkt mit dem Signal der Oberflächen-Plasmonresonanz. Als anzupassende Parameter verbleiben die Gesamtkonzentration des immobilisierten Liganden $[L]_t$ sowie die Komplex-Dissoziationskonstante K_D . Die Anpassung wurde mit Hilfe des Programmes „Kaleidagraph“ durchgeführt.

2.5 Verwendete Computerprogramme

Zur Analyse und Bearbeitung von DNA- und Protein-Sequenzdateien wurde das Programmpaket „GCG“ (Devereux *et al.*, 1984; Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI, USA) unter dem Betriebssystem UNIX verwendet. Insbesondere kamen die Programme „Bestfit“, „Map“, „Mapsort“, „Peptidesort“, „Seqed“ und „Translate“ zum Einsatz.

Dreidimensionale Strukturen von Proteinen und kleineren Molekülen wurden mit den Programmen „Insight II“ der Firma MSI und „Molscript“ (Kraulis, 1991) auf einer Workstation „Indigo 2“ (Silicon Graphics) unter UNIX analysiert und dargestellt. Dabei wurden Atomkoordinaten aus Proteinkristallstrukturen verwendet, die der „Protein Data Bank“ (Berman *et al.*, 2000) entnommen werden konnten.

Die Auswertung von Meßdaten aus biophysikalischen Analysen erfolgte mit Hilfe des Programmes „Kaleidagraph“ (Synergy Software, Reading, USA) auf einem „Apple Macintosh PowerPC“.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion des rekombinanten ApoD

3.1.1 Amplifizierung des ApoD-Strukturgens aus humaner cDNA

Voraussetzung für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war die Isolierung der humanen ApoD-cDNA. Das Strukturgen, dessen Sequenz von Drayna *et al.* (1986) bestimmt wurde, konnte mittels PCR unter Verwendung spezifischer Oligodesoxynukleotide aus einer kommerziell erhältlichen humanen Leber-cDNA-Bank amplifiziert werden, welche aus der Leber eines 40jährigen Kaukasiers gewonnen worden war und die in dem Vektor pGAD10 kloniert war. Die zur Amplifizierung eingesetzten Oligodesoxynukleotide MV-1 und MV-2 wurden so konstruiert, daß sie einerseits zu den terminalen Sequenzabschnitten der ApoD-cDNA komplementär waren und andererseits die einfache Klonierung des entstandenen PCR-Fragments ermöglichten (Abbildung 5, siehe auch Abschnitt 3.1.2).

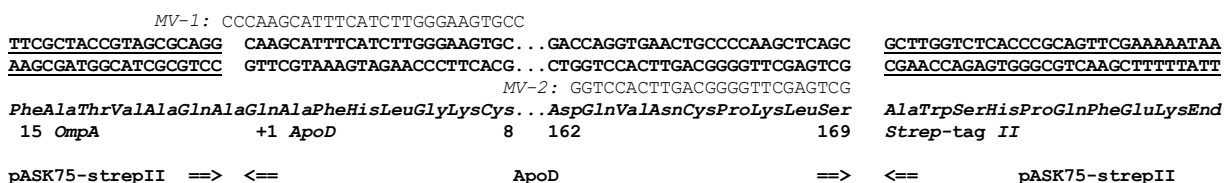


Abbildung 5. Amplifizierung des ApoD-Genes. Gezeigt sind die relevanten Ausschnitte der DNA-Sequenzen von pASK75-strepII (links und rechts, unterstrichen) und des muren ApoD (Mitte). Das Strukturgen des ApoD wurde mittels der als *Primer* verwendeten Oligodesoxynukleotide MV-1 und MV-2 durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt (509 bp) wurde anschließend mit dem durch Verdau mit *StuI* und *Eco47III* erhaltenen Fragment (3206 bp) von pASK75-strepII ligiert.

Um das Strukturgen des ApoD mit hoher Replikationsgenauigkeit zu amplifizieren, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und weist deshalb im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase eine deutlich niedrigere Fehlerrate auf (Lundberg *et al.*, 1991). Allerdings führt diese enzymatische Aktivität zu einem partiellen Abbau der als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide. Dies kann jedoch durch den Einbau einer Phosphothioat-Bindung anstelle der 3'-terminalen Phosphodiesterbindung verhindert werden (Skerra, 1992). Die Oligodesoxynukleotide MV-1 und MV-2 waren entsprechend synthetisiert worden.

Mit Hilfe dieser *Primer* konnte durch PCR mit 35 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C ein singuläres Produkt der erwarteten Größe von 509 bp erhalten werden (siehe Abschnitt 3.1.2).

3.1.2 Konstruktion bakterieller Expressionsvektoren

Zur rekombinanten Herstellung des ApoD wurden verschiedene Plasmide ausgehend von dem Expressionsvektor pASK75-strepII konstruiert. Dieser universelle Expressionsvektor (Skerra, 1994; Voss & Skerra, 1997) war bereits erfolgreich für die gentechnische Produktion zweier anderer Lipocaline, des BBP (Schmidt, 1995) und des RBP (Schmidt, 1998) eingesetzt worden. Bei allen im Laufe dieser Arbeit konstruierten Plasmiden wird das ApoD durch die an den N-Terminus des murens Proteins fusionierte wirtseigene OmpA-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) in den periplasmatischen Raum von *E. coli* sekretiert. Unter den oxidativen Bedingungen dieses Zellkompartiments können sich die Disulfidbindungen des rekombinanten ApoD ausbilden. Die Fusionierung eines Affinitätsanhängsels mit dem Strukturgen sollte die einfache Reinigung des Proteins erlauben.

Das mittels PCR amplifizierte Gen des humanen ApoD wurde zunächst auf dem Vektor pASK75-strepII kloniert. Da die zur Amplifizierung des ApoD-Gens verwendete *Pfu*-DNA-Polymerase PCR-Fragmente mit glatten Enden erzeugt, konnte das amplifizierte ApoD-Gen über in der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors vorhandene Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *StuI* und *Eco47III* eingeführt werden. Zur Konstruktion des Vektors wurde pASK75-strepII mit *StuI* und *Eco47III* geschnitten und das entstandene große Fragment (3206 bp) isoliert und dephosphoryliert, um die bei glatten DNA-Enden mögliche intramolekulare Ligierung sowie die Bildung von Konkataleren zu verhindern. Hingegen wurde das PCR-Fragment phosphoryliert. Nach erfolgter Ligierung wurde die Insertion des Vektorfragments durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* analysiert. Da die Klonierungsstrategie zwei Orientierungen des ApoD-Strukturgens im Vektor zuließ, wurde durch Restriktionsanalyse anhand der internen *MscI*-Schnittstelle dessen Ausrichtung überprüft. Durch Restriktionsanalyse von vier Klonen mit dem Insert konnten drei Klone ermittelt werden, die das PCR-Fragment in der gewünschten Orientierung trugen. Die Identität des PCR-Fragments mit dem ApoD-Gen wurde durch Sequenzierung mittels der Oligodesoxynukleotide F-83 und PR-1 bestätigt. Eines der erhaltenen Plasmide mit der korrekten Sequenz wurde als pApoD1 (3715 bp) bezeichnet (vergleiche pApoD2 in Abbildung 6).

Um bei der bakteriellen Produktion des ApoD oxidative Quervernetzung oder die Entstehung von Disulfidisomeren zu vermeiden, wurde das Kodon für den Aminosäurerest Cys116 mittels ortsgerichteter Mutagenese gegen ein Kodon für Serin ausgetauscht. Der Aminosäurerest Cys116 des humanen Serum-ApoD bildet eine kovalente Bindung zu Cys6 des Apo-AII aus (Blanco-Vaca *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994) und ist nicht an der Bildung intramolekularer Disulfidbrücken beteiligt. Da zudem Cys116 beispielsweise im ApoD des Hasen nicht vorhanden ist (Provost *et al.*, 1990), konnte davon ausgegangen werden, daß Cys116 für die Faltung des Proteins keine essentielle Bedeutung hat.

Ausgehend von pApoD1 wurde unter Verwendung des Oligodesoxynukleotids MV-3 nach der Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987; siehe Abschnitt 2.2.5.6) eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt. Der resultierende Vektor, dessen korrekte Gensequenz durch Sequenzierung unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide F-83 und PR-1 bestätigt werden konnte, wurde als pApoD2 bezeichnet (Abbildung 6).

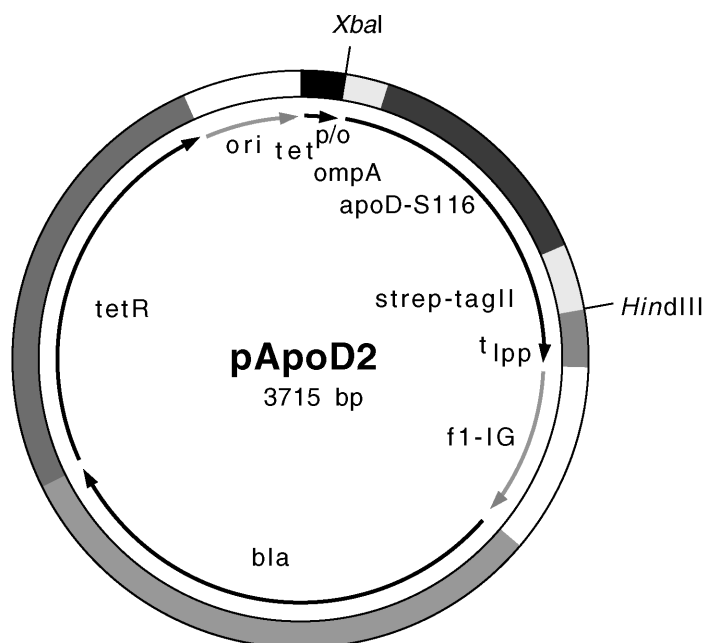


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Plasmids pApoD2 für die gentechnische Herstellung von ApoD in *E. coli*. Das Strukturgen des ApoD mit der Mutation C116S (ApoD-S116) ist zwischen den für das OmpA-Signalpeptid und für das Strep-tag II kodierenden Sequenzen kloniert. Die Genkassette steht unter der Transkriptionskontrolle des *tet*-Promotors ($tet^{p/o}$). t_{Ipp} , f1-IG, bla, tetR und ori bezeichnen den rho-unabhängigen Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Bakteriophagen f1, das β -Lactamasegen, das Tetracyclin-Repressorgen und den Replikationsursprung des Vektors.

Zur Anwendung alternativer Reinigungsstrategien wurden ausgehend von pApoD2 Plasmide konstruiert, die zusätzlich zum *Strep*-tag II die Albumin-Bindungsdomäne (ABD) oder anstelle des *Strep*-tag II eine Hexahistidinsequenz (His_6) als Affinitätsanhängsel trugen.

Rekombinante Proteine, die mit der dritten Albumin-Bindungsdomäne (ABD) des Proteins G von *Streptococcus* G148 fusioniert sind, lassen sich durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem humanem Serum-Albumin (HSA) reinigen (Nygren *et al.*, 1988). Um ein Fusionsprotein aus humanem ApoD und der ABD produzieren zu können, wurde die genetische Information für die ABD dem Vektor pBBP22 (Schlehuber *et al.*, 2000), welcher für ein anderes Fusionsprotein mit der ABD kodiert, entnommen. Unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Bst*BI, die den Vektor pBBP22 in der für das *Strep*-tag II kodierenden Gensequenz schneidet, sowie *Hind*III, die direkt nach der kodierenden Sequenz für die ABD schneidet, wurde ein Fragment von 159 bp Größe erhalten. Dieses wurde mit dem durch Hydrolyse mit den Enzymen *Bst*BI und *Hind*III erhaltenen großen Fragment (3703 bp) des

Vektors pApoD2 ligiert. Das konstruierte Plasmid (3862 bp), dessen korrekte Zusammensetzung durch Sequenzierung mit den Oligodesoxynukleotiden F-83 und PR-1 verifiziert wurde, kodierte für ein Fusionsprotein aus dem Signalpeptid OmpA, dem humanen ApoD-(S116), dem *Strep*-tag II sowie der ABD und wurde als pApoD3 bezeichnet.

Um das humane ApoD mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (Hochuli *et al.*, 1988; siehe Abschnitt 2.3.2.2) reinigen zu können, wurde es als Fusionsprotein mit dem Hexahistidin-Anhängsel synthetisiert. Dazu wurde der Expressionsvektor pASK60-His herangezogen und das Hexahistidin-Anhängsel unter Ausnutzung der *Eco47III*-Schnittstelle des Vektors pApoD2 exakt mit dem Strukturgen des humanen ApoD fusioniert. Deshalb wurde der Vektor pASK60-His durch Hydrolyse mit dem Enzym *AatI* am 5'-Ende der His₆-Sequenz linearisiert. Die entstandenen Überhänge wurden unter Ausnutzung der 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase entfernt. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit *BglI* im zu pApoD2 homologen Bereich des β -Lactamasegens geschnitten und das kleinere Fragment (1361 bp) isoliert. pApoD2 wurde unter Verwendung von *Eco47III* und *BglI* hydrolysiert und das größere Fragment (2345 bp) isoliert. Beide Fragmente wurden miteinander ligiert und ergaben den Vektor pApoD4 (3706 bp), dessen korrekte Zusammensetzung durch Sequenzanalyse unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide F-83 und PR-1 bestätigt wurde. pApoD4 kodiert dementsprechend für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, ApoD-(S116) und dem Hexahistidin-Anhängsel.

Erfahrungen bei der Herstellung anderer rekombinanter Proteine in *E. coli* hatten gezeigt, daß das Wachstum von Kulturen zur Produktion plasmidkodierter Fremdproteine häufig mit einem Plasmidverlust der Zellen einhergeht. Dies gilt insbesondere bei Verwendung des Antibiotikums Ampicillin zur Selektion (Fiedler & Skerra, 2001). Das Enzym β -Lactamase, welche die Hydrolyse des Antibiotikums bewirkt, kann während des Wachstums der Produktionskultur ins Medium gelangen, wenn die rekombinante Produktion von für das Wirtsbakterium toxischen Proteinen zu einer erhöhten Permeabilität der Bakterienwand oder zur Lyse der Zelle führt. Durch die Präsenz des hochaktiven Enzyms im Kulturmedium wird das Antibiotikum abgebaut, wodurch Zellen, die ihr Plasmid verloren haben und deshalb weder Plasmid-DNA replizieren, transkribieren noch entsprechende Genprodukte synthetisieren müssen, einen Wachstumsvorteil gegenüber plasmidtragenden Zellen erhalten.

Das Antibiotikum Chloramphenicol inhibiert die Peptidyl-Transferase auf der großen (50 S) Untereinheit prokaryontischer Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese. Das cytoplasmatische Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase, deren Gen als plasmidkodierter Resistenzmarker dient, katalysiert die Acetylierung des Antibiotikums mit dem Coenzym Acetyl-CoA und führt damit zu dessen Inaktivierung. Gelangt bei der Kultivierung chloramphenicolresistenter Bakterien das Enzym durch vollständige Lyse ins Medium, so führt dies dennoch nicht zur Inaktivierung des Antibiotikums, da das zur Umsetzung notwendige Coenzym dort nur in vernachlässigbar geringer Konzentration vorhanden ist.

Die Verwendung von Expressionsvektoren, die das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase konstitutiv exprimierten, sollte den Plasmidverlust in der Produktionskultur gering halten und so – verglichen mit der Verwendung von Ampicillin als Antibiotikum – zu einer stabileren Ausbeute an rekombinantem Protein führen (Fiedler & Skerra, 2001). Zur Konstruktion entsprechender Vektoren wurde der gesamte Bereich zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III aus pApoD2 isoliert und mit dem durch Verdau mit *Xba*I und *Hind*III erhaltenen großen Fragment des Vektors pASK111 (Skerra, unveröffentlicht) ligiert. Damit wurde der Vektor pApoD5 erhalten, der wiederum für ein Fusionsprotein aus dem OmpA-Signalpeptid, humanem ApoD-(S116) und dem *Strep*-tag II kodierte (Abbildung 7). Das Plasmid pApoD6, welches durch analoge Subklonierung ausgehend von pApoD4 gewonnen wurde, kodierte für ein entsprechendes Fusionsprotein mit dem Hexahistidin-Anhängsel. Die korrekte Basensequenz beider Vektoren konnte durch Sequenzierung mittels der Oligodesoxynukleotide F-83 und PR-1 bestätigt werden. Eine Übersicht der in dieser Arbeit erstellten Vektoren ist im Anhang (Abschnitt 8) enthalten.

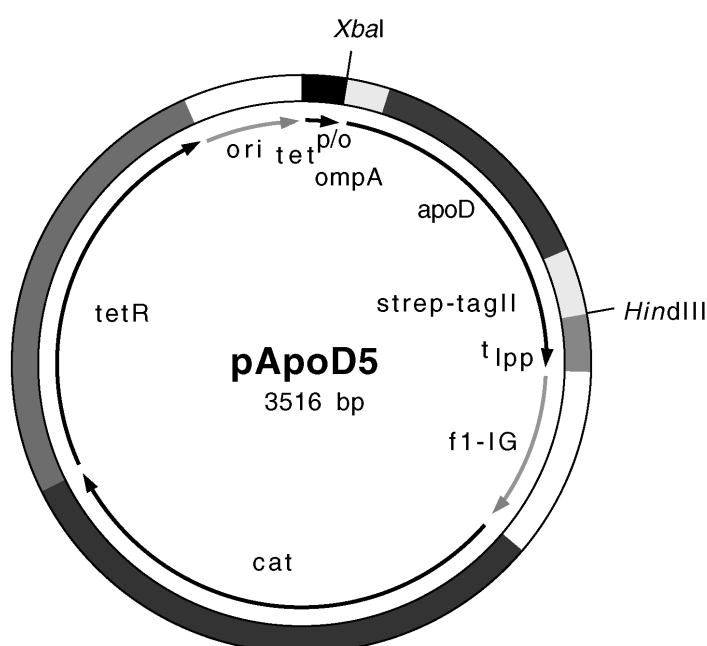


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Vektors pApoD5. Das Plasmid kodiert unter der Kontrolle des *tet*-Promotors für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, dem Gen des humanen ApoD-(S116) und dem *Strep*-tag II. Anstelle des β -Lactamasegens *bla* (vergleiche Abbildung 6) ist in diesem Vektor das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase *cat* vorhanden. Die anderen Elemente des Vektors pApoD5 entsprechen den in Abbildung 6 dargestellten.

3.1.3 Expressionsversuche in *E. coli*

In den konstruierten Expressionsvektoren steht das Strukturgen des humanen ApoD unter der Transkriptionskontrolle des streng regulierten *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994).

Dadurch wird die Basalsynthese eines unter Umständen toxischen Fremdgens im Vergleich zu anderen Promotor/Operator-Systemen sehr niedrig gehalten. Zur funktionellen Produktion von Proteinen mit strukturellen Disulfidbrücken in *E. coli* muß die Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle sekretiert werden, denn nur unter den oxidierenden Bedingungen dieses Zellkompartiments können diese sich effizient ausbilden. Durch die in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Klonierungsstrategien wurde das humane ApoD mit seinen zwei Disulfidbrücken als Fusionsprotein mit der bakteriellen OmpA-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) produziert. Bei der Translokation des Proteins über die innere Membran der Bakterienzelle wird das Signalpeptid abgespalten, so daß das mature rekombinante Protein über das am C-Terminus fusionierte Affinitätsanhängsel aus der periplasmatischen Zellfraktion isoliert werden konnte. Gleichzeitig ermöglichte diese Fusionsstrategie den immunchemischen Nachweis des rekombinanten Proteins über sein Affinitätsanhängsel.

Um das humane ApoD effizient produzieren zu können, wurde zunächst ein geeigneter Stamm des Bakteriums *E. coli* ermittelt. Dazu wurden Zellen der Stämme W3110, K272 und JM83 mit Plasmid-DNA des Typs pApoD2 und pApoD5 transformiert und Produktionskulturen angesetzt. Die Genexpression des ApoD wurde ausgelöst, indem der *tet*-Promotor induziert wurde. Anschließend wurden Proben sowohl vom Gesamtzellprotein als auch von der periplasmatischen Zellfraktion präpariert und analysiert. Das rekombinante Protein wurde durch Analyse mittels *Western Blot* nachgewiesen (Abbildung 8).

Das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz, ApoD und *Strep*-tag II konnte im Gesamtprotein der Stämme *E. coli* W3110, KS272 und JM83, die mit den Plasmiden pApoD2 oder pApoD5 transformiert worden waren, jeweils nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8, Spuren 1 bis 4). In der periplasmatischen Zellfraktion konnte das rekombinante ApoD zudem in prozessierter Form bei einer apparenten Molekularmasse von 24 kDa detektiert werden, wobei sich die relativ größte Menge ApoD im Periplasma von JM83/pApoD5 fand. Bei der Produktion in dem Stamm W3110 war der Anteil nichtprozessierten Proteins (sowie im *Western Blot* sichtbarer cytoplasmatischer, kontaminierender Proteine) in der präparierten Periplasmafraktion (Spur 5) signifikant höher als in den Stämmen KS272 oder JM83. Dies wurde auf eine partielle Lyse von Zellen während der Zellfraktionierung zurückgeführt, die bei allen untersuchten Stämmen beobachtet wurde, bei W3110 aber besonders deutlich auftrat. Die Analyse der Expressionsprodukte von KS272/pApoD2 zeigte (Spuren 2, 6), daß dieser Stamm das Fremdprotein im Vergleich zu W3110 und JM83 in geringerem Ausmaß degradiert. KS272 war zur Minimierung proteolytischen Abbaus heterologer sekretierter Proteine als Protease-defizienter Stamm konstruiert worden (Meerman & Georgiou, 1994). Die präparative Produktion und Reinigung des ApoD mit K272 und JM83 unter Verwendung der Plasmide pApoD2 und pApoD5 zeigte jedoch, daß höhere Ausbeuten an rekombinantem Protein mit JM83 erzielt werden. Die besondere Eignung des Stamms JM83 zur gentech-

nischen Herstellung von ApoD bestätigte frühere Erfahrungen, die bei der heterologen Produktion anderer Lipocaline gemachten wurden (Müller & Skerra, 1993; Schmidt, 1995).

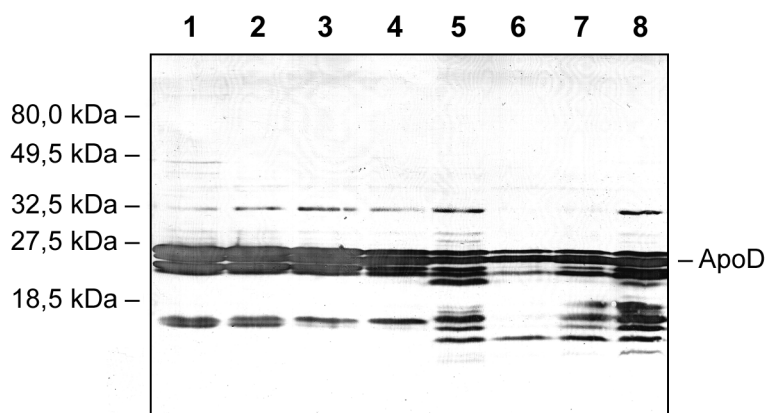


Abbildung 8. Analyse der Produktion von ApoD in *E. coli* mittels *Western Blot*. Zellen der *E. coli*-Stämme W3110 (Spuren 1, 5), KS272 (Spuren 2, 6) sowie JM83 (Spuren 3, 4, 7, 8) wurden mit den Plasmiden pApoD2 (Spuren 1, 2, 3, 5, 6, 7) oder pApoD5 (Spuren 4, 8) transformiert. Nach Kultivierung bis $OD_{550} = 0,5$ und anschließender dreistündiger Induktion der ApoD-Biosynthese durch Zugabe von $200 \mu\text{g/l}$ aTc bei 22°C wurden das Gesamtprotein der Zellen (Spuren 1 bis 4) sowie die periplasmatische Fraktion (Spuren 5 bis 8) präpariert. Die Proben wurden im 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Das rekombinante Protein wurde auf der Membran anhand des *Strep*-tag II mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch chromogene Reaktion nachgewiesen. Die dem prozessierten ApoD entsprechende Bande ist markiert.

Auch die Analyse der Expressionsprodukte der Vektoren pApoD3 oder pApoD4, die für Fusionsproteine des ApoD mit der ABD beziehungsweise dem Hexahistidin-Anhängsel kodieren, in den Stämmen JM83 und W3110 ergab, daß rekombinantes ApoD in das Periplasma von *E. coli* sekretiert wurde (ohne Abbildung). Versuche zur Isolierung des ApoD (Abschnitt 3.1.4) ließen aber den Schluß zu, daß die Reinigung mit den hier verwendeten Affinitätsmodulen weniger effizient war als mit dem *Strep*-tag II.

3.1.4 Isolierung des rekombinanten Proteins

Durch die Präparation der Periplasmafraktion der induzierten Zellen war das rekombinante ApoD bereits angereichert. Mittels des an den C-Terminus fusionierten Affinitätsanhängsels wurde das ApoD schließlich von den periplasmatischen Wirtsproteinen abgetrennt.

Die Produktion des ApoD als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II ermöglichte die Isolierung des ApoD mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.3.2.1). Das Protein wurde bei Produktion in den *E. coli* Stämmen JM83 und KS272 mittels der Plasmide pApoD2 oder pApoD5 und anschließender Reinigung in guter Reinheit erhalten. Dabei erschien das rekombinante ApoD in der Analyse mittels SDS-PAGE als singuläre Bande bei einer apparenten Molmasse von 24 kDa (siehe Abbildung 9). Die höchsten Ausbeuten an gereinigtem Protein wurden durch Kultivierung von JM83 erzielt. Bei der Produktion des

rekombinanten ApoD mit den Expressionsvektoren pApoD2 und pApoD5 in JM83 konnten Ausbeuten von $120 \mu\text{g/l}_{\text{Kulturmedium}}$ beziehungsweise $220 \mu\text{g/l}_{\text{Kulturmedium}}$ erzielt werden. Deshalb wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Plasmid pApoD5 in Kombination mit dem Stamm *E. coli* JM83 für die Proteinproduktion im präparativen Maßstab verwendet.

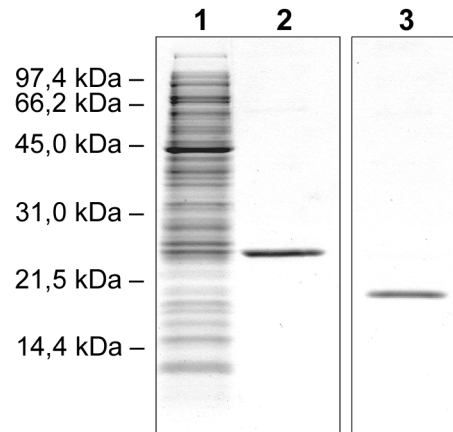


Abbildung 9. Produktion in *E. coli* und Reinigung des rekombinanten ApoD. Die periplasmatische Zellfraktion einer für 3 h mit $200 \mu\text{g/l}$ aTc induzierten Kultur von *E. coli* JM83/pApoD5 (Spur 1) und das durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte ApoD (Spur 2: reduziert, Spur 3: ohne Reduktion der Disulfidbrücken) wurden auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Um ApoD im größeren Maßstab gentechnisch herzustellen, wurden Versuche zur Etablierung eines Fermentationsverfahrens durchgeführt. Dazu wurde der Wildtypstamm *E. coli* W3110, der auch in Minimalmedium kultivierbar ist, in Verbindung mit den Expressionsvektoren pApoD2 und pApoD4 benutzt und nach einer Vorschrift, die zur funktionellen Produktion von Antikörperfragmenten erfolgreich eingesetzt worden war (Schiweck & Skerra, 1995), bis zu hoher Zelldichte fermentiert. Im Gesamtzellprotein sowie in der periplasmatischen Zellfraktion konnte das ApoD über das *Strep*-tag II oder das Hexahistidin-Anhängsel auf dem Western-Blot mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat bzw. Nickel-NTA/Alkalische-Phosphatase-Konjugat nachgewiesen werden.

Bei der anschließend durchgeführten Streptavidin- oder Metallchelate-Affinitätschromatographie stellte sich jedoch heraus, daß zusammen mit dem rekombinanten ApoD stets zwei höhermolekulare Proteine eluiert wurden. Die Molmasse dieser Proteine konnte anhand ihrer Mobilität in der SDS-PAGE auf 40 kDa beziehungsweise 45 kDa abgeschätzt werden. Vermutlich handelte es sich dabei um Komponenten der Bakterienzellmembran des Stammes *E. coli* W3110, die aufgrund ihres hydrophoben Charakters mit dem rekombinanten ApoD interagierten. Um derartigen Wechselwirkungen entgegenzuwirken, wurden die Affinitätschromatographien unter modifizierten Pufferbedingungen durchgeführt. Jedoch bewirkten weder erhöhte oder erniedrigte Ionenstärke (10 mM bis 1 M NaCl) noch der Zusatz

organischer Substanzen wie 10% Ethylenglykol zum Laufpuffer eine effiziente Abtrennung des rekombinanten ApoD von den kontaminierenden Proteinen.

Auch Metallchelat-Affinitätschromatographien, bei denen Ni^{2+} statt Zn^{2+} als immobilisierte Kationen in Verbindung mit Iminodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) als stationärer Phase dienten, führten nicht zu einer effizienteren Isolierung des rekombinanten ApoD mit dem Hexahistidin-Anhängsel aus der periplasmatischen Zellfraktion. Durch vor- oder nachgeschaltete Reinigungen mittels hydrophober Interaktions- oder Ionenaustauschchromatographie konnte die Reinheit ebenfalls nicht gesteigert werden.

Eine Betrachtung des theoretischen Strukturmodells des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) offenbarte zwei Histidinreste, His4 und His122, die auf verschiedenen β -Strängen, aber räumlich benachbart auf der Außenseite der β -Faltstruktur gelegen sind. Diese Seitenketten, die sich in der Mitte eines hydrophoben Bereiches der ApoD-Struktur befinden, sollten die Komplexierung von Metallionen bewirken können und daher die Immobilisierung des ApoD auf einer chelatisierenden Säulenmatrix bereits ohne ein Hexahistidin-Anhängsel ermöglichen. Deshalb wurden Versuche zur Reinigung des rekombinanten ApoD mit dem *Strep*-tag II am C-Terminus aus dem Periplasma von *E. coli* W3110 über Metallchelat-Affinitätschromatographie durchgeführt, wobei IDA mit Zn^{2+} oder Ni^{2+} sowie NTA mit Ni^{2+} als chelatisierende Matrices verwendet wurden. Tatsächlich wurde eine Immobilisierung des ApoD auf den Trennmaterialien beobachtet. Im ansteigenden Imidazol-Konzentrationsgradienten wurde ApoD allerdings zusammen mit ebenfalls schwach auf der Säule gebundenen bakteriellen Proteinen eluiert. Eine darauffolgende Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie erlaubte zwar die Abtrennung eines Großteils dieser Proteine, konnte aber die kontaminierenden Proteine von 40 kDa und 45 kDa Masse nach wie vor nicht entfernen.

Versuche, die Identität der mit dem rekombinanten ApoD koeluierten Proteine durch N-terminale Sequenzierung und anschließende Datenbankrecherche zu ermitteln, schlugen fehl, da sich die Proteine nicht in ausreichender Menge auf einer an sich dazu geeigneten Membran immobilisieren ließen.

3.2 Proteinchemische Charakterisierung des rekombinanten ApoD

3.2.1 N-terminale Sequenzierung

Die korrekte Prozessierung des rekombinanten humanen ApoD konnte durch N-terminale Sequenzierung des in JM83/pApoD5 produzierten und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isolierten Proteins bestätigt werden. Die ermittelte Aminosäuresequenz lautete in

Übereinstimmung mit der von Drayna *et al.* (1986) veröffentlichten Sequenz „Gln-Ala-Phe-His“, so daß die bakterielle OmpA-Signalsequenz korrekt abgespalten worden war. Vorangegangene Analysen von nativem ApoD, welches aus verschiedenen humanen Geweben isoliert worden war, hatten allerdings eine Blockierung seines N-Terminus durch Pyroglutamat ergeben (Balbín *et al.*, 1990; Drayna *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1994). Offensichtlich ist diese posttranslationale Modifizierung beim in *E. coli* synthetisierten ApoD nicht vorhanden.

3.2.2 Massenspektrometrische Analyse

Die molekulare Masse des rekombinanten ApoD wurde mittels Elektrospray-Massenspektrometrie ermittelt. In der untersuchten Probe des durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteins fand sich eine einzige Molekülspezies mit einer Masse von 20394,8 Da. Dies steht in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretisch für das Fusionsprotein aus humanem ApoD-(C116S) mit dem *Strep*-tag II – unter Berücksichtigung zweier Disulfidbrücken – berechneten Masse von 20394,0 Da. Die massenspektrometrische Untersuchung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Veith und C. Rudolph (beide TU Darmstadt) mit einem Esquire-LC Instrument (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt.

3.2.3 Untersuchung der Tertiärstruktur

3.2.3.1 Ausbildung der Disulfidbrücken

Im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raumes von *E. coli*, in den das rekombinante ApoD sekretiert wurde, sollten sich die Disulfidbrücken effizient ausbilden können. Tatsächlich zeigte das rekombinante ApoD im nichtreduzierten Zustand eine singuläre Bande in der SDS-PAGE. Dabei war die gelelektrophoretische Mobilität des ApoD im nicht reduzierten Zustand verglichen mit dem reduzierten Protein deutlich erhöht (siehe Abbildung 9), was auf die korrekte Ausbildung der zwei Disulfidbindungen des gentechnisch hergestellten Proteins schließen ließ. Dagegen führt das Vorliegen von topologisch falschen oder gar nicht ausgebildeten Disulfidbindungen zu Faltungsisomeren, die sich in der Regel in ihrem gelelektrophoretischen Laufverhalten unterscheiden. Die Bildung solcher Isomere war bei der bakteriellen Produktion eines anderen Lipocalins, des RBP, beobachtet worden (Müller & Skerra, 1993).

3.2.3.2 CD-Spektroskopie

Um Aufschluß über die Sekundärstruktur des rekombinanten ApoD zu erhalten, wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Dabei wurde der Wellenlängenbereich (190 bis 250 nm) im Fern-UV untersucht, denn in diesem Bereich des Spektrums werden die spek-

tralen Eigenschaften eines Proteins hauptsächlich von den jeweiligen Sekundärstrukturelementen bestimmt (Johnson, 1988). Da sich die CD-Spektren für ideale α -Helix-, β -Faltblatt- und *Random Coil*-Strukturen deutlich unterscheiden, kann der jeweilige Anteil dieser Sekundärstrukturelemente eines Proteins abgeschätzt werden.

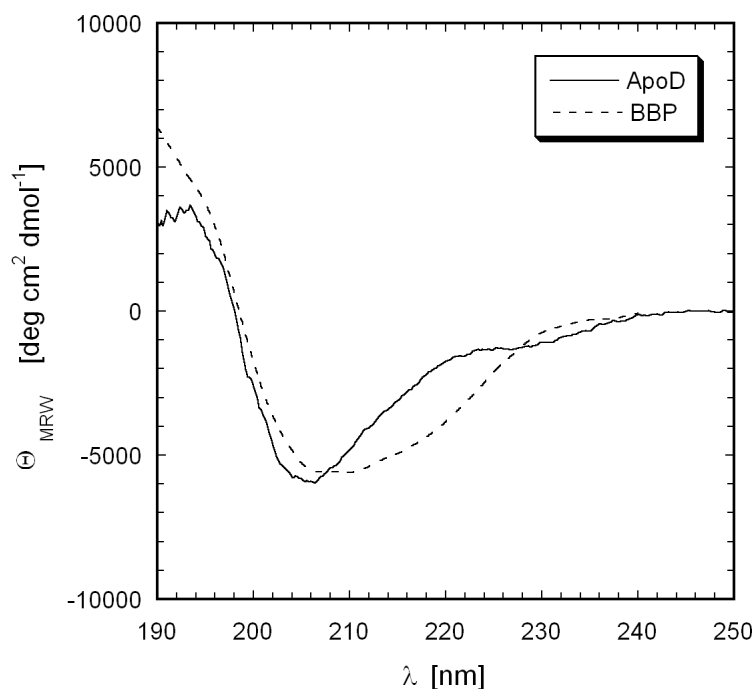


Abbildung 10. Die CD-Spektren von rekombinantem ApoD und BBP im Vergleich. Das Spektrum einer $13 \mu\text{M}$ ApoD-Lösung in 10 mM NaPi ($\text{pH } 7,5$) wurde bei einer Temperatur von $22 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Quarzküvette (2 mm Schichtdicke) durch Akkumulation von 16 Einzelspektren gemessen. Die gemessene Elliptizität θ_{Obs} wurde auf die molare Elliptizität θ_{MRW} umgerechnet (siehe Abschnitt 2.4.2). Das CD-Spektrum des BBP wurde von Beste (1998) unter gleichen Bedingungen bestimmt und mit freundlicher Genehmigung abgebildet.

Das CD-Spektrum des rekombinanten ApoD zeigt den für ein β -Faltblatt-Protein typischen Verlauf mit einem Maximum bei 195 nm und einem charakteristischen Minimum im Bereich zwischen 200 nm und 210 nm (siehe Abbildung 10). Weiterhin weist das ApoD-Spektrum Ähnlichkeit mit dem Spektrum des rekombinanten BBP auf (Beste, 1998). Allerdings ist beim BBP-Spektrum das lokale Minimum im Vergleich zum Spektrum des ApoD deutlich verbreitert, was auf die Anwesenheit α -helicaler Strukturelemente hinweist.

Die von Peitsch & Boguski (1990) postulierte Struktur des ApoD beschreibt das Protein als β -Faltblattstruktur mit einer bei den *Kernel*-Lipocalinen konservierten typischen α -Helix. Aufgrund der bekannten Kristallstrukturen des BBP (Huber *et al.*, 1987) und der Ähnlichkeit der CD-Spektren von rekombinantem ApoD und BBP kann davon ausgegangen werden, daß das in *E. coli* produzierte ApoD im wesentlichen die Lipocalin-typische Faltungsarchitektur besitzt.

3.2.4 Untersuchungen zum Oligomerisierungsstatus des ApoD

Einige Proteine aus der Familie der Lipocaline liegen natürlicherweise in oligomerer Form vor (Übersicht in Åkerstrom *et al.*, 2000a). Der Oligomerisierungsstatus des nativen ApoD ist nicht geklärt und dürfte von dem Gewebe, aus dem ApoD isoliert wird, abhängen. In der Fachliteratur liegen dazu widersprüchliche Angaben vor. So berichtet Lea (1988) von einem ApoD-Trimer, welches aus Brustkrebszysten-Flüssigkeit isoliert worden war. Balbín *et al.* (1990) schlossen aufgrund von Gelpermeationschromatographie-Experimenten bei aus gleicher Quelle gewonnenem ApoD auf eine tetramere Struktur. Um den Oligomerisierungsstatus des rekombinanten ApoD zu bestimmen, wurden Experimente mittels Gelpermeationschromatographie und analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt.

Unter milden Bedingungen sollten sich bei einer Gelpermeationschromatographie die Monomere eines eventuell vorliegenden Oligomers nicht voneinander trennen. Für die Messungen wurde mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigtes und gegen den verwendeten Laufpuffer dialysiertes Protein verwendet. Die mit einer Säule des Typs Superdex 75 durchgeführten Chromatographien (Laufpuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5) zeigten eine Tendenz des ApoD zur Aggregation, was sich durch die Elution eines geringeren Teils des aufgetragenen Proteins im Bereich des Totvolumens der Säule äußerte. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß das rekombinante ApoD – im Gegensatz zum rekombinanten BBP – nicht im für Monomere erwarteten Molekularbereich eluierte, aber auch nicht im Größenbereich von Oligomeren erschien. Dagegen verblieb das Protein fast vollständig auf der Säule. Unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumchlorid) ließ sich das adsorbierte ApoD anschließend von der Säule waschen und mittels *Western Blotting* über das *Strep*-tag II bei einer apparenten Molmasse von 24 kDa nachweisen.

Zur Verbesserung des Elutionsverhaltens des ApoD wurde der Einfluß der Pufferbedingungen untersucht. Um eventuelle hydrophobe Interaktionen von ApoD-Molekülen mit dem Säulenmaterial zu unterdrücken, wurden Versuche mit Laufpuffern veränderter pH-Werte (pH 6,5 bis 8,5), hoher, mittlerer und reduzierter Ionenstärke (0 M bis 1 M NaCl oder 1 M Betain) sowie in Gegenwart eines organischen Lösungsmittels (10 % v/v Ethylenglykol in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5) durchgeführt. Um eine mögliche Wechselwirkung des bakteriell hergestellten und deshalb nicht glykosylierten ApoD mit den Zuckerresten der Säulenmatrix zu kompetitieren, wurden Chromatographieversuche auch in Gegenwart von 1 M Glucose (in 50 mM Natriumphosphat, pH 7,5) durchgeführt. Außerdem wurde ein Laufpuffer, der 100 µM Progesteron enthielt, zur Chromatographie eingesetzt. Dieses vom rekombinanten ApoD komplexierte Steroid (siehe Abschnitt 3.2.5.2) sollte zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des ApoD während des Trennvorgangs dienen und dadurch eine eventuell vorhandene Tendenz zur Aggregation oder Adsorption unterdrücken.

Die beschriebenen Variationen der Chromatographiebedingungen führten jedoch nicht zu einer Elution des ApoD von der Säule. Um eine spezielle Wechselwirkung des ApoD zu dem verwendeten Säulenmaterial auszuschließen, wurden andere Trennmaterialien auf ihre Eignung zur Größenbestimmung des ApoD untersucht. Doch weder durch die Verwendung von Silika-basierten (Typ SW, Tosohaas) noch von Polymer-basierten (Typ PW, Tosohaas) Gelpermeations-Säulenmaterialien konnte die Elution des rekombinanten ApoD im nativen Zustand erreicht werden. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche ließen keine Aussage über den Oligomerisierungsstatus des rekombinanten ApoD zu, sondern deuteten auf ein ausgeprägtes Adsorptionsverhalten des nicht glykosylierten Proteins hin.

Alternativ wurde versucht, den Oligomerisierungsstatus des rekombinanten ApoD mittels analytischer Ultrazentrifugation zu bestimmen. Die Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes wurde für 48 h bei einer Temperatur von 4 °C bei 288000 g verfolgt, wobei die Messung freundlicherweise von Dr. G. Richter (TU München) mit einer Ultrazentrifuge des Typs Optima XL-1 (Beckman Instruments, München) durchgeführt wurde. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wiesen darauf hin, daß das Protein über die Dauer des Zentrifugationslaufes aggregierte, obwohl dem verwendeten Puffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7,5) der Ligand Progesteron (10 µM) zur Stabilisierung der Tertiärstruktur des Proteins zugesetzt worden war. Eine Bestimmung des Oligomerisierungsstatus war deshalb mittels dieser Methode ebenfalls nicht möglich.

3.2.5 Liganden-Bindungsstudien

Die biochemische Funktionalität des gentechnisch in *E. coli* hergestellten ApoD wurde in Liganden-Bindungsstudien analysiert, die in Lösung mit Hilfe der Fluoreszenztitration erfolgten. Das Verfahren beruhte in diesem Fall auf der Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Proteins infolge der Komplexbildung (siehe Abschnitt 2.4.1).

Zunächst wurden die optimalen Wellenlängen zur Anregung und Emission der Fluoreszenz des ApoD für die Messungen bestimmt. Dazu wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum des ApoD gemessen (Anregungswellenlänge 280 nm, Meßbereich 290 nm bis 400 nm). Das Maximum der Fluoreszenzintensität lag bei 340 nm. Die Messung eines Anregungsspektrums im Bereich von 250 nm bis 330 nm bei einer Detektionswellenlänge von 340 nm ergab ein Maximum der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm. Um vorzugsweise die Fluoreszenz der fünf Tryptophanreste des rekombinanten ApoD anzuregen, von denen nach der hypothetischen Struktur (Peitsch & Boguski, 1990) dieses Lipocalins zwei in der Bindungstasche und damit in direktem Kontakt zum gebundenen Liganden liegen sollten, wurde für die Bindungsstudien eine Anregungswellenlänge von 295 nm gewählt.

Überraschenderweise wurde in Vorexperimenten eine zeitabhängige Abnahme der Proteinfluoreszenz des ApoD festgestellt. Dieses Verhalten ließ sich auf eine Tendenz des ApoD zur Adsorption auf Glasoberflächen zurückführen, da der beschriebene Effekt durch die Verwendung einer Quarzglasküvette mit vollständig polierten Oberflächen wirkungsvoll eingeschränkt werden konnte. Wurde die Proteinlösung außerdem mit 0,01 % w/v Gelatine versetzt, so blieb die Proteinfluoreszenz über die typische Dauer (30 min) einer Fluoreszenzmeßreihe im wesentlichen konstant. Gelatine ist denaturiertes Kollagen und dementsprechend weitestgehend frei von aromatischen, fluoreszierenden Aminosäuren.

3.2.5.1 Effekte organischer Lösungsmittel auf die Fluoreszenzeigenschaften

Bei Versuchen zur Ermittlung der Liganden-Bindungseigenschaften des rekombinanten ApoD wurde ein signifikanter Einfluß der zur Solubilisierung der Liganden verwendeten organischen Lösungsmittel auf die Fluoreszenzemission des Proteins festgestellt. In der Biochemie übliche Lösungsmittel wie Ethanol, Dioxan, Acetonitril oder Dimethylformamid führten zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Proteinfluoreszenz bei 340 nm nach Anregung bei 295 nm. Dieser ungewöhnliche Effekt wurde genauer untersucht. Eine Konzentration von 1 % v/v der unterschiedlichen organischen Lösungsmittel führte bei einer 1 μ M Lösung von ApoD jeweils zu einer Abnahme von etwa 5 % (Ethanol 4,7 %, Dioxan 5,2 %, Acetonitril 5,3 %, DMF 6,1 %) der Fluoreszenzintensität (Abbildung 11).

Interessanterweise wurde die Fluoreszenzintensität des strukturell verwandten, rekombinanten BBP durch diese Lösungsmittel nicht nennenswert beeinflusst. Um auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Phänomen um einen von den Lösungsmitteln hervorgerufenen inneren Filtereffekt handelt, wurde eine Lösung von N-Acetyl-L-tryptophanamid mit den gleichen Lösungsmitteln titriert. Dabei konnte im Gegensatz zu den Messungen, die mit dem ApoD durchgeführt worden waren, sogar eine leichte Zunahme der Fluoreszenz festgestellt werden (ohne Abbildung). Die Verminderung der Fluoreszenzintensität des ApoD muß demnach auf eine Interaktion der Lösungsmittel mit dem rekombinanten ApoD zurückzuführen sein. Da das ApoD ein Protein mit exponierten hydrophoben Regionen ist, zu denen möglicherweise sogar spektroskopisch aktive Tryptophanreste gehören, kann eine direkte Wechselwirkung der organischen Lösungsmittel mit diesen Resten die beobachteten Effekte erklären. Weiterhin können die Lösungsmittel zu geringen Strukturänderungen des Proteins führen, die eine Veränderung der molekularen Umgebung begrabener Tryptophanreste hervorrufen und so eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des ApoD bewirken.

Die Fluoreszenzemission des ApoD wurde besonders stark von Aceton beeinträchtigt. Eine Konzentration schon von 1 % v/v Aceton führte zu einem dramatischen Absinken der Proteinfluoreszenz auf 10 % des Ausgangswertes (ohne Abbildung). Fluoreszenzemissionsspektren von ApoD bei verschiedenen Acetonkonzentrationen zeigten, daß die Abnahme der Fluores-

zenzintensität nicht mit einer Verschiebung des Maximums einherging. Gleichzeitig konnte eine Zunahme der Emission bei 430 nm beobachtet werden. Eine analoge Veränderung der Fluoreszenzemission in Gegenwart von Aceton wurde auch bei dem rekombinanten BBP sowie bei der Modellverbindung N-Acetyl-L-tryptophanamid beobachtet. Es handelte sich demnach um einen speziellen Effekt dieses Lösungsmittels, offenbar unabhängig von den Eigenschaften des ApoD. Fujimori (1960) beobachtete bei Lösungen der Aminosäure Tryptophan bereits ähnliche Effekte in Gegenwart von Aceton.

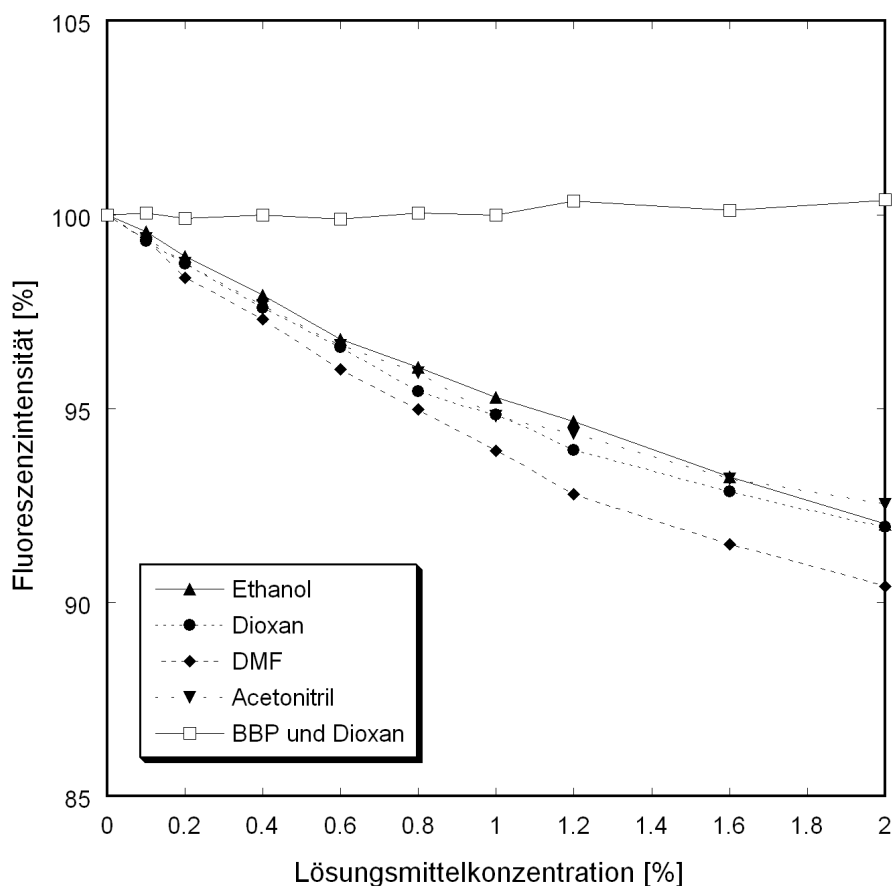


Abbildung 11. Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf die Fluoreszenz des ApoD. Zur Messung wurde eine Proteinlösung (1 μ M; Natriumphosphatpuffer, pH 7,5) mit zunehmender Menge des Lösungsmittels versetzt und die Veränderung der Fluoreszenzemission (Emissionswellenlänge: 340 nm) nach Anregung bei 295 nm aufgezeichnet. Die gemessenen Intensitäten wurden skaliert und sind in Prozent des Anfangswertes angegeben.

3.2.5.2 Quantifizierung der Affinität zu potentiellen Liganden

Frühere Untersuchungen mit dem aus natürlichen Quellen gewonnenen ApoD ließen den Schluß zu, daß eine biochemische Funktion des ApoD in der Komplexierung verschiedener Liganden zu bestehen scheint. Unter diesen Liganden, deren Affinität zu ApoD bereits in mehreren Bindungsstudien getestet worden war (Dilley *et al.*, 1990; Lea, 1988), fanden sich

die strukturell verwandten Steroide Progesteron, Testosteron und Pregnenolon. Außerdem war eine Bindung von Arachidonsäure nachgewiesen worden (Morais Cabral *et al.*, 1995).

Aufgrund theoretischer Überlegungen wurde zudem vorgeschlagen, daß ApoD Bilirubin komplexiert (Peitsch & Boguski, 1990). Zeng *et al.* (1996) identifizierten ApoD im menschlichen Achselschweiß und isolierten es aus dieser Drüsenflüssigkeit zusammen mit dem Geruchsmolekül *E*-3-Methyl-2-hexensäure (*E*-3M2H). Die genannten Verbindungen (Abbildung 12) wurden deshalb hier auf eine Bindung an das rekombinante ApoD untersucht.

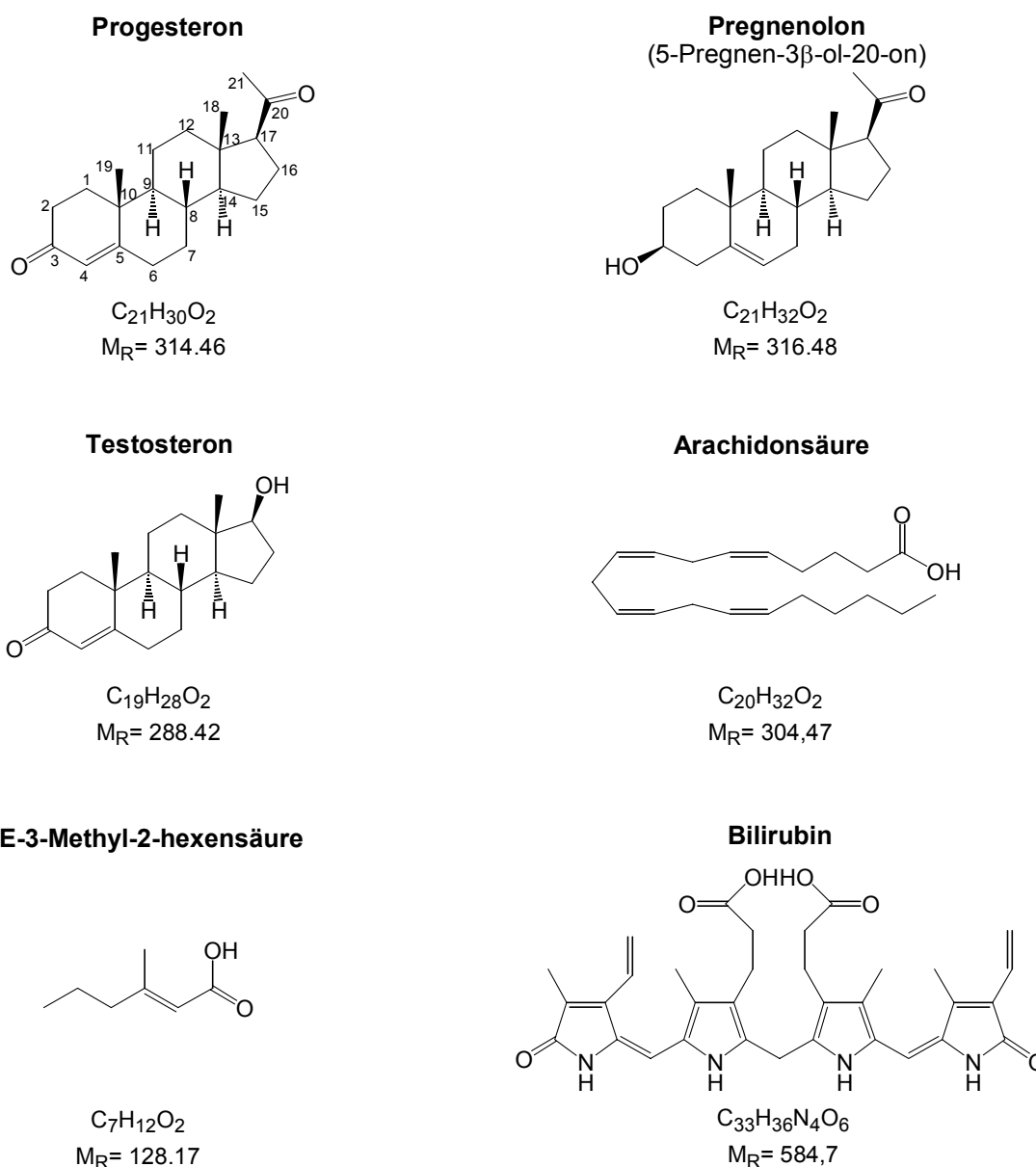


Abbildung 12. Chemische Strukturen, Summenformeln und Molmassen der auf Bindung zu ApoD untersuchten Verbindungen.

Da die Komplexierung von Progesteron durch ApoD in mehreren unabhängigen Studien beschrieben worden war, wurde zunächst das Bindungsverhalten des ApoD gegenüber diesem

Steroid untersucht. Bei dem Titrationsexperiment wurde eine deutliche Fluoreszenzlöschung durch den Liganden festgestellt (Abbildung 13), ohne daß sich dabei das Maximum der Fluoreszenzemission des ApoD veränderte.

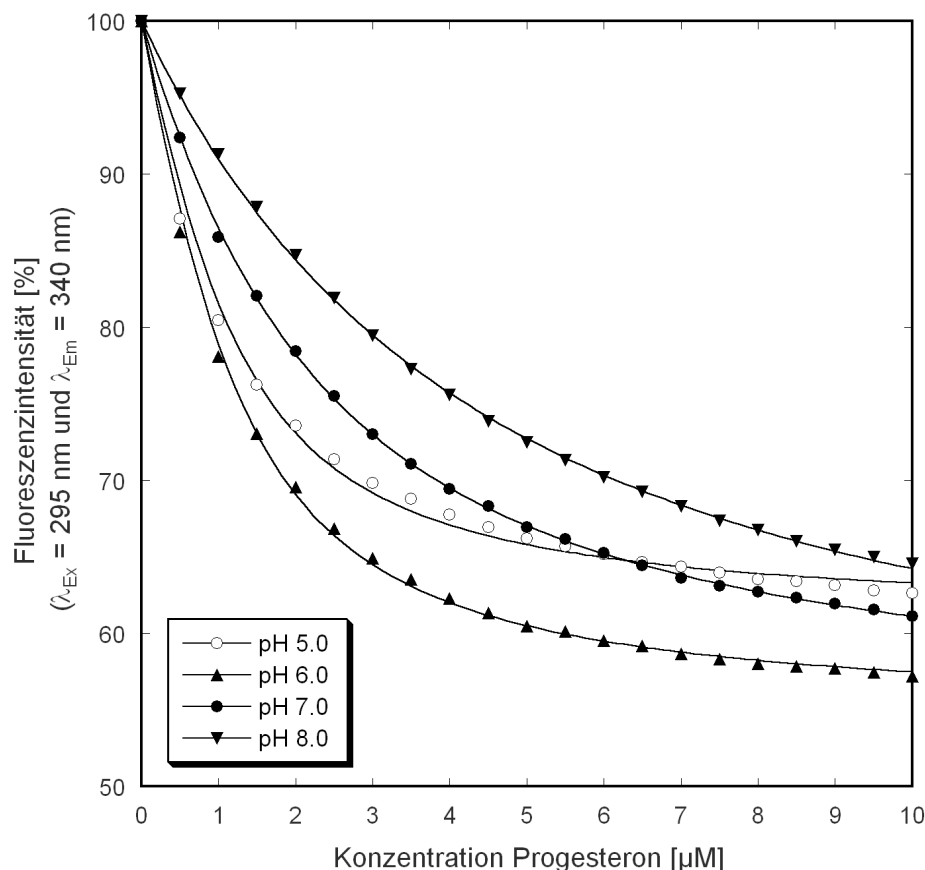


Abbildung 13. Fluoreszenztitration des ApoD mit Progesteron bei verschiedenen pH-Werten. Das in *E. coli* JM83/pApoD5 produzierte Protein wurde mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die 1 µM Proteinlösung wurde vorgelegt und mit zunehmender Menge einer Stammlösung in 10 % v/v Dioxan des Steroidliganden Progesteron versetzt. Die Proteinfluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und bei 340 nm gemessen. Die Meßwerte wurden um den Einfluß des Lösungsmittels korrigiert, auf einen Ausgangswert von 100 % skaliert und mittels nichtlinearer Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepaßt (siehe Abschnitt 2.4.1). Die Messungen wurden in einem Puffersystem aus 10 mM Natriumcitrat und 10 mM NaPi mit 100 mM Natriumchlorid und 1 mM EDTA bei pH 8,0, pH 7,0, pH 6,0 und pH 5,0 durchgeführt.

Zudem wurde deutliche pH-Abhängigkeit der Affinität festgestellt, die mit einer Zunahme der molaren Fluoreszenz des Protein-Ligandenkomplexes zu sauren pH-Werten einherging. So betrug bei pH 8,0 die Lösungsaffinität 50 %, bei pH 7,0 46 %, bei pH 6,0 45 % und bei pH 5,0 nur noch 39 %, bezogen auf den Anfangswert. Gleichzeitig war aber die Affinität von ApoD und Progesteron bei sauren pH-Werten stärker, was sich in den für die unterschiedlichen Pufferbedingungen ermittelten Komplex-Dissoziationskonstanten äußerte (Tabelle 1).

Mit den Steroidverbindungen Pregnenolon und Testosteron wurden analoge Titrationsexperimente durchgeführt, wohingegen jedoch keine Lösungsaffinität der Proteinfluoreszenz detektiert werden konnte (Abbildung 15). Auch für den Geruchsstoff E-3M2H wurde in

entsprechenden Experimenten kein Einfluß auf die Fluoreszenz festgestellt. Die Titration mit Bilirubin führte zwar zu einer Abnahme der ApoD-Fluoreszenz, ein Vergleichsexperiment mit N-Acetyl-L-tryptophanamid anstelle von ApoD ergab aber, daß die Reduktion der Proteinfluoreszenz bei zunehmender Bilirubin-Konzentration allein auf den inneren Filtereffekt dieser Verbindung zurückzuführen war. Die Verbindungen Arachidonsäure, *E*-3M2H, Pregnenolon, Progesteron und Testosteron, die auf Bindung zum rekombinanten ApoD überprüft wurden, zeigten keinen inneren Filtereffekt.

Zur Untersuchung der Komplexieigenschaften des ApoD bezüglich der Arachidonsäure wurde zunächst ein Absorptionsspektrum dieser Verbindung in Ethanol aufgenommen (Abbildung 14). Anhand des Spektrums wurden die in der Literatur nicht beschriebenen Extinktionskoeffizienten zu $\epsilon_{237} = 1290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{276} = 458 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt, so daß mit deren Hilfe die Konzentration der Ligandenlösung in der geeigneten Verdünnung exakt eingestellt werden konnte.

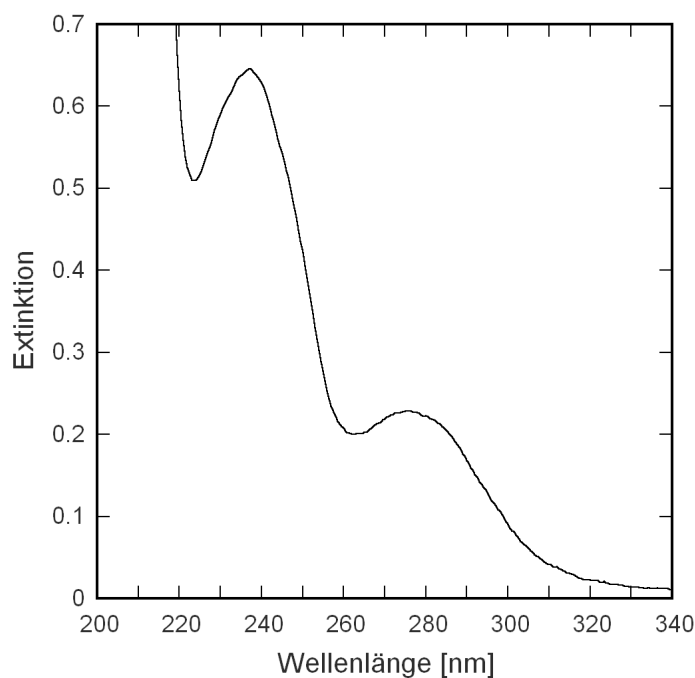


Abbildung 14. Absorptionsspektrum von Arachidonsäure. Das Spektrum wurde bei einer Arachidonsäure-Konzentration von 0,5 mM in Ethanol gemessen und um die Extinktion von Ethanol korrigiert. Aus den Extinktionsmaxima wurden die Extinktionskoeffizienten zu $\epsilon_{237} = 1290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{276} = 458 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.

In anschließenden Titrationsexperimenten mit dem rekombinanten ApoD und Arachidonsäure wurde eine deutliche Wechselwirkung festgestellt. Der in diesem Fall gemessene Fluoreszenz-Löschungseffekt (Abbildung 15) war allerdings geringer als beim Liganden Progesteron (siehe Tabelle 1).

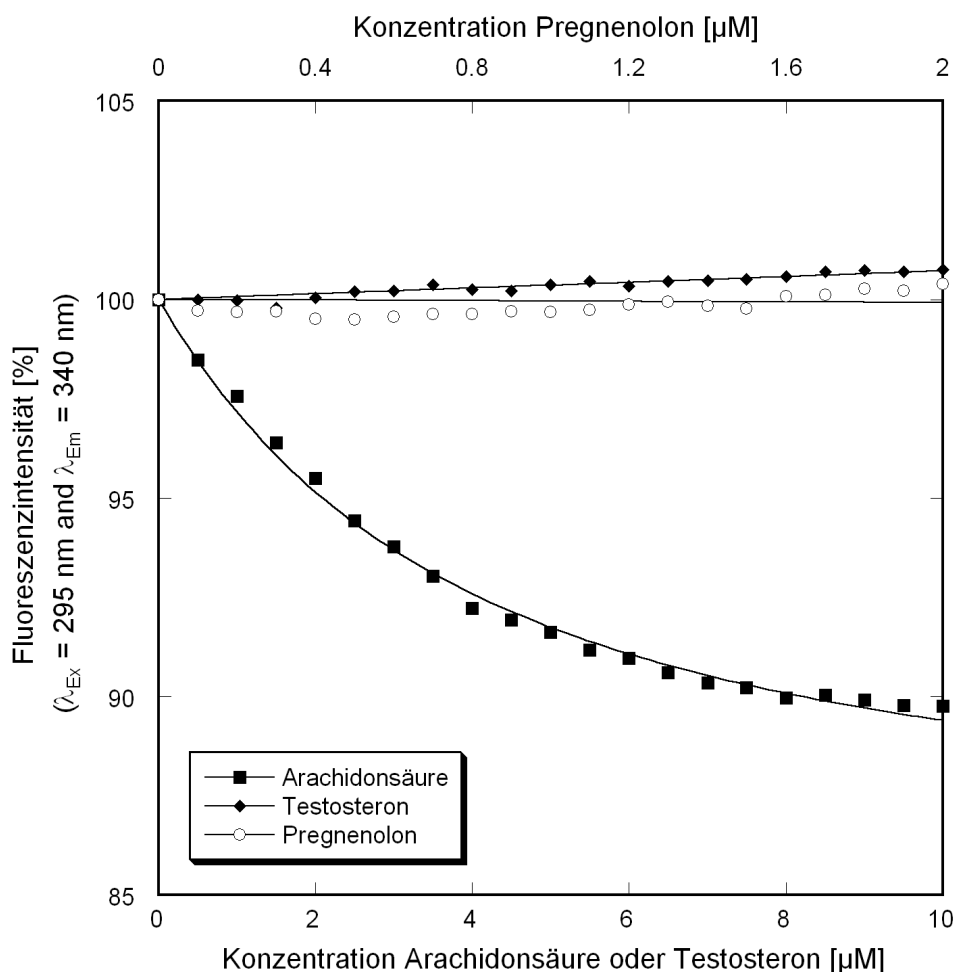


Abbildung 15. Fluoreszenztitration des rekombinanten ApoD mit Arachidonsäure, hier im Vergleich mit Testosteron sowie Pregnenolon. Eine 1 µM ApoD-Lösung (50 mM NaPi mit 1 mM EDTA, pH 7,5; im Falle der Messung mit Arachidonsäure 10 mM Natriumcitrat, 10 mM NaPi mit 100 mM NaCl, pH 6,0) wurde mit Stammlösungen in 10 % Dioxan (Pregnenolon, Testosteron) beziehungsweise 10 % Ethanol (Arachidonsäure) der Verbindungen titriert und die bei 295 nm angeregte Fluoreszenzemission bei 340 nm gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden korrigiert, skaliert und mittels nichtlinearer Regression angepaßt (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

Die Komplex-Dissoziationskonstante wurde bei pH 6,0 zu 3 µM bestimmt. Bei höheren pH-Werten zeigte die gemessene Bindungsisotherme einen zunehmend sigmoidalen Verlauf und konnte deshalb nicht unter der Annahme bimolekularer Komplexbildung ausgewertet werden. Dieses Verhalten ist möglicherweise durch Micellbildung der im neutralen beziehungsweise alkalischen Milieu deprotonierten Arachidonsäure zu erklären. Die in der Literatur beschriebene kritische Micellbildungskonstante der amphipathischen Verbindung liegt mit 68 µM (bei 50 mM NaPi, pH 7,8; Yokoyama *et al.*, 1993) allerdings oberhalb des zur Affinitätsbestimmung untersuchten Konzentrationsbereichs.

Zwei verschiedene Kontrollexperimente wurden zur genaueren Untersuchung der Komplexeigenschaften des ApoD durchgeführt. Um zu prüfen, ob das Fehlen einer Fluoreszenzlöschung des ApoD bei Titration mit Pregnenolon, Testosteron, Bilirubin sowie E-3M2H

tatsächlich auf nicht vorhandene Affinität zurückzuführen ist oder eventuell auf einem fehlenden spektroskopischen Effekt dieser Substanzen auf die Fluoreszenz der Tryptophanreste beruht, wurde ApoD zunächst mit Progesteron komplexiert, was zu einer ausgeprägten Fluoreszenzabnahme führt (siehe oben). Anschließend wurde der Komplex mit Lösungen der genannten Verbindungen titriert. Im Fall der Konkurrenz sollte Progesteron aus der Bindungstasche des ApoD verdrängt werden und die beobachtete Fluoreszenzemission daher ansteigen. Keine der untersuchten Verbindungen bewirkte jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich (maximale Konzentrationen: Pregnenolon 2 μM , Testosteron 10 μM , Bilirubin 10 μM , *E*-3M2H 100 μM) eine nennenswerte Zunahme der beobachteten Fluoreszenzintensität. Erwartungsgemäß führte die Titration des Komplexes von ApoD und Progesteron mit dem Liganden Arachidonsäure, der die Fluoreszenz des ApoD in geringerem Ausmaß als Progesteron löscht, dagegen zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz (ohne Abbildung).

Um zusätzlich auszuschließen, daß die im Vergleich zu den anderen untersuchten Verbindungen deutlich kleinere Verbindung *E*-3M2H zwar Affinität zu ApoD besitzt, aber nicht in der selben Bindungstasche wie Progesteron komplexiert wird, wurden Verdrängungsexperimente mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) durchgeführt. ANS besitzt eine allgemeine Affinität zu hydrophoben Regionen von Proteinen und verändert bei der Bindung reversibel seine spektroskopischen Eigenschaften. Dabei verschiebt sich das Emissionsmaximum der bei 370 nm angeregten Fluoreszenz des ANS von 512 nm zu 470 nm (Cardamone & Puri, 1992). Diese Änderung der Fluoreszenzeigenschaften konnte bei Zugabe des ANS zu einer ApoD-Lösung spektroskopisch verfolgt werden. Wurde der gebildete Komplex aus ANS und ApoD anschließend mit *E*-3M2H titriert, so wurde bis zu einer Konzentration von 100 μM nur eine geringfügige Änderung der Fluoreszenz des ApoD-ANS-Komplexes festgestellt. Die analoge Titration mit Progesteron zeigte hingegen den erwarteten Konkurrenzeffekt (Abbildung 16).

Die durchgeführten Analysen zeigen, daß das rekombinante ApoD den Steroidliganden Progesteron mit einer Komplex-Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich bindet. Die erhaltenen Meßwerte stimmen mit früheren Bindungsstudien, die mit ApoD aus natürlichen Quellen durchgeführt wurden, gut überein (Dilley *et al.*, 1990; Lea, 1988). Das strukturell verwandte Steroid Testosteron wird dagegen von dem rekombinanten ApoD nicht erkannt, ebensowenig wie das als Ligand diskutierte Steroid Pregnenolon. Arachidonsäure, deren Affinität zu dem aus Brustkrebszysten-Flüssigkeit isolierten ApoD – wenn auch mit größerem Wert (Morais Cabral *et al.*, 1995) – bereits gezeigt worden war, wird von dem rekombinanten ApoD meßbar komplexiert. Dies belegt zumindest im Prinzip die biochemische Bindungsfunktion des rekombinanten ApoD und bestätigt damit dessen native Faltung.

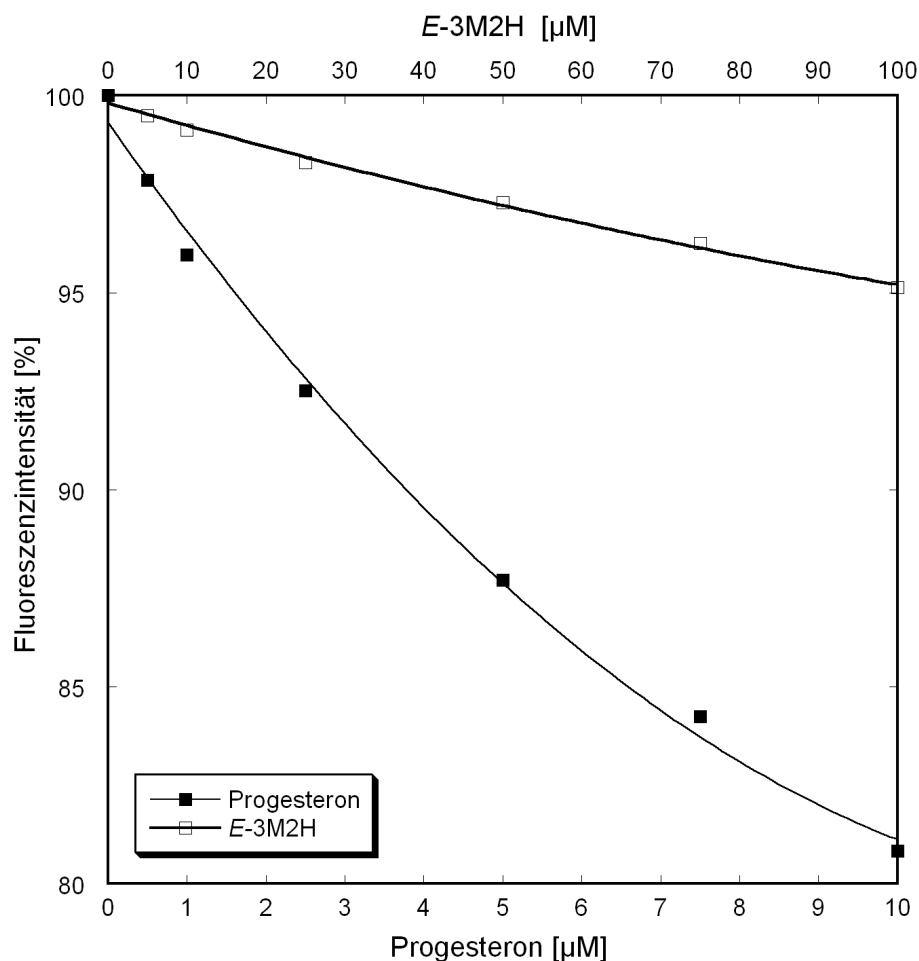


Abbildung 16. Kompetitive Titration des ApoD in Gegenwart von ANS. Eine 1 µM ApoD-Lösung (50 mM NaPi, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde zunächst durch Zugabe von 20 µM 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) komplexiert. Anschließend wurde mit *E*-3M2H bzw. Progesteron titriert und die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften von ANS bei 470 nm nach Anregung bei 370 nm verfolgt.

Ligand	$K_D / \mu\text{M}$	f_{PL} in % von f_{P}	pH
Progesteron	$0,60 \pm 0,04$	61	5,0
Progesteron	$0,62 \pm 0,02$	55	6,0
Progesteron	$1,71 \pm 0,02$	54	7,0
Progesteron	$3,76 \pm 0,07$	50	8,0
Pregnenolon	n. b.	n. b.	7,5
Testosteron	n. b.	n. b.	7,5
<i>E</i> -3M2H	n. b.	n. b.	7,5
Arachidonsäure	$3,25 \pm 0,22$	86	6,0
Bilirubin	n. b.	n. b.	8,0

Tabelle 1. Mittels Fluoreszenztitration ermittelte Dissoziationskonstanten (K_D) der Komplexbildung von rekombinantem ApoD mit verschiedenen Liganden. Angegeben sind außerdem die ermittelte molare Fluoreszenz des Protein-Ligandenkomplexes (f_{PL}) in % der molaren Proteinfluoreszenz (f_{P}) sowie der pH-Wert, bei dem die Messung durchgeführt wurde. Die genauen Meßbedingungen sind in Abschnitt 2.4.1 angegeben. Nicht bestimmbare Werte sind mit „n. b.“ bezeichnet.

3.3 Versuche zur Verbesserung der proteinchemischen Eigenschaften des ApoD

Das humane ApoD ließ sich in *E. coli* produzieren und in löslicher Form isolieren. Die vorangegangenen Untersuchungen ließen den Schluß zu, daß das korrekt prozessierte ApoD das Faltungsmuster eines Lipocalins besitzt. Die biochemische Funktionalität des rekombinanten ApoD konnte zumindest für zwei Liganden nachgewiesen werden. Dennoch verhielt sich das rekombinante ApoD bezüglich einiger Kriterien anders, als dies frühere Erfahrungen mit anderen gentechnisch hergestellten Lipocalinen (RBP: Müller & Skerra, 1993; BBP: Schmidt & Skerra, 1994) erwarten ließen.

Während die Ausbeute bei der bakteriellen Produktion des RBP und dessen untersuchter Mutanten zwischen 300 und 900 $\mu\text{g/l}_{\text{Kulturmedium}}$ lag (Schmidt, 1998) und bei der Herstellung des BBP und dessen Mutanten Ausbeuten von bis zu 2,8 $\text{mg/l}_{\text{Kulturmedium}}$ erreicht wurden (Beste, 1998), lieferte die Produktion des ApoD nur vergleichsweise geringe Mengen von 220 $\mu\text{g/l}_{\text{Kulturmedium}}$. Eine Tendenz zur Adsorption auf Glasoberflächen, wie sie beim ApoD auftrat, war bei RBP und BBP nicht beobachtet worden, ebensowenig wie bei diesen Proteinen eine Beeinflussung der Proteinfluoreszenz durch die organischen Lösungsmittel Ethanol, Dioxan, Acetonitril und DMF (siehe Abschnitt 3.2.5.1) festgestellt werden konnte. Die auffälligste Eigenschaft des rekombinanten ApoD war jedoch, daß sich das Protein nicht mittels Gelpermeationschromatographie reinigen oder analysieren ließ, da es – sofern nicht unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet wurde – auf den unterschiedlichen verwendeten Säulen haften blieb (siehe Abschnitt 3.2.4).

Genauere Betrachtung der von Peitsch & Boguski (1990) vorhergesagten dreidimensionalen Struktur des ApoD führte zu der Hypothese, daß eine Häufung hydrophober Aminosäurereste auf der Oberfläche des β -Barrels für die beschriebenen proteinchemischen Auffälligkeiten dieses Lipocalins verantwortlich sein könnte. Der Rest Cys116 des aus dem Serum isolierten ApoD bildet eine intermolekulare Disulfidbindung mit Cys6 des ApoA-II und damit einen kovalenten Komplex mit dem HDL-Partikel aus (Yang *et al.*, 1994). In der dreidimensionalen Struktur des ApoD liegt die Aminosäure Cys116 auf dem β -Strang G des Lipocalins (Abbildung 17). Dessen Seitenkette ist dem Lösungsmittel zugewandt und befindet sich inmitten eines durch zahlreiche unpolare Aminosäurereste gebildeten hydrophoben Bereichs.

In räumlicher Nachbarschaft befinden sich die Seitenketten der Aminosäuren Ile117, Ile118, Leu5, Leu85, Leu101, Leu110, Leu120, Phe3, Phe89, Phe92, Phe121, Phe125, Val87, Val111 und Val123. Auffälligerweise befindet sich der Rest Asn78, der neben Asn45 eine der zwei Positionen des ApoD darstellt, an dem N-Glykosylierung beobachtet wurde (Schindler *et al.*, 1995), auf der selben Hemisphäre des Proteins wie die hydrophobe Oberflächenregion. Das gleiche gilt für den Tryptophanrest Trp99, der ebenso wie Trp91 nach dem Strukturmodell außergewöhnlich exponiert angeordnet ist. Eine besondere Rolle spielen die Reste Trp99,

Leu101 sowie Ile118 und Leu120 (siehe Abbildung 17), wie mittlerweile gezeigt werden konnte (A. Nasreen, M. Vogt & A. Skerra, in Vorbereitung; siehe Abschnitt 4.3).

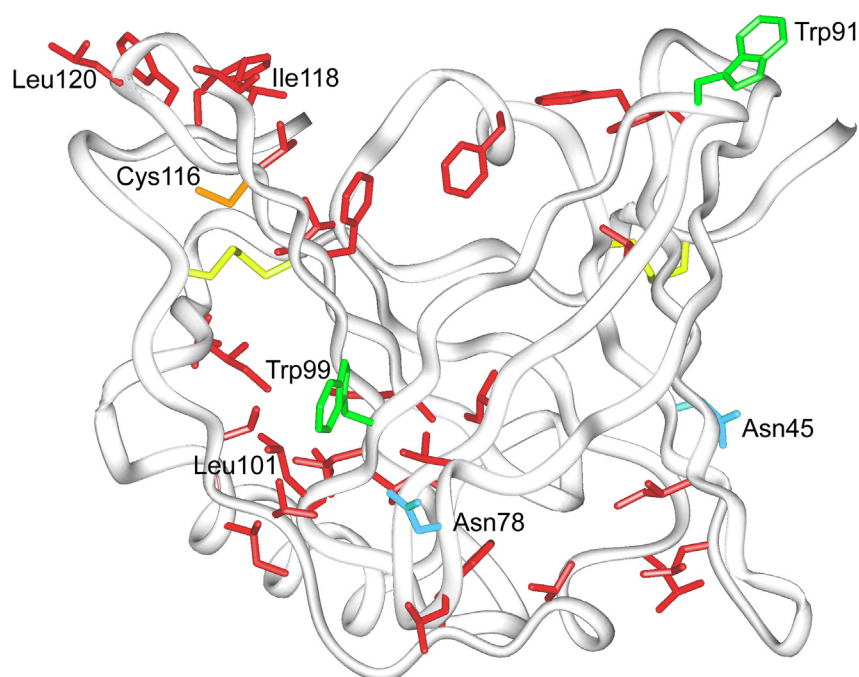


Abbildung 17. Ausschnitt aus der hypothetischen Struktur des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990). In dem Molekül mit dem als Band dargestellten Peptidrückgrat sind ausgewählte hydrophobe Reste Isoleucin, Leucin, Phenylalanin sowie Valin (rot) dargestellt. Weiterhin sind die Reste Asn45, Asn78 (blau), an denen das native Molekül glykosyliert ist, die exponierten Reste Trp91, Trp99 (jeweils grün), die beiden Disulfidbrücken (gelb) sowie Cys116 (orange) eingezeichnet. Die Reste Trp99, Leu101, Ile118 und Leu120 spielen für das proteinchemische Verhalten des ApoD eine besondere Rolle, wie mittlerweile gezeigt werden konnte (A. Nasreen, M. Vogt & A. Skerra, in Vorbereitung). Die Graphik wurde mit Hilfe der Software „Insight II“ erstellt.

Die hydrophobe Oberflächenregion könnte die Assoziation des ApoD mit dem HDL-Partikel im humanen Serum bewirken. Dabei könnte das ApoD entweder mit der Lipid-Phase interagieren, oder an das ApoA-II binden, indem diese beiden Proteine zunächst mittels hydrophober Kontakte wechselwirken. Eine solche Annäherung sollte dann die kovalente Verknüpfung der beiden Apolipoproteine zum experimentell nachgewiesenen Heterodimer ermöglichen. Bei dem gentechnisch hergestellten ApoD war Cys116 gegen Ser substituiert worden (siehe Abschnitt 3.1.2), womit die Entstehung von Disulfidisomeren vermieden werden konnte. Durch das Fehlen des natürlichen Interaktionspartners ApoA-II ist die ausgedehnte hydrophobe Region des ApoD jedoch dem Solvent exponiert, was ein gewisses unspezifisches Bindungsverhalten erklären könnte. Ein vergleichbarer Effekt konnte bei F_{vh} -Fragmenten beobachtet werden. Dabei konnte die schlechte Löslichkeit der Moleküle mit durch das Fehlen der leichten Kette solvensexponierten hydrophoben Bereichen erklärt werden. Folgerichtig führten Punktmutationen im wechselwirkenden Bereich zu verbesserten biophysikalischen Eigenschaften dieser Immunglobulin-Fragmente (Glockshuber *et al.*, 1990; Davies & Riechmann, 1995). Eine eventuell stattfindende Abschirmung der hydrophoben

Bereiche durch die Oligosaccharid-Seitenketten des natürlicherweise glykosylierten ApoD kann bei dem rekombinanten Protein nicht geschehen, da das in *E. coli* produzierte Protein diese posttranslationale Modifikation nicht aufweist.

Um die proteinchemische Handhabbarkeit des rekombinanten ApoD zu vereinfachen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Bibliothek von ApoD-Varianten hergestellt, bei denen zufällige punktuelle Aminosäuremutationen eingeführt worden waren. Mittels eines Selektionssystems wurden anschließend Varianten identifiziert, die im Vergleich zum Ausgangsprotein eine veränderte Genexpression und Löslichkeit aufweisen. Im dazu eingesetzten *Colony Screening*-Verfahren wurden Kolonien, die Varianten mit in diesem Sinne verbesserten Eigenschaften sekretierten, über ein intensiveres Farbsignal ermittelt.

3.3.1 Einführung von zufälligen Mutationen

Um ApoD-Varianten mit statistisch über die gesamte Länge des Proteins verteilten Punktmutationen herzustellen, wurde die Methode der fehlererzeugenden (*Error Prone*) PCR (Leung *et al.*, 1989; Casson & Manser, 1995) eingesetzt. Unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide askD20 und PR-1 wurde das gesamte Strukturgen des ApoD einschließlich des für die *OmpA*-Signalsequenz kodierenden Bereichs unter Bedingungen, die zu Basenfehlpaarungen führten und deshalb zufällige Mutationen in den Amplifikaten hervorriefen, vervielfältigt. Als DNA-Matrize wurde der Vektor pApoD10 eingesetzt, der dem Vektor pApoD5 (siehe Abschnitt 3.1.2) bis auf zwei *Bst*XI-Schnittstellen im Strukturgen des ApoD entspricht. Diese Schnittstellen waren mittels Einzelstrangmutagenese unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide askD27 und askD28 eingeführt worden, um die einfache Subklonierung der ApoD-Genkassette von Mutanten, die im Verlauf eines Anreicherungsverfahrens gewonnen werden sollten (siehe Abschnitt 3.4.1), zu ermöglichen. Der Vektor pApoD10 (Übersicht siehe Abschnitt 8.1) kodiert für ein Fusionsprotein aus *OmpA*-Signalpeptid, ApoD und *Strep*-tag II mit den durch die Einführung der Schnittstellen bedingten Mutationen Leu23Pro, Pro133Val und Asn134Ala.

Durch *Error Prone*-PCR wurde ein einheitliches DNA-Produkt der erwarteten Größe von 641 bp erhalten, welches mittels der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Bst*BI auf dem für das *Colony Screening*-Verfahren geeigneten Vektor pApoD12 kloniert wurde.

3.3.2 Expressionsanalyse im *Colony Screening*-Verfahren

Zur parallelen Durchmusterung der ApoD-Mutanten wurde das *Colony Screening*-Verfahren (Skerra *et al.*, 1991) angewandt. Dazu wurde der Vektor pApoD12 konstruiert, der für ein Fusionsprotein aus *OmpA*-Signalpeptid, ApoD, dem *Strep*-tag II, einer kurzen Verbindungs-

sequenz (Pro-Ser-Ala) und einer bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) kodiert. Diese aus 46 Aminosäuren bestehende große Domäne des Protein G aus *Streptococcus* G148 (Åkerstrom *et al.*, 1987; Olsson *et al.*, 1987) besitzt Bindungsaffinität zu humanem Serum-Albumin (HSA) und ermöglicht die funktionelle Immobilisierung von Fusionsproteinen auf mit HSA beschichteten Oberflächen (König & Skerra, 1998).

Zur Konstruktion des Vektors pApoD12 wurde das Plasmid pBBP22 (Schlehuber, 2001), das bereits zur Durchmusterung komplexer BBP-Bibliotheken mit Hilfe des *Colony Screening*-Verfahrens entwickelt worden war, mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Bst*XI hydrolysiert und das entstandene große Fragment (3252 bp) isoliert. Durch analogen Verdau des Vektors pApoD10 wurde ein Fragment (610 bp) präpariert, welches das Strukturgen des ApoD umfaßte. Durch Ligierung der beiden Fragmente wurde der Vektor pApoD12 (Abbildung 18) erhalten. Zur Klonierung der Zufallsvarianten wurde pApoD12 mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Bst*XI geschnitten und das große Fragment (3252 bp) isoliert. Das mittels fehlererzeugender PCR synthetisierte ApoD-Gen wurde zur Erzeugung kompatibler Schnittstellen mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysiert und das entstandene Fragment von 610 bp Länge mit dem Vektorfragment ligiert.

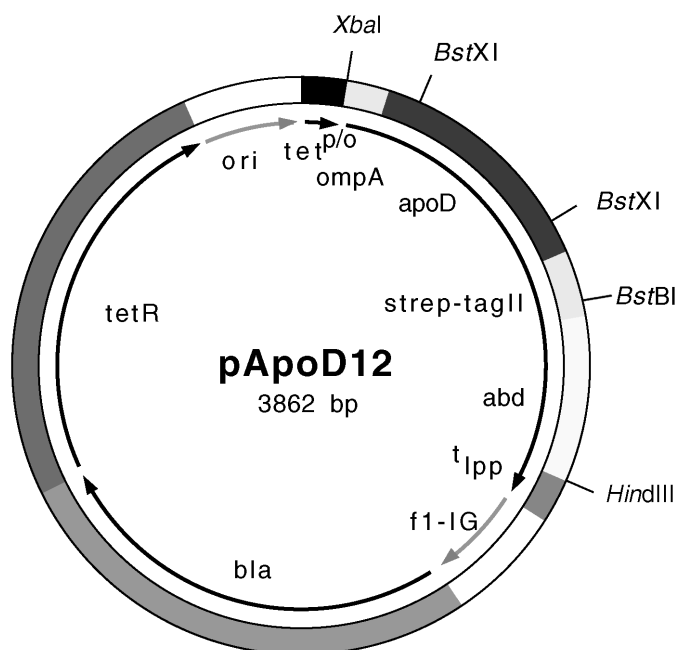


Abbildung 18. Schematische Darstellung des Vektors pApoD12. Das Plasmid kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotors ($tet^{p/o}$) für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, dem ApoD, dem *Strep*-tag II und der ABD. Zur Selektion auf transformierte Zellen trägt der Vektor das Gen für die β -Lactamase (bla). Alle weiteren genetischen Merkmale entsprechen denen von pApoD2 (siehe Abbildung 6).

Für die Untersuchung von Varianten wurde der *Amber*-Suppressorstamm *E. coli* TG1-F gewählt, damit Varianten, die ein durch die Mutagenese entstandenes internes *Amber*-Stoppkodon (TAG) trugen, dennoch als funktionelle Fusionsproteine mit der ABD produziert

wurden. Nach Transformation von TG1-F⁻ mit dem Ligierungsansatz wurde die Zellsuspension auf einer hydrophilen Membran ausplattiert, was zur Entstehung von etwa 500 Kolonien führte. Nach Induktion der rekombinanten Genexpression wurde das Fusionsprotein sekretiert und partiell von den entstandenen Bakterienkolonien freigesetzt (Abbildung 19A).

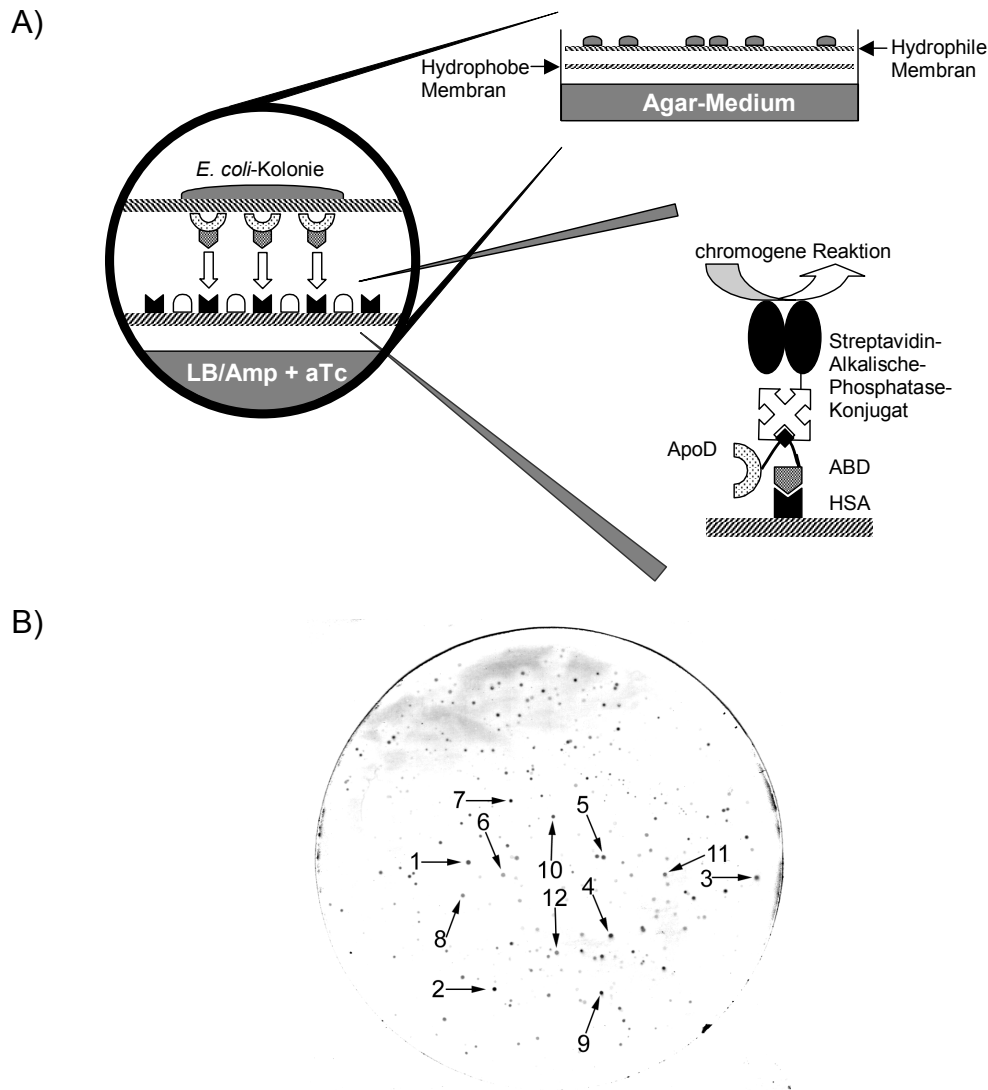


Abbildung 19. A) Schema des *Colony Screening*-Assays zur Identifizierung von Varianten des ApoD mit verbesserten Expressions-Eigenschaften in *E. coli*. Nach Transformation von TG1-F⁻ mit dem Ligierungsansatz der ApoD-Mutanten auf dem Vektor pApoD12 wurden die Kolonien auf einer hydrophilen Membran auf Selektivmedium bei 37 °C kultiviert, bis sie eine Größe von ca. 0,5 mm erreicht hatten. Die Membran wurde danach auf eine hydrophobe, zuvor mit HSA beschichtete Membran gelegt, die ihrerseits auf einer aTc-haltigen LB/Amp-Agarplatte plaziert war. Dadurch wurde die Genexpression der ApoD-Varianten induziert. Während fünfzehnstündiger Inkubation diffundierte das synthetisierte Fusionsprotein aus ApoD, Strep-tag II und ABD durch die hydrophile Membran und wurde durch Komplexbildung mit HSA auf der hydrophoben Membran funktionell immobilisiert. Diese Membran wurde entnommen und die Varianten anhand des Strep-tag II mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Reaktion detektiert. Die gebildeten Farbsignale konnten einzelnen Kolonien auf der hydrophilen Membran zugeordnet werden. B) Ergebnis des *Colony Screening*-Assays zur Selektion von ApoD-Varianten mit erhöhter Ausbeute bei der bakteriellen Sekretion. Die Abbildung zeigt die Membran, die nach Inkubation mit Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat und chromogener Reaktion erhalten wurde. Die Pfeile verweisen auf Farbsignale, die von den zur Analyse ausgewählten Kolonien EP1 bis EP12 erzeugt worden waren.

Die sekretierten Fusionsproteine wurden anhand der ABD auf einer zweiten Membran immobilisiert, die vorher mit HSA beschichtet worden war. Kolonien, die lösliches ApoD sekretierten, wurden über ihr *Strep*-tag II mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat auf dieser zweiten Membran detektiert. Die dabei auf der Membran erhaltenen Farbsignale unterschieden sich in Morphologie und Intensität. Zwölf Kolonien, die besonders deutliche Signale hervorriefen (siehe Abbildung 19B), wurden ausgewählt (EP1 bis EP12) und einer Analyse unterzogen.

3.3.3 DNA-Analyse selektierter Mutanten

Die DNA-Analyse der Varianten EP1 bis EP12 ergab, daß die fehlererzeugende PCR bei allen selektierten Varianten zu einer überschaubaren Anzahl von Mutationen über den gesamten Bereich von OmpA-Signalsequenz und ApoD-Strukturgen einschließlich des C-terminalen *Strep*-tag II geführt hatte. Jede Variante trug im Vergleich zum ApoD-Wildtypgen zwischen 4 und 16 Basensubstitutionen, woraus zwischen 3 und 14 Aminosäuresubstitutionen beziehungsweise Stoppkodons resultierten (siehe Abbildung 20). Von den zwölf ausgewählten Varianten kodierten zwei (EP6, EP12) für Proteine, deren Translation durch entstandene *Amber*-Stoppkodons partiell terminiert wurde, und drei (EP2, EP4, EP8) für Proteine, die je einen zusätzlichen Cysteinrest trugen. Bei letzteren war davon auszugehen, daß es bei der Proteinproduktion zur Bildung von Disulfidisomeren kommt. Bei der Variante EP7 war das Kodon für die Translationsinitiation (ATG) gegen GTG substituiert. Die Analyse der restlichen sechs, offensichtlich vollständig funktionellen Varianten (EP1, EP3, EP5, EP9, EP10, EP11) ergab, daß einige Aminosäurepositionen des ApoD in unterschiedlichen Varianten durch jeweils den gleichen Aminosäurerest substituiert waren. Dabei handelte es sich um die Positionen Asn16 (ausgetauscht gegen Asp in EP5 und EP11), Lys53 (Glu in EP9 und EP12) und Leu129 (Ser in EP1 und EP5).

3.3.4 Herstellung und Charakterisierung der Mutanten

3.3.4.1 Produktion in *E. coli*

Die selektierten Varianten EP1, EP3, EP5, EP9, EP10 und EP11, die weder *Amber*-Stoppkodons noch neue Cysteinreste aufwiesen, wurden in *E. coli* unter Verwendung von Expressionsplasmiden vom Typ pApoD10 produziert. Dazu wurde jeweils das kodierende Gen mittels *Xba*I und *Bst*BI aus dem Plasmid des Typs pApoD12 ausgeschnitten (610 bp) und mit dem großen Fragment (2906 bp) des analog geschnittenen Vektors pApoD10 ligiert. Mit dem Ligierungsansatz wurden Zellen des Stamms *E. coli* JM83 transformiert.

	XbaI	OmpA:		-1 +1		10	
121	AGATAACGAGGGCAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCGATTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCAAGCATTTCATCTTGGGAAGTGCCCAATCCTCCGGTG					240	
ApoD:	ArgEndArgGlyGlnLysMetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaGlnAlaPheHisLeuGlyLysCysProAsnProProVal						
EP1:G.....C.....	Val		Leu			
EP2:C.....	Gly		Leu			
EP3:T.....	Val					
EP4:C.....	Ala		Leu			
EP5:						
EP6:						
EP7:G.....	Val		Gly	Pro	Asn	
EP8:C.....			Ala		Arg	
EP9:G.....	Gln	ThrLeu				
EP10:G.....		Val	Leu		Gln	
EP11:						
EP12:G.....C.....T.....				Gln	His	Amb
241	CAGGAGAATTTGACGTGAATAAGTATCCAGGAAGATGGTAACGAAATGAGAAGATCCCAACAACCTTTGAGAATGGACGCTGCATCCAGGCCAACTACTACTAATGGAAAACGGAAAG					360	
ApoD:	GlnGluAsnPheAspValAsnLysTyrProGlyArgTrpTyrGluIleGluLysIleProThrThrPheGluAsnGlyArgCysIleGlnAlaAsnTyrSerLeuMetGluAsnGlyLys						
EP1:C.....			Ser			
EP2:						
EP3:						
EP4:G.....G.....			Thr			
EP5:G.....	Asp	Arg	Lys			
EP6:						
EP7:						
EP8:						
EP9:G.....	Pro			Arg		
EP10:					Glu	
EP11:G.....C.....	Asp		AlaPhe			
EP12:A.....			His		Glu	
361	ATCAAAGTGTAAACAGGAGTTGAGAGCTGATGGAACTGTGAATCAAATCGAAGGTGAAGCCACCCAGTTAACCTCACAGAGCCTGCCAAGCTGGAAGTTAAGTTTTCCTGGTTTATG					480	
ApoD:	IleLysValLeuAsnGlnGluLeuArgAlaAspGlyThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThrGluProAlaLysLeuGluValLysPheSerTrpPheMet						
EP1:						
EP2:G.....T.....	Arg		Leu			
EP3:C.....	Leu	Pro	Gly		Gly	
EP4:T.....	Asn		Arg	Gly	Ala	Thr
EP5:						
EP6:G.....T.....			GluVal			
EP7:G.....C.....		Asp	Gly		Thr	
EP8:		Pro				
EP9:G.....					Gly	
EP10:G.....	Arg		Arg			
EP11:C.....C.....	Leu	Asp	Val			
EP12:G.....G.....	Asp		Gly	Gly		
481	CCATCGGCACCCCTAGTTCCTGGCCACCGACTATGAGAAGTATGCCCTCGTATTCCTGTACTAGLATAATCCCACTTTTTCACGTGGATTGCTTGGATTTGGCCAGAAACCTG					600	
ApoD:	ProSerAlaProTyrTrpIleLeuAlaThrAspTyrGluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerIleIleGlnLeuPheHisValAspPheAlaTrpIleIleAlaArgAsnVal						
EP1:C.....					Ser	
EP2:C.....C.....G.....		Arg	His		Gly	
EP3:C.....	Pro		Asn			
EP4:A.....		Ser		Leu	Asp	Ser
EP5:G.....	Ala					
EP6:G.....G.....G.....A.....	Ala	Val	AmbGly	AmbAla		Ser
EP7:				Arg		
EP8:C.....					Leu	
EP9:C.....C.....		Ala		Thr		
EP10:G.....		Gly		Pro		
EP11:G.....A.....T.....	Pro		Ala		Arg	
EP12:			Ala			

	140	150	160	170
601	GCTCTCCCTOCAGAAACAGTGGACTCTCTAAAAAATATCCTGACTTCTAATAACATTGATGTCAGAAAATGACGGTCACAGACCAGGTGAAGTCCCAAGTCAGCGCTGGTCTCAC 720			
ApoD:	<u>AlaLeuProProGluThrValAspSerLeuLysAsnIleLeuThrSerAsnAsnIleAspValLysLysMetThrValThrAspGlnVal</u> <u>Asp</u> CysProLysLeuSerAlaTrpSerHis			
EP1:			
EP2:			
EP3:			
EP4:			
EP5:			
EP6:			
EP7:			
EP8:			
EP9:			
EP10:			
EP11:			
EP12:			

Abbildung 20. DNA- und korrespondierende Aminosäuresequenzen der selektierten ApoD-Varianten EP1 bis EP12 aus der mittels fehlererzeugender PCR hergestellten Bibliothek. Abgebildet ist ein Bereich aus der Sequenz des Vektors pApoD10, der an der *Xba*I-Schnittstelle (TCTAGA, unterstrichene Basen; siehe Abbildung 18) beginnt, das gesamte Strukturgen des ApoD umfaßt und bis in das Affinitätsanhängsel *Strep*-tag II hineinreicht. In den Gensequenzen der ApoD-Varianten sind nur diejenigen Basen und Aminosäuren angegeben, die sich von der Sequenz des rekombinanten Wildtyp-ApoD unterscheiden. Unterbrochen unterstrichen dargestellt sind jene Aminosäurepositionen, an denen eine stille Basensubstitution aufgetreten war. Aminosäurepositionen, bei denen es in mehreren Varianten zu derselben Substitution kam, sind invers dargestellt. Die ersten Aminosäuren des Affinitätsanhängsels *Strep*-tag II, in dem sich auch die zur Klonierung verwendete *Bst*BI-Schnittstelle befindet (TTCGAA, siehe Abbildung 18), sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Die bakterielle Produktion der Varianten erfolgte wie in Abschnitt 2.2.11.1 beschrieben. Die ApoD-Varianten wurden in *E. coli* als Fusion mit dem OmpA-Signalpeptid sowie dem *Strep*-tag II produziert. Aus der periplasmatischen Zellfraktion konnten alle prozessierten Varianten mit Hilfe dieses Affinitätsanhängsels wie zuvor im Einschnitt-Reinigungsverfahren isoliert werden (siehe Tabelle 2). Dabei traten bei der Reinigung der ApoD-Varianten EP1, EP5, EP9 und EP10 in den Elutionsfraktionen keine Verunreinigungen (siehe Abbildung 21) auf. Geringfügige Kontaminationen mit Wirtsproteinen wurden dagegen in den Elutionsfraktionen von EP3 und EP11 nachgewiesen. Die gelelektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE entsprach bei allen Varianten der des Wildtyp-ApoD.

Die erzielten Ausbeuten der gereinigten Varianten wurden anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei zeigte sich, daß von den untersuchten Varianten zwei mit ähnlicher Ausbeute wie das rekombinante Wildtyp-ApoD gewonnen werden konnten. Bei den Varianten EP3, EP5, EP9 und EP10 war die erzielte Ausbeute jedoch deutlich geringer. Keine der selektierten Varianten wurde in *E. coli* mit höherer Ausbeute als das Wildtyp-ApoD produziert (siehe Tabelle 2).

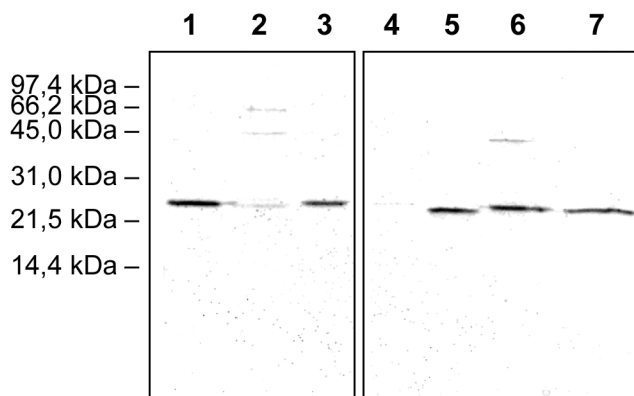


Abbildung 21. Analyse der mittels fehlererzeugender PCR erhaltenen und durch das *Colony Screening*-Verfahren isolierten ApoD-Varianten mit Hilfe der SDS-PAGE. Die Varianten EP1 (Spur 1), EP3 (Spur 2), EP5 (Spur 3), EP9 (Spur 4), EP10 (Spur 5), EP11 (Spur 6) sowie das Wildtyp-ApoD (Spur 7) wurden mit Hilfe von pApoD10 durch Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* JM83 produziert und über ihr *Strep*-tag II mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteinproben wurden in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Variante	AS-Substitutionen	Ausbeute [$\mu\text{g}/\text{l}_{\text{Kultur}}$]	Veränderung [%]
EP1	2	170	-20
EP3	6	70	-70
EP5	9	90	-60
EP9	5	70	-70
EP10	3	120	-45
EP11	7	150	-30
ApoD	-	220	-

Tabelle 2. Ausbeuten der bakteriell hergestellten und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten ApoD-Varianten EP1, EP3, EP5, EP9, EP10 und EP11 bezogen auf einen Liter Kulturmedium. Die Ausbeuten wurden anhand der Absorption bei 280 nm unter Verwendung eines kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten bestimmt. Zum Zeitpunkt der Ernte betrug die Zelldichte jeweils $\text{OD}_{550} = 1,1$. Die Anzahl der Aminosäuresubstitutionen bezieht sich auf das rekombinante Wildtyp ApoD. Weiterhin ist die Veränderung der Ausbeute bezogen auf die bakterielle Produktion des Wildtyp-ApoD angegeben.

3.3.4.2 Bestimmung des Retentionsverhaltens in der Gelpermeationschromatographie

Um zu untersuchen, ob die mittels des *Colony Screening*-Verfahrens isolierten ApoD-Varianten durch die gegenüber dem ApoD-Wildtyp eingeführten Aminosäuresubstitutionen verbesserte Löslichkeit besitzen, wurden Versuche mittels Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Dazu wurden die in *E. coli* produzierten und im Einschnittverfahren mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Varianten des ApoD auf eine Säule des Typs Superdex 75 HR aufgetragen, wobei als Laufpuffer 100 mM Natriumphosphat pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA verwendet wurde. Die untersuchten Varianten EP1, EP3, EP5,

EP9, EP10 und EP11 zeigten das gleiche Verhalten wie der ApoD-Wildtyp und eluierten im nativen Zustand nicht von Säule. Die mittels fehlererzeugender PCR eingeführten Mutationen hatten die Löslichkeit daher nicht positiv beeinflusst.

Insgesamt war festzustellen, daß keine der erhaltenen Varianten im Vergleich zum Wildtyp-ApoD verbesserte proteinchemische Eigenschaften besaß. Durch das eingesetzte Verfahren war es nicht möglich, Varianten zu isolieren, die sich mit höherer Ausbeute als das rekombinante Wildtyp-ApoD herstellen ließen. Auch wies keine der untersuchten Varianten eine verbesserte Löslichkeit auf. Deshalb konnten – trotz der in verschiedenen Varianten aufgetretenen gleichen Mutationen – keine Aminosäurepositionen identifiziert werden, die zu den ungewöhnlichen Eigenschaften des ApoD beitrugen. Offensichtlich war mittels des *Colony Screening*-Verfahrens nicht wie eigentlich beabsichtigt auf eine verbesserte Sekretion der Varianten selektiert worden.

Die durchgeführten Experimente zeigten allerdings gleichzeitig, daß die Lipocalin-Struktur des ApoD stabil genug ist, um zahlreiche Aminosäuresubstitutionen zu tolerieren, da sich entsprechende Varianten des ApoD nach wie vor in löslicher Form in *E. coli* produzieren ließen.

3.4 Etablierung eines Phagemid-Präsentationssystems

Zur Herstellung von Anticalinen auf der Grundlage der Gerüststruktur des humanen ApoD wurde die zur Generierung von Anticalinen auf Basis des BBP (Schmidt, 1995; Beste, 1998; Beste *et al.*, 1999; Schlehuber, 2001) entwickelte Strategie an das ApoD angepaßt. Dazu wurde wiederum eine evolutive Strategie gewählt, indem zunächst Aminosäurepositionen im Bereich der Bindungstasche des ApoD selektiv mutagenisiert wurden. Die entstandene, komplexe Bibliothek wurde dann auf ApoD-Varianten mit Affinität zu vorgegebenen Liganden durchmustert. Zur Anreicherung von bindungsaktiven Varianten sollte das Verfahren des *Phage Display* (Smith, 1985; Übersichten in Wells & Lowman, 1992; Kay *et al.*, 1996; Barbas *et al.*, 2001) eingesetzt werden, weshalb zunächst ein Vektorsystem zu optimieren war, welches die Präsentation von ApoD-Varianten auf der Oberfläche von Phagemiden ermöglichte.

Zur effizienten Durchmusterung der Zufallsbibliothek von ApoD-Varianten mit neuen Liganden-Bindungseigenschaften sollte das Verfahren des monovalenten *Phage Display* (Lowman & Wells, 1991) angewendet werden. Die Präsentation des Fremdproteins auf der Oberfläche von Phagemidpartikeln gelingt, indem durch entsprechende Plasmide, welche die intergenische Region des Phagen fl besitzen und als Phasmide bezeichnet werden, ein Fusionsprotein aus bakteriellem Signalpeptid, Fremdprotein und dem Phagenhüllprotein pIII des Bakteriophagen M13 oder Fragmenten desselben in *E. coli* synthetisiert wird. Dabei bewirkt die Signalsequenz die Translokation des N-Terminus des Fusionsproteins in das Peri-

plasma des Bakteriums. Die pIII-Domäne am C-Terminus des Fusionsproteins durchspannt die innere Membran von *E. coli*, wo auch die Phagenassemblierung stattfindet. Dabei kommt es teilweise zum Einbau des Fusionsproteins neben dem nativen Phagenhüllprotein in die Phagemidpartikel (Barbas *et al.*, 2001).

Grundsätzlich sind zwei unterschiedliche Fusionsstrategien zur monovalenten Präsentation des Fremdproteins auf der Phagemidoberfläche beschrieben worden. Einerseits kann das Fremdprotein mit dem kompletten pIII fusioniert werden. Diese Strategie wurde zunächst bei Antikörperfragmenten erfolgreich eingesetzt (McCafferty *et al.*, 1990; Griffiths *et al.*, 1994). Alternativ läßt sich das Fremdprotein mit C-terminalen Fragmenten des pIII fusionieren. Das aus insgesamt 406 Aminosäureresten bestehende pIII, dessen Kristallstruktur mittlerweile gelöst ist, läßt sich strukturell in drei Domänen unterteilen (Stengele *et al.*, 1990; Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1999). Die aus 66 Aminosäureresten bestehende N-terminale Domäne N1 und die darauffolgende Domäne N2 (Reste 86 bis 216), welche durch eine glycinreiche Region miteinander verbunden sind, vermitteln die Anheftung an die F-Pili des Wirtsbakteriums und sind damit notwendig für die Infektiosität des Phagen (Deng *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne des pIII (Reste 217 bis 406) beginnt mit einer sich über 40 Reste erstreckenden weiteren glycinreichen Region und bewirkt die Verankerung des Proteins in der Phagenhülle. Fremdproteine konnten erfolgreich als Fusion mit einem auf die Aminosäuren 198 bis 406 verkürzten pIII auf der Phagemidoberfläche präsentiert werden (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991). Ein nochmals verkürztes Fragment des pIII ($\Delta\Delta$ pIII, Aminosäuren 217 bis 406) wurde von Beste (1998) zur funktionellen Präsentation des BBP auf der Phagemidoberfläche eingesetzt, wobei diese Verkürzung essentiell war.

3.4.1 Konstruktion von Vektoren

Zur Herstellung von Phagemiden, die das ApoD oder dessen Varianten auf ihrer Oberfläche präsentieren, mußten diese Proteine als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII oder dessen Domänen produziert werden. Dazu wurden ausgehend von dem Vektor pApoD5 eine Reihe von speziellen Plasmiden eingesetzt. Diese Plasmide mußten Erkennungssequenzen für geeignete Restriktionsendonukleasen tragen, um die effiziente Klonierung von Sequenzbibliotheken und die Subklonierung von ApoD-Varianten auf anderen Vektoren zwecks Charakterisierung zu ermöglichen.

3.4.1.1 Einführung von *Bst*XI-Schnittstellen in das ApoD-Gen

Die kombinatorische Komplexität einer Bibliothek von Proteinvarianten hat grundlegenden Einfluß auf die erzielbare Affinität daraus isolierbarer Bindungsproteine (Perelson & Oster, 1979). Vorangegangene Arbeiten hatten gezeigt (Beste, 1998; Schmidt, 1995), daß die

praktisch erreichbare Größe einer Bibliothek entscheidend von der Effizienz der Ligierung zwischen Vektorfragment und dem der Zufallsmutagenese unterworfenen Insert bestimmt wird. Dabei limitiert unter anderem die Bildung von Konkameren des Inserts oder des Vektorfragments die Ligierungseffizienz. Ausgehend von pApoD5 wurde deshalb der Vektor pApoD10 konstruiert, der die Produktion des ApoD mit dem *Strep*-tag II in *E. coli* ermöglichte, dabei aber zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI im Strukturgen des ApoD trägt.

Diese Schnittstellen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide askD27 und askD28 in den Vektor pApoD5 eingeführt (freundlicherweise von I. Theobald durchgeführt) und flankieren jenen Bereich des ApoD, der durch die Zufallsmutagenese (siehe Abschnitt 3.5) mittels PCR verändert werden sollte. Das Restriktionsenzym *Bst*XI erkennt die DNA-Sequenz CCANNNNN'NTGG und schneidet an der mit Strich gekennzeichneten Stelle, wodurch an der hydrolysierten DNA 3'-Überhänge von je vier Basen Länge entstehen. Mit Hilfe von zwei verschiedenen *Bst*XI-Schnittstellen entstandene DNA-Fragmente sind, solange die mit N bezeichneten Basen nicht identisch sind, nicht ligierungsfähig. Die beiden *Bst*XI-Schnittstellen im Vektor pApoD10 waren in diesem Sinne ausgelegt und sollten eine effiziente Ligierung von Vektorfragment mit dem mittels PCR gewonnenen Insert unter Vermeidung der Bildung von Konkameren ermöglichen. Als einzige zu erwartende Nebenprodukte der Ligierungsreaktion sollten alternierende tandemartige Verknüpfungen von Insert und Vektorfragment entstehen können.

Die Insertion der beiden den zu mutagenisierenden Bereich des ApoD-Gens flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen war nur unter gleichzeitiger Einführung von drei Aminosäuresubstitutionen möglich. Dabei handelte es sich um die Mutationen Leu23Pro, Pro133Val und Asn134Ala, von denen die erste nach dem Strukturmodell des ApoD am Aminoterminus des β -Faltblattstrangs A und die beiden anderen im Bereich zwischen Strang H und der darauffolgenden α -Helix liegen.

Um einen eventuellen Einfluß der Aminosäuresubstitutionen auf die Faltung des rekombinanten Proteins zu untersuchen, wurde ApoD mit dem Plasmid pApoD10 in *E. coli* JM83 produziert. Dabei wurde wie bei der Produktion von ApoD mittels pApoD5 in JM83 vorgegangen (siehe Abschnitt 3.1). Das mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Zellfraktion des Bakteriums im Einschnittverfahren isolierte ApoD wurde mittels SDS-PAGE analysiert, wobei das rekombinante Protein als singuläre Bande bei einer apparenten molaren Masse von 24 kDa erschien. Die gelelektrophoretische Mobilität des mit pApoD10 hergestellten ApoD entsprach der des mittels pApoD5 produzierten sowohl unter reduzierenden als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen. Die bei der gentechnischen Produktion erhaltene Ausbeute war für die beiden rekombinanten Proteine nahezu identisch und betrug jeweils ungefähr $220 \mu\text{g/l}_{\text{Kulturmedium}}$.

Weiterhin wurden mit dem Protein Liganden-Bindungsstudien durchgeführt. Dazu wurde das gereinigte ApoD(Pro23,Val133,Ala134) mit dem Steroidliganden Progesteron (siehe Abschnitt 3.2.5.2) titriert und wie zuvor die Fluoreszenzintensität der Tryptophanreste des ApoD verfolgt. Aus den bei pH 8,0 gemessenen Intensitäten konnte mittels nichtlinearer Regression die Komplex-Dissoziationskonstante in guter Übereinstimmung mit den für das unveränderte rekombinante Protein erhaltenen Daten zu $1,61 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$ bestimmt werden. Die eingeführten drei Aminosäuresubstitutionen hatten demzufolge keinen nennenswerten Einfluß auf die Faltung, die Ausbildung der beiden Disulfidbrücken sowie die Komplexierungseigenschaften des ApoD.

3.4.1.2 Vektoren für das *Phage Display*

Um die zur funktionellen Präsentation des ApoD am besten geeignete Strategie zu ermitteln, wurden mehrere Phasmide konstruiert (freundlicherweise durchgeführt von I. Theobald), die jeweils unter Kontrolle des streng regulierten Tetracyclin-Promotors (*tet^D0*; Skerra, 1994) für unterschiedliche Fusionsproteine aus ApoD und Fragmenten des Phagenhüllproteins pIII kodierten. Zur Verminderung der Gendosis des für *E. coli* toxischen Fusionsproteins wurde teilweise ein *Amber*-Stoppkodon zwischen ApoD-Gen und pIII-Fragment eingeführt. Ein solches *Amber*-Stoppkodon wird in *E. coli supE*-Stämmen zu ca. 10 % durch Glutamin ersetzt (Miller, 1992).

Zunächst wurde ein Vektor für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, ApoD mit *Strep*-tag II und dem um N1-N2 verkürzten pIII ($\Delta\Delta\text{pIII}$; Aminosäurereste 217 bis 406) konstruiert. Dazu wurde der Vektor pBBP23 (Beste, 1998), der für das *Phage Display* des BBP entwickelt worden war, mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Bst*BI hydrolysiert und das isolierte Vektorfragment mit dem aus pApoD10 durch Verdau mit *Xba*I und *Bst*BI erhaltenen Fragment (610 bp), welches das ApoD-Strukturgen umfaßte, ligiert, wobei auf das *Strep*-tag II ein *Amber*-Stoppkodon folgte (siehe Abbildung 22; Tabelle 3).

Um die gegenüber der früher verwendeten Ampicillin-Resistenz stringenter Chloramphenicol-Resistenz (siehe Abschnitt 3.1.2) auszunutzen, wurde unter Verwendung der Schnittstellen für *Xba*I und *Hind*III der gesamte für das Fusionsprotein kodierende Bereich präpariert und mit dem durch analoge Hydrolyse des Vektors pASK111 erhaltenen großen Fragment ligiert. Das resultierende Phasmid wurde als pApoD14 bezeichnet (siehe Abbildung 22; Tabelle 3).

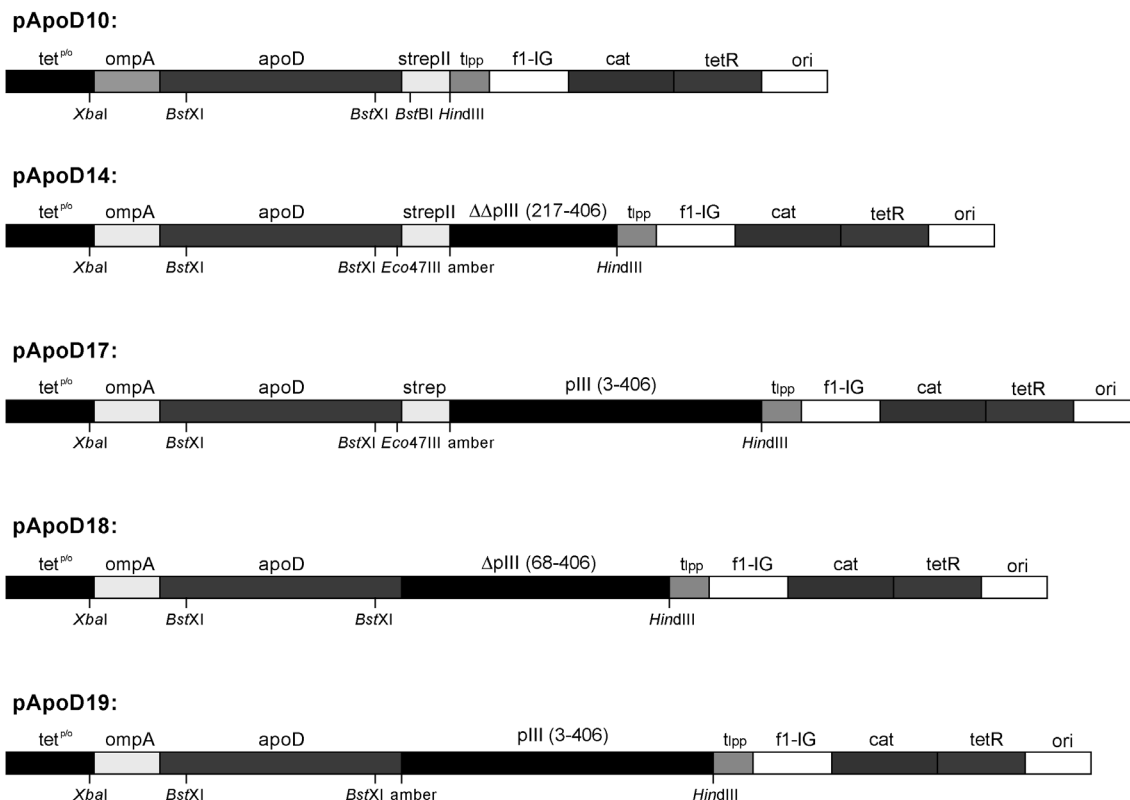


Abbildung 22. Schematische linearisierte Darstellung der für die Präsentation von partiell randomisierten ApoD-Varianten auf Phagemidpartikeln konstruierten Vektoren. Die Phasmide pApoD14, pApoD17, pApoD18 und pApoD19 sind vom Vektor pApoD10 abgeleitet, welcher aus pApoD5 (siehe Abschnitt 3.1.2) durch Einführung zweier *BstXI*-Schnittstellen, die den mutagenisierten Bereich des ApoD-Gens einrahmten, erhalten wurde. Die Expression der Fusionsgene wird auf allen Vektoren durch den *tet*-Promotor (Skerra, 1994) reguliert. Die bakterielle OmpA-Signalsequenz führt zur Translokation des N-terminalen Bereichs des Fusionsproteins aus ApoD und pIII in den periplasmatischen Raum von *E. coli*. Die Translation ist im Falle der Vektoren pApoD14, pApoD17 und pApoD19 durch ein *Amber*-Stoppkodon partiell inhibiert. pIII, ΔpIII sowie ΔΔpIII stehen für die kodierende Sequenz des M13-Phagenhüllproteins III beziehungsweise dessen Fragmente; die entsprechenden Aminosäurereste sind – bezogen auf das vollständige mature pIII – in Klammern angegeben. Die weiteren Elemente entsprechen denen des Vektors pApoD5 (siehe Abbildung 7). Zusätzlich sind die für die Konstruktion der Plasmide bedeutsamen Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

Vektor	Strukturgen	<i>Strep</i> -tag / Linker	Stopp	pIII
pApoD10	OmpA-ApoD(<i>BstXI</i>)	<i>Strep</i> -tag II	-	-
pApoD14	OmpA-ApoD(<i>BstXI</i>)	<i>Strep</i> -tag II	+	ΔΔpIII (217 bis 406)
pApoD17	OmpA-ApoD(<i>BstXI</i>)	<i>Strep</i> -tag	+	pIII (3 bis 406)
pApoD18	OmpA(ΔK12)-ApoD(<i>BstXI</i>)	-	-	ΔpIII (68 bis 406)
pApoD19	OmpA(ΔK12)-ApoD(<i>BstXI</i>)	Ala-Gly-Gly-Ala	+	pIII (3 bis 406)
pBBP30	OmpA-BBP(<i>BstXI</i>)	<i>Strep</i> -tag II	+	ΔΔpIII (217-406)

Tabelle 3. Vektoren zur Präsentation von ApoD-Varianten auf der Oberfläche filamentöser Phagen. Die einzelnen Sequenzen des durch den *tet*-Promotor regulierten Bereiches sind angegeben: Strukturgen, Affinitätsanhängsel, eventuell vorhandene Linker- oder *Amber*-Stoppkodon-Sequenzen (TAG) und der am C-Terminus fusionierte Bereich des pIII. Zum Vergleich ist das Phasmid pBBP30 beschrieben, das bis auf das *cat*-Gen weitgehend dem Vektor pBBP20 entspricht, der für die Phagenpräsentation des BBP (Beste *et al.*, 1999) erfolgreich eingesetzt wurde. Alle angegebenen Vektoren tragen das Gen für die Chloramphenicol-Resistenz (*cat*).

Ausgehend von pApoD14 wurde ein Vektor konstruiert, der für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz, ApoD, *Strep*-tag und dem kompletten pIII (Aminosäuren 3 bis 406) kodierte. Dazu wurde der für das *Strep*-tag, das *Amber*-Stoppkodon sowie das pIII kodierende Bereich aus dem Phasmid pBBP8 (Schmidt, 1995) durch Hydrolyse mit den Restriktionsenzymen *Eco*47III und *Hind*III isoliert und durch Ligierung mit dem aus einem Verdau von pApoD14 mit den Enzymen *Eco*47III und *Hind*III erhaltenen Vektorfragment der Vektor pApoD17 gewonnen (siehe Abbildung 22; Tabelle 3). Durch ortsgerichtete Mutagenese von pApoD17 mittels der Oligodesoxynukleotide askD21 und askD36 wurden der für das *Strep*-tag und das darauffolgende *Amber*-Stoppkodon kodierende Bereich sowie die N1-Domäne des pIII (Aminosäurereste 1 bis 67) deletiert. Gleichzeitig wurde die in der kodierenden Region für die OmpA-Signalsequenz befindliche einzelne K12-Erkennungssequenz (AACNNNNNNGTGC) durch zwei stille Mutationen eliminiert und der Vektor so bezüglich dieses genetischen Restriktionssystems (Übersicht in Murray, 2000) passiviert. Der erhaltene Vektor wurde als pApoD18 bezeichnet und kodierte unter der Kontrolle des *tet*^{p/o} für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, ApoD und dem um N1 verkürzten pIII (Δ pIII; Aminosäuren 68 bis 406).

Das Phasmid pApoD19 wurde schließlich aus pApoD17 durch ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide askD21 und askD37 konstruiert. Dabei wurde das *Strep*-tag – unter Beibehaltung des *Amber*-Stoppkodons – durch das Tetrapeptid Ala-Gly-Gly-Ala substituiert und wiederum die K12-Erkennungssequenz im OmpA-Genabschnitt entfernt. pApoD19 kodierte demnach für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz, ApoD, (Ala-Gly-Gly-Ala) sowie dem kompletten pIII (Aminosäuren 3 bis 406).

3.4.2 Studien zur Präsentation von Fusionsproteinen aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII auf der Oberfläche von Phagemiden

Um die beste Strategie zur Präsentation des ApoD sowie dessen Varianten auf der Oberfläche von Phagemiden zu ermitteln, wurden die unterschiedlichen konstruierten Phasmide (Abschnitt 3.4.1.2) sowohl auf ihre Eigenschaften bezüglich der Produktion des Fusionsproteins als auch der Ausbeute an Phagemiden analysiert. Hierzu wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue verwendet. Dieser *Amber*-Suppressorstamm war in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich zur Herstellung von Phagemiden, die das BBP als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII präsentierten, verwendet worden (Schmidt, 1995; Beste, 1998; Schlehuber, 2001).

Mit den Phasmiden pApoD14, pApoD17, pApoD18 und pApoD19 (siehe Abschnitt 3.4.1.2) jeweils transformierte Bakterienzellen wurden kultiviert und der *tet*-Promotor für 3 h induziert. Zur Untersuchung des Einflusses von Induktorkonzentration und Temperatur auf die Produktion des Fusionsproteins wurden Kulturen mit 0 μ g/l, 25 μ g/l oder 200 μ g/l aTc

induziert und bei 26 °C oder 30 °C kultiviert. Zur Analyse der rekombinanten Translationsprodukte wurde das Gesamtzellprotein präpariert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Fusionsproteine aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII beziehungsweise dessen Fragmenten wurden dann unter Verwendung eines murinen Antikörpers, der gegen das Phagenhüllprotein pIII gerichtet war, sowie eines geeigneten Zweitantikörpers, der mit der Alkalischen Phosphatase konjugiert war, in einer chromogenen Reaktion nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.3.6). Fusionsproteine, die auf den Vektoren pApoD14 oder pApoD17 kodiert waren, wurden zusätzlich anhand des *Strep*-tag-Affinitätsanhängsels mit Hilfe eines Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugats detektiert.

Die Fusionsproteine aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII beziehungsweise dessen Fragmenten konnten nach der Induktion des *tet*^o im Gesamtprotein aller mit den Phasmiden transformierten Zellen mittels des anti-pIII-IgG detektiert werden (Abbildungen 23 und 24). Im Gesamtzellprotein von mit pApoD14 transformierten Bakterien ließ sich das Fusionsprotein mit einer berechneten Molmasse von 39,4 kDa bei einer apparenten Molmasse von ca. 45 kDa sowohl mit dem anti-pIII-IgG als auch über das *Strep*-tag II nachweisen. Anhand des *Strep*-tag II konnte außerdem eine Bande bei einer apparenten Molmasse von 24 kDa detektiert werden. Diese war dem ApoD zuzuordnen und spiegelte den Anteil des Genproduktes wider, bei dem das *Amber*-Stoppkodon nicht supprimiert worden war. Weitere Banden waren wahrscheinlich auf Abbauprodukte zurückzuführen.

In Zellen, die mit dem für ein Fusionsprotein aus ApoD und pIII (Aminosäuren 3 bis 406) kodierenden Phasmid pApoD17 transformiert waren, konnte das Genprodukt im erwarteten Molmassenbereich (apparente Molmasse: ca. 70 kDa, kalkulatorisch: 62,7 kDa) ebenfalls mit beiden immunchemischen Verfahren detektiert werden. Der Vergleich zu den im Falle des pApoD14 erhaltenen Signalen zeigte, daß letztere eine größere Intensität aufwiesen. Dies sprach für eine stärkere Genexpression des auf pApoD14 kodierten Fusionsproteins oder eine höhere Stabilität dieses Genproduktes gegenüber Proteolyse. Interessanterweise waren die durch Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat erhaltenen Färbungen im Falle von pApoD17 verglichen mit den mit pApoD14 erhaltenen schwächer. Dies kann vermutlich durch die früher beobachtete im Vergleich zum *Strep*-Tag höhere Affinität des *Strep*-tag II zu Streptavidin erklärt werden, wenn diese Peptide als interne Affinitätsanhängsel verwendet werden (Schmidt, 1994).

Die Phasmide pApoD18 und pApoD19 führten nach der Induktion des *tet*-Promotors zur Produktion des entsprechenden Fusionsproteins mit einer Molmasse von 54,4 kDa beziehungsweise 61,8 kDa, welche im *Western Blot* bei einer apparenten Molmasse von ca. 64 kDa beziehungsweise 68 kDa sichtbar gemacht werden konnten. Da in diesen Vektoren die für das *Strep*-tag kodierende Sequenz nicht mehr vorhanden war, konnten die Genprodukte nur mit Hilfe des anti-pIII-IgG detektiert werden (Abbildungen 23, 24). Dabei wurde das von

pApoD18 kodierte Genprodukt in größerer Menge produziert, was sich durch deutlich intensivere Farbsignale als bei pApoD19 zeigte. Die Ausbeute des von pApoD18 kodierten Genprodukts war aber geringer als bei pApoD17.

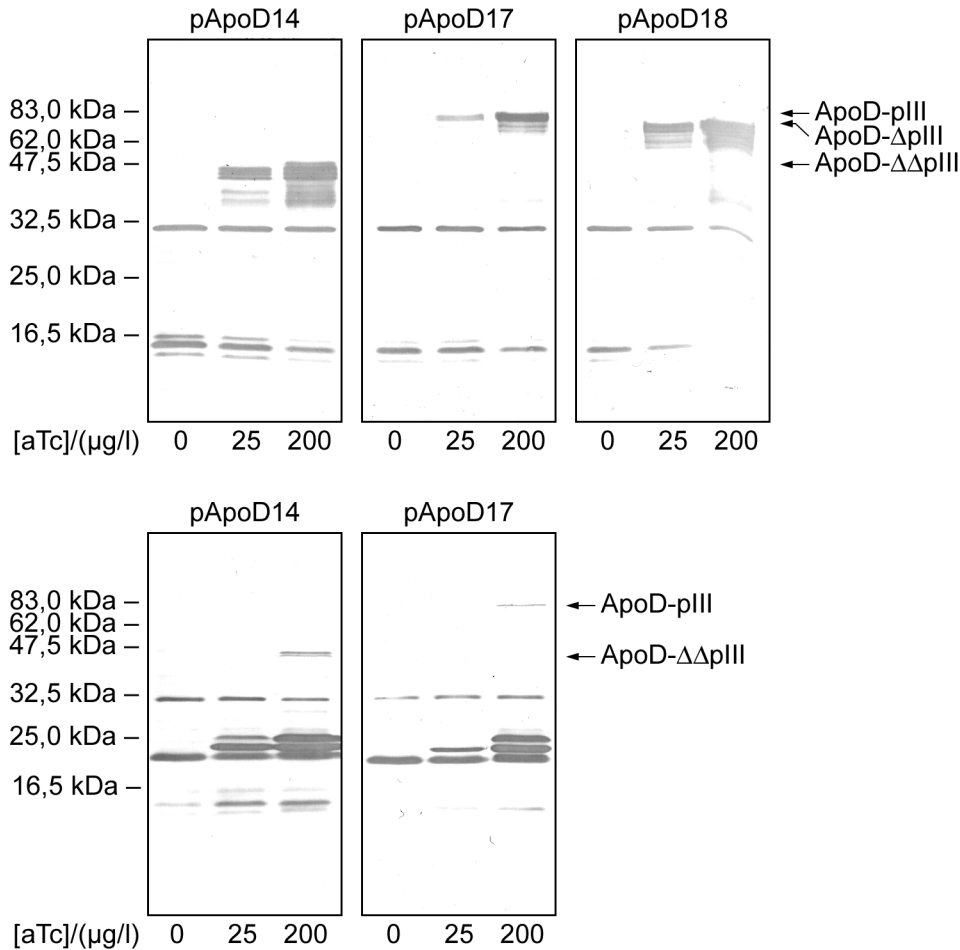


Abbildung 23. Analyse von Expressionsprodukten der Phasmidvektoren pApoD14, pApoD17 und pApoD18 mittels *Western Blot*. Zellen von *E. coli* XL1-Blue wurden mit den entsprechenden Phasmiden transformiert und bei 30 °C kultiviert. Die Genexpression des plasmidkodierten Fusionsproteins wurde für 3 h mit 25 µg/l oder 200 µg/l aTc induziert. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz nicht induziert (0 µg/l aTc). Das Gesamtprotein von Zellen aus je 75 µl Kulturvolumen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Das Fusionsprotein aus ApoD und pIII (Aminosäuren 3 bis 406), ΔpIII (68 bis 406) und ΔΔpIII (217 bis 406) wurde einerseits mit Hilfe eines murinen anti-pIII-IgG und eines anti-Maus-IgG/Alkalische-Phosphatase-Konjugats nachgewiesen (obere Reihe). Im Fall von pApoD14 und pApoD17 wurden die rekombinanten Genprodukte auch anhand des *Strep*-tag II (*Strep*-tag bei pApoD17) mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat detektiert (untere Reihe). Das mittels des anti-pIII-Antikörpers erhaltene Farbsignal war deutlich stärker als das entsprechende mittels des *Strep*-tag II bzw. *Strep*-tag erhaltene, was vermutlich auf den sterisch eingeschränkten Zugang des zwischen den globulären Proteinen ApoD und ΔpIII bzw. pIII gelegenen Affinitätsanhängsels zurückzuführen war.

Die Analyse des Gesamtzellproteins durch *Western Blotting* zeigte bei allen verwendeten Phasmiden Banden im Molmassenbereich kleiner der Masse des Fusionsproteins, die mit dem anti-pIII-IgG reagierten. Diese sind vermutlich auf partiellen proteolytischen Abbau des Fusionsproteins zurückzuführen. Sie traten besonders bei den Phasmiden pApoD14 und pApoD18 auf, welche für das ApoD als Fusion mit ΔΔpIII bzw. ΔpIII kodierten. Das

Fusionsprotein aus ApoD und dem vollständigem pIII – kodiert entweder auf pApoD17 oder pApoD19 – zeigte hingegen weitaus geringere Anzeichen von proteolytischem Angriff, allerdings bei erniedrigter Ausbeute im Fall von pApoD19.

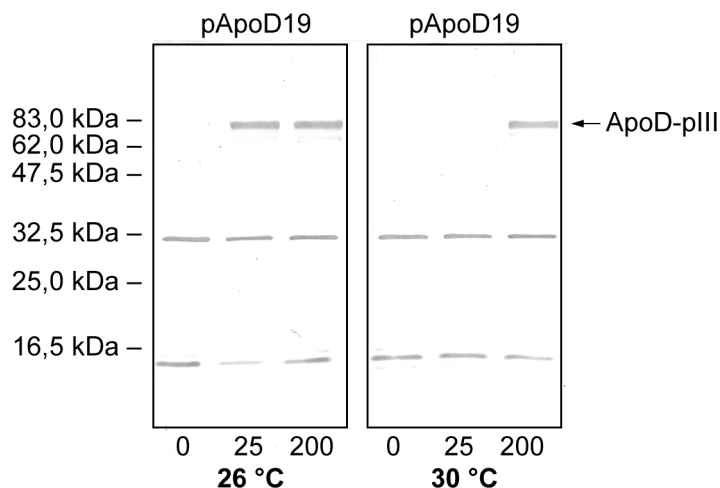


Abbildung 24. Analyse der Expressionsprodukte von pApoD19 mittels *Western Blot*. *E. coli* XL1-Blue wurde mit pApoD19 transformiert und kultiviert. Bei verschiedenen Induktorkonzentrationen (0 µg/l, 25 µg/l, 200 µg/l aTc) wurde für 3 h bei 26 °C beziehungsweise bei 30 °C inkubiert. Die Analyse der Genprodukte erfolgte wie bei Abbildung 23 beschrieben, wobei der Nachweis mit Hilfe des anti-pIII-IgG erfolgte.

Auffälligerweise war bei einer Temperatur von 26 °C und einer Konzentration von 25 µg/l aTc der *tet*-Promotor des Phasmids pApoD19 bereits praktisch vollständig induziert, denn eine Erhöhung der Induktorkonzentration auf 200 µg/l führte nicht zu einem verstärkten Farbsignal im *Western Blot*. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C bei allen Phasmiden die Produktion des Fusionsproteins durch Erhöhung der Konzentration von aTc auf 200 µg/l gesteigert werden (siehe Abbildung 24).

Die strenge Regulierung des *tet*-Promotors (Skerra, 1994) und dessen besondere Eignung zur Produktion zelltoxischer Translationsprodukte aufgrund der geringen Leckrate vor der Induktion zeigte sich in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Schmidt, 1995) in der Beobachtung, daß keines der verwendeten Phasmide in Abwesenheit des Induktors zu einer detektierbaren Produktion des Fusionsproteins führte. Allerdings konnte das unfusionierte ApoD mittels des *Strep*-tag II detektiert werden (Abbildung 23). Ein wachstumshemmender Effekt des Fusionsproteins aus ApoD und pIII oder dessen Fragmenten äußerte sich in einer verlangsamten Zunahme der Zelldichte nach Induktion im Vergleich zu nicht induzierten Kulturen. Besonders deutlich konnte dieser Einfluß bei mit pApoD18 transformierten Zellen festgestellt werden. Dieser Phasmidvektor trägt zwischen den Gensequenzen von ApoD und pIII kein *Amber*-Stoppkodon, wodurch es stets zur Translation des vollständigen Genproduktes kommt.

Nachdem die Produktion eines Fusionsproteins aus ApoD und $\Delta\Delta$ pIII, Δ pIII sowie pIII im Gesamtzellprotein von *E. coli* XL1-Blue nachgewiesen werden konnte, wurde der Einbau des

Proteins in Phagemide analysiert. Dazu wurde unter Verwendung des jeweils transformierten *Amber*-Suppressorstamms *E. coli* XL1-Blue durch Infektion mit dem Helferphagen VCS-M13 Phagemide hergestellt. Zusätzlich wurden mit dem Phasmid pApoD18, in dessen kodierender Sequenz sich zwischen ApoD und Δ pIII kein *Amber*-Stoppkodon befindet, Phagemide in dem *E. coli* Nicht-Suppressorstamm JM83-F' produziert. Zum Vergleich wurden außerdem Phagemide mit dem Phasmidvektor pBBP30 (siehe Tabelle 3) hergestellt. pBBP30 entspricht dem Vektor pBBP20, der zur Präsentation einer Variantenbibliothek des BBP erfolgreich eingesetzt worden war (Beste, 1998), trug aber – wie alle anderen hier untersuchten Phasmide – das *cat*-Gen für die Chloramphenicol-Resistenz.

Die Proteinbestandteile der Phagemide wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach *Western Blotting* mit Hilfe des anti-pIII-IgG immunchemisch analysiert. Bei der Phagemidherstellung wurden nach 7 h Inkubation bei 30 °C und einer Induktorkonzentration von 200 µg/l aTc mit pApoD14, pApoD17, pApoD18 und pApoD19 sowie pBBP30 in XL1-Blue jeweils ca. $1 \cdot 10^{11}$ cfu Phagemide erhalten, mit pApoD18 in JM83-F' dagegen nur $5 \cdot 10^9$ cfu. Dies war vermutlich auf das beobachtete deutlich verlangsamte Wachstum von mit pApoD18 transformierten JM83-F'-Zellen zurückzuführen.

Das Fusionsprotein aus ApoD und Δ pIII, Δ pIII oder pIII konnte in allen Phagemiden, die im Suppressorstamm XL1-Blue produziert worden waren, mit Hilfe des anti-pIII-IgG detektiert werden (Abbildung 25). Dabei wurden die stärksten Signale bei den mittels pApoD17 und pApoD19 hergestellten Phagemiden erhalten, die jeweils ein Fusionsprotein aus ApoD und dem kompletten pIII verpackt hatten.

Interessanterweise enthielten Phagemide, die mit dem Phasmid pApoD18, bei welchem kein *Amber*-Stoppkodon die Biosynthese des ApoD- Δ pIII-Fusionsproteins einschränkte, in XL1-Blue hergestellt worden waren, das Fusionsprotein in ähnlicher Menge wie mit pApoD14, pApoD17 oder pApoD19 hergestellte Phagemide, deren Phasmid ein *Amber*-Stoppkodon im Fusionsgen trug. Dagegen ließ sich in mit pApoD18 im Nicht-Suppressorstamm JM83-F' hergestellten Phagemidpartikeln das Fusionsprotein nicht nachweisen. Demnach bewirkt das Fusionsprotein aus ApoD- Δ pIII in *E. coli* XL1-Blue keinen drastischen toxischen Effekt auf die Zelle, wohl aber auf Zellen des Stamms JM83-F'. Dagegen hatte die Produktion eines BBP- Δ pIII-Proteins, bei dem das Fusionsgen nicht durch ein *Amber*-Stoppkodon getrennt war, in früheren Versuchen zum Absterben von XL1-Blue-Zellen geführt (Stibora, Beste & Skerra, unveröffentlicht).

Ein Vergleich der mit pApoD14 beziehungsweise pBBP30 hergestellten Phagemide, die beide ein Fusionsprotein aus ApoD oder BBP und dem auf die C-terminale Domäne verkürzten Phagenhüllprotein (Δ pIII) enthielten, zeigte, daß das BBP-Fusionsprotein mit signifikant besserer Ausbeute in die Phagemidpartikel eingebaut wurde als ApoD- Δ pIII (siehe Abbildung 25).

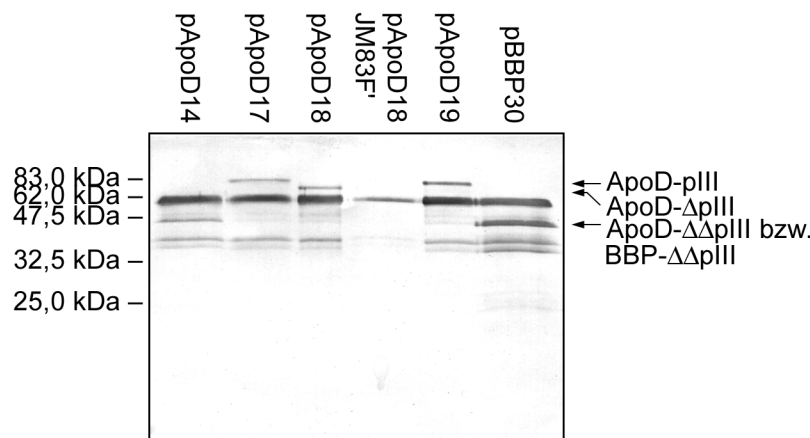


Abbildung 25. Nachweis verschiedener Fusionsproteine aus ApoD und pIII (Aminosäuren 3 – 406), Δ pIII (68 – 408) beziehungsweise $\Delta\Delta$ pIII (217 – 406) in Phagemidpartikeln durch *Western Blot*. Zur Herstellung der Phagemide wurden Zellen von *E. coli* XL1-Blue mit einem der Phasmide pApoD14, pApoD17, pApoD18, pApoD19, pBBP30 beziehungsweise *E. coli* JM83-F' mit pApoD18 transformiert und mit dem Helferphagen VCS-M13 infiziert. Nach Induktion mit aTc (200 μ g/l) wurde für 7 h bei 30 °C inkubiert. Jeweils ca. $1 \cdot 10^{11}$ cfu (pApoD18/JM83-F': $5 \cdot 10^9$ cfu) der isolierten Phagemidpartikel wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Fusionsproteine wurden mittels eines anti-pIII-IgG und eines Zweitantikörpers, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.3.6).

Insgesamt ergaben diese Untersuchungen, daß ein Fusionsprotein aus ApoD und dem $\Delta\Delta$ pIII, Δ pIII oder dem vollständigem pIII im *Amber*-Suppressorstamm *E. coli* XL1-Blue mit Hilfe der konstruierten Phasmide produziert werden kann. Die synthetisierten Proteine wurden in unterschiedlichem Ausmaß proteolytisch angegriffen, wobei sich das Fusionsprotein von ApoD mit dem kompletten pIII in dieser Hinsicht als stabiler erwies als die Konstrukte mit den verkürzten Phagenhüllproteinen. Die Fusionsproteine des ApoD mit dem pIII oder dessen Fragmenten wurden von *E. coli* XL1-Blue in Phagemidpartikel eingebaut, wobei sich das Konstrukt aus ApoD und vollständigem pIII, kodiert durch pApoD19, besonders gut nachweisen ließ. Der Nicht-Suppressorstamm JM83-F' war hingegen unter den untersuchten Induktionsbedingungen weniger geeignet, um mit Hilfe des Phasmids pApoD18 ApoD-präsentierende Phagemide zu produzieren.

Zur Präsentation des ApoD als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII auf der Oberfläche von Phagemiden wurde der Vektor pApoD19 ausgewählt, weil dieser sowohl bei der Produktion des Fusionsproteins als auch bei dessen Einbau und der Herstellung der ApoD-präsentierenden Phagemide vergleichsweise die besten Ausbeuten ergab.

3.4.3 *Phage Display* mit dem Phasmidvektor pApoD19

Die Funktionsweise des monovalenten *Phage Display* mit Hilfe des Phasmids pApoD19 wird in Abbildung 26 erläutert.

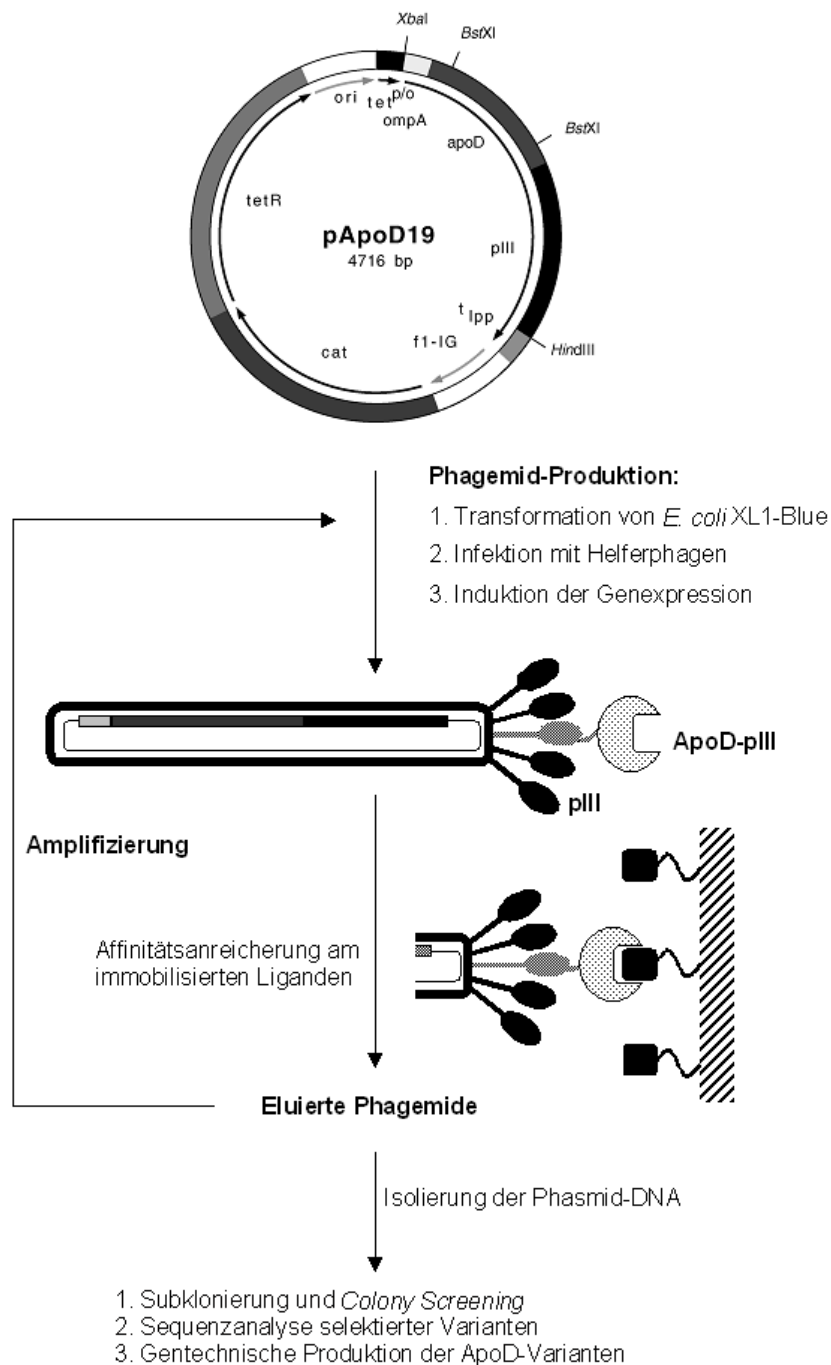


Abbildung 26. Schematische Darstellung des *Phage Display* auf Basis des Vektors pApoD19. *E. coli* XL1-Blue wird mit der Phasmid-DNA transformiert und produziert nach Infektion mit einem Helferphagen und Induktion der heterologen Genexpression Phagemide. Nach Affinitätsanreicherung am immobilisierten Liganden werden bindende Phagemide entweder amplifiziert und einem erneuten Anreicherungszyklus zugeführt oder ihre DNA zwecks Subklonierung in einen für das *Colony Screening*-Verfahren geeigneten Vektor abschließend isoliert.

Zunächst wurden die mittels Zufallsmutagenese erzeugten DNA-Fragmente (siehe Abschnitt 3.5.3) über die *Bst*XI-Schnittstellen in den Vektor pApoD19 inseriert. *E. coli* XL1-Blue wurde mit der ligierten Phasmid-DNA transformiert und anschließend mit dem Helferphagen VCS-M13 superinfiziert. Die Produktion des ApoD-pIII-Fusionsproteins wurde durch Induktion des *tet*-Promotors in Gang gesetzt, wodurch in den Zellen Phagemide assembliert

wurden, die neben dem natürlichen Phagenhüllprotein das phasmidkodierte Fusionsprotein aus ApoD und pIII auf ihrer Oberfläche präsentierten. Gleichzeitig wurde die einzelsträngige DNA-Form des für die präsentierte Variante jeweils kodierenden Phasmids verpackt.

Die Phagemide wurden aus dem Kulturüberstand isoliert und zur Affinitätsanreicherung an einem immobilisierten Liganden eingesetzt. Die so aufgrund ihrer Bindungseigenschaften angereicherten Phagemide konnten durch Infektion von *E. coli* amplifiziert und in einem erneuten Anreicherungszyklus eingesetzt werden. Im Anschluß wurden mit eluierten Phagemiden Bakterienzellen infiziert und aus diesen die Phasmid-DNA isoliert. Durch Subklonierung der ApoD-Genkassetten mittels der *Bst*XI-Schnittstellen auf dem Vektor pApoD12 konnten die selektierten Varianten anhand des *Colony Screening*-Verfahrens einzeln auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften durchmustert werden. Zwecks detaillierter Analyse ihrer Eigenschaften wurden ausgewählte ApoD-Varianten schließlich durch Subklonierung ihrer Genkassetten auf dem Vektor pApoD10 im präparativen Maßstab produziert.

3.5 Zufallsmutagenese der ApoD-Bindungstasche

Die grundsätzliche Eignung des humanen ApoD mit seiner Lipocalin-Struktur zur Generierung neuartiger molekularer Erkennungseigenschaften sollte durch die Konstruktion einer Bibliothek von ApoD-Varianten und deren anschließender Durchmusterung mittels des zuvor etablierten Phagen-Präsentationssystems (siehe Abschnitt 3.4) gezeigt werden.

3.5.1 Auswahl der Aminosäurepositionen für die Randomisierung

Um dem ApoD, welches naturgemäß die niedermolekularen Verbindungen Progesteron und Arachidonsäure komplexiert, die Fähigkeit zur Bindung von Protein-Antigenen zu verleihen, wurden insgesamt 24 Aminosäurepositionen für die Zufallsmutagenese ausgewählt.

Diese Aminosäureseitenketten befanden sich auf den Schleifenregionen und angrenzenden Bereichen der Bindungstasche des ApoD (siehe Abbildung 27). Dabei wurden solche Aminosäuren in die Mutagenese einbezogen, deren Seitenketten in Richtung der Bindungstasche wiesen. Diese exponierte Lage der Seitenketten auf der β -Faßstruktur und die Flexibilität der Peptidschleifen ließen annehmen, daß die Veränderung dieser Regionen ausgedehnte molekulare Oberflächen erzeugte, welche die Komplexierung sterisch anspruchsvoller Proteinliganden gestatten. Auf eine Variation der Länge der Peptidschleifen wurde dagegen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

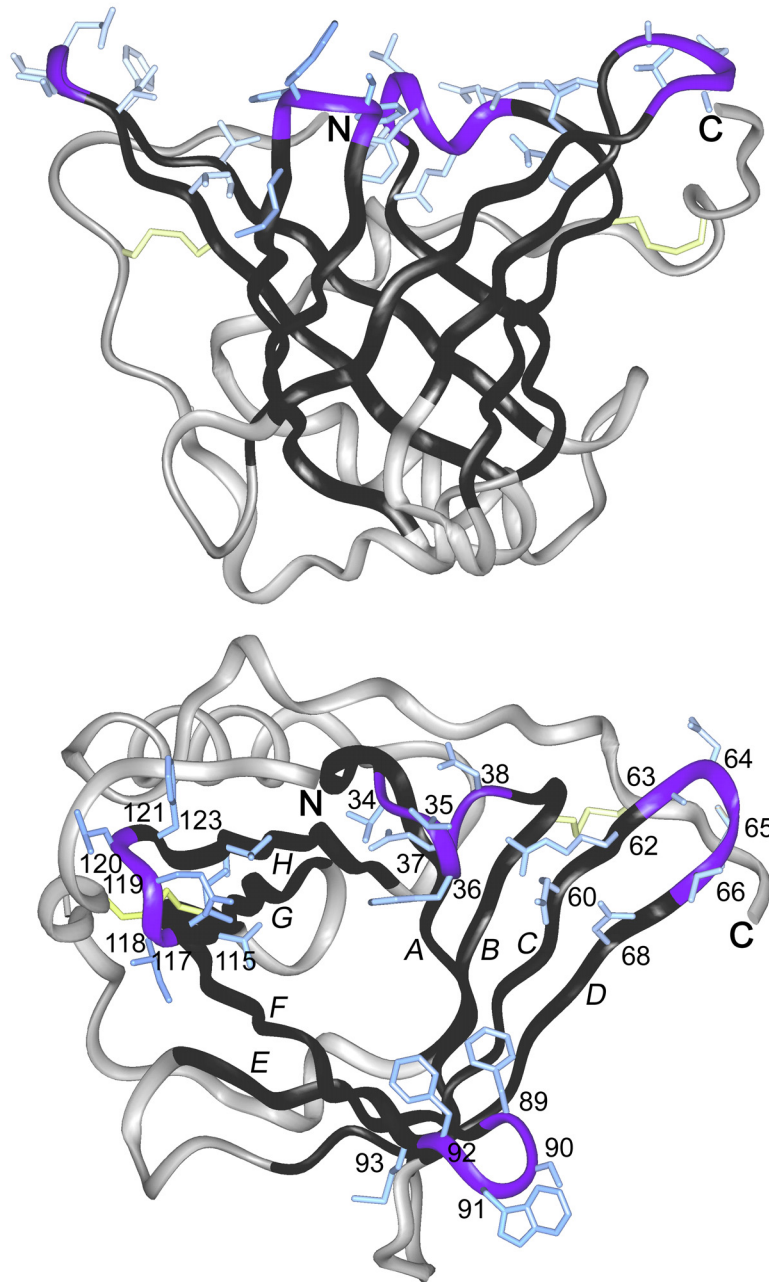


Abbildung 27. Strukturmodell des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) samt der für die Zufallsbibliothek ausgewählten Aminosäurepositionen. Die hypothetische dreidimensionale Gestalt des humanen ApoD ist in der Seitenansicht (oben) und mit Blick auf den Eingang der Bindungstasche (unten) jeweils als Bändermodell dargestellt. Die β -Stränge des Moleküls A bis H (kursiv) sind schwarz gezeichnet, während Schleifenbereiche, die den Eingang zur Bindungstasche flankieren, blau und die randomisierten Aminosäureseitenketten (numeriert) hellblau gefärbt sind. Außerdem sind die beiden Disulfidbrücken des ApoD (gelb) markiert sowie N- und C-Terminus bezeichnet.

Mittels des theoretischen Strukturmodells für das ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) wurden für die Mutagenese die Aminosäurepositionen Thr34, Thr35, Phe36, Glu37 und Asn38 ausgewählt, die sich im ausgedehnten ersten Schleifensegment, welches die β -Faltblattstränge A und B verbindet, befinden. Im Bereich der zweiten Schleifenregion wurden die Aminosäurereste Glu60, Arg62, Ala63, Asp64, Gly65, Thr66 und Asn68 mutagenisiert. Glu60 und

Ala62 befinden sich auf dem β -Strang C und weisen mit ihrer Seitenkette auf die zentrale Achse der β -Faßstruktur, wie auch die auf Strang D gelegenen Aminosäurereste Thr66 und Asn68. Die Positionen Leu61 und Val67 wurden in die Mutagenese nicht einbezogen, da deren Seitenketten nach dem Modell des ApoD auf die Außenseite des β -Barrels zeigen und deshalb keinen Beitrag zur Komplexierung eines Proteinliganden in der durch die Schleifenregionen neu erzeugten Bindungstasche leisten sollten. Die die β -Stränge E und F verbindende dritte Peptidschleife, welche die Reste Phe89, Ser90, Trp91, Phe92 und Met93 umfaßt, wurde vollständig randomisiert. Die auf Strang G liegenden Aminosäurereste Thr115 und Ile117 weisen mit ihrer Seitenkette zur Innenseite der Kavität und wurden zusammen mit Ile118, Gln119 und Leu120 sowie den auf dem Strang F gelegenen Resten Phe121 und Val123 mutagenisiert. Beibehalten wurde die Position Ser116, da der im natürlichen ApoD an dieser Stelle vorhandene Cysteinrest auf die Außenseite der Faßstruktur zeigt (Abschnitt 3.1.2), sowie der ähnlich angeordnete Aminosäurerest His122. Alle durch die Zufallsmutagenese erzeugten ApoD-Varianten trugen außerdem die bereits zuvor eingefügten Mutationen Cys116Ser (siehe Abschnitt 3.1.2) sowie Leu23Pro, Pro133Val und Asn134Ala, die mit der Einführung der *Bst*XI-Schnittstellen einhergegangen waren (Abschnitt 3.4.1.1).

Zur Erzeugung einer großen strukturellen Variabilität sollten an den mutagenisierten Positionen möglichst viele unterschiedliche Aminosäurereste eingebaut werden. Allerdings war die Substitution von Aminosäurepositionen gegen die Reste Cys, Gly und Pro als ungünstig anzusehen. Durch eingefügte Cysteinreste kann es zur Bildung von Disulfid-isomeren oder Dimeren kommen. Gly und Pro haben bestimmenden Einfluß auf die Sekundärstruktur des Proteins, was im Hinblick auf eine effiziente Faltung vermieden werden sollte. Die in dieser Arbeit eingesetzte Mutagenese-strategie erlaubte jedoch keinen selektiven Ausschluß der für diese Aminosäuren kodierenden Basentriplets.

Da alle in die Mutagenese einbezogenen Positionen in den die Bindungstasche umrahmenden Bereichen der β -Faltblätter oder in Schleifenbereichen des β -Fasses lagen und deshalb sterisch wenig eingeschränkt waren, bestand dagegen keine Notwendigkeit, voluminöse Seitenketten aufgrund eines eventuell ungünstigen Einflusses auf die Gesamtstruktur des Lipocalins von der Substitution auszuschließen.

Weiterhin sollte das Entstehen von Stoppkodons in den Zufallskodons vermieden werden. Allein das *Amber*-Stoppkodon (TAG) wurde toleriert, da der für die Herstellung der Phagemide verwendete *supE*-Stamm *E. coli* XL1-Blue dieses Stoppkodon supprimiert, indem zu etwa 10 % die Aminosäure Gln eingebaut wird (Miller, 1992). Durch Beschränkung der dritten Base jedes Kodons auf T oder G (Einbuchstabenkode: K) konnten die Stoppkodons Ochre (TAA) und Opal (TGA) im mutierten Gen vermieden werden, ohne daß die Zahl der 20 kodierten Aminosäuren eingeschränkt wurde.

Theoretisch lassen sich durch die vollständige Mutagenese der 24 ausgewählten Positionen $32^{24} = 1,3 \cdot 10^{36}$ kombinatorische Varianten (entsprechend $20^{24} = 1,7 \cdot 10^{31}$ unterschiedliche Proteine) erzeugen. Der in der Praxis erreichbare Umfang einer Phagen-Präsentationsbibliothek ist aufgrund mehrerer Faktoren limitiert (siehe Abschnitt 4.5), so daß die im Zuge dieser Arbeit erzeugten Bibliotheken nur einen kleinen Ausschnitt der möglichen ApoD-Varianten repräsentierten.

3.5.2 Strategie zur konzertierten Mutagenese der ausgewählten Aminosäuren

Die Erzeugung einer statistisch möglichst gleichverteilten Bibliothek von Varianten des ApoD setzte die konzertierte Mutagenese der ausgewählten (Abschnitt 3.5.1) Aminosäurepositionen in den vier Schleifenregionen dieses Lipocalins voraus. Die gleichzeitige Mutagenese der über einen Bereich von etwa 290 bp im ApoD-Strukturgen auf vier Schleifenregionen des ApoD verteilten Reste wurde mittels einer mehrstufigen PCR erreicht. Hierzu wurden vier Oligodesoxynukleotide konstruiert, die von der ApoD-Gensequenz abgeleitet waren und an den zu verändernden Positionen degenerierte Basentriplets trugen (Abbildung 28 und 29).

Zur gemeinsamen Mutagenese der ersten und zweiten Schleifenregion des ApoD-Strukturgens dienten die Oligodesoxynukleotide MV-4 und MV-5, mit denen unter Verwendung des Vektors pApoD10 als Matrize ein Fragment von 149 bp Länge amplifiziert wurde. Analog führten die degenerierten Oligodesoxynukleotide MV-6 und MV-7 zur Amplifizierung eines 147 bp umfassenden Bereiches, der die dritte und vierte Schleifenregion des ApoD beinhaltet.

Die beiden Produkte, die in separaten Reaktionsansätzen synthetisiert worden waren, wurden in einer anschließenden *Assembly*-PCR zur Erzeugung eines kombinierten DNA-Fragments benutzt, welches die gesamte durch die *Bst*XI-Schnittstellen begrenzte Genkassette des ApoD beinhaltet. Dazu wurden die Oligodesoxynukleotide MV-8 und MV-10 verwendet, die mit den im ersten Amplifizierungsschritt erzeugten Genfragmenten an den Flanken überlappten und als *PCR-Primer* dienten. Zusammen mit dem Oligodesoxynukleotid MV-9, welches mit beiden Genfragmenten hybridisierte, wurde mittels PCR ein Fragment von 358 bp Länge synthetisiert. Dieses Fragment trug in einem Abstand von 12 bp bzw. 10 bp zu seinen 5'- und 3'-Enden jeweils eine *Bst*XI-Schnittstelle. Die beiden Erkennungstellen für diese TypIIa-Restriktionsendonuklease führten zu zwei nicht-palindromen und gegenseitig inkompatiblen kohäsiven Enden (vgl. Abschnitt 3.4.1.1). Das DNA-Fragment konnte daher effizient mittels dieses Enzyms geschnitten und anschließend mit dem für das *Phage Display* verwendeten Phasmidvektor pApoD19 ligiert werden. Der Einbau des vermittelnden Oligodesoxynukleotids MV-9 führte außerdem unter Verwendung zweier stiller Basensubstitutionen zu einer *Xho*I-Schnittstelle in dem mutagenisierten ApoD-Gen, wodurch aus der Amplifizierung

resultierende Genfragmente später anhand des erhaltenen Restriktionsmusters vom Wildtyp-Gen unterschieden werden konnten.

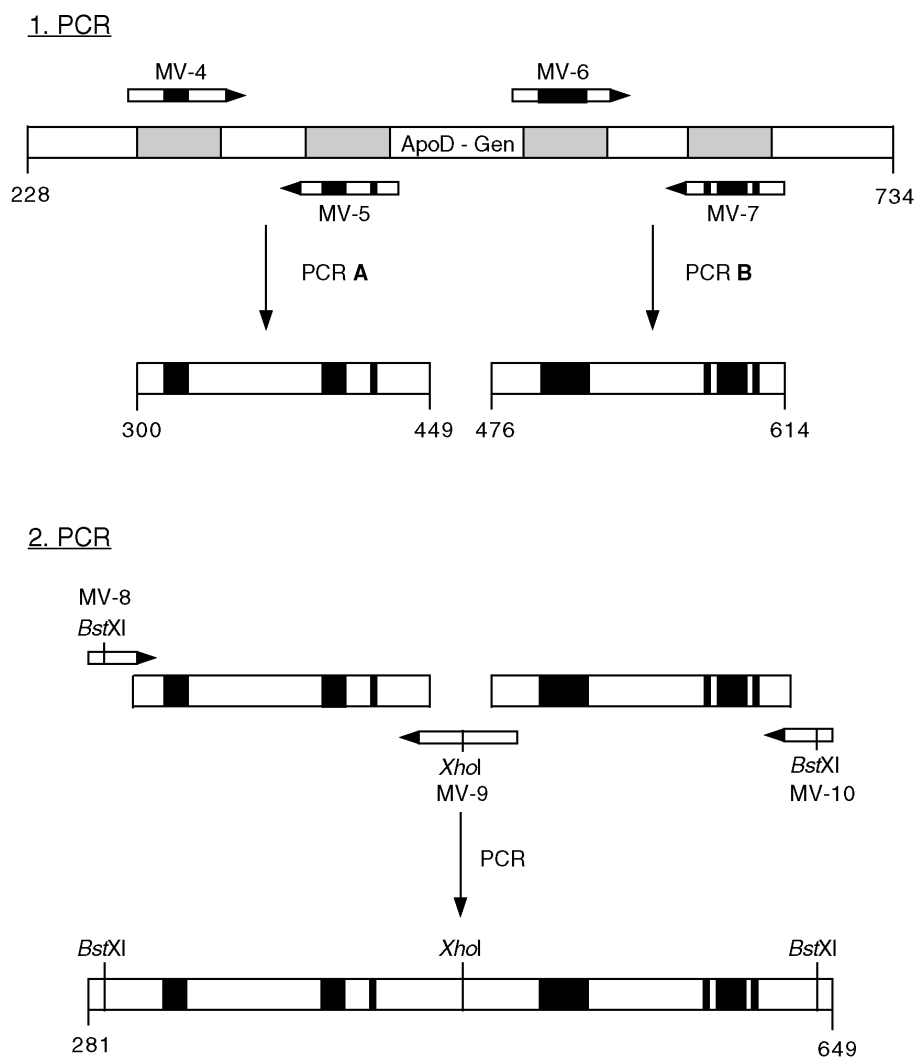


Abbildung 28. Zweistufige PCR-Strategie zur Randomisierung von 24 Aminosäurepositionen in den Schleifenbereichen (grau gezeichnet) des ApoD-Strukturgens. Im ersten Schritt wurden mittels der degenerierten Oligodesoxynukleotide MV-4 und MV-5 bzw. MV-6 und MV-7 (randomisierte Bereiche sind durch schwarze Balken symbolisiert) unter Verwendung der auf dem Vektor pApoD10 klonierten ApoD-cDNA als Matrize je ein Fragment des ApoD-Gens durch PCR amplifiziert (A und B), welches zwei der Schleifen umfaßte. Die beiden erhaltenen Fragmente wurden in einem zweiten Amplifizierungsschritt gemeinsam als Matrize eingesetzt, wobei unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide MV-8, MV-10 sowie des vermittelnden *Primers* MV-9 in wenigen Zyklen das komplette ApoD-Genfragment assembliert wurde. Gleichzeitig wurde mit MV-9 eine *XhoI*-Schnittstelle eingeführt, um das PCR-Produkt durch Restriktionsanalyse detektieren zu können. Anhand der *BstXI*-Schnittstellen wurde die genetische Bibliothek anschließend auf dem für das *Phage Display* verwendeten Vektor pApoD19 kloniert.

```

      BstXI
MV-8 : CTGAAATAAGTATCCAGGAAGATGGTACGAAATTGAGAAG
      MV-4 : GAFGGTACGAAATGGAAGAATCCCAANNKNNKNNKNNKGGACCG
      CCAAGCAATTTCATCTTTGGGAAGTCCCAATTCCTCCGGTGCCAGGAGAAATTTGACGGTAAFAAGTATCCAGGAAGATGGTACGAAATGGAAGAATCCCAACACCTTTGAGAAATGGACCG
      228
      GTTCCGTAAAGTAGAACCCCTTCACGGGGTTAGGAGGCCACCTCTTAAACTGCACCTTATTTACAGGTCCTTTACCAATGCTTTAACTCTTCFAGGGTGTGGAACTCTTTACCTGCC
      GlnAlaPheHisLeuGlyLysCysProAsnProValGlnGluAsnPheAspValAsnLysTyrProGlyArgTrpTyrGluIleGluLysIleProThrThrPheGluAsnGlyArg
      1         10         20         30         40
      TGCATCCAGG
      TGCAATCCAGGCCAACTACTCACTAATGGAAACCGAAAGATCAAAAGTGTAAACCAGGAGTTGAGAGCTGATGGAACGTGAATCAAATCGAAGGTGAAGCCACCCAGTTAACCTCACAC
      348
      ACGTAGGTCGGGTGATGAGTGATACCTTTTCGCTTTTAGTTTCACAAATTTGGTCTCAACTCTCGACTACCTTGACACTTAGTTAGCTTCCACTTCGGTGGGTCAATTTGGAGTGT
      CTAGTTTCACAAATTTGGTCTCANNMAACNNNNNNNNNNNNMCAACNNMGTTAGCTTCCACTTCGG :MV-5
      CysIleGlnAlaAsnTyrSerLeuMetGluAsnGlyLysIleLysValLeuAsnGlnGluLeuArgAlaAspGlyThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThr
      41         50         60         70         80
      XhoI
      GAGCCTGCCAAGCTCGAGGTTAAGNNKNNKNNKNNKNNKCCATCGGCACCCGTACTG :MV-6
      GAGCCTGCCAAGCTGGAAGTTAAGTTTCTCTGGTTTATGCCATCGCACCGGTATGGATCCCTGGCCACCCGACTATGAGAACTATGCCCTCGTGTATCCCTGTACTAGTATCATCCAACTT
      468
      CTCGGACGGTTCGACCTTCAATTCAAAAGGACCAATAACGTGTGGCATGACCTAGCACCGGTGGCTGATCTCTTGATACGGGAGCACATAAGGACATGATCATAGTAGTGTGAA
      CCGGAGCACATAAGGACANNNNTCANNNNNNNNNNNM
      CTCGGACGGTTCGAGCTCCAA :MV-9
      GluProAlaLysLeuGluValLysPheSerTrpPheMetProSerAlaProTyrTrpIleLeuAlaThrAspTyrGluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerIleIleGlnLeu
      81         90         100         110         120
      BstXI
      TTTCAGTGGATTTGCTTTGGATCTTTGGCCAGAAACGTTGGCTCTCCCTCCAGAAACAGTGGACTCTCTAAAAAATATCCTGACTTCTAAATACATTTGATGTCAAGAAAAATGACGGTCA
      588
      AAAAGTCACCTFAAACGAAACCTAGAACCGGTCTTTGACCCGAGGAGGTCTTTGTCACCTGAGAGATTTTATATAGGACTGAAGATTTATGTAACCTACAGTTCTTTTACTGCCAGTGT
      NNMGTNNMCTFAAACGAAACCTAGAACCC :MV-7
      CTAFAAACGAAACCTAGAACCGGTCTTTGACCCGAGGAGGTC :MV-10
      PheHisValAspPheAlaTrpIleLeuAlaArgAsnValAlaLeuProProGluThrValAspSerLeuLysAsnIleLeuThrSerAsnAsnIleAspValLysLysMetThrValThr
      121         130         140         150         160
      GACCAGTGAACCTGCCCCAAGCTCAGCGTTGGTctCACCCGCGCTCGAAAAATAATAA
      708
      CTGGTCCACTTGACGGGGTTCGAGTCG :MV-2
      GGTCCACTTGACGGGGTTCGAGTCG :MV-2
      AspGlnValAsnCysProLysLeuSerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEndEnd
      161
      S'trep-tag II
  
```

Abbildung 29. Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des Vektors pApoD10. Gezeigt ist der Bereich des ApoD-Strukturgens samt Aminosäuresequenz, beginnend mit Gln1 und endend mit dem *Strep*-tag II. Außerdem sind die Oligodesoxynukleotide, die zur Erzeugung der Zufallsbibliothek eingesetzt wurden, abgebildet. Die Position der Aminosäurereste im ApoD ist unterhalb der Sequenz angegeben, zusätzlich geben die Zahlen am Zeilenende die Position der Nukleotide im Vektor pApoD10 an. Die Oligodesoxynukleotide sind je nach ihrer Orientierung ober- bzw. unterhalb der ApoD-Sequenz angegeben, wobei komplementäre Bereiche blau, die randomi-

sierten Basentriplets dagegen rot gefärbt sind. Die Genkassette wird durch die zwei *Bst*XI-Schnittstellen (unterstrichen), die insgesamt drei Aminosäuresubstitutionen (unterstrichen) erforderten, flankiert. Zwei stille Mutationen im *Primer* MV-9 führten eine *Xho*I-Schnittstelle (unterstrichen) in das amplifizierte DNA-Fragment ein.

3.5.3 Synthese einer Bibliothek von ApoD-Varianten

Die Synthese der ApoD-Zufallsbibliothek erfolgte mittels der beschriebenen zweistufigen PCR-Strategie (Abschnitt 3.5.2). Dazu wurden unter Verwendung des Plasmids pApoD10 als Matrize mittels der Oligodesoxynukleotid-Paare MV-4/MV-5 beziehungsweise MV-6/MV-7 unter Standardbedingungen (Abschnitt 2.2.5.7) die beiden Fragmente der Größe von 149 bp bzw. 147 bp erzeugt. Die anschließende *Assembly*-PCR unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide MV-8, MV-10 sowie MV-9 wurde zunächst hinsichtlich der Menge der als Matrize eingesetzten Fragmente wie auch der Hybridisierungstemperatur optimiert. Die durchgeführten Vorexperimente erwiesen, daß größere Mengen der Matrizen-DNA zu einer Zunahme von Nebenprodukten bei der Amplifizierung führten. Durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur konnte die Bildung unspezifischer Amplifizierungsprodukte dagegen deutlich zurückgedrängt werden. Die Verwendung von je 3 ng der als Matrize benutzten PCR-Fragmente und eine Hybridisierungstemperatur von 65 °C führte schließlich mit hoher Spezifität zu einem PCR-Produkt der erwarteten Größe von 358 bp.

Die mittels *Assembly*-PCR erhaltenen randomisierten ApoD-Genfragmente wurden isoliert und mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI hydrolysiert, wodurch ein beidseitig leicht verkürztes Genfragment von 322 bp Größe gewonnen wurde.

Um die Zufallsmutagenese des ApoD-Gens experimentell zu überprüfen, wurde das PCR-Fragment über seine *Bst*XI-Schnittstellen zunächst im analytischen Maßstab auf dem Vektor pApoD19 kloniert. Dazu wurde *E. coli* XL1-Blue mit dem Ligierungsansatz elektrotransformiert. Sowohl aus dem Pool der erhaltenen Transformanden als auch aus zehn individuellen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels des Oligodesoxynukleotids MV-1 sequenziert. Die Analyse der gepoolten DNA ergab, daß an allen 24 randomisierten Positionen des ApoD die durch die degenerierten Oligodesoxynukleotide vorgegebene Basenverteilung NNK vorhanden war (siehe Abbildung 30). Dagegen wies die DNA-Bibliothek an den anderen Positionen wie geplant die Original-Basensequenz des ApoD auf.

Durch die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA von zehn Einzeltransformanden konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Strukturgene der Plasmid-kodierten ApoD-Varianten an den durch die *Primer*-Konstruktion vorausbestimmten Positionen die vorgesehene Randomisierung trugen. Die kodierten ApoD-Varianten wiesen die entsprechende Aminosäuresubstitutionen auf, wobei vier der Varianten je ein durch die Mutagenese-strategie zugelassenes *Amber*-Stoppkodon trugen. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen zeigte, daß es nicht zu einer Bevorzugung bestimmter Kodons an den mutagenisierten Positionen gekommen war.

Bei zwei Klonen mußten im Bereich der *Primer* MV-5 sowie MV-6 Deletionen von Sequenzabschnitten festgestellt werden, was vermutlich auf eine unvollständige Synthese dieser Oligodesoxynukleotide zurückzuführen war. Bei drei Varianten traten an unterschiedlichen Positionen außerhalb der mutagenisierten Bereiche einzelne Basensubstitutionen auf, was durch die bekannte Fehlerrate der in der PCR-Mutagenese verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase erklärt werden konnte. Insgesamt war aufgrund der durchgeführten Sequenzanalyse davon auszugehen, daß ca. 80 % der in der Bibliothek repräsentierten Sequenzen für funktionelle, partiell randomisierte ApoD-Varianten kodierten.

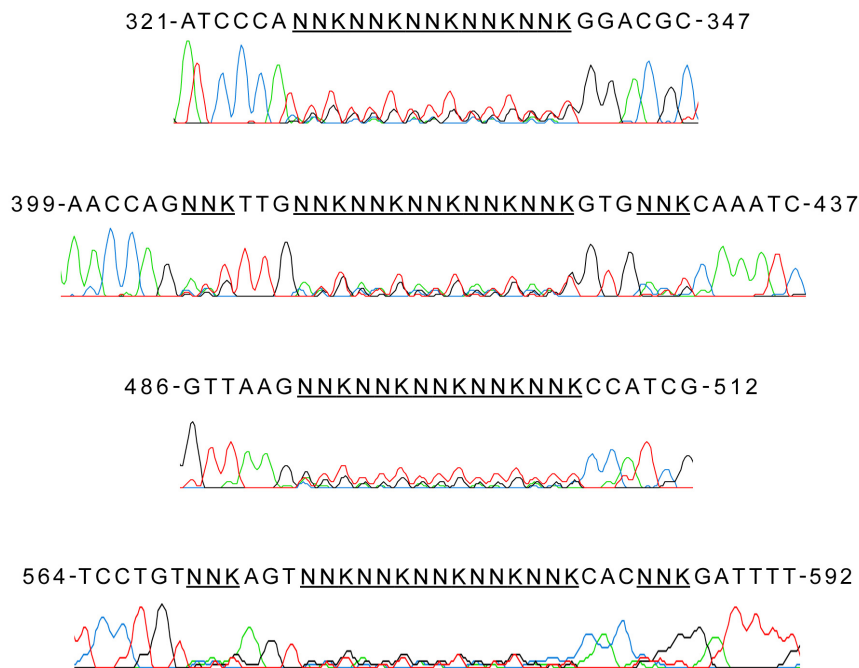


Abbildung 30. Ausschnitt aus der Sequenzanalyse der ApoD-Bibliothek. Plasmid-DNA wurde aus der vereinigten Kultur von Transformanten der mutagenisierten DNA (nach Insertion in pApoD19) isoliert und mittels des Oligodesoxynukleotids MV-1 unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (siehe Abschnitt 2.2.8) sequenziert. Gezeigt sind die Bereiche des Elektropherogramms sowie die entsprechende Basensequenz des kodierenden DNA-Stranges für die vier randomisierten Regionen des ApoD-Gens (N = A, C, G, T; K = T, G; vgl. Abbildung 29). Die Numerierung bezieht sich auf die Nukleotidabfolge in dem Plasmid-Vektor pApoD19 (siehe Abbildung 26).

3.6 Erste Zufallsbibliothek

3.6.1 Herstellung der ApoD-Bibliothek I

Zur Herstellung der ersten präparativen Phagemidbibliothek wurden 16 pmol (3,25 µg) des mit *Bst*XI geschnittenen PCR-Fragments (322 bp), welches für die an insgesamt 24 Aminosäurepositionen randomisierten ApoD-Varianten kodierte, mit 16 pmol (43 µg) des durch *Bst*XI-Verdau von pApoD19 erhaltenen Vektorfragmentes (4394 bp) ligiert (Abschnitt

2.2.5.4). Die ligierte DNA wurde nach Entsalzung zur Elektrottransformation von *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Transformationskompetenz der verwendeten Zellen war vorher unter Verwendung von aus Zellen gewonnener Plasmid-DNA (pApoD19) zu $1,6 \cdot 10^9$ Transformanden pro μg eingesetzter DNA unter ansonsten identischen Bedingungen bestimmt worden.

Zur Transformation der Zellen mit der randomisierten DNA wurden jeweils $1,4 \mu\text{g}$ des Ligierungsproduktes und $40 \mu\text{l}$ der Suspension elektrokompeter Zellen in insgesamt 33 Elektroporationen eingesetzt (Abschnitt 2.2.2.2). Die Ansätze wurden vereinigt und in Vollmedium unter Selektivbedingungen kultiviert. Anschließend wurden Zellen zur Präparation der Plasmid-DNA im Midi-Maßstab (Abschnitt 2.2.3.1) einerseits sowie zur Herstellung der Phagemide (Abschnitt 2.2.10.1) andererseits entnommen. Zur Phagemidproduktion wurde die Genexpression des Fusionsproteins aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII mit $200 \mu\text{g/l}$ aTc induziert. Aus 200 ml Bakterienkultur wurden $1,2 \cdot 10^{11}$ Phagemide (cfu) erhalten.

Die Größe der Bibliothek wurde durch Zählen der Transformanden einer Verdünnung, die dem vereinigten Ansatz nach einstündigem Wachstum im Anschluß an die Elektroporation entnommen und auf LB/Cam-Agar ausplattiert worden war (siehe Abschnitt 2.2.2.2), zu $1,5 \cdot 10^8$ unabhängigen Klonen bestimmt. Damit schien die Bibliothek eine ausreichende Menge von ApoD-Varianten zu repräsentieren, um Selektionsexperimente durchführen zu können. Dennoch war die erreichte Diversität in Anbetracht der eingesetzten DNA-Menge geringer, als es die Transformationskompetenz der eingesetzten *E. coli*-Zellen sowie die bei der Herstellung von Bibliotheken auf der Basis des BBP gemachten Erfahrungen (Beste, 1998) erwarten ließen.

3.6.2 Anreicherungsversuche hinsichtlich Bindungsaktivität für Nogo-A

Aus der ApoD-Bibliothek sollten ApoD-Varianten mit Bindungsaffinität zu Proteinliganden gewonnen werden. Als potentiell „Antigen“ wurde das neuronale Inhibitorprotein Nogo-A gewählt. Dabei handelt es sich um integrales Membranprotein aus dem Myelin der weißen Substanz des Zentralnervensystems (Chen *et al.*, 2000), welches inhibierende Wirkung auf das Aussprossen von Axonen besitzt (Huber & Schwab, 2000). Ein verkürztes Fragment des Nogo-A der Ratte, welches die Aminosäurereste 234 bis 940 des nativen Proteins umfaßt, konnte löslich in *E. coli* produziert werden (Fiedler *et al.*, 2002). Dieses als NiFr2 bezeichnete Protein wurde für Selektionsexperimente mit der ApoD-Bibliothek eingesetzt.

Zur Affinitätsanreicherung wurden die Phagemide mit der Lösung eines Konjugates aus NiFr2 und Biotin inkubiert. Anschließend wurden entstandene Komplexe aus dem Antigen und Phagemid-präsentierten ApoD-Varianten mit Hilfe von Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln von nichtbindenden Phagemiden abgetrennt. Die gebundenen

Phagemide wurden bei saurem pH-Wert eluiert, durch anschließende Infektion von *E. coli* amplifiziert und in weiteren Selektionszyklen eingesetzt.

Insgesamt wurden sieben Anreicherungszyklen durchgeführt, welche durch die Bestimmung der relativen Phagemidtitel einzelner Fraktionen in einem Elutionsprofil graphisch dokumentiert wurden (Abbildung 31). Der relative Phagemidtitel der Waschfraktionen nahm bei allen Selektionszyklen vom ersten bis zum fünften Waschschrift ab und verblieb bis zur Elution etwa auf dem erreichten Niveau. Bei der Elution kam es jeweils zu einer Verzehnfachung der Anzahl eluierter Phagemide verglichen mit den im vorausgegangenen Waschschrift abgelösten Phagemiden. Während die Elutionsprofile der ersten vier Selektionszyklen sich nur wenig unterschieden, nahm der relative Phagemidtitel bei den Zyklen fünf und sechs deutlich zu, ging aber im siebten Zyklus leicht zurück. Im sechsten und siebten durchgeführten Zyklus wurden 0,5 % beziehungsweise 0,09 % der jeweils eingesetzten Phagemide bei der Elution wiedergewonnen.

3.6.3 Analyse der angereicherten Phagemide

3.6.3.1 Nachweis von Bindungsaktivität durch *Colony Screening*

Die Phasmid-DNA von *E. coli* XL1-Blue-Zellen, die mit Phagemiden aus dem Elutionsschritt des sechsten oder siebten Selektionszyklus infiziert worden waren, wurde präpariert. Durch enzymatische Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI wurde die Genkassette (322 bp), welche die mutagenisierten Regionen der selektierten ApoD-Varianten umfaßte, ausgeschnitten und mit dem durch analogen Verdau erhaltenen großen Fragment (3540 bp) des Vektors pApoD12 ligiert. Dieser Vektor erlaubt die Produktion von ApoD beziehungsweise ApoD-Varianten als Fusion mit der ABD (siehe Abschnitt 3.3.2).

Mit den Ligierungsansätzen wurden Zellen des Stammes *E. coli* TG1-F⁻ transformiert und diese zum Zweck des *Colony Screenings* (siehe Abschnitt 2.2.10.6) auf je einer Membran ausplattiert. Dieser *Amber*-Suppressorstamm kam hier zum Einsatz, damit bei ApoD-Varianten, die ein durch die Mutagenese-strategie zugelassenes *Amber*-Stoppkodon trugen, die Translation nicht vorzeitig terminiert wurde. Zur Untersuchung von Varianten auf ihre Bindungseigenschaften zu dem rekombinanten Nogo-A mittels des *Colony Screening*-Verfahrens wurde die mit HSA beschichtete hydrophobe Membran, auf der die Varianten über die am C-Terminus fusionierte ABD im Verlauf der Induktionsphase immobilisiert waren, zunächst mit dem NiFr2-Biotin-Konjugat inkubiert. Zum Nachweis des gebundenen Konjugats auf der Membran wurde anschließend mit Extravidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat inkubiert und so gebundenes NiFr2 durch chromogene Reaktion nachgewiesen. Dabei konnten allerdings keine Kolonien identifiziert werden, die Farbsignale stärker als die Hintergrundfärbung hervorriefen.

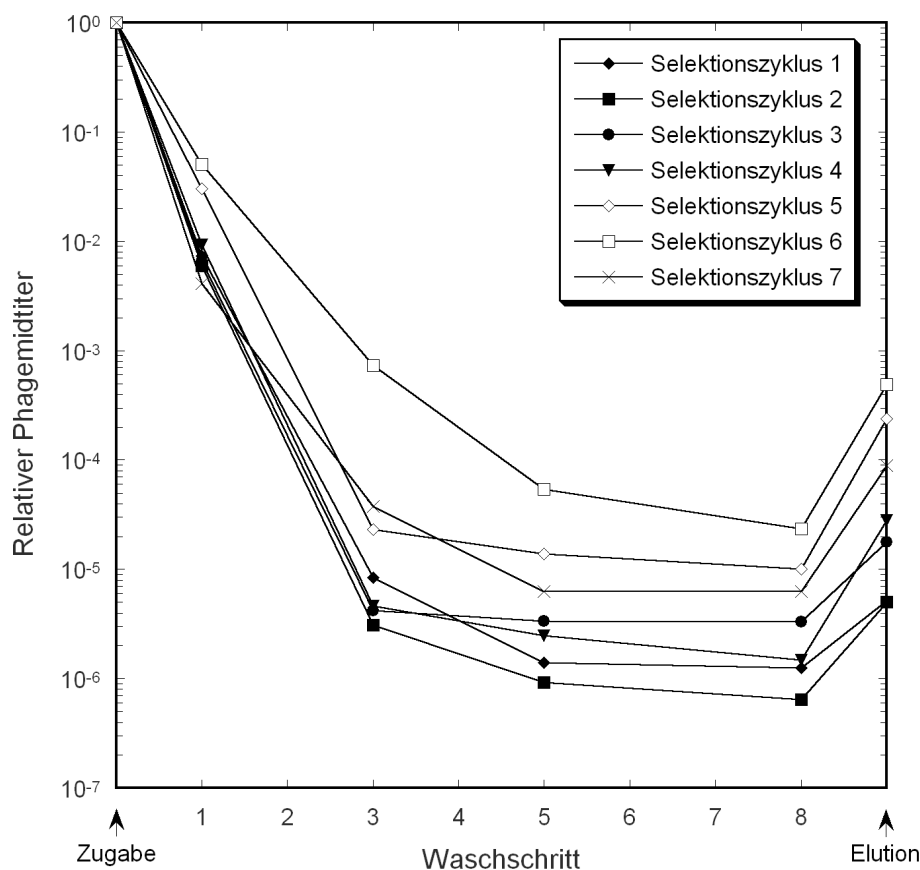


Abbildung 31. Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1 bis 7 zur Anreicherung von ApoD-Phagemiden mit Bindungsaffinität zum rekombinanten neuronalen Inhibitorprotein Nogo-A. Biotinyliertes NiFr2 (33 pmol) wurde mit $1,5 \cdot 10^{11}$ Phagemiden einer Zufallsbibliothek, die $1,5 \cdot 10^8$ ApoD-Varianten repräsentierte, in einem Volumen von 400 μ l inkubiert. Anschließend wurden gebildete Komplexe mit Hilfe magnetischer Streptavidin-Partikel abgefangen. Nach achtmaligem Waschen der Partikel wurden gebundene Phagemide mittels pH-Absenkung eluiert, anschließend amplifiziert und in einem erneuten Selektionszyklus eingesetzt. Die Abbildung wurde erstellt, indem die Phagemidtitel ausgewählter Fraktionen bestimmt, durch die Zahl der für den jeweiligen Selektionszyklus eingesetzten Phagemide dividiert und halblogarithmisch gegen die Waschschrte aufgetragen wurden.

3.6.3.2 DNA-Analyse selektierter Klone

Die für ApoD-Varianten kodierenden DNA-Abschnitte der Phasmide von zwölf Kolonien, die durch Infektion mit dem Phagemidpool der Elutionsfraktion der sechsten Anreicherungsrunde erhalten worden waren, wurden einer genetischen Analyse unterzogen. Dabei wurden nur sechs verschiedene DNA-Sequenzen gefunden, die aber alle für nicht funktionelle ApoD-Varianten kodierten. Die vorherrschende, siebenfach detektierte Variante besaß zwei durch die Mutagenese eingeführte *Amber*-Stoppkodons sowie ein zusätzliches Cysteinkodon. Drei weitere Klone trugen je ein *Amber*-Stoppkodon und außerdem mindestens je ein zusätzliches Cysteinkodon. Von den verbleibenden zwei Sequenzen wies eine im durch *Primer* MV-5 randomisierten Bereich Deletionen sowie Insertionen auf, die andere ein durch die

Mutagenesestrategie nicht vorgesehenes *Ochre*-Stoppkodon innerhalb des durch MV-7 randomisierten Abschnittes.

Insgesamt ergab sich, daß eine Anreicherung von Klonen, die für ApoD-Varianten mit Bindungsaffinität zu dem vorgegebenen Antigen kodierten, nicht gelungen war. Vielmehr zeigte sich, daß es im Laufe der wiederholten Anreicherungen und Phagemidamplifikationen zu einer Akkumulation von nichtfunktionellen Varianten kam, die vermutlich in Bezug auf ihre Verträglichkeit für den Wirtsorganismus *E. coli* Vorteile gegenüber funktionellen ApoD-Varianten besaßen.

3.7 Zweite Zufallsbibliothek

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse, die bei dem Selektionsversuch mit der ApoD-Bibliothek I erhalten worden waren, wurden bei der Herstellung einer zweiten Phagenbibliothek sowie bei der Anreicherung und Amplifikation der Phagemide methodische Änderungen vorgenommen. Im Vordergrund stand die Erhöhung der Komplexität der Zufallsbibliothek, denn nach theoretischen Erwägungen korreliert die Größe einer Bibliothek mit der erreichbaren Affinität selektierter Varianten (Perelson & Oster, 1979). Weiterhin sollte der Selektionsdruck hinsichtlich Varianten, die für nichtfunktionelle ApoD-Varianten kodierten, verringert werden.

Im folgenden wurde für Selektionsexperimente humanes Hämoglobin als exemplarisches Antigen verwendet, da dieses humane Protein in homogener Form einfach erhältlich ist. Damit wurden Schwierigkeiten bei der Affinitätsanreicherung, die eventuell auf uneinheitliche Präparationen des rekombinanten NiFr2 bzw. dessen nur eingeschränkte Verfügbarkeit zurückzuführen waren, umgangen.

3.7.1 Strategien zur Erhöhung der Diversität und Herstellung der ApoD-Bibliothek II

Zur Erzeugung der zweiten Bibliothek wurden je 16 pmol der durch Hydrolyse mittels *Bst*XI erzeugten Fragmente des PCR-Produktes (322 bp; 3,25 µg) sowie des Vektors pApoD19 (4394 bp; 43 µg) miteinander ligiert.

Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurde das Verhältnis von DNA-Menge zu eingesetzten kompetenten Zellen optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß – bezogen auf 40 µl der in einem Transformationansatz eingesetzten Suspension kompetenter Zellen – bei Einsatz von mehr als 10^{-7} g DNA die Zahl der erhaltenen Transformanden deutlich abnahm. Um die Anzahl notwendiger Transformationen im Hinblick auf die praktische Durchführung

gering zu halten, erwies sich letztlich die Verwendung von 100 μ l Zellsuspension und 10^{-6} g DNA pro Ansatz als optimal.

Zur Herstellung der Phagenbibliothek II wurden schließlich 4,6 ml Zellsuspension in 46 Ansätzen mit je 10^{-6} g DNA transformiert. Die Kompetenz der hierbei eingesetzten Zellen betrug durchschnittlich $1 \cdot 10^9$ Transformanden pro μ g eingesetzter DNA, wie Vorexperimente mit dem Vektor pApoD19 ergaben. Nach der Transformation wurden die Ansätze vereinigt und in Flüssigmedium unter Selektivbedingungen kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

Bei der anschließenden Phagemidproduktion wurde die Genexpression des Fusionsproteins aus ApoD und pIII mit nur 25 μ g/l aTc induziert. Durch diese im Vergleich zur Herstellung der ApoD-Bibliothek I schwächere Induktion sollte ein Wachstumsnachteil für Zellen, die ein vollständiges Fusionsprotein produzierten, verringert werden. Aufgrund der Ergebnisse, die bezüglich der Genexpression des Fusionsproteins in *E. coli* erzielt worden waren (siehe Abschnitt 3.4.2), wurde gleichzeitig die Inkubationstemperatur während der Induktion von 30 °C auf 26 °C verringert. Diese Bedingungen wurden auch bei der Amplifizierung der Phagemide nach jeder Affinitätsanreicherung angewandt.

Die ApoD-Bibliothek II repräsentierte $1,7 \cdot 10^9$ unabhängige Varianten. Dabei konnten aus 200 ml Kultur $6,5 \cdot 10^{12}$ Phagemide (cfu) erhalten werden. Insgesamt konnte die Größe der ApoD-Bibliothek II verglichen mit der Bibliothek I um den Faktor zehn gesteigert werden.

3.7.2 Anreicherungsversuche hinsichtlich Bindungsaktivität für Hämoglobin

Mit der erzeugten Phagemidbibliothek wurden Affinitätsanreicherungen an humanem Hämoglobin durchgeführt. Im Gegensatz zu den Anreicherungsversuchen mit Nogo-A (siehe Abschnitt 3.6.2), bei denen das Antigen in Lösung eingesetzt worden war, wurde das Hämoglobin auf einer Kunststoffoberfläche immobilisiert. Dazu wurden Flügelstifte (ImmunoSticks, Nunc) mit einer hohen Bindungskapazität für Proteine eingesetzt und durch Inkubation in Hämoglobin-Lösung beschichtet. Der mit dem Proteinliganden beladene Flügelstift wurde mit Phagemiden ($3,3 \cdot 10^{12}$ cfu) der ApoD-Bibliothek II inkubiert und nichtbindende Phagemide in acht Waschschritten entfernt. An dem Flügelstift verbliebene Phagemide wurden durch Absenken des pH-Wertes eluiert und nach Amplifizierung in dem folgenden Anreicherungszyklus eingesetzt.

Die Phagemidtitel von Wasch- und Elutionsfraktionen wurden bestimmt und graphisch dargestellt (Abbildung 32). Alle Elutionsprofile zeigten eine starke Abnahme der Phagemidtitel während der Waschschriffe, die sich in den Selektionszyklen eins und zwei auch in der Elutionsfraktion fortsetzte. Dagegen konnte in der Elutionsfraktion des dritten Anreicherungszyklus ein Anstieg des Phagemidtiters um das dreifache (bezogen auf die achte Waschfraktion) verzeichnet werden. Im Verlauf des vierten bis achten Selektionszyklus nahm

der Phagemidtiters in der Elutionsfraktion bis schließlich auf das Dreißigfache – verglichen mit der vorangegangenen Fraktion – zu.

Damit erhöhte sich der Anteil der nach Affinitätsanreicherung im Elutionsschritt wiedergewonnenen Phagemide von $3,3 \cdot 10^{-4} \%$ im ersten auf $5,7 \cdot 10^{-3} \%$ im fünften und $0,04 \%$ im achten Selektionszyklus. Ein ähnlicher Verlauf der Elutionsprofile war bei der Selektion aus Antikörper-Phagemidbibliotheken beobachtet worden (Marks *et al.*, 1991) und deutete auf die Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten hin.

Phagemide, die im Elutionsschritt des fünften sowie des achten Selektionszyklus erhalten worden waren, wurden eingesetzt, um die jeweils kodierten ApoD-Varianten individuell auf ihre Bindungseigenschaften zu Hämoglobin zu untersuchen.

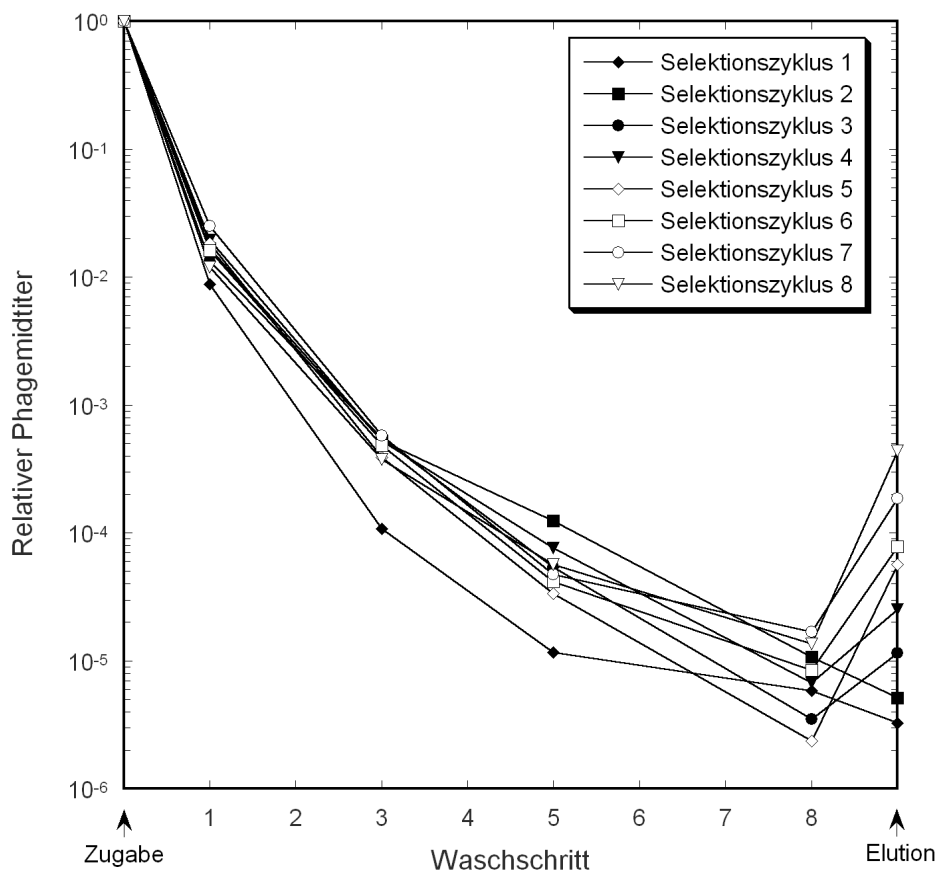


Abbildung 32. Überlagerung der Elutionsprofile der Selektionszyklen 1 bis 8 zur Anreicherung von ApoD-Varianten mit Bindungsaffinität zu Hämoglobin aus der ApoD-Bibliothek II ($1,7 \cdot 10^9$ unabhängige Varianten) mittels *Phage Display*. Nach Inkubation eines mit Hämoglobin beschichteten Polystyrol-Flügelstiftes mit $2,9 \cdot 10^{11}$ bis $3,3 \cdot 10^{12}$ cfu Phagemiden wurden nichtbindende Phagemide durch wiederholtes Waschen des Flügelstiftes mit PBS/T 0,1 entfernt. Im Anschluß an den achten Waschschr. wurden bindende Phagemide durch Absenken des pH-Wertes auf 2,2 eluiert und die Lösung sofort neutralisiert. Die Phagemidtiters ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktionen wurden bestimmt und als Bruchteil der im jeweiligen Zyklus eingesetzten Phagemide als relativer Phagemidtiters halblogarithmisch aufgetragen. Die eluierten Phagemide wurden vor Einsatz im jeweils nächsten Selektionszyklus durch Infektion von *E. coli* XL1-Blue amplifiziert.

3.7.3 Analyse der angereicherten Phagemide

3.7.3.1 Nachweis von Bindungsaktivität durch *Colony Screening*

Zur Analyse der Bindungseigenschaften der angereicherten ApoD-Varianten wurden Phagemide aus dem fünften sowie achten Selektionszyklus eingesetzt. Dazu wurde *E. coli* XL1-Blue mit den Phagemiden infiziert und die Phasmid-DNA als Pool isoliert. Durch Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI wurde die Genkassette (322 bp) der selektierten ApoD-Varianten aus dem Phasmidvektor ausgeschnitten und auf dem Vektor pApoD12 durch Ligierung mit dessen durch analogen Verdau erhaltenen Fragment (3540 bp) (siehe Abschnitt 3.3.2) subkloniert. Nach Transformation von Zellen des *Amber*-Suppressorstammes *E. coli* TG1-F⁻ mit dem Ligierungsansatz wurden die Bakterien auf Membranen ausplattiert und zu Kolonien kultiviert. Das während der Induktion des *tet*-Promotors synthetisierte Fusionsprotein aus ApoD-Variante und ABD wurde auf einer zweiten, mit HSA beschichteten Membran immobilisiert.

ApoD-Varianten mit Bindungsaffinität zu humanem Hämoglobin wurden identifiziert, indem ihre Wechselwirkung mit Digoxigenin-markiertem Hämoglobin unter Verwendung eines Konjugats aus Anti-Digoxigenin-F_{ab}/Fragment und Alkalischer Phosphatase in einer chromogenen Reaktion nachgewiesen wurde (Abbildung 33). Auf den hydrophoben Membranen, auf denen die ApoD-Varianten immobilisiert worden waren, wurden punktförmige Färbungen erhalten, die sich zwar nur schwach vor dem Hintergrund abzeichneten, aber eindeutig einzelnen Kolonien auf der hydrophilen Membran zugeordnet werden konnten. Die starke Hintergrundfärbung könnte durch eine Wechselwirkung von Hämoglobin mit der Alkalischen Phosphatase erklärt werden (vgl. Abschnitt 3.8.2.1).

Die Durchmusterung der Phagemide aus dem fünften Selektionszyklus mittels des *Colony Screening*-Verfahrens führte zur Identifizierung von 16 Kolonien. Durch analoges Vorgehen konnten aus der Elutionsfraktion des achten Selektionszyklus vier Kolonien, die zu einem Farbsignal auf der Membran führten, identifiziert werden. Die stärksten Farbsignale wurden mit den Kolonien aus dem fünften Anreicherungszyklus erhalten, welche die als HbgA, HbgB, HbgC, HbgD, HbgE und HbgF bezeichneten ApoD-Varianten (Abschnitt 3.7.3.2) produzierten. Eine Kolonie, die eine als HbgG bezeichnete Variante produzierte, fiel durch eine im Vergleich zum Hintergrund hellere Färbung besonders auf. Der zur Kontrolle untersuchte Wildtyp des ApoD erzeugte dagegen im *Colony Screening*-Verfahren kein nennenswertes Farbsignal.

21	<i>BstXI</i>	41	60
<i>Lys</i>	<i>Tyr</i>	<i>Pro</i>	<i>Glu</i>
288	AAGTATCCAGGAAGTGGTACGAAATGAGAAGATCCCAACACCTTTGAGAAATGGACCTCCATCCAGGCCAACACTACTCATAATGAAAACCGAAAGATCAAAGTGTAAACCCAGGAG	407	TTT
HbgA
HbgB
HbgC
HbgD
HbgE
HbgF
HbgG
61	<i>ArgAlaAspGlyThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThrGluProAlaLysLeuGluValLysPheSerTrpPheMetProSerAlaProTyrTrpIle</i>	81	100
408	TTGAGAGCTGATGGAACTGTGAATCAAATCGAAGTGAAGCCACCCAGTAAACCTCACAGAGCTGCCAAGCTGGAAGTTAAGTTTCTGTTTATGTCATCGCACCGTACTCGGATC	527
HbgA
HbgB
HbgC
HbgD
HbgE
HbgF
HbgG
101	<i>LeuAlaThrAspTyrGluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerIleIleGlnLeuPheHisValAspPheAlaTrpIleLeuAlaArgAsnValAlaLeuProProGluThrVal</i>	121	140
528	CTGGCCACCGACTATGAGAAGTATGCCCTCGTGTATCCCTGATACAGTACATCAACACTTTTCCAGTGGATTTTGCCTGGATCTTGGCCAGAACGTTGGCTCTCCCTCCAGAACAGTG	647
HbgA
HbgB
HbgC
HbgD
HbgE
HbgF
HbgG

Abbildung 34. DNA- und Aminosäuresequenzen der ApoD-Varianten HbgA, HbgB, HbgC, HbgD, HbgE, HbgF und HbgG im Vergleich mit der Sequenz des ApoD. Gezeigt ist der Bereich der Aminosäurepositionen 21 bis 140 (entsprechend den Nukleotiden 288 bis 647 des Vektors pApoD10), der die gesamte, durch die *Bst*XI-

Schnittstellen (unterstrichen) flankierte Genkassette umfaßt. Die degenerierten Kodons für die gerichtete Zufallsmutagenese sowie die betroffenen Aminosäurepositionen sind rot eingezeichnet. *Amber*-Stoppkodons, welche in *supE*-Suppressorstämmen als Gln translatiert werden, wurden später zwecks effizienter Produktion mittels gerichteter Mutagenese durch Gln (violett) substituiert (Abschnitt 3.8.1). Der in HbgB auftretende Rest Cys123 wurde gegen Ser (blau) ausgetauscht, um die Bildung von Disulfidisomeren zu unterbinden. Die durch Einbau des Oligodesoxynukleotids MV-9 bei der Herstellung der Bibliothek eingeführte *XhoI*-Schnittstelle ist unterstrichen.

Position	ApoD	HbgA	HbgB	HbgC	HbgD	HbgE	HbgF	HbgG
34	<u>Thr</u>	Gln ^a	Phe	Ile	Tyr	Arg	<u>Thr</u>	Ala
35	<u>Thr</u>	Phe	Gln ^a	Gln ^a	Ala	Gln ^a	Met	Leu
36	<u>Phe</u>	Val	Val	<u>Phe</u>	<u>Phe</u>	Ile	<u>Phe</u>	<u>Phe</u>
37	<u>Glu</u>	Trp	Ser	Leu	Phe	Ser	Gln ^a	Trp
38	<u>Asn</u>	Met	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Phe
60	<u>Glu</u>	Phe	Val	His	Ala	Asp	<u>Glu</u>	Arg
62	<u>Arg</u>	<u>Arg</u>	Leu	His	Trp	Leu	Tyr	Ser
63	<u>Ala</u>	Ile	Tyr	Phe	<u>Ala</u>	Asn	Trp	Leu
64	<u>Asp</u>	Thr	Asn	Phe	Thr	Met	Tyr	Tyr
65	<u>Gly</u>	Leu	Val	Trp	Ser	Val	Asn	Gln
66	<u>Thr</u>	Asp	Tyr	Asn	Trp	Phe	Met	Ile
68	<u>Asn</u>	Trp	Thr	Leu	Val	Ala	Ile	Val
89	<u>Phe</u>	Glu	Leu	Val	Arg	<u>Phe</u>	Ser	Val
90	<u>Ser</u>	Gly	Thr	Gln	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	Val	Arg
91	<u>Trp</u>	Leu	Pro	Met	Arg	Gly	Leu	Pro
92	<u>Phe</u>	Gly	Leu	Val	Met	<u>Phe</u>	Tyr	Met
93	<u>Met</u>	Asp	Leu	Ser	Arg	<u>Met</u>	Val	Val
115	<u>Thr</u>	Glu	Met	Ala	Ser	Tyr	Ser	Gln ^a
117	<u>Ile</u>	Phe	Tyr	Phe	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	Tyr	Ser
118	<u>Ile</u>	Leu	<u>Ile</u>	Gln	Leu	Val	His	Ser
119	<u>Gln</u>	Trp	Thr	Leu	Trp	Ala	Leu	Ala
120	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	Val	Ser	Ile	Gln	Glu	Thr
121	<u>Phe</u>	<u>Phe</u>	Leu	Met	Asp	Tyr	<u>Phe</u>	Arg
123	<u>Val</u>	Trp	Cys ^b	Leu	Pro	Thr	Glu	Phe
103 ^c	<u>Thr</u>							Ile

Tabelle 4. Die Aminosäuren der selektierten ApoD-Varianten sowie des ApoD an den mutagenisierten Positionen. Aminosäuren, die mit der ursprünglich im ApoD vorhandenen Aminosäure übereinstimmen, sind unterstrichen. ^a*Amber*-Stoppkodon, in *supE*-Suppressorstämmen als Gln translatiert. ^bDas an dieser Position gefundene Cys wurde später gegen Ser ausgetauscht. ^cDiese Substitution entstand durch eine zufällige Mutation.

Bemerkenswerterweise handelte es sich hierbei um jene Kolonien, die im *Colony Screening*-Verfahren (Abschnitt 3.7.3.1) die auffälligsten Farbsignale erzeugt hatten. Dabei konnten

sieben verschiedene Sequenzen gefunden werden, deren Genprodukte als HbgA, HbgB, HbgC, HbgD, HbgE, HbgF und HbgG bezeichnet wurden. Die Variante HbgA war in zwei der Plasmide gefunden worden.

Die Gensequenzen der Plasmide der anderen acht Kolonien wiesen im Bereich ihrer ApoD-Genkassetten eine Verschiebung des Leserahmens durch Insertionen oder Deletionen auf, zudem besaßen diese Plasmide mehrfache *Amber*-Stoppkodons sowie mehrere eingefügte Cysteinreste. Auch vier Plasmide, die ausgehend von Phagemiden des achten Anreicherungszyklus erhalten worden waren, hatten in ihrer ApoD-Genkassette Deletionen oder Insertionen, die eine Verschiebung des Leserahmens bewirkten. Eine spezifische Interaktion der kodierten Apo-Varianten mit Hämoglobin konnte daher nicht angenommen werden.

Der Vergleich der Gensequenzen der ApoD-Varianten mit der Sequenz des rekombinanten Wildtyp-ApoD ergab, daß alle 24 in die Zufallsmutagenese einbezogenen Aminosäurepositionen tatsächlich randomisiert worden waren (siehe Tabelle 4). Mit Ausnahme von HbgD war es bei allen Varianten zum Einbau eines *Amber*-Stoppkodons gekommen, welches in fünf Fällen im ersten mutagenisierten Segment auftrat. Die Variante HbgB kodierte darüber hinaus für einen zusätzlichen Cysteinrest, was im Hinblick auf die eventuelle Entstehung von Disulfidisomeren oder Dimeren als ungünstig angesehen wurde.

Auffälligerweise war an insgesamt vier Positionen des ApoD der Charakter der ursprünglich vorhandenen Aminosäure in einigen selektierten Varianten beibehalten worden (Abbildung 35). Besonders war dies beim aromatischen Rest Phe36 im ersten Schleifenbereich der Fall, welcher entweder konserviert oder gegen die hydrophoben Reste Val oder Ile ausgetauscht worden war. Im dritten Schleifenbereich waren Ser90 und Phe92 in einigen Varianten gegen Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften substituiert worden, gleiches gilt für den Rest Ile117 im vierten die Faltblattstränge verbindenden Peptidsegment.

Aufgrund der relativ hohen Konservierung dieser Positionen kann angenommen werden, daß die Charakteristika der entsprechenden Aminosäuren für die Faltung des ApoD von Bedeutung sind. Gleichzeitig zeigt dies, daß das eingesetzte Anreicherungsverfahren einen Selektionsdruck in Richtung funktioneller Varianten ausübte.

Bei den Varianten HbgC, HbgF und HbgG war jeweils eine Base außerhalb der randomisierten Positionen zusätzlich mutiert, was nur im Fall von HbgG zu einem Aminosäureaustausch (Thr103 zu Ile) führte. Diese Basenaustausche konnten auf statistische Fehler der *Taq*-DNA-Polymerase bei der zur Erzeugung der Gensequenzen verwendeten PCR oder auf Fehler bei der Replikation der einzelsträngigen Phagemid-DNA zurückgeführt werden.

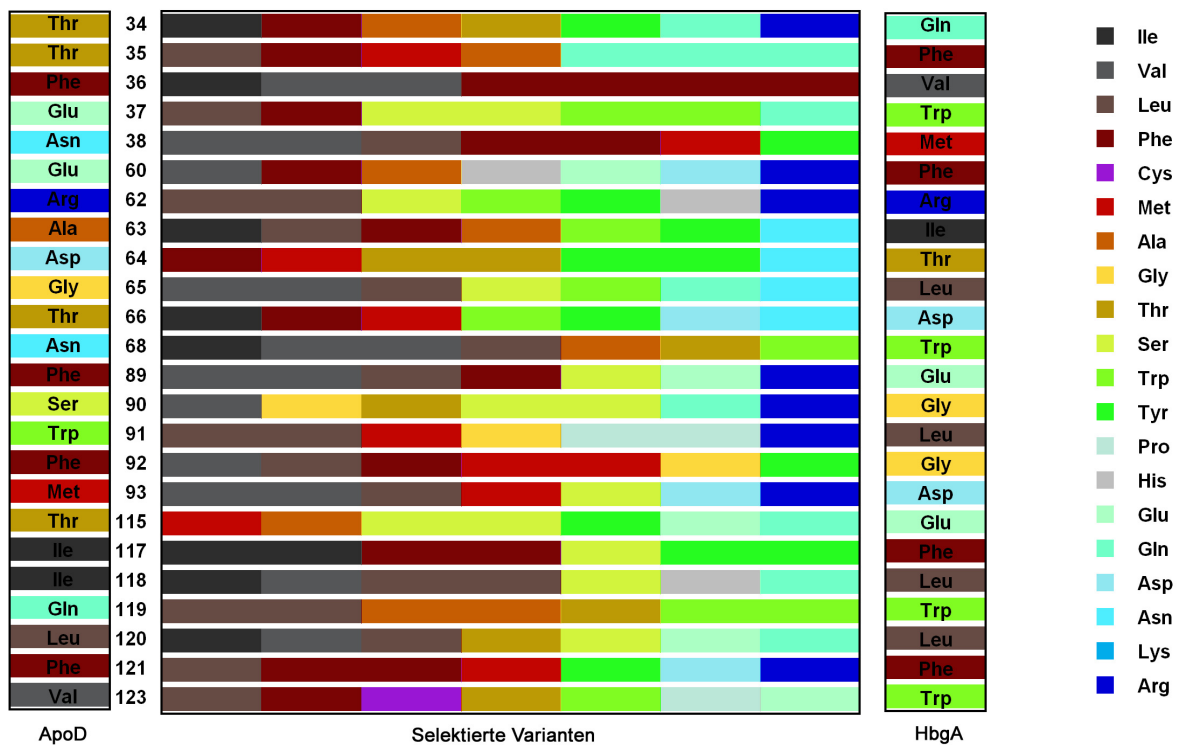


Abbildung 35. Die in sieben selektierten Varianten des ApoD gefundenen Aminosäuren (Bildmitte), die bei den im Wildtyp-ApoD (links) randomisierten Positionen auftraten. Die Aminosäuren sind entsprechend abnehmender Hydrophathie nach Kyte & Doolittle (1982) sortiert und mit einem Farbkode (siehe Legende, ganz rechts) gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die an den entsprechenden Positionen der zweifach gefundenen Variante HbgA auftreten, sind rechts separat noch einmal angegeben.

3.8 Charakterisierung selektierter Varianten aus der ApoD-Bibliothek II

3.8.1 Gentechnische Produktion und Reinigung der selektierten Varianten

Zur gentechnischen Herstellung der Varianten wurden die Strukturgene zunächst im Expressionsvektor pApoD10 (Abschnitt 3.4.1.1) mittels der beiden *Bst*XI-Schnittstellen subkloniert. Um die Translation des ApoD-Strukturgens – samt *Strep*-tag II – in dem das *Amber*-Stoppkodon nicht supprimierenden Stamm *E. coli* JM83 zu ermöglichen, welcher sich schon bei der Produktion des rekombinanten Wildtyp-ApoD als besonders geeignet herausgestellt hatte (Abschnitt 3.1.3), wurden die in den selektierten Varianten aufgetretenen *Amber*-Stoppkodons (TAG) unter Verwendung geeigneter Oligodesoxynukleotide (HbgA: MV-21; HbgB: MV-23; HbgC: MV-25; HbgE: MV-22; HbgF: MV-26; HbgG: MV-20) mittels ortsgerechter Mutagenese jeweils durch ein Glutamin-Kodon (CAG) substituiert. Zur Vermeidung von Disulfidisomeren oder Dimeren wurde mittels des Oligodesoxynukleotids MV-24 der in HbgB durch TGT kodierte Rest Cys123 gegen Ser mit dem kodierenden Basentriplett TCT

ausgetauscht. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde in allen Fällen durch DNA-Sequenzanalyse mittels der *Primer* MV-1 oder MV-2 bestätigt.

Die Proteinproduktion wurde im präparativen Maßstab (Abschnitt 2.2.11.1) durchgeführt und die Varianten anschließend mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) aus dem Periplasma von JM83 isoliert. Die ApoD-Varianten HbgA, HbgB, HbgC, HbgD, HbgE und HbgF ließen sich mit ähnlichen Ausbeuten wie das rekombinante Wildtyp ApoD gewinnen (HbgA: 200 µg/l_{Kulturmedium}). Die Variante HbgG konnte mit der beschriebenen Verfahrensweise jedoch nicht hergestellt werden.

Eine Analyse mittels SDS-PAGE ergab, daß sich die gentechnisch produzierten ApoD-Varianten HbgA, HbgB, HbgE und HbgF durch Streptavidin-Affinitätschromatographie im Einschritt-Reinigungsverfahren mit nur geringen Kontaminationen durch Wirtsproteine isolieren ließen (Abbildung 36). Hingegen waren bei den Varianten HbgC und HbgD deutliche Verunreinigungen durch bakterielle Proteine zu erkennen.

Für den Einsatz zur Bindungsanalyse durch Oberflächen-Plasmonresonanz (siehe Abschnitt 3.8.2.2) wurden HbgA und Wildtyp-ApoD auch als Fusionsproteine mit der Albuminbindenden Domäne (ABD) in JM83 hergestellt. Dazu wurde die Genkassette des für HbgA kodierenden Vektors über die beiden *Bst*XI-Schnittstellen ausgeschnitten und auf dem Vektor pApoD12 (siehe Abschnitt 3.3.2) subkloniert. Durch Streptavidin-Affinitätschromatographie konnten die Fusionsproteine in gereinigter Form aus dem periplasmatischen Zellextrakt isoliert werden.

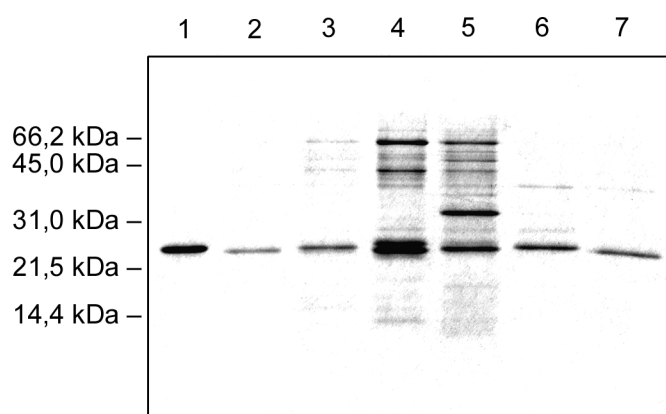


Abbildung 36. SDS-PAGE-Analyse der in *E. coli* JM83 mittels des Expressionsvektors pApoD10 hergestellten und im Einschrittverfahren durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten ApoD-Varianten sowie des Wildtyp-ApoD. ApoD (Spur 1), HbgA (Spur 2), HbgB (Spur 3), HbgC (Spur 4), HbgD (Spur 5), HbgE (Spur 6) und HbgF (Spur 7) wurden jeweils direkt als Eluat der Affinitätschromatographie aufgetragen (je 20 µl). Die Abbildung zeigt ein 15 %iges SDS-Gel nach Anfärbung mit Coomassie Brilliantblau.

3.8.1.1 CD-spektroskopische Analyse der Variante HbgA

Um Informationen über die Sekundärstruktur der ApoD-Variante HbgA zu gewinnen, wurde das CD-Spektrum im Bereich des fernen UV (190 nm bis 250 nm) aufgenommen (Abbildung 37). Das Spektrum zeigt den für β -Faltblattproteine typischen Verlauf der molaren Elliptizität mit einem lokalen Maximum bei einer Wellenlänge von 195 nm und einem breiten lokalen Minimum bei 210 nm. Zum Vergleich wurden die Spektren des rekombinanten ApoD, hergestellt mit den Vektoren pApoD5 (siehe Abschnitt 3.1.2) sowie pApoD10 (siehe Abschnitt 3.4.1.1), herangezogen. Beiden Vektoren kodieren für das Wildtyp-ApoD, allerdings enthält das Genprodukt von pApoD10 die Mutationen Leu23Pro, Pro133Val und Asn134Ala, die mit der Einführung von *Bst*XI-Schnittstellen in das Strukturgen des ApoD einhergegangen waren.

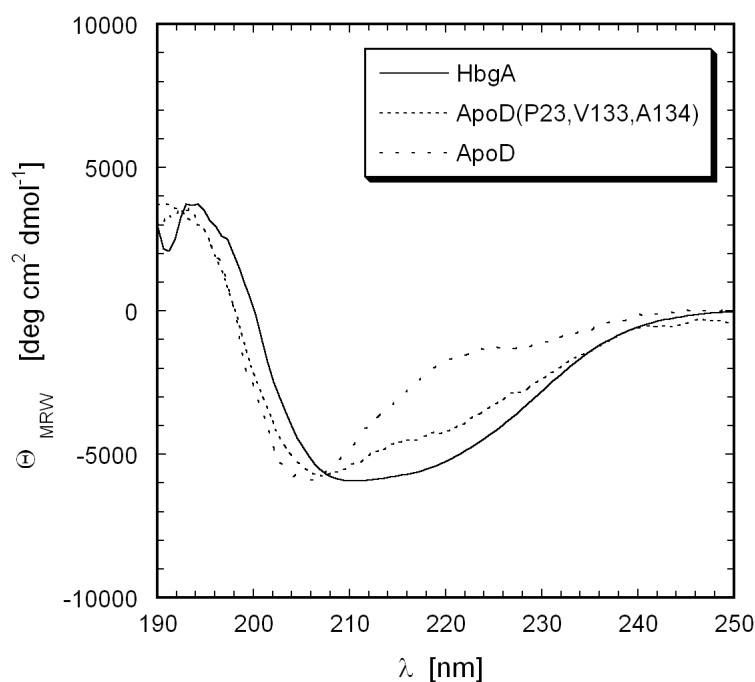


Abbildung 37. CD-Spektrum der ApoD-Mutante HbgA im Vergleich mit den Spektren von ApoD und ApoD(P23,V133,A134). Die Spektren wurden durch Überlagerung von je 16 Einzelspektren erhalten. Die Proteinlösungen wiesen eine Konzentration von 7 μM bis 15 μM in 10 mM NaPi (pH 7,5) auf. Die experimentell gemessene Elliptizität θ_{Obs} wurde in die molare Elliptizität θ_{MRW} umgerechnet (siehe Abschnitt 2.4.2).

Die Spektren aller drei Proteine zeigen Ähnlichkeit. Die Spektren von HbgA und ApoD(P23,V133,A134) sind annähernd deckungsgleich, obwohl HbgA im Vergleich zu diesem Protein, auf dessen Basis die Zufallsbibliothek konstruiert worden war, 21 Aminosäuresubstitutionen enthält (vgl. Tabelle 4). Dagegen machten sich die Mutationen Leu23Pro, Pro133Val und Asn134Ala im Spektrum bemerkbar, wie der Vergleich mit dem rekombinanten Wildtyp-ApoD zeigt. Alle drei Positionen liegen im Strukturmodell des ApoD (siehe Abbildung 3) in den Schleifenregionen auf der verschlossenen Seite der Faßstruktur. Trotz ihrer vorhergesagten Anordnung auf der Außenseite des β -Fasses deutet das Spektrum

darauf hin, daß der Austausch zu Änderungen in der Sekundärstruktur führte. Bemerkenswerterweise zeigen die Spektren von HbgA und ApoD(P23,V133,A134) eine größere Ähnlichkeit zum Spektrum des BBP (siehe Abbildung 10) als das ApoD.

Aus den CD-Messungen konnte geschlossen werden, daß in der ApoD-Variante HbgA die für die Lipocaline typische β -Faltblattstruktur im wesentlichen erhalten geblieben war. Damit konnte gezeigt werden, daß die Proteinarchitektur des ApoD den Austausch von Aminosäurepositionen in den Peptidschleifen ohne drastische Veränderung der Sekundärstruktur toleriert.

3.8.2 Quantifizierung der Bindungseigenschaften isolierter Varianten

3.8.2.1 ELISA

Um die Bindungseigenschaften der ApoD-Varianten HbgA, HbgB, HbgC, HbgD, HbgE und HbgF, die in *E. coli* im präparativen Maßstab hergestellt wurden, zu humanem Hämoglobin zu untersuchen, wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit Hämoglobin beschichtet und anschließend mit Lösungen der gereinigten Varianten inkubiert. Gebundene ApoD-Varianten sollten anschließend über das *Strep*-tag II mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch chromogene Reaktion nachgewiesen werden.

Dabei wurde in allen mit Hämoglobin beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte ein Farbsignal festgestellt, welches von der Konzentration der ApoD-Variante unabhängig war und deshalb vermutlich auf eine Wechselwirkung von Hämoglobin mit Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat zurückzuführen war. Diese unerwünschte Interaktion machte eine Bestimmung der Bindungsaffinitäten selektierter ApoD-Varianten zu Hämoglobin mittels des beschriebenen ELISA-Aufbaus unmöglich, da ein durch ein Bindungsereignis zwischen ApoD-Varianten und Hämoglobin entstandenes Farbsignal durch die Hintergrundfärbung maskiert würde.

3.8.2.2 Oberflächen-Plasmonresonanz

Da das von HbgA im *Colony Screening*-Verfahren erzeugte Farbsignal intensiver als das der anderen mittels der Affinitätsanreicherung isolierten ApoD-Varianten war (siehe Abschnitt 3.7.3.1) und HbgA als sekretiertes Protein zweier verschiedener Kolonien identifiziert worden war, wurde die Wechselwirkung von HbgA und humanem Hämoglobin mittels Oberflächen-Plasmonresonanz analysiert. Mit dieser Methode (siehe Abschnitt 2.4.3) lassen sich Bindungsereignisse mit hoher Empfindlichkeit detektieren (Huber *et al.*, 1999).

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Molekülen mittels Oberflächen-Plasmonresonanz wird einer der Bindungspartner auf einem Sensorchip immobilisiert, während die zweite, als Analyt bezeichnete Molekülspezies die Sensoroberfläche überspült. Bei der Interaktion der Bindungspartner kommt es zu einem stationären Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation. Aus den im Gleichgewichtszustand bei verschiedenen Konzentrationen gemessenen Intensitäten des Oberflächen-Plasmonresonanz-Signals läßt sich die Komplex-Dissoziationskonstante ermitteln (siehe Abschnitt 2.4.3). Prinzipiell waren zwei Strategien zur Interaktionsanalyse von HbgA und humanem Hämoglobin möglich, die sich darin unterschieden, welcher der Bindungspartner auf der Sensoroberfläche immobilisiert wurde. Um die bessere Vorgehensweise zur Quantifizierung einer Bindung von HbgA und Hämoglobin zu ermitteln, wurden beide Strategien verfolgt.

Es gelang, HbgA über freie Aminogruppen kovalent mit der Carboxymethyldextran-Matrix zu verknüpfen, was anhand der deutlichen Zunahme des Resonanzsignals detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 2.4.3). Die Applikation von Hämoglobin-Lösungen verschiedener Konzentrationen führte jeweils zu einem Ansteigen des Resonanzsignals. Bei Kontrollexperimenten, bei denen anstelle von HbgA das Wildtyp-Protein ApoD auf der Sensoroberfläche immobilisiert worden war, veränderte sich die Plasmonresonanz allerdings um den gleichen Betrag, so daß das veränderte Resonanzverhalten nicht auf ein spezifisches Bindungsphänomen deutete. Die Zunahme des Resonanzsignals mußte deshalb auf die bereits beim *Colony Screening* und im ELISA beobachtete Tendenz des Hämoglobins zur unspezifischen Wechselwirkung mit Proteinen und Oberflächen zurückgeführt werden.

Eine Alternative zur direkten Immobilisierung der ApoD-Variante HbgA auf der Sensoroberfläche stellte die Verwendung des Fusionsproteins mit der Albumin-bindenden Domäne (ABD) dar. Entsprechende Vorexperimente zeigten, daß sich HSA über seine freien Aminogruppen effizient an die Carboxymethyldextran-Matrix der Sensoroberfläche koppeln ließ. Sowohl gereinigtes HbgA als auch ApoD (siehe Abschnitt 3.8.1) konnten auf einer so derivatisierten Sensoroberfläche mittels der an den C-Terminus fusionierten ABD reversibel immobilisiert werden. Dabei führte der konstante Flüssigkeitsstrom zu stetigem Abtransport von dissoziiertem Fusionsprotein und so zu einer geringen zeitabhängigen Abnahme des Resonanzsignals.

Mit der auf diese Weise immobilisierten ApoD-Variante HbgA wurden Bindungsexperimente durchgeführt, indem Hämoglobin-Lösungen über die Sensoroberfläche geleitet wurden. Dabei konnte ein Anstieg des Resonanzsignals bis zu einem Maximalwert gemessen werden, der von der Konzentration der Hämoglobin-Lösung abhängig war. Die erfaßten Resonanzsignale wurden um den Wert korrigiert, der für eine nur mit HSA, nicht aber dem Fusionsprotein beschichteten Sensoroberfläche erhalten wurde. Bei analogen Experimenten, die mit dem Fusionsprotein aus ApoD und ABD durchgeführt worden waren, wurde bei Applikation von Hämoglobin allerdings ebenfalls eine Zunahme des Resonanzsignals festgestellt. Die mit

HbgA gemessenen und korrigierten Änderungen des Resonanzsignals waren aber signifikant größer als die in entsprechenden Experimenten für den das rekombinante Wildtyp-ApoD erhaltenen Werte, welche zudem nicht das bei Versuchen mit HbgA beobachtete Sättigungsverhalten aufwiesen. Dies sprach für eine besondere Interaktion von HbgA und Hämoglobin.

Eine zweite Strategie bestand in der Immobilisierung des humanen Hämoglobins auf der Sensoroberfläche und der Verwendung von HbgA beziehungsweise ApoD als Analyt. Hämoglobin konnte über seine freien Aminogruppen kovalent mit der Sensoroberfläche verknüpft werden. Bindungsversuche mit HbgA als Analyt zeigten einen deutlichen Anstieg des um das Signal eines nicht derivatisierten Kanals korrigierten Resonanzsignals bis zu einem konzentrationsabhängigen Gleichgewichtswert (siehe Abbildung 38A).

Dagegen wurde bei Verwendung von ApoD als Analyt keine Zunahme des Resonanzsignals detektiert. Die erhaltenen Gleichgewichtswerte wurden gegen die Konzentration der Analyten aufgetragen (Abbildung 38B). Die Komplex-Dissoziationskonstante K_D konnte mittels nicht-linearer Regression bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.4.3) und betrug für die Bindung von HbgA und Hämoglobin $2,16 \pm 0,36 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu zeigte ApoD keine meßbare Bindungsaffinität zu Hämoglobin (Tabelle 5).

Durch die Berechnung des Quotienten aus der Sättigungskonzentration von HbgA und der Konzentration des auf der Sensoroberfläche gekoppelten Hämoglobins konnte unter Berücksichtigung der molekularen Masse beider Spezies sowie der Kenntnis, daß ein Resonanzsignal von 1000 RU einer Flächenkonzentration von 1 ng/mm^2 entspricht, ein Bindungsverhältnis von 0,275 Molekülen HbgA auf ein Hämoglobin-Tetramer ermittelt werden.

Um die Spezifität der Bindung von HbgA zu Hämoglobin zu ermitteln, wurde die Wechselwirkung des Anticalins mit den Proteinen BSA und Myoglobin mittels Oberflächen-Plasmonresonanz analysiert. Dazu wurde die Sensoroberfläche kovalent mit dem potentiellen Bindungspartner derivatisiert und HbgA bzw. ApoD in verschiedenen Konzentrationen als Analyt eingesetzt, um die Gleichgewichtswerte der Interaktion zu ermitteln. Die mit immobilisiertem BSA durchgeführten Messungen ergaben, daß dieses Serumprotein mit dem Anticalin HbgA keine Wechselwirkung eingeht. Hingegen zeigte sich eine Bindung von HbgA an das immobilisierte Myoglobin, für die eine Komplex-Dissoziationskonstante K_D von $16,86 \pm 11,38 \mu\text{M}$ ermittelt werden konnte. Eine Affinität des rekombinanten Wildtyp-ApoD zu BSA oder Myoglobin ließ sich dagegen nicht nachweisen.

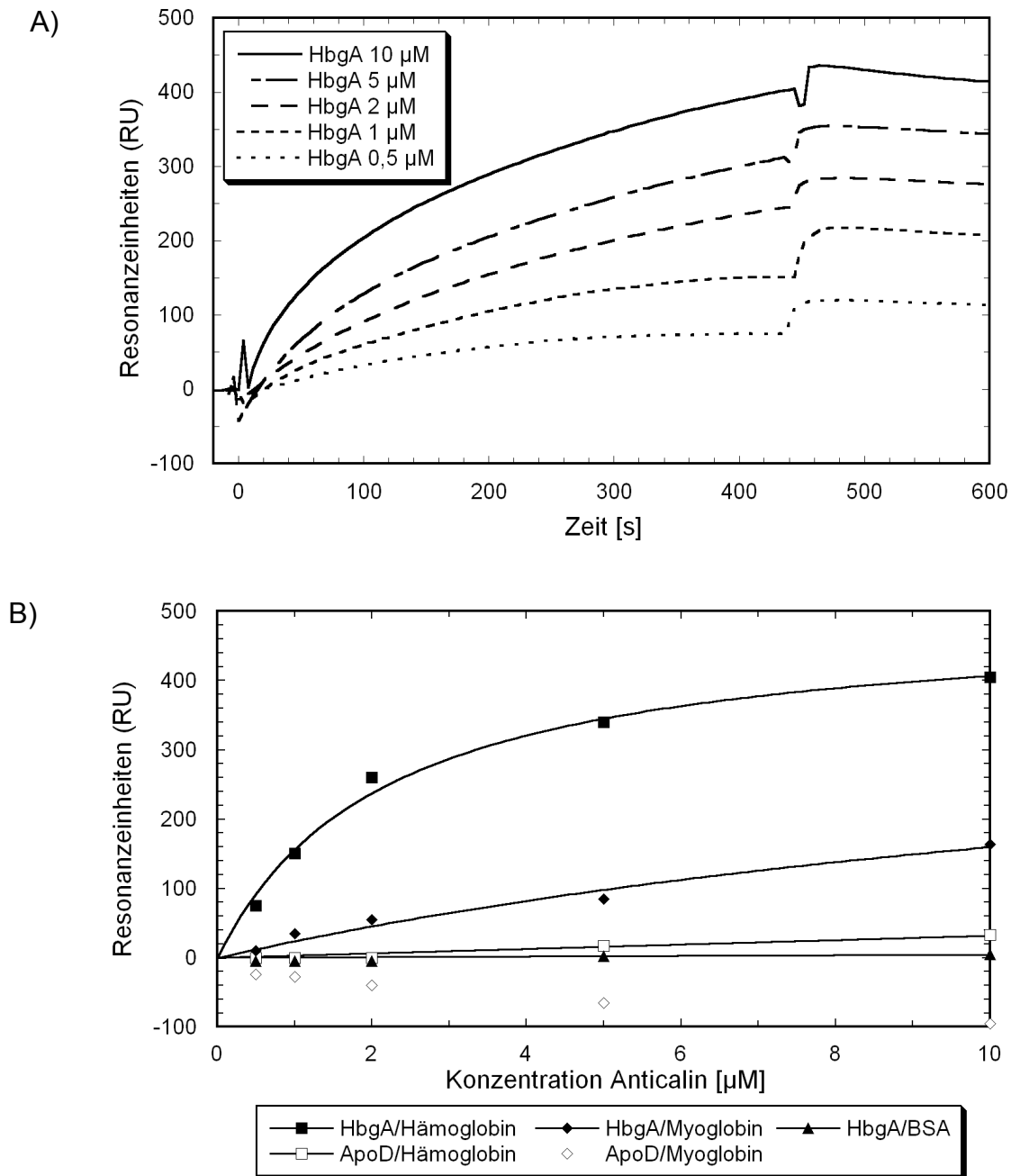


Abbildung 38. Ermittlung von Affinität und Spezifität der Bindung von HbgA an humanes Hämoglobin mittels Oberflächen-Plasmonresonanz. **A)** Auf der Carboxymethyl-dextran-Matrix der Sensoroberfläche war humanes Hämoglobin (5000 RU) kovalent immobilisiert worden. Lösungen von HbgA im Konzentrationsbereich von 0,5 μM bis 10 μM wurden über die Sensoroberfläche geleitet und die Zunahme des Resonanzsignals aufgenommen. Die Meßkurven wurden um die Signale korrigiert, die parallel auf einer nicht mit Hämoglobin derivatisierten Sensoroberfläche detektiert wurden. **B)** Die Gleichgewichtswerte, die dem maximalen Resonanzsignal (siehe A) entsprachen, wurden gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. In analog durchgeführten Experimenten wurden Myoglobin oder BSA kovalent auf Sensoroberflächen immobilisiert (jeweils 5000 RU) und mit HbgA oder ApoD als Analyt die Gleichgewichtswerte der Wechselwirkung gemessen. Mittels nichtlinearer Regression wurde – soweit möglich – die apparente Komplex-Dissoziationskonstante ermittelt (Tabelle 5).

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß das aus der ApoD-Bibliothek II isolierte Anticalin HbgA den vorgegebenen Proteinliganden Hämoglobin mit einer Komplex-Dissoziationskonstante in der gleichen Größenordnung komplexiert, wie sie für die Wechselwirkung von ApoD zu seinen natürlichen Hapten-Liganden gemessen wurde (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Die Bindung von HbgA zu Hämoglobin ist spezifisch, da BSA gar nicht und Myoglobin mit nur geringer Affinität komplexiert wird. Die schwächere Bindung an Myoglobin ist angesichts der bekannten strukturellen Homologie von Hämoglobin und Myoglobin durchaus plausibel.

K_D / μM	HbgA	ApoD
Hämoglobin	2,16 ± 0,36	n. b.
Myoglobin	16,86 ± 11,38	n. b.
BSA	n. b.	–

Tabelle 5. Komplex-Dissoziationskonstanten (K_D) für die Bindung von HbgA und ApoD an die Proteine Hämoglobin, Myoglobin sowie BSA. Die K_D-Werte wurden abgeschätzt, indem die mittels Oberflächen-Plasmonresonanz gemessenen Gleichgewichtswerte (in RU) gegen die Anticalin-Konzentration aufgetragen und durch nichtlineare Regression angepaßt wurden (siehe Abbildung 38). Nicht bestimmbare K_D-Werte sind mit „n. b.“ bezeichnet.

4 Diskussion

4.1 Die bakterielle Produktion des humanen ApoD

Obwohl das Apolipoprotein D als Bestandteil des humanen Plasmas seit den siebziger Jahren bekannt ist und es mittlerweile in zahlreichen Geweben wie auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen wurde, ist seine physiologische Bedeutung bis heute weitgehend ungeklärt. Vor diesem Hintergrund war es erstaunlich, daß in der Fachliteratur die gentechnische Herstellung dieses humanen extrazellulären Lipocalins und dessen Charakterisierung bisher nicht beschrieben worden war.

Nennenswerte Mengen der mRNA des ApoD waren in der Leber des Menschen nachgewiesen worden (Drayna *et al.*, 1986). Deshalb wurde zur Klonierung seines Gens in dieser Arbeit eine kommerziell erhältliche cDNA-Bank verwendet.

Zur bakteriellen Produktion des ApoD wurde eine Strategie angewandt, welche bereits erfolgreich zur Herstellung zweier anderer Lipocaline – des Retinol-Bindungsproteins (Müller & Skerra, 1993) und des Bilin-Bindungsproteins (Schmidt & Skerra, 1994) – verfolgt worden war. Dabei kam der universelle Plasmidvektor pASK75 (Skerra, 1994) zum Einsatz, bei dem die rekombinante Genexpression durch den Tetracyclin-Promotor gesteuert ist. Dieses Promotor/Operator-System vereint die Eigenschaft einer beinahe vollständigen Repression während der Wachstumsphase der Bakterien mit einer starken Promotoraktivität nach Induktion mit Anhydrotetracyclin und erfüllt damit in idealer Weise die Anforderungen, die an ein effizientes System zur Transkriptionsregulation heterologer Gene gestellt werden (Makrides, 1996). Das durch den prokaryontischen Organismus *E. coli* im Cytosol synthetisierte Protein wurde mittels der bakteriellen OmpA-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) in den periplasmatischen Raum sekretiert, wobei die Tatsache ausgenutzt wurde, daß sich die Sekretionsmechanismen in pro- und eukaryontischen Organismen weitgehend gleichen. Der Proteinexport über die cytoplasmatische Membran wird dabei in Gram-negativen Bakterien vom Translocase-Komplex katalysiert (Übersichten in: Wickner & Leonard, 1996; Driessen *et al.*, 2001).

Die Translokation des ApoD ins Periplasma besitzt eine Reihe von Vorteilen. So erlaubt das oxidierende Milieu in diesem Zellkompartiment die funktionelle Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen (Übersicht in: Missiakis & Raina, 1997), wohingegen im Cytoplasma reduzierende Bedingungen herrschen. Ein weiterer Vorteil im Hinblick auf die Funktionalität des heterologen Expressionsproduktes ist die Tatsache, daß die Proteaseaktivität im periplasmatischen Raum geringer ist als im Cytoplasma (Talmadge & Gilbert, 1982). Für die vereinfachte Isolierung des Proteins ist außerdem entscheidend, daß im Periplasma nur ca. 100 der insgesamt 1100 Proteinspezies des Wirtsorganismus *E. coli* vorliegen und insofern die Anzahl

abzutrennender Proteine durch die Zellfraktionierung bereits signifikant verringert werden kann.

Bei der gentechnischen Produktion mancher Proteine in *E. coli* kommt es durch die Überlastung des Sekretionsapparates zur Akkumulation des Präproteins im Cytoplasma. Die Interaktion von exponiert vorliegenden, hydrophoben Bereichen des ungefalteten Proteins im Periplasma mit der Zellmembran kann zu einer Permeabilisierung führen, wodurch es in manchen Fällen zur Lyse des Wirtsbakteriums kommt (Skerra, 1989). Ein solcher Effekt kann die bei der Proteinproduktion in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.1) festgestellte Instabilität der Zellen sowie deren teilweise Lyse erklären, die im Vergleich zur rekombinanten Produktion anderer Lipocaline (Müller & Skerra, 1993; Schmidt & Skerra, 1994) verstärkt auftrat. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß bakterielle Lipocaline, die eine für diese Proteinfamilie relativ hohe Sequenzhomologie von 30 % zu ApoD zeigen, assoziiert mit der äußeren Zellmembran gefunden wurden (Bishop *et al.*, 1995). Die im Laufe dieser Arbeit beobachtete Kontamination mit Wirtspoteinen bei der Reinigung des ApoD, insbesondere im Zusammenhang mit der Fermentation, deutet ebenfalls auf eine Assoziation mit Komponenten der Bakterienmembran. Diese Verunreinigungen konnten letztlich durch die Wahl eines anderen *E. coli* Stammes (siehe Abschnitt 3.1.4) vermieden werden, so daß das ApoD aus dem periplasmatischen Raum mit Hilfe des Affinitätsanhängsels *Strep*-tag II (Skerra & Schmidt, 2000) in hoher Reinheit gewonnen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.4).

Der im monomeren ApoD ungepaart vorliegende Cysteinrest 116 war zur gentechnischen Produktion gegen Serin substituiert worden. Cys116 dient beim humanen ApoD zu einer kovalenten Verknüpfung mit dem Apolipoprotein A-II (Yang *et al.*, 1994), fehlt aber im ApoD von Nagetieren (Provost *et al.*, 1990). Da das Protein trotzdem in den Lipoproteinen von Hasen nachgewiesen werden konnte, hat Cys116 wohl für die Assoziation des ApoD mit den Plasmalipoproteinen nur fakultative Bedeutung. Für die beobachtete Interaktion scheinen demnach exponierte, ausgeprägt hydrophobe Bereiche auf den an der Komplexbildung beteiligten Molekülspezies verantwortlich zu sein. Entsprechend zeigt die vermutete Kontaktstelle auf der Außenseite des β -Barrels beim Maus-ApoD einen noch deutlicher hydrophoben Charakter als beim humanen ApoD, da hier kein Cysteinrest vorhanden ist, der die Assoziation von ApoD und Apo A-II kovalent stabilisiert.

Tatsächlich ließ sich das ApoD als lösliches Protein mit ausgebildeten Disulfidbrücken aus *E. coli* isolieren, wobei weder Proteindimere noch Disulfidisomere auftraten. Die durch Massenspektrometrie bestimmte Molekülmasse entsprach dem für das prozessierte ApoD unter Berücksichtigung der Ausbildung von Disulfidbrücken ermittelten theoretischen Wert. Das CD-Spektrum des rekombinanten ApoD zeigte die Charakteristika eines gefalteten Proteins mit hohem β -Faltblattanteil.

Bemerkenswerterweise zeigte sich durch N-terminale Sequenzierung des in *E. coli* produzierten ApoD, daß der nach der Prozessierung der Signalsequenz am Aminoterminus befindliche Glutamin-Rest nicht als Pyroglutamat vorlag und damit nicht für den Edman-Abbau blockiert war, was massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten. Diese posttranslationale Modifikation war für das natürliche Protein, welches aus Cystenflüssigkeit (Balbín *et al.*, 1990) oder aus dem Plasma (Drayna *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1994) isoliert worden war, wiederholt beschrieben worden. Auch andere aus Mammalia isolierte Lipocaline, wie das murine 24p3 (Chu *et al.*, 1997) und dessen humanes Homologes, das Neutrophil-Gelatinase-assoziierte Lipocalin (Kjeldsen *et al.*, 2000), sowie das Aphrodisin des Hamsters (Henzel *et al.*, 1988) weisen einen zyklisierten N-terminalen Glutamatrest auf.

In eukaryontischen Organismen verläuft die Pyroglutamat-Bildung extrazellulärer Proteine und Peptide spontan oder enzymkatalysiert. Nichtenzymatisch bildet sich Pyroglutamat vor allem in Gegenwart von Phosphationen (Blombäck, 1968). Bei einigen Peptidhormonen kommt es unter Einfluß der Glutaminyl-Cyclase (GC) zur Entstehung des N-terminalen Pyroglutamates (Busby *et al.*, 1987; Fischer & Spiess, 1987). Die mRNA der GC konnte in der bovinen Hypophyse (Pohl *et al.*, 1991) und später in zahlreichen weiteren Geweben des Rindes nachgewiesen werden, wobei die GC-Aktivität in Thymus und Milz deutlich höher als in anderen untersuchten Geweben war (Sykes *et al.*, 1999).

Die N-terminale Pyroglutamat-Bildung dient vermutlich der Erhöhung der proteolytischen Stabilität entsprechender Proteine und Peptide. Über das Auftreten von N-terminalen Pyroglutamatresten in prokaryontischen Organismen ist vergleichsweise wenig bekannt. Bei einigen bakteriell hergestellten Proteinen konnte diese posttranslationale Modifikation aber eindeutig nachgewiesen werden (Danse *et al.*, 1994; Steinrücke *et al.*, 1987).

4.2 Liganden-Bindungseigenschaften des ApoD: Hinweise auf die physiologische Funktion

Die hier etablierte Produktion des rekombinanten humanen ApoD in guter Ausbeute und hoher Reinheit ermöglichte erstmals die Durchführung ausführlicher Liganden-Bindungsstudien. Das in *E. coli* hergestellte Protein zeichnet sich im Vergleich zum humanen ApoD durch bessere Homogenität aus, denn dessen Glykosylierungsmuster und der Oxidationszustand des ungepaarten Cys116 variieren in Abhängigkeit von Gewebe oder Gewebsflüssigkeit, aus denen ApoD isoliert wird (Zeng *et al.*, 1996).

Die Liganden-Bindungsstudien mit dem rekombinanten ApoD zeigten, daß die Steroidverbindung Progesteron mit einer Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich komplexiert wird. Ein solches Bindungsverhalten war auch für das aus natürlicher Quelle isolierte ApoD berichtet worden (Dilley *et al.*, 1990). Die dabei mittels Gleichgewichtsdialyse

ermittelten Bindungsaffinitäten stehen in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durch Fluoreszenztitration bestimmten Werten. Die von Dilley *et al.* (1990) beobachtete pH-Abhängigkeit der Bindung von Progesteron, welche sich in einer Zunahme der Affinität hin zu aciden pH-Werten äußerte, zeigte sich auch bei dem bakteriell hergestellten Protein. Bemerkenswerterweise veränderte sich neben der Affinität zu dem Steroid auch die molare Fluoreszenz des Protein-Liganden-Komplexes in pH-abhängiger Weise. Ein solches Verhalten kann durch titrierbare Seitenketten erklärt werden. Anhand des Strukturmodelles des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) konnten in der räumlichen Umgebung aller vier Tryptophanreste des Proteins entsprechende Aminosäuren identifiziert werden.

Für den Rest Trp26, der sich auf Faltblattstrang A befindet und in das Zentrum der Kavität weist, scheint eine Wechselwirkung mit den am geschlossenen Ende des Hohlraumes gelegenen Resten Asp104 oder Glu106 möglich. Die Protonierung von Glu28 oder insbesondere Glu37 könnte die Fluoreszenz des ebenfalls inmitten der Bindungstasche situierten Restes Trp127 beeinflussen. Vor diesem Hintergrund sind auch die Reste Glu71 und Glu86 in Verbindung mit Trp91, sowie Glu15 und Glu81 und ihre sterische Orientierung in Bezug auf Trp99 in Betracht zu ziehen, wobei die Lage dieser Tryptophanreste auf der Außenseite der Faltblattstruktur einen Einfluß auf die Komplexierungseigenschaften eher unwahrscheinlich macht. Experimentelle Versuche mittels Titration zur Ermittlung des pK_A -Wertes der entsprechenden Seitenkette durch Titration blieben aber erfolglos.

Im Gegensatz zu Progesteron wird die verwandte Steroidverbindung Testosteron von ApoD nicht komplexiert. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Dilley *et al.*, 1990). Eine Komplexbildung von ApoD mit Pregnenolon – obwohl für das natürliche Protein beschrieben (Dilley *et al.*, 1990) – wurde dagegen nicht detektiert. In der früheren Studie war jedoch die Homogenität des aus Cystenflüssigkeit isolierten Proteins nicht gezeigt worden, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß die dort beobachtete Bindung auf ein kontaminierendes Protein zurückzuführen ist.

Auch für die Verbindungen *E*-3M2H und Bilirubin konnte keine Affinität im physiologisch relevanten Bereich detektiert werden. Die erstgenannte Verbindung war zusammen mit ApoD aus dem Sekret der Achselschweißdrüsen isoliert worden (Zeng *et al.*, 1996). Allerdings wurde postuliert, daß *E*-3M2H erst durch Verseifung beziehungsweise bakteriellen Abbau des ApoD freigesetzt wird (Spielman *et al.*, 1995). Dementsprechend könnte ein höhermolekularer Vorläufer von ApoD komplexiert oder mit diesem sogar kovalent verknüpft sein.

Die strukturelle Homologie des ApoD zum BBP veranlaßte Peitsch & Boguski (1990), die Komplexierung von Bilirubin zu postulieren. Eine solche Funktion des ApoD konnte allerdings bis heute auch nicht durch andere experimentelle Daten untermauert werden.

Unzweifelhaft ließ sich dagegen die bereits von Morais-Cabral *et al.* (1995) beschriebene Komplexierung von Arachidonsäure durch das rekombinante ApoD nachweisen. Die im

Rahmen dieser Arbeit bestimmte Komplex-Dissoziationskonstante von 3 μM unterschied sich zwar um mehrere Größenordnungen von dem für das natürliche Protein – ebenfalls durch Fluoreszenztitration ermittelten – veröffentlichten Wert (6 nM), allerdings war das dort eingesetzte Protein aus Brustkrebs-Cystenflüssigkeit nicht genauer charakterisiert worden. Zudem waren die Bindungsstudien im neutralen pH-Bereich durchgeführt worden, bei dem hier jedoch ein nicht-ideales Titrationsverhalten der amphiphilen Arachidonsäure festgestellt wurde (siehe Abschnitt 2.4.1.1).

Trotz der Bindungsfunktion für zwei unterschiedliche Liganden – Progesteron und Arachidonsäure – erwies sich das ApoD als Rezeptorprotein mit wohldefinierten Eigenschaften. Das Lipocalin besitzt die erstaunliche Fähigkeit, zwischen sehr ähnlichen Strukturen zu diskriminieren (Abbildung 39, siehe auch Abbildung 12). Von den Steroiden Progesteron, Pregnenolon und Testosteron wird die erstgenannte Verbindung mit hoher Spezifität erkannt. Dabei unterscheiden sich Progesteron und Testosteron nur durch die Substituenten an der Kohlenstoffposition C17 in Steroidring D. Testosteron besitzt dort einen Hydroxylsubstituenten, während Progesteron einen Acylrest trägt. Pregnenolon zeigt verglichen mit den beiden anderen Verbindungen Unterschiede in der Konformation des Steroidgerüsts im Bereich der Ringe A und B, wobei Pregnenolon eine Doppelbindung zwischen C5 und C6 aufweist.

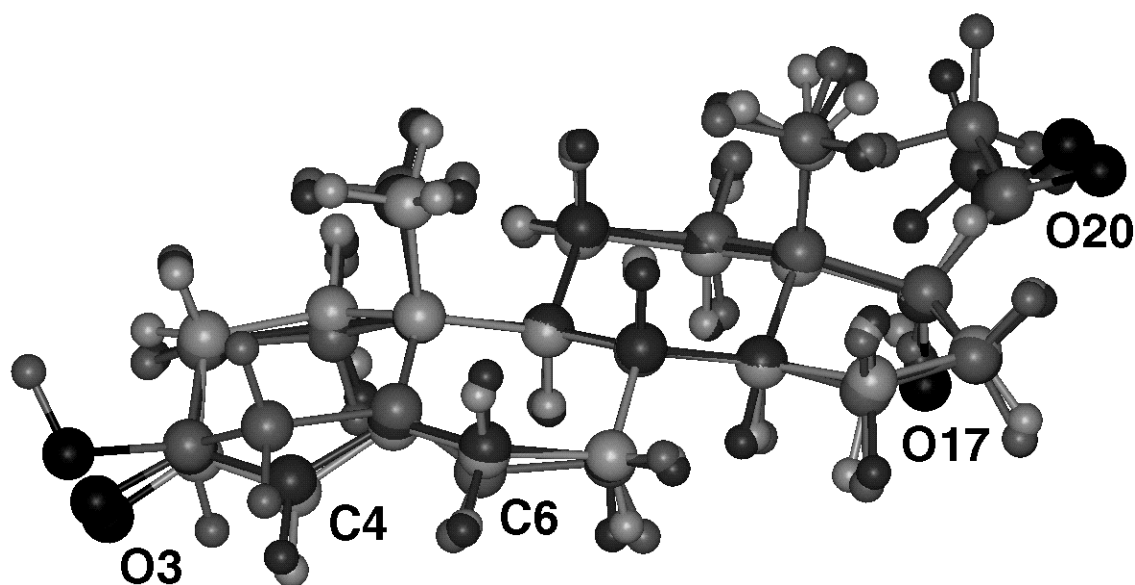


Abbildung 39. Struktureller Vergleich des ApoD-Liganden Progesteron (dunkelgrau) mit Pregnenolon (grau) und Testosteron (hellgrau). Gezeigt ist eine räumliche Überlagerung dieser drei Steroide anhand der Kohlenstoffatome C1 bis C3, C5 und C7 bis C17 (siehe Abbildung 12). Wasserstoff- und Kohlenstoffatome sind als kleine bzw. große Kugeln dargestellt, die Sauerstoffatome an den Positionen C3, C17 oder C20 sind schwarz gezeichnet. Deutlich ist zu erkennen, daß sich die strukturellen Unterschiede der Verbindungen gegenüber Progesteron auf die Bereiche um C4 (Pregnenolon) bzw. C17 (Testosteron) beschränken. Die Atomkoordinaten der Moleküle (Progesteron: KEFBEC; Pregnenolon: PREGOL; Testosteron: EPITES) wurden der Cambridge Crystallographic Database entnommen und die Graphik mit Hilfe der Software „Insight II“ erstellt.

Dagegen besitzen Progesteron und Testosteron je ein System aus zwei konjugierten Doppelbindungen zwischen dem Sauerstoffatom O3 und dem Kohlenstoffatom C3 sowie den Ringkohlenstoffatomen C4 und C5. Die Beobachtung, daß die geringen Unterschiede an den weit voneinander entfernten Ringen A und D des Steroidgerüsts im Falle von Pregnenolon bzw. Testosteron zur Diskriminierung gegenüber Progesteron führen, weist darauf hin, daß ApoD diesen Liganden vollständig umschließt.

Die durchgeführten Liganden-Bindungsstudien legten nahe, daß sich das bakteriell hergestellte ApoD in seinen Bindungseigenschaften vom natürlichen Protein nicht wesentlich unterscheidet. Die Abweichungen, ein N-terminaler Gln-Rest anstelle Pyroglutamat-Derivatisierung, die Substitution Cys116Ser sowie das C-terminale Affinitätsanhängsel *Strep*-tag II, hatten ebenso wie die fehlende Glykosylierung wohl keinen Einfluß auf die Affinität zu einem in der zentralen Kavität des Lipocalins gebundenen Haptenliganden.

Zusammenfassend ergab sich, daß das in zahlreichen Geweben und Gewebsflüssigkeiten auftretende ApoD von den verschiedenen Verbindungen, welche als Liganden diskutiert worden sind, nur Progesteron sowie Arachidonsäure komplexiert. Die Dissoziationskonstanten der beiden binären Komplexe liegen im mikromolaren Bereich und damit in der gleichen Größenordnung, in der andere Proteine aus der Familie der Lipocaline, wie beispielsweise das RBP (Cogan *et al.*, 1976) oder das Epididymale Retinsäurebindungsprotein (Sundaram *et al.*, 1998), ihren jeweiligen Liganden binden.

Interessanterweise wurde bei der experimentellen Durchführung der Liganden-Bindungsstudien eine auffällige Empfindlichkeit der spektroskopischen Eigenschaften des ApoD gegenüber organischen Lösungsmitteln beobachtet, die sich wahrscheinlich auf die exponierte Position von Tryptophanresten zurückführen läßt. Allerdings ist für das strukturell verwandte β -Lactoglobulin (BLG; Übersicht in Sawyer & Kontopidis, 2000) ein Einfluß organischer Lösungsmittel auf die Sekundärstruktur seit längerem bekannt (Dufour & Haertlé, 1990). In diesem Fall legten spektroskopische Untersuchungen nahe, daß zunehmende Hydrophobie des Lösungsmittels – 35 % v/v Ethanol – eine reversible Konformationsänderung im Protein hervorruft, wodurch vermutlich eine zweite Bindungsstelle für den natürlichen Liganden gebildet wird. Diese konnte allerdings unter den Hochsalzbedingungen bei der Kristallisation in der Struktur des β -Lactoglobulin (Kontopidis *et al.*, 2002) bislang nicht identifiziert werden. In diesem Zusammenhang bleibt zu untersuchen, inwieweit der beim rekombinanten ApoD in Gegenwart organischer Lösungsmittel beobachtete Effekt, der schon bei deutlich geringeren Konzentrationen auftrat, mit einer Modulation der Bindungseigenschaften einhergeht. Eine auf diese Weise variable Ligandenspezifität könnte das ApoD, welches in einigen physiologischen Kompartimenten monomer, im Serum dagegen assoziiert vorliegt, zu einer jeweils angepaßten biologischen Funktion befähigen.

In Anbetracht des vielfachen Vorkommens des ApoD im menschlichen Organismus scheint es durchaus wahrscheinlich, daß das Protein im Kontext des jeweiligen Gewebes spezielle Funktionen übernimmt. Eine physiologische Funktion als Bindungs- oder Transportprotein für Progesteron *in vivo* ist im weiblichen Brustgewebe anzunehmen. Die Affinität zu Arachidonsäure, ein Zwischenprodukt der Biosynthese von Eicosanoiden und Prostaglandinen, weist auf eine bedeutende Rolle des ApoD bei der Regulation zellulärer Vorgänge hin. Der Arachidonsäurestoffwechsel ist direkt mit der Bildung von cyclischem AMP in Verbindung mit Zellproliferation sowie der Aktivität von Nervenzellen verknüpft (Lagarde, 1988; wiedergegeben in Morais-Cabral *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß das Expressionsniveau des ApoD bei der Regeneration peripheren Nervengewebes stark ansteigt (Boyles *et al.*, 1990; Spreyer *et al.*, 1990) und auch in Phasen der Quieszenz diverser Tumorzelllinien deutlich erhöht ist (Provost *et al.*, 1991). Umgekehrt ging in menschlichen Krebszelllinien die Induktion der ApoD-Genexpression mit einem Wachstumsarrest und zunehmender Zelldifferenzierung einher (López-Boado *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß ApoD die Konzentration der verfügbaren Arachidonsäure unter veränderten Wachstumsbedingungen reguliert.

Weitere Studien sind nötig, um die Bedeutung des ApoD bei den unterschiedlichen physiologischen Vorgängen aufzuklären. Hier könnte neben der Bindung von niedermolekularen Liganden auch eine direkte Wechselwirkung mit bislang unbekanntem Rezeptoren von Bedeutung sein. Interessanterweise konnte kürzlich ein weiteres Apolipoprotein der Familie der Lipocaline zugeordnet werden. Das als Apolipoprotein M (Xu *et al.*, 1999) bezeichnete Protein, welches wie das ApoD im HDL und LDL des humanen Plasmas vorkommt, besitzt eine 19 %ige Sequenzidentität zu ApoD und weist aufgrund theoretischer Betrachtungen die Lipocalin-Faltungsarchitektur auf (Duan *et al.*, 2001). Über die physiologische Funktion oder die Liganden-Bindungseigenschaften dieses Proteins ist allerdings bisher nichts bekannt.

4.3 Versuch der Optimierung proteinchemischer Eigenschaften des rekombinanten ApoD: Neigung zur Aggregation und Adsorption

Das humane ApoD konnte zwar in dem prokaryontischen Organismus *E. coli* hergestellt werden, die dabei erzielten Ausbeuten waren allerdings deutlich geringer als jene, die bei der ähnlich durchgeführten gentechnischen Produktion anderer Lipocaline (Beste, 1998; Schmidt, 1998) erhalten worden waren. Darüber hinaus wurde eine Destabilisierung der Wirtszellen während der Expression des ApoD-Gens festgestellt, was sich in einer verstärkten Lyse der Bakterien äußerte.

Bekanntermaßen hängt die Effizienz, mit der Fremdproteine in *E. coli* produziert werden, von mehreren Faktoren ab (Übersicht in: Makrides, 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit einge-

setzten bakteriellen Expressionsvektoren sind in bezug auf Transkriptions- und Translations-effizienz weitgehend optimiert (Skerra, 1994), so daß in erster Linie die Aminosäuresequenz des zu synthetisierenden Proteins die Ausbeute bestimmt. Dabei spielen besonders die Sekretions- und Faltungseffizienz sowie Stabilität des rekombinanten Genproduktes, dessen Empfindlichkeit gegenüber Proteasen und dessen Toxizität für die Wirtszelle eine Rolle.

Von Nachteil ist insbesondere eine Tendenz des Fremdproteins zur Aggregation. Für die Aggregation von Makromolekülen sind vor allem hydrophobe Wechselwirkungen von Intermediatzuständen der Faltung verantwortlich (Zettlmeissl *et al.*, 1979). Bei diesen Vorgängen spielt unter anderem das als *Molten Globule* (Creighton, 1997) bezeichnete Zwischenprodukt der Proteinfaltung eine Rolle. Andererseits kann Aggregation auch bei nativ gefalteten Proteinen auftreten, wenn diese hydrophobe Regionen auf der Oberfläche präsentieren. Proteine, die isoliert von ihrem biologischen Kontext vorliegen, weisen in manchen Fällen ausgeprägt hydrophobe Bereiche auf, welche Interaktionsstellen zu einem natürlichen Bindungspartner darstellen. Beispielsweise mußte bei Immunglobulin-Fragmenten eine deutliche Tendenz zur Aggregation festgestellt werden, bei denen die bei vollständigen Antikörpern dem Lösungsmittel nicht zugänglichen Kontaktstellen von leichter und schwerer Kette zu Assoziation und unspezifischer Adsorption sowohl im Periplasma von *E. coli* als auch *in vitro* führten (Skerra, 1989; Glockshuber *et al.*, 1990; Davies & Riechmann, 1995). Die Bildung von Aggregaten rekombinanter F_v-Fragmente konnte im Einklang damit eingeschränkt werden, indem hydrophobe Oberflächenregionen durch Substitution einzelner Seitenketten gegen hydrophile Reste verkleinert wurden, was zu einer erhöhten Ausbeute in *E. coli* führte (Nieba *et al.*, 1997).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche brachten eine deutliche Tendenz des rekombinanten ApoD zur Aggregation ans Licht. So zeigten Untersuchungen zur Bestimmung des Oligomerisierungsstatus, daß das Protein bei der Größenausschlußchromatographie zum größten Teil an die Säule adsorbierte. Ein kleinerer Anteil des applizierten ApoD erschien im Ausschlußvolumen, was auf die Aggregation des Proteins hinwies. Die experimentelle Messung der molekularen Masse von ApoD-Oligomeren mittels analytischer Ultrazentrifugation schlug gleichfalls fehl, da die Bildung hochmolekularer Aggregate detektiert wurde. Weiterhin mußte eine Neigung des rekombinanten ApoD zur Wechselwirkung mit Gefäßoberflächen festgestellt werden. So konnte eine zeitabhängige Abnahme des Signals bei der Messung der Proteinfluoreszenz durch Adsorption an die Glasoberfläche der eingesetzten Küvette erklärt werden.

Die hier durchgeführte biochemische Charakterisierung des ApoD deutete allerdings darauf hin, daß das bakteriell hergestellte Protein nativ gefaltet ist und die beschriebenen Wechselwirkungen demnach nicht auf fehlgefaltete Formen des rekombinanten Proteins zurückzuführen war. So lag das gereinigte Protein als einheitliches Disulfid-Isomer vor und zeigte

zumindest teilweise die Liganden-Bindungseigenschaften, die bereits für das humane ApoD beschrieben worden waren (Dilley *et al.*, 1990; Morais Cabral *et al.*, 1995). Gleichzeitig entsprach der hohe β -Faltblattanteil des Proteins, der mittels CD-spektroskopischer Messungen ermittelt wurde, der postulierten Lipocalin-Faltungsarchitektur. Für die Homogenität des rekombinanten ApoD sprach ferner die Beobachtung, daß sich die bei Liganden-Bindungsexperimenten mittels Fluoreszenztitration gewonnenen Daten bei gegebener Konzentration der beiden Interaktionspartner stets unter Annahme der Bildung eines binären Komplexes anpassen ließen.

Eine aufgrund dieser experimentellen Befunde durchgeführte Analyse des dreidimensionalen Strukturmodells des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990; siehe Abbildung 17) führte zur Identifizierung eines ausgeprägt hydrophoben Bereiches (siehe Abschnitt 3.3) in der Umgebung des Cysteinrestes 116, der für die kovalente Bindung zum ApoA-II verantwortlich ist (Yang *et al.*, 1994). Die zur Bildung dieser intermolekularen Disulfidbrücke notwendige Assoziation der beiden Moleküle wird wahrscheinlich durch die hydrophobe Interaktion geeigneter Bereiche ausgelöst, welche anschließend vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt sind.

Ein weiterer Aspekt ist, daß das rekombinante ApoD aufgrund seiner Herstellung in *E. coli* nicht die für eukaryontische Organismen typischen posttranslationalen Modifikationen besitzt und insbesondere nicht glykosyliert ist. Interessanterweise liegen die Positionen Asn45 und Asn78, an denen die Oligosaccharidketten am ApoD fixiert sind (Schindler *et al.*, 1995), auf der gleichen Hemisphäre des Proteins wie die beschriebenen hydrophoben Bereiche. Vermutlich führt deren Fehlen ebenfalls zur Solvensexposition von hydrophoben Regionen, was die Bildung von Aggregaten fördert. Im Einklang damit steht, daß sich das native glykosylierte Protein im Gegensatz zum bakteriell hergestellten ApoD mittels Gelpermeationschromatographie isolieren ließ (Balbín *et al.*, 1990). Am Rande sei angemerkt, daß sich das Glykosylierungsmuster des als Heterodimer vorliegenden Serum-ApoD von dem des monomer vorliegenden, aus Achselsekret isolierten ApoD unterscheidet (Zeng *et al.*, 1996).

Um das rekombinante humane ApoD im Hinblick auf seine Tendenz zur Aggregation zu optimieren, wurde versucht, die Primärstruktur des Proteins zu verändern. Prinzipiell können zu diesem Zweck zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. Durch ortsgerichtete Substitution einzelner Aminosäurereste lassen sich hydrophobe Wechselwirkungen zielgerichtet unterbinden. Eine solche Vorgehensweise, die beispielsweise für Immunglobulinfragmente erfolgreich angewandt wurde (Knappik & Plückthun, 1995; Nieba *et al.*, 1997), setzt allerdings die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur des Proteins voraus. Da aber für das humane ApoD nur ein Strukturmodell (Peitsch & Boguski, 1990) existiert, dessen Übereinstimmung mit der tatsächlichen Gestalt des Proteins bis heute nicht erwiesen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zweiter, kombinatorischer Ansatz verfolgt. Dazu wurde zunächst eine Bibliothek von zahlreichen Zufallsmutanten des Proteins erzeugt. Aus dem entstandenen Ensemble wurden anschließend Moleküle mit veränderten Faltungseigenschaften selektiert.

Durch die Sequenzanalyse der selektierten Mutanten sollten sich Bereiche des Proteins identifizieren lassen, die für die Aggregation von Bedeutung sind. Im Anschluß können dann gezielt Varianten konstruiert werden, die nur die zur Verhinderung der Aggregation erforderlichen Mutationen tragen.

Zur Erzeugung genetischer Diversität bieten sich verschiedene Methoden an (Übersicht in Hoogenboom, 1997). Da sich der anhand des dreidimensionalen Modells des ApoD identifizierte hydrophobe Oberflächenbereich aufgrund der β -Faß-Topologie dieses Lipocalins über weite Abschnitte des Gens erstreckt, konnte kein Sequenzbereich eingengt werden, der für die beobachteten proteinchemischen Eigenheiten des ApoD entscheidend war. Zudem war nicht auszuschließen, daß auch Regionen außerhalb der β -Faßstruktur Bedeutung für das Aggregations- bzw. Adsorptionsverhalten haben. Aus diesem Grund erschien die zufällige Mutation von Aminosäuren über die gesamte Länge des ApoD notwendig. Zu diesem Zweck bietet sich neben der Verwendung von bakteriellen Mutatorstämmen (Coia *et al.*, 1997), bei denen die Frequenz des Auftretens spontaner Punktmutationen auf genetischer Ebene um den Faktor 10^3 bis 10^5 höher als bei natürlichen Stämmen liegt, vor allem die fehlererzeugende PCR (Leung *et al.*, 1989) an. Dieses Verfahren, das sich zur Veränderung der Bindungsaffinitäten von Antikörpern bewährt hat (Gram *et al.*, 1992; Casson & Manser, 1995), wurde hier angewandt.

Zur anschließend notwendigen Durchmusterung der Varianten eignet sich im besonderen der *Colony Screening*-Assay (Skerra *et al.*, 1991; Schlehuber *et al.*, 2000), mit dem parallel bis zu 1000 Kolonien mit einfachen Mitteln untersucht werden können. Dieser Assay wurde hier eingesetzt, um ApoD-Varianten mit verändertem Faltungsverhalten zu identifizieren. Varianten mit verbesserter Faltungseffizienz im bakteriellen Periplasma sollten damit einhergehend eine geringere Neigung zur Aggregation oder Adsorption zeigen. Kolonien, die solche Varianten produzieren, sollten sich durch Nachweis des Proteins im *Colony Screening*-Assay – hier als ABD-Fusion (siehe Abschnitt 3.3.2) – über ein intensiveres Signal detektieren lassen.

Tatsächlich konnte eine Diversifizierung der Aminosäuresequenz des ApoD erreicht werden. Die genetische Analyse der Kolonien, die mittels des Assays identifiziert werden konnten, ergab allerdings keine signifikante Häufung von Aminosäuresubstitutionen in bestimmten Regionen des Proteins. Dies läßt den Schluß zu, daß das verwendete Selektionskriterium nicht geeignet war, um effektiv zwischen Kolonien zu diskriminieren, welche verschiedene ApoD-Varianten mit unterschiedlichen Faltungseigenschaften produzieren.

Alternativ hätte sich eine Anreicherung von ApoD-Varianten – beispielsweise mittels *Phage Display* – empfohlen. Dabei könnte eine Selektion auf eine erhöhte Stabilität der Faltungsarchitektur des ApoD erfolgen. So ließe sich eine erstellte Bibliothek auf Varianten durchmustern, die unter Streßbedingungen – bei erhöhter Temperatur oder in Anwesenheit

chaotroper Agentien – funktionell sind und weiterhin Bindung zum natürlichen Liganden Progesteron zeigen. Mittels eines ähnlichen Ansatzes konnte beispielsweise die Stabilität eines scF_v-Fragmentes erhöht werden. Einhergehend mit zwei Mutationen, die sich in den CDR-1 und CDR-2 befanden, nahm dabei außerdem die Ausbeute bei der Herstellung in *E. coli* zu (Jung *et al.*, 1999).

Mittlerweile war die Optimierung der proteinchemischen Eigenschaften des ApoD Ziel weiterer Studien, bei denen das Strukturmodell des ApoD als Grundlage für rationales *Protein Design* diente. Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurden dabei einzelne Aminosäuren in der eingangs beschriebenen solvensexponierten, vorwiegend hydrophoben Region des ApoD gegen hydrophile Reste ausgetauscht. Tatsächlich führten diese Substitutionen zu einem veränderten Verhalten des ApoD bei der Gelpermeationschromatographie (A. Nasreen, M. Vogt & A. Skerra, in Vorbereitung). Bakteriell hergestelltes ApoD, bei dem der auffällig exponierte Rest Trp99 gegen His ausgetauscht wurde, besitzt nach diesen Untersuchungen eine verminderte Tendenz zur Aggregation. Tryptophanreste spielen in einigen Fällen bei Protein-Protein-Interaktionen eine besondere Rolle (Clackson & Wells, 1995), und die auffällige Lage in der hydrophoben Region um Cys116 ließ im Fall des ApoD vermuten, daß die Reste Trp91 oder Trp99 zur Komplexbildung mit ApoA-II beitragen. Durch die zusätzlichen Substitution Ile118Ser und Leu120Ser gelang es, die hier beobachtete Adsorption des ApoD an das Säulenmaterial (siehe Abschnitt 3.2.4) zu unterbinden, so daß das Protein bei einem seiner molekularen Masse entsprechenden Volumen im Säuleneluat erschien. Diese Versuche untermauern die Hypothese, daß die den Rest Cys116 umgebende hydrophobe Region für das beobachtete Verhalten des ApoD verantwortlich ist.

Obwohl durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mutationsstudien die strukturellen Ursachen für die Neigung des ApoD zu Aggregation und Adsorption letztendlich nicht lokalisiert werden konnten, erwiesen diese Experimente immerhin, daß die Faltungsarchitektur dieses Lipocalins zahlreiche Substitutionen – auch innerhalb der β -Stränge der Faßstruktur – toleriert und sich die entsprechenden Varianten mit ähnlichen Ausbeuten wie das Wildtyp-Protein in *E. coli* produzieren lassen. Aufgrund dieser Eigenschaft schien das humane ApoD zur Generierung künstlicher Bindungsproteine prinzipiell geeignet.

4.4 Strategien zur Präsentation des ApoD auf Phagemiden

Um aus einer komplexen molekularen Bibliothek Proteinvarianten mit definierten Eigenschaften zu isolieren, hat sich im besonderen die Methode des *Phage Display* (Übersichten in Wells & Lowman, 1992; Kay *et al.*, 1996; Barbas *et al.*, 2001) bewährt. Den verschiedenen Variationen dieses Verfahrens gemein ist die Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche als Fusionsprotein mit einem Phagenhüllprotein, wobei meist entweder das pIII oder das pVIII verwendet wird. Phagenbibliotheken wurden zunächst so

konstruiert, daß jede Kopie des entsprechenden Phagenhüllproteins (pIII: 5, pVIII: 2670 Kopien) das Fremdprotein enthält (Smith, 1985). Dadurch entstehen allerdings Phagenpartikel mit polyvalenten Bindungseigenschaften.

Um bei der Affinitätsanreicherung eine apparente Zunahme der Bindungsaffinität durch den Aviditätseffekt und damit eine bevorzugte Selektion niedrigaffiner Varianten (Cwirla *et al.*, 1990) zu vermeiden, wurden Methoden für die monovalente Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche entwickelt (Lowman *et al.*, 1991). Dies ist durch die Duplizierung des Gens für das Hüllprotein des Phagen möglich, wobei nur eines der Gene mit dem Gen für das Fremdprotein fusioniert wird. Dabei wird das Fusionsprotein meist auf einem als Phasmid bezeichneten Plasmid kloniert, welches die intergenische Region eines filamentösen Phagen trägt. Durch die Regulierung der Genexpression des Fusionsgenes kann bei Koexpression des unveränderten Hüllproteins mit Hilfe eines Helferphagen das stöchiometrische Verhältnis der beiden Proteine eingestellt werden. Bei Verwendung des pVIII ist wegen der großen Zahl von Kopien mit dieser Strategie eine zwar verminderte, aber immer noch polyvalente Präsentation zu erwarten.

Das Phagenhüllprotein pIII besteht aus drei Domänen. Die Kristallstruktur der aminoterminalen Domäne (N1; Aminosäuren 1 bis 66) konnte ebenso wie die der sich an eine verbindende Sequenz anschließenden zweiten N-terminalen Domäne (N2; Aminosäuren 86 bis 216) kürzlich aufgeklärt werden (Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999). Diese Domänen sind für die Infektion der Bakterienzelle verantwortlich. Dabei bindet N2 an den bakteriellen F-Pilus (Deng *et al.*, 1999), welcher sich daraufhin kontrahiert und damit den Phagen in Kontakt mit der äußeren Bakterienmembran bringt. Die Domäne N1 des pIII, die beim ungebundenen Phagen mit N2 wechselwirkt (Lubkowski *et al.*, 1999), interagiert nun mit der membranständigen C-terminalen Domäne des periplasmatischen *E. coli*-Proteins TolA (Riechmann & Holliger, 1997). Der weitere Verlauf der Infektion ist noch weitgehend ungeklärt. Die C-terminale Domäne des pIII (Aminosäuren 217 bis 406) dient zur Verankerung des Proteins in der Phagenhülle.

Die Strategie des monovalenten *Phage Display* erlaubt es, auch N-terminal verkürzte Varianten des pIII zur Fusion des Fremdproteins einzusetzen, wobei bei Verwendung nur der Aminosäuren 198 bis 406 in manchen Fällen im Vergleich zur Verwendung des vollständigen pIII eine verbesserte Phagemidproduktion beobachtet werden konnte (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991). Ein um N1 und N2 verkürztes Fragment des pIII (Aminosäuren 217 bis 406) wurde erfolgreich benutzt, um das Lipocalin BBP funktionell auf Phagemiden zu präsentieren (Beste *et al.*, 1999), wobei in diesem Falle durch die weitere Verkürzung die Präsentation des BBP wesentlich verbessert werden konnte.

Für die monovalente Präsentation des ApoD auf Phagemiden wurde dieses als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII hergestellt. Zur Ermittlung einer optimalen Präsentations-

Strategie wurde eine Reihe von Phasmiden konstruiert, welche für Fusionen von ApoD und dem vollständigen pIII bzw. dessen um N1 oder N1-N2 verkürzte Fragmente kodierten. Diese Phasmide basierten auf dem Vektor pASK111, der die Vorzüge einer durch die Chloramphenicol-Resistenz erhöhten Plasmidstabilität (siehe Abschnitt 3.1.2) mit denen des streng regulierten *tet*-Promotors (Skerra, 1994) kombiniert. Durch die geringe Basalsynthese dieses Promotors sollten die zelltoxischen Effekte des Fusionsproteins (Hoogenboom *et al.*, 1991) vor der Induktion verringert werden. Phasmide, bei denen die Genexpression des Fusionsproteins durch den *tet*-Promotor erfolgt, waren bereits erfolgreich zum *Phage Display* von BBP-Varianten eingesetzt worden (Beste *et al.*, 1999) und eigneten sich zur Präsentation von scF_v-Fragmenten (Zahn *et al.*, 1999).

Die Verwendung ausschließlich der C-terminalen Domäne des pIII als Fusionspartner hatte sich bei der Konstruktion einer Phagemidbibliothek von F_{ab}-Fragmenten vor allem im Hinblick auf die Höhe der erzielbaren Phagemidtitel als Vorteil gegenüber der Fusion mit dem Vollängenprotein pIII erwiesen (Ørum *et al.*, 1993). Dies konnte darauf zurückgeführt werden, daß die N-terminalen Domänen des pIII eine inhibitorische Wirkung auf die Superinfektion der Wirtszelle des Plasmids durch den Helferphagen ausüben (Boeke *et al.*, 1982). Dabei konkurriert die N1-Domäne des im Periplasma befindlichen Fusionsproteins vermutlich mit N1-Domänen des Helferphagen um die Bindungsstelle von TolA (Riechmann & Holliger, 1997).

Hoogenboom *et al.* (1991) stellten mit dem vollständigen pIII als Fusionspartner Phagemid-präsentierte Bibliotheken von Antikörperfragmenten dar, die erfolgreich in Affinitätsanreicherungen eingesetzt wurden. Dabei wurde allerdings eine deutliche Toxizität des Fusionsproteins für die Zelle festgestellt, da eine zu starke Induktion des *lac*-Promotor-Operator-Systems, unter dessen Kontrolle das Fusionsprotein stand, zur Zellyse führte. Die Basalsynthese des Promotors genügte zur Bereitstellung des Fusionsproteins, so daß es zur Präsentation des Fremdproteins auf Phagemiden kam. Das *Phage Display* von Knottin-Varianten, die mit Hilfe eines ähnlichen Phasmidvektors mit dem Vollängen-pIII fusioniert wurden (Smith *et al.*, 1998), führte zu einer vergleichsweise verbesserten Phagemidproduktion und beeinträchtigte die Infektiosität der hergestellten Phagemide kaum. Dies kann vermutlich auf die geringe Größe (4 kDa) und damit den verminderten sterischen Anspruch der präsentierten Cellulose-bindenden Domäne zurückgeführt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Phagemid-Präsentation des ApoD als Fusion mit dem vollständigen pIII ergaben, daß das ApoD auf diesen Partikeln präsentiert wurde (siehe Abschnitt 3.4.2). Gleichzeitig konnte keine signifikante Abnahme der Infektiosität der Phagemidpartikel festgestellt werden. Die kompakte Gestalt dieses Lipocalins mit nur 20 kDa schien die Interaktion des Phagen mit dem F-Pilus sterisch nicht zu behindern.

Experimente, die durchgeführt worden waren, um die Präsentation des BBP auf der Oberfläche der Phagemide zu optimieren (Stibora, Beste & Skerra, unveröffentlicht), hatten gezeigt, daß ein zwischen BBP-Strukturgen und dem pIII-Fragment befindliches *Amber*-Stoppkodon von Vorteil für die Phagemidproduktion ist. Die Substitution des *Amber*-Stoppkodons gegen ein Glutaminkodon führte bei mit den entsprechenden Phasmiden transformierten Bakterienzellen selbst dann zur Lyse, wenn der *tet^{p/o}* nicht induziert wurde. Die Anwesenheit des *Amber*-Stoppkodons verringerte die Konzentration des Fusionsproteins in der Zelle und führte damit zu einem verminderten Toxizitätseffekt.

Ähnlich wurde bei den Versuchen zur Produktion von ApoD-präsentierenden Phagemiden ein verlangsamtes Wachstum von JM83-F'-Zellen festgestellt, wenn das Fusionsgen aus ApoD und komplettem pIII nicht durch ein *Amber*-Stoppkodon unterbrochen war (siehe Abschnitt 3.4.2). Dieser offensichtlich toxische Effekt des Fusionsproteins wurde dagegen bei Verwendung des Stammes XL1-Blue nicht beobachtet. Anscheinend weisen Fusionsproteine aus ApoD und pIII tolerierbare Toxizität für diesen Stamm auf. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß selbst die vollständige Induktion des die rekombinante Genexpression regulierenden *tet*-Promotors einen nur mäßig negativen Einfluß auf das Zellwachstum hatte.

Die Hypothese (Beste, 1998), daß die Verwendung des kompletten pIII als Fusionspartner gegenüber einer Fusion nur mit der C-terminalen Domäne (Aminosäuren 217 bis 406) von Vorteil sei, weil das präsentierte Protein in diesem Fall den größtmöglichen Abstand zum überaus voluminösen Phagemidpartikel aufweist, wurde allerdings durch die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur der beiden N-terminalen Domänen (Aminosäuren 1 bis 216) des pIII entkräftet. Nach Lubkowski *et al.* (1998) liegen N- und C-Termini des Fragmentes N1-N2 räumlich dicht beieinander, so daß die gewählte Fusionsstrategie die räumliche Orientierung des Fremdproteins gegenüber dem Phagemidpartikel wohl nur wenig beeinflusst. Eine Vergrößerung des Abstandes zwischen Phagemidpartikel und fusioniertem Fremdprotein sollte sich eher erreichen lassen, wenn zur Fusion das nur um die Domäne N1 (Aminosäurereste 1 bis 66) verkürzte pIII eingesetzt wird.

Die Fusionsproteine aus ApoD und dem um N1 oder N1-N2 verkürzten pIII ließen sich in *E. coli* herstellen. Dabei war die Ausbeute höher als bei dem ApoD-Fusionsprotein mit dem vollständigen pIII. Die verkürzten Fusionsproteine konnten auch auf entsprechend hergestellten Phagemidpartikeln nachgewiesen werden. Allerdings war die Stabilität der Fusionsproteine ein weiterer wichtiger Aspekt für die Auswahl eines zur Phagemid-Präsentation des ApoD geeigneten Verfahrens. Dabei unterlag das Fusionsprotein aus ApoD und den um N1 beziehungsweise N1-N2 verkürzten Fragmenten des pIII deutlichem proteolytischen Abbau. Insgesamt erwies sich die Fusion des ApoD mit dem Vollängen-pIII als am beständigsten gegenüber Degradation. Deshalb wurden die Varianten der ApoD-Bibliothek als Fusionsproteine mit dem vollständigen pIII auf Phagemidpartikeln präsentiert.

4.5 Herstellung von komplexen ApoD-Zufallsbibliotheken und Strategien zur Selektion von Varianten mit neuartigen Bindungseigenschaften

Eine Analyse des Strukturmodells (Peitsch & Boguski, 1990) des ApoD führte zur Identifizierung von 24 Aminosäurepositionen, die eine ausgedehnte molekulare Oberfläche bildeten und deshalb eine geeignete Kontaktstelle zu einem makromolekularen Antigen darstellten. Diese Reste waren auf die vier Peptidschleifen, welche die natürliche Bindungstasche des Lipocalins bilden, und angrenzende Faltblattbereiche des Proteins verteilt und wurden ortsspezifisch randomisiert. Von der Mutagenese ausgenommen wurden solche Aminosäurepositionen, deren Lage im Proteingerüst eine essentielle Bedeutung für die Faltung des Lipocalins vermuten ließ. Dabei wurde bewußt eine relativ große Zahl von Aminosäurepositionen ausgewählt, um einerseits die Gewinnung von ApoD-Varianten gegen unterschiedliche potentielle Antigene zu ermöglichen und andererseits eventuellen Ungenauigkeiten des Strukturmodells Rechnung zu tragen.

Zur Mutagenese der ausgewählten Aminosäurepositionen wurde eine zweistufige PCR-Strategie eingesetzt, welche mit Hilfe degenerierter Oligodesoxynukleotide die konzertierte Randomisierung der Gensequenz ermöglichte. Um die effiziente Klonierung der erzeugten Gene in einem für das *Phage Display* geeigneten Vektor zu erreichen, wurde die von Schmidt (1995) für das BBP entwickelte Ligierungsstrategie übernommen. Dabei ist die randomisierte Genkassette durch zwei Schnittstellen der TypIIa-Restriktionsendonuklease *BstXI*, deren Restriktionsprodukte in diesem Fall nicht kompatibel oder palindrom sind, flankiert. Die Einführung der entsprechenden genetischen Erkennungssequenzen war beim ApoD nur unter Generierung dreier Aminosäuresubstitutionen möglich. Die ausgetauschten Reste befanden sich auf der geschlossenen Seite der β -Faßstruktur (siehe Abbildung 3) und waren gemäß dem Strukturmodell des Proteins (Peitsch & Boguski, 1990) mit ihren Seitenketten zum Solvens orientiert, so daß diese Substitutionen in struktureller Hinsicht tolerabel schienen. Tatsächlich beeinflussten die drei Mutationen die proteinchemischen Eigenschaften des rekombinanten ApoD und dessen Fähigkeit, Progesteron zu komplexieren, nur unwesentlich (siehe Abschnitt 3.4.1.1).

Bei der Synthese der Gen-Pools für die einzelnen ApoD-Bibliotheken wurden durch die Verwendung von NNK-Kodons die Stoppkodons *Ochre* und *Opal* von vornherein ausgeschlossen. Um an den randomisierten Positionen den Einbau aller 20 Aminosäuren zu ermöglichen, mußte dagegen das *Amber*-Stoppkodon (TAG) toleriert werden, welches in *supE*-Suppressorstämmen partiell als Gln translatiert wird. Theoretisch beträgt bei insgesamt 24 mittels NNK-Kodons randomisierten Aminosäurepositionen die Wahrscheinlichkeit des Einbaus mindestens eines *Amber*-Stoppkodons $1-(31/32)^{24} = 0,53$. Bei beiden konstruierten Bibliotheken unterschieden sich die erzeugten Gene an den vorbestimmten Positionen vom ApoD,

wobei keine Häufung bestimmter Kodons festgestellt werden konnte. Die Anzahl der aufgetretenen *Amber*-Stoppkodons entsprach dem durch die Art der Zufallsmutagenese zu erwartenden Maß.

Entscheidend für die erzielbare Affinität von aus einer Zufallsbibliothek isolierten Varianten von Bindungsproteinen ist die anfängliche Komplexität der eingesetzten Bibliothek (Perelson & Oster, 1979). Durch die beschriebene PCR-Strategie unter Verwendung degenerierter Oligodesoxynukleotide war ein theoretischer Sequenzraum aufgespannt worden, der unter der Annahme vollständiger Randomisierung $1,3 \cdot 10^{36}$ verschiedene Kombinationen enthält, die im Prinzip für $1,7 \cdot 10^{31}$ verschiedene ApoD-Varianten kodieren können. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten ApoD-Phagemidbibliotheken mit $1,5 \cdot 10^8$ bzw. $1,7 \cdot 10^9$ Varianten verkörpern demzufolge einen nur geringen Teil der kalkulatorischen Diversität.

Eine vollkommene Abdeckung aller theoretisch möglichen Sequenzen in Phagenbibliotheken ist eigentlich nur möglich, wenn die Zahl der randomisierten Aminosäurepositionen nicht größer als sechs ist (Lowman & Wells, 1991), da mit den heutzutage zur Verfügung stehenden Methoden zellbasierende Bibliotheken aus praktischen Gründen auf maximal 10^{11} Varianten limitiert sind. Zur Erzeugung von Proteinen mit modifizierten Eigenschaften lassen sich demnach zwei verschiedene Strategien verfolgen.

Beim sogenannten *Majority Sampling* (Ladner, 1996) werden nur wenige Aminosäurepositionen variiert und alle theoretisch möglichen Varianten in einer zu durchmusternden Bibliothek dargestellt. Diese Vorgehensweise setzt deshalb voraus, daß die bindungsbestimmenden Aminosäuren bereits bekannt sind und empfiehlt sich deshalb vor allem zur Modifizierung einer vorhandenen oder mittels eines vorangegangenen Selektionsprozesses erzeugten Affinität. Durch das dann als Affinitätsmaturierung bezeichnete Verfahren konnten bestehende Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern signifikant verstärkt werden (Hawkins *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1995; Schier *et al.*, 1996; Schlehuber *et al.*, 2000).

Für die im Rahmen dieser Arbeit dagegen verfolgte Verfahrensweise des *Minority Sampling* werden Bibliotheken mit einer großen Anzahl von mutagenisierten Aminosäurepositionen konstruiert, wodurch die theoretisch mögliche Komplexität nur partiell abgebildet wird. Auf diese Weise kann eine größere Vielfalt an molekularen Oberflächen erzeugt werden, allerdings sind viele Varianten von vornherein vom Selektionsverfahren ausgeschlossen. Die Einschränkung der Diversität ist jedoch nicht unbedingt entscheidend. So ergaben strukturelle Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen, daß mitunter nur eine geringe Zahl von Aminosäuren essentiell zur Bindung beiträgt (Jin *et al.*, 1992; Clackson & Wells, 1995; Muller *et al.*, 1997). Demnach sollten in einer umfangreichen Protein-Bibliothek mehrere Varianten existieren, welche ähnliche Bindungsspezifitäten bezüglich eines vorgelegten Antigens besitzen, so daß auch aus unvollständigen Ensembles durchaus Moleküle mit entsprechenden Eigenschaften isoliert werden können. Dies konnte für Bibliotheken naiver

und synthetischer Antikörper-Repertoires (Vaughan *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1994) und in letzter Zeit auch für alternative Liganden-bindende Proteingerüste (Nord *et al.*, 1997; Beste *et al.*, 1999; Übersicht in Skerra, 2000a) experimentell gezeigt werden und bestätigte sich auch bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Anreicherungsexperimenten.

Entscheidend für die Gewinnung bindungsaktiver Varianten ist jedoch nicht die einfache genetische Komplexität der Bibliothek, sondern vielmehr die Zahl der funktionellen Varianten, die durch sie repräsentiert wird (Knappik *et al.*, 2000). Klone, deren Strukturgene Deletionen, eine Verschiebung des Leserahmens oder mehrere TAG-Stoppkodons enthalten, verringern die funktionelle Größe des Ensembles. Zusätzlich eingeschränkt wird die Bibliothek durch Varianten, die zwar genetisch intakt sind, bei denen aber durch die Zufallsmutagenese eingeführte Aminosäuresubstitutionen die proteinchemischen Eigenschaften des Proteins negativ beeinflussen. So kann der Austausch einzelner Reste die Faltung des Proteins verhindern, eine Tendenz zur Aggregation bewirken oder eine Toxizität des Genproduktes für die Bakterienzelle hervorrufen. Weiterhin können eingeführte Mutationen zu weniger effizienter Translation, Sekretion, Prozessierung des Signalpeptides oder Assemblierung der Phagemide führen, oder das Genprodukt kann vermehrt dem proteolytischen Angriff wirtseigener Enzyme unterliegen (Clackson & Wells, 1994). Die tatsächliche funktionelle Diversität einer hergestellten Phagemidbibliothek dürfte demnach deutlich unter der experimentell anhand der Transformandenanzahl ermittelten Größe liegen. Bei den in dieser Arbeit hergestellten Bibliotheken wurde der Anteil funktioneller ApoD-Varianten zu 80 % abgeschätzt.

Zur Isolierung Antigen-bindender Phagemide aus Bibliotheken sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Sie alle basieren auf repetitiven Zyklen, welche die Bindung an das Antigen, Waschschritte, die Elution gebundener Phagemidpartikel und deren Amplifizierung beinhalten. Dazu kann das Antigen auf Chromatographie-Materialien (McCafferty *et al.*, 1990; Marks *et al.*, 1991) oder auf Kunststoffoberflächen, wie Mikrotiterplatten (Barbas *et al.*, 1992; Widersten & Mannervik, 1995) oder Polystyrolstiften (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1996; Beste *et al.*, 1999) immobilisiert werden. Dagegen ermöglicht es beispielsweise die Verwendung eines biotinylierten Antigens, den Selektionsprozeß in Lösung durchzuführen. Der gebildete Komplex von Phagemid und Antigen wird in diesem Fall mittels an magnetische Kügelchen gekoppeltem Streptavidin isoliert (Hawkins *et al.*, 1992; Low *et al.*, 1996). Das letztgenannte Verfahren bietet die Möglichkeit, die Antigenkonzentration während der Selektion präzise einzustellen. Aus einfachen theoretischen Betrachtungen ergibt sich, daß das Antigen im Vergleich zu den Phagemiden im Unterschuß angeboten werden sollte, und dabei die Antigenkonzentration die gewünschte Dissoziationskonstante nicht überschreitet (Hawkins *et al.*, 1992).

Im Anschluß an eine Entfernung von unkomplexierten Phagemiden durch Waschen werden gebundene Partikel isoliert. Dazu kommen im allgemeinen zwei verschiedene Vorgehensweisen zur Anwendung. Zum einen läßt sich ein reversibel gebundenes Antigen durch Zugabe

des freien Liganden verdrängen, wobei idealerweise nur spezifisch gebundene Phagemide freigesetzt werden. Ist die Geschwindigkeit der Dissoziation des gebildeten Komplexes allerdings gering, so werden die entsprechenden Phagemide unter kompetitiven Bedingungen nicht effizient eluiert. Damit gehen unter Umständen Varianten mit hohen Bindungsaffinitäten verloren. Bei einer Elution unter denaturierenden Bedingungen werden andererseits praktisch alle Phagemide, unabhängig von ihrer Affinität zum Antigen, abgelöst. In diesem Fall ist die Dissoziation nicht von der Geschwindigkeit der Einstellung eines kompetitiven Gleichgewichtes abhängig. Da keine Vorhersage der Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung und -dissoziation von ApoD-Varianten und Antigenen möglich war, wurde hier während der Anreicherungszyklen die Elution unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

Um Varianten mit Affinität zum Antigen in einer durch Anreicherungsverfahren erhaltenen Subpopulation identifizieren zu können, wird das erhaltene Ensemble anschließend in der Regel in Form von löslichem Protein oder auch von Phagemiden beispielsweise in einem ELISA auf ihre Bindungsaktivität analysiert (Marks *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991). Eine besonders elegante Methode stellt der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte *Colony Screening*-Assay dar, der ursprünglich von Skerra *et al.* (1991) zur Analyse von F_{ab}-Fragmenten entwickelt worden war. Schlehuber *et al.* (2000) benutzten diese Methode, um Varianten des BBP zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich diese Strategie als gut geeignet, um isolierte ApoD-Varianten nach der Affinitätsanreicherung durch *Phage Display* auf ihre Antigen-Bindungseigenschaften zu durchmustern.

Erste Versuche zur Anreicherung von ApoD-Varianten mit Bindungsaktivität für das Neuronale Inhibitorprotein Nogo-A wurden unter Verwendung eines biotinylierten, in *E. coli* hergestellten Antigens (Fiedler *et al.*, 2002) durchgeführt. Dabei wurde das Antigen in einer Konzentration von 82 nM eingesetzt. Diese Experimente ergaben, daß es trotz offensichtlicher Anreicherung einer Phagemidfraktion nicht zu einer Selektion auf bindungsaktive ApoD-Varianten gekommen war. Dabei erwies sich als hauptsächliches Problem die Akkumulation von Phasmiden, bei denen die Produktion eines Fusionsproteins aus ApoD-Variante und pIII durch ein Stoppkodon unterbunden war. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, bei den nachfolgenden Anreicherungsexperimenten den Selektionsdruck gegen Zellen, die das Fusionsprotein produzieren, zu verringern. Dies wurde erreicht, indem der *tet*-Promotor während der Phagemidamplifizierung nur partiell induziert wurde.

Zur Anreicherung von ApoD-Varianten mit Affinität zu Hämoglobin aus der ApoD-Bibliothek II wurde das Antigen auf einer Polystyrol-Oberfläche in hoher Konzentration immobilisiert. Die Selektionsexperimente führten zur Isolierung von sieben verschiedenen ApoD-Muteinen, unter denen sechs Varianten waren, bei denen die Translation des Fusionsproteins aus ApoD und pIII durch *Amber*-Stoppkodons unterbrochen war. Im Vergleich zu den ersten Selektionsversuchen besaßen diese Varianten nur jeweils ein *Amber*-Kodon, so daß

man davon ausgehen konnte, daß die entsprechenden Genprodukte zumindest mit geringer Effizienz auf der Phagemidoberfläche präsentiert wurden. Diese ApoD-Varianten erwiesen sich im *Colony Screening*-Assay als bindungsaktiv. Durch eine im Vergleich zur anfänglich eingesetzten Strategie schwächere Induktion des *tet*-Promotors während der Selektion wurde die Konzentration von unter Umständen zelltoxischen Fusionsproteinen vermindert, so daß es letztlich zu einer Anreicherung bindungsaktiver Varianten kam, die gleichzeitig für den Wirtsorganismus verträglich waren.

Während der Amplifikation der Phagemide bei den Anreicherungszyklen wird ein Selektionsdruck in Richtung auf hochinfektiöse, für die Wirtszelle wenig toxische und für die Phagenassemblierung verträgliche Varianten ausgeübt (Levitan, 1998). Dies wurde auch während der Anreicherungen von ApoD-Varianten beobachtet und äußerte sich durch einen zunehmenden Anteil von Varianten mit Stoppkodons oder verschobenem Leserahmen. So wurden in der Elutionsfraktion der fünften Anreicherungsrunde gegen das vorgelegte Antigen Hämoglobin funktionelle Varianten erhalten, wogegen aus der achten Anreicherungsrunde keine Phagemide isoliert werden konnten, die für eine funktionelle ApoD-Variante kodierten. Für die Isolierung von Varianten mit Antigen-Bindungsaktivität war es offensichtlich essentiell, die Selektion nach wenigen Zyklen abubrechen.

Um die funktionelle Komplexität zukünftiger ApoD-Bibliotheken über den im Rahmen dieser Arbeit erreichten Umfang hinaus zu erhöhen, lassen sich verschiedene Strategien entwerfen. Deletionen, die vorwiegend in den Bereichen der *PCR-Primer* auftraten, lassen sich in der Regel auf bei der Synthese der randomisierten Oligodesoxynukleotide erzeugte verkürzte Nebenprodukte zurückführen. Als problematisch erwies sich bei den durchgeführten Selektionsexperimenten das Auftreten von durch die Mutagenese-strategie zugelassenen *Amber*-Stoppkodons. Zwar wird durch diese die Funktionalität der Bibliothek in einem *E. coli supE*-Stamm nur bedingt eingeschränkt, bei mehrfachem Auftreten von *Amber*-Kodons in einer Variante ist diese allerdings nicht mehr wirksam repräsentiert. Deshalb sollten diese künftig durch eine optimierte Synthese der Bibliothek vermieden werden. Dazu böte sich die Verwendung von Oligodesoxynukleotiden an, die unter Einsatz definierter Mischungen von Trinukleotidbausteinen synthetisiert werden (Virnekäs *et al.*, 1994). Gleichzeitig wäre es durch ein solches Verfahren möglich, an einzelnen Positionen des zu mutierenden Gens unerwünschte Aminosäuren zu vermeiden. Darüber hinaus kann durch die Randomisierung in Trinukleotid-Einheiten – anstelle einzelner Nukleotide – die wegen der Degenerierung des genetischen Codes auftretende ungleiche Verteilung der Aminosäuren verhindert werden. Die beschriebene Vorgehensweise konnte bereits bei synthetischen Antikörperbibliotheken realisiert werden (Knappik *et al.*, 2000), erfordert aber einen beträchtlichen Aufwand bei der Synthese der Oligodesoxynukleotide.

Eine weitere Strategie zur Vergrößerung der funktionellen Komplexität zukünftiger ApoD-Bibliotheken läßt sich aus der Analyse der im Rahmen dieser Arbeit selektierten Varianten

ableiten. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hämoglobin-bindenden ApoD-Varianten mit dem ApoD zeigte, daß einige der randomisierten Reste konserviert oder vorwiegend durch verwandte Aminosäuren ausgetauscht worden waren (siehe Abschnitt 3.8). Dies kann darauf deuten, daß die entsprechenden Aminosäurereste eine essentielle Bedeutung für das Faltungsverhalten des ApoD besitzen. Diese Positionen sollten deshalb zukünftig von der Mutagenese ausgeschlossen werden.

4.6 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der ApoD-Variante HbgA

Die Durchmusterung einer Zufallsbibliothek des ApoD mit $1,7 \cdot 10^9$ unabhängigen Varianten mittels *Phage Display* führte zur Isolierung von sieben ApoD-Muteinen, die sich im *Colony Screening*-Assay als bindungsaktiv bezüglich des vorgegebenen Antigens Hämoglobin erwiesen.

Bei der Detektion der Bindung von ApoD-Varianten an Hämoglobin im *Colony Screening*-Assay erschwerte der erhebliche Signal-Hintergrund die Identifizierung von Kolonien, die bindungsaktive Mutanten sekretierten. Ursächlich dafür war vermutlich eine Wechselwirkung zwischen Hämoglobin und der zum Nachweis eingesetzten Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm. Ähnlich kam es auch bei Versuchen zur Quantifizierung der Bindung im ELISA mittels Streptavidin/Alkalische-Phosphatase-Konjugat zu einem hohen Signal-Hintergrund.

Zwecks detaillierter Analyse ihrer Bindungseigenschaften wurde die ApoD-Variante HbgA ausgewählt, welche im *Colony Screening*-Assay zweifach auftrat und wiederholt zu einem intensiven Farbsignal geführt hatte. HbgA unterschied sich in 21 der zur Herstellung der Bibliothek mutagenisierten 24 Positionen der Peptidschleifenregionen vom Ausgangsprotein. Nach Subklonierung ließ sich HbgA in löslicher Form aus dem Periplasma des Wirtsorganismus *E. coli* isolieren. CD-spektroskopische Messungen ergaben, daß das Protein die β -Faltblattarchitektur des ursprünglichen Lipocalins beibehalten hatte (siehe Abschnitt 3.8.1).

Zur Quantifizierung der Bindung von HbgA an Hämoglobin wurde die Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR; Jönsson *et al.*, 1991) verwendet, die sich auch zum Nachweis schwächerer Komplex-Dissoziationskonstanten – bis zu 10^{-5} M – eignet (Huber *et al.*, 1999). Mittels SPR läßt sich eine apparente Gleichgewichtskonstante bestimmen, die vom idealen Wert abweichen kann, da einer der Bindungspartner an der festen Phase immobilisiert ist. Diese Gleichgewichtskonstante kann aus einer kinetischen Analyse von Assoziations- und Dissoziationsphase indirekt ermittelt werden, oder, unmittelbar, aus den Gleichgewichtszuständen der Bindung bei verschiedenen Konzentrationen. Letzteres Verfahren bietet den Vorteil, daß es unabhängig von Massentransporteffekten ist, welche die gemessenen Assoziations- und Dissoziationsphasen der Bindungspartner beeinflussen können (Schuck, 1997).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Strategien zur SPR-Analyse der Bindung des Anticalins HbgA zu Hämoglobin untersucht, die sich durch den jeweils immobilisierten Bindungspartner unterschieden. Es gelang, HbgA sowohl kovalent auf dem Sensor als auch indirekt als Fusionsprotein mit der Albumin-bindenden Domäne (ABD; Åkerstrom *et al.*, 1987) durch Wechselwirkung mit humanem Serum-Albumin (HSA) auf einer mit HSA beschichteten Sensoroberfläche zu fixieren. Diese Vorgehensweise schien zunächst von Vorteil, weil zur Bestimmung der Komplex-Dissoziationskonstante über die Messung des Gleichgewichtszustandes der in Lösung präsentierte Bindungspartner sinnvollerweise in Konzentrationen in der Größenordnung der Gleichgewichtskonstante eingesetzt wird. Da Hämoglobin kommerziell erhältlich ist, war bei dieser Strategie keine Limitation des Meßfensters aufgrund beschränkter Verfügbarkeit des Antigens zu erwarten. Gleichzeitig sollte sich auch eine sehr schwache Bindung über die Ausnutzung des durch die homodimere Zusammensetzung des Hämoglobins ermöglichten Aviditätseffekt detektieren lassen. Bei der indirekten Immobilisierung der ApoD-Variante über die ABD sollte diese Domäne gleichzeitig als molekularer Abstandshalter fungieren und die sterische Zugänglichkeit des Anticalins verbessern.

Es gelang, HbgA sowohl kovalent als auch indirekt mit der Sensoroberfläche zu immobilisieren. Prinzipiell scheint die Durchführung von SPR-Messungen mittels Fixierung eines Bindungspartners anhand der ABD-HSA-Wechselwirkung auf der Sensoroberfläche ähnlich wie bei anderen Affinitätsanhängseln, die bereits erfolgreich zur diesem Zweck in SPR-Assays eingesetzt wurden (Übersicht in Huber *et al.*, 1999), möglich zu sein. Die nanomolare Affinität von ABD-Fusionsproteinen zu immobilisiertem HSA liegt in einem geeigneten Bereich (König & Skerra, 1998), so daß eine ausreichend stabile Basislinie während der Messung gewährleistet ist. Andererseits ist die anschließende Regeneration des Sensors leicht möglich, wodurch dieser zur wiederholten Vermessung von ABD-Fusionsproteinen eingesetzt werden kann. Darüber hinaus führt diese Strategie zur selektiven Fixierung des ABD-Fusionsproteins, wodurch auf eine stringente Reinigung möglicherweise verzichtet werden kann.

Derartige Bindungsstudien deuteten im Prinzip auf eine Komplexbildung zwischen dem Anticalin und Hämoglobin (siehe Abschnitt 3.8.2.2). Dabei wurde jedoch ein ungünstiges Signal-Rauschen-Verhältnis festgestellt, welches auf eine unspezifische Wechselwirkung des Hämoglobins mit der Sensoroberfläche zurückzuführen war. Wurde das Anticalin hingegen direkt kovalent an die Sensoroberfläche gekoppelt, so konnte keine Bindung von Hämoglobin detektiert werden; möglicherweise führte dies zu einer sterischen Blockierung der Bindungstasche des Lipocalins für den voluminösen Liganden.

Letztlich gelang es, die Komplexbildung zu quantifizieren, indem die Meßanordnung umgekehrt wurde. Dazu wurde Hämoglobin auf dem Biosensor kovalent fixiert und das Anticalin – nur mit dem *Strep*-tag II fusioniert – als Analyt eingesetzt (siehe Abschnitt 3.8.2.2). Durch Analyse der Gleichgewichts-Bindungskonzentrationen wurde dabei eine

apparente Komplex-Dissoziationskonstante von $2,16 \pm 0,36 \mu\text{M}$ ermittelt. Dabei wurde das Antigen spezifisch von HbgA erkannt, wie Vergleichsexperimente mit Myoglobin und BSA zeigten. Übrigens liegt die ermittelte Affinität des modifizierten ApoD für Hämoglobin in der Größenordnung der Bindungskonstante, mit der das ursprüngliche ApoD seinen natürlichen Liganden Progesteron bindet.

Interessanterweise wurde für die Stöchiometrie der Komplexbildung festgestellt, daß das molare Verhältnis von HbgA zu dem Hämoglobin-Tetramer kleiner als eins ist. Dies deutet darauf hin, daß ein Teil des auf der Sensoroberfläche immobilisierten Hämoglobins nicht funktionell oder sterisch nicht zugänglich ist. Humanes Hämoglobin besteht aus je zwei α - und β -Monomeren (Übersicht in Dickerson & Geis, 1983). Die beobachtete, wenn auch deutlich schwächere Wechselwirkung des Anticalins HbgA mit Myoglobin, das bekanntermaßen als Monomer vorliegt und strukturelle Homologie zu Hämoglobin zeigt, könnte darauf hindeuten, daß nur eine Untereinheit des Hämoglobin-Tetramers an der Bindung beteiligt ist. Eine Analyse des Epitops auf Hämoglobin wurde aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Das mittels kombinatorischer Techniken erzeugte Anticalin HbgA zeigt Affinität im mikromolaren Bereich zu seinem Zielprotein. Aus naiven Bibliotheken, die auf anderen Gerüststrukturen basierten, konnten künstliche Bindungsproteine mit Dissoziationskonstanten in der gleichen Größenordnung gewonnen werden (Martin *et al.*, 1996; McConnell & Hoess, 1995; Nord *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998). Ähnliche Affinitäten wurden für aus frühen Antikörperbibliotheken isolierte Bindungsproteine zu Protein-Antigenen ermittelt (Marks *et al.*, 1991; Nissim *et al.*, 1994).

Um die Affinität von HbgA weiter zu steigern, ließe sich in Analogie zur sekundären Immunantwort als „Affinitätsmaturierung“ bezeichnetes Verfahren anwenden (Übersicht in Hoogenboom, 1997). Zu diesem Zweck wird durch Mutagenese begrenzter Bereiche eine auf dem selektierten Bindungsprotein basierende Bibliothek erstellt, deren Mitgliedern die Erkennungsfunktion für das Antigen bereits aufgeprägt ist. Diese Bibliothek wird anschließend auf höheraffine Varianten durchmustert. Letztlich kommt es so zu einer Evaluierung von Varianten, die im zugänglichen Sequenzraum dem aus der ursprünglichen Bibliothek isolierten Bindungsprotein benachbart sind. Mittels dieser Methode konnte beispielsweise die Bindungsaffinität von Antikörperfragmenten (Hawkins *et al.*, 1992) signifikant gesteigert werden. Auch bei Anticalinen auf Basis des BBP konnte diese Strategie erfolgreich angewandt werden und führte zu Bindungsmolekülen mit – im Vergleich zum Ausgangsprotein – zehnfach erhöhter Affinität zum Liganden Digoxigenin (Schlehuber *et al.*, 2000).

Zur Generierung der genetischen Diversität dieser Sekundärbibliotheken bieten sich unterschiedliche Mutagenesestrategien an. Neben der auf einzelne Bereiche beschränkten Zufallsmutagenese können die fehlererzeugende PCR (Casson & Manser, 1995) oder Mutator-

Stämme (Low *et al.*, 1996) eingesetzt werden. Das Verfahren des DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994) basiert auf der zufälligen Fragmentierung von für verschiedene Varianten kodierender DNA mittels DNase I und anschließender Rekonstitution vollständiger Gene durch PCR. Dadurch kann die Kombination von phänotypischen Eigenschaften der zugrunde liegenden Proteine erreicht werden. Diese Vorgehensweise bietet sich zur Generierung affinitäts-maturierter Varianten auf Basis einer selektierten Subpopulation von Anticalinen an, die das gleiche Epitop erkennen.

4.7 Das humane ApoD als Gerüststruktur für künstliche Rezeptorproteine

Seit einigen Jahren ist die gentechnische Produktion von Antikörper-Fragmenten in prokaryontischen Organismen möglich (Skerra & Plückthun, 1988; Übersicht in Skerra, 1993). Durch Kombination dieser Technologie mit den Methoden der Molekularbiologie lassen sich heutzutage durch *Protein Engineering* quasi maßgeschneiderte Antikörper herstellen (Übersicht in Dall'Acqua & Carter, 1998), die unterschiedliche Anwendungen in Analyse, Diagnostik und Therapie finden.

Immunglobuline weisen jedoch einige intrinsische Nachteile auf. Sie sind relativ groß und vor allem aus mehreren Ketten aufgebaut, was ihre proteinchemische Handhabbarkeit erschwert. Deshalb werden zahlreiche Versuche unternommen, auf der Basis alternativer Gerüststrukturen künstliche Bindungsproteine zu erzeugen. Mittlerweile wurde eine Reihe von Proteinen auf ihre Eignung zur Generierung von Bindungsmolekülen mit neuartigen Bindungseigenschaften untersucht (Übersichten in Nygren & Uhlén, 1997; Skerra, 2000a).

Zu diesem Zweck besonders geeignet sind Proteine aus der Familie der Lipocaline (Übersicht in Flower, 1996). Lipocaline bestehen aus einer singulären Polypeptidkette und stellen mit einer Größe von ungefähr 170 Aminosäuren relativ kompakte Moleküle dar. Die Lipocaline haben sich im Laufe der Evolution als vielseitige Rezeptormoleküle entwickelt, die kleine, meist hydrophobe Liganden komplexieren. Die Spezifität der unterschiedlichen Lipocaline zu ihren jeweiligen Bindungspartnern wird – ähnlich wie bei den Immunglobulinen – durch die Struktur der Peptidschleifen, welche die β -Stränge der Faßstruktur verbinden, erzeugt. Beste (1998) und Schlehuber (2001) gelang es, auf der Basis des BBP Bindungsmoleküle mit hoher Affinität zu niedermolekularen Verbindungen zu erzeugen.

Von besonderem Interesse ist der potentielle Einsatz von künstlichen Bindungsproteinen in der Humantherapie. Hierbei steht insbesondere die Entwicklung von artifiziellen Rezeptorproteinen für Protein-Antigene im Vordergrund. Bindungsproteine auf Basis der Lipocaline, sogenannte Anticaline (Übersicht in Skerra, 2001), besitzen eine molekulare Masse von ungefähr 20 kDa und sind damit deutlich kleiner als Antikörper oder deren Fragmente; denn

selbst die kleinste Antigen-bindende Einheit, das F_v-Fragment, ist um ca. 50 % größer. Da die für zahlreiche medizinische Applikationen so bedeutsame Gewebepenetration mit zunehmender Molekülgröße abnimmt (Chester & Hawkins, 1995), scheinen die Anticaline für therapeutische Anwendungen besonders geeignet.

Für therapeutische Anticaline lassen sich leicht mögliche Zielstrukturen entwerfen. So könnten gegen ein Effektorprotein gerichtete Anticaline dessen Wechselwirkung zu seinem natürlichen Interaktionspartner kompetitiv inhibieren und damit eine neutralisierende Wirkung ausüben. Die Fusion von Anticalinen mit Enzymen oder anderen Effektor-domänen könnte im Anschluß an die Bindung eines Zielmoleküls – beispielsweise eines Zelloberflächenproteins – eine entsprechende Reaktion hervorrufen. Auf diese Weise ließe sich beispielsweise ein zelltoxischer Effekt exakt adressieren. Solche Verfahren, die bereits in Verbindung mit Immunglobulin-Fragmenten eingesetzt werden, eröffnen vor allem bei der Bekämpfung von Tumoren vielversprechende Behandlungsmöglichkeiten (Übersicht in Reiter & Pastan, 1998).

Für den Einsatz von Bindungsproteinen in der medizinischen Therapie ist es essentiell, daß diese eine geringe Immunogenität aufweisen. Für solche Anwendungen bieten sich deshalb Anticaline auf Basis einer humanen Gerüststruktur an, da solche von körpereigenen Proteinen abgeleitete Moleküle nur vergleichsweise geringe Immunreaktionen zur Folge haben sollten.

Folgerichtig wurde in dieser Arbeit die Proteinarchitektur eines humanen Lipocalins auf ihre Eignung zur Erzeugung von Anticalinen mit Affinität zu Protein-Antigenen untersucht. Das ApoD schien zu diesem Zweck aus mehreren Gründen geeignet. Die Homologie des ApoD zum BBP machte eine Voraussage der dreidimensionalen Struktur des Proteins möglich (Peitsch & Boguski, 1990), wodurch das ApoD zum Zeitpunkt des Beginns dieser Studien neben dem RBP (Cowan *et al.*, 1990) das einzige humane Lipocalin mit brauchbarer Strukturinformation darstellte. Die Struktur des ApoD, dessen Bindungstasche verglichen mit der des RBP vermutlich weiter geöffnet ist, sollte gerade die Generierung ausgedehnter Kontaktstellen, wie sie zur Komplexierung makromolekularer Zielstrukturen erforderlich sind, ermöglichen. Für die Verwendung des ApoD sprach zudem, daß es in zahlreichen humanen Geweben und extrazellulären Flüssigkeiten auftritt, wobei es nach heutigem Stand der Forschung keinen Rezeptor für dieses Protein gibt, was für die beabsichtigte therapeutische Nutzung ApoD-basierter Anticaline von Vorteil wäre.

Tatsächlich führte der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz zur Erzeugung eines humanen Anticalins im Prinzip zum Erfolg. Die Ergebnisse zeigen, daß die zur Randomisierung ausgewählten Aminosäurepositionen grundsätzlich geeignet sind, in ApoD-Varianten molekulare Oberflächen mit Affinität zu Protein-Antigenen zu erzeugen. Die vier Peptidschleifen des ApoD weisen damit offensichtlich eine ähnliche strukturelle Plastizität auf, wie sie für die analogen Bereiche des BBP gefunden wurden (Korndörfer *et al.*, 2003). Gleichzeitig deuten

die erhaltenen Resultate an, daß das Raummodell des ApoD (Peitsch & Boguski, 1990) eine brauchbare Planungsgrundlage liefert. Das erhaltene Anticalin auf der Basis des ApoD zeigt hinsichtlich Affinität und Spezifität Komplexierungseigenschaften, die denen von Antikörpern vergleichbar sind.

Prinzipiell sollten humane Anticaline gegenüber anderen Gerüstrukturen Vorteile aufweisen. So besitzen viele Bindungsproteine (Übersicht in Übersicht in Skerra, 2000a), die auf nicht-humanen Strukturen beruhen, eine potentiell große Immunogenität und scheinen daher für therapeutische Anwendungen weniger geeignet. Mittels *Protein Engineering* veränderte humane Lipocaline sind hinsichtlich ihrer diesbezüglichen Eigenschaften ähnlich zu bewerten wie modifizierte humane Antikörper; eine exakte Voraussage der Immunogenität ist aber nach heutigem Kenntnisstand nicht möglich.

Zum zweiten besitzt die Lipocalin-Architektur aufgrund ihrer vier ausgedehnten Peptid-schleifenbereiche, welche die Bindung zum Antigen bestimmen, eine besondere Variabilität in Bezug auf die Natur des Antigens. Die in der vorliegenden Arbeit bewerkstelligte Umgestaltung des niedermolekulare Moleküle bindenden ApoD in ein Rezeptormolekül, das selektiv ein Protein-Antigen komplexiert, stellt die Vielseitigkeit und das Potential der Anticalin-Technologie unter Beweis.

Es muß allerdings erwähnt werden, daß die Generierung von artifiziellen Bindungsproteinen auf Basis des ApoD – ungeachtet der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse – aufgrund der Neigung des Moleküls zur Aggregation (siehe Abschnitt 4.3) mit Schwierigkeiten einherging. Zwar konnten diese letztlich umgangen werden, jedoch empfiehlt sich vor diesem Hintergrund auch eine Untersuchung anderer humaner Lipocalin-Strukturen wie beispielsweise des Neutrophilen Gelatinase-assoziierten Lipocalins, dessen Raumstruktur mittlerweile bestimmt werden konnte (Coles *et al.*, 1999), auf ihre Eignung als molekulare Gerüststruktur für künstliche Rezeptormoleküle. Zudem dürfte die Strukturaufklärung des ApoD oder eines seiner Derivate hilfreich sein.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Protein aus der Strukturfamilie der Lipocaline, das humane Apolipoprotein D (ApoD), durch *Protein Engineering* so umgestaltet, daß es ein vorbestimmtes Protein-„Antigen“ (humanes Hämoglobin) – anstelle seiner natürlichen Liganden Progesteron und Arachidonsäure – komplexiert.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die gentechnische Herstellung des ApoD in *Escherichia coli* etabliert. Dazu wurde die kodierende DNA des ApoD aus einer cDNA-Bank amplifiziert und in einem geeigneten bakteriellen Expressionsvektor pApoD5 kloniert, auf dem das Strukturgen unter der Transkriptionskontrolle des stringent regulierten *tet^o* stand. Die kodierende Region für das ApoD wurde dabei am 5'-Ende mit der bakteriellen OmpA-Signalsequenz und am 3'-Ende mit einem Genabschnitt für das Affinitätsanhängsel *Strep*-tag II fusioniert. Damit wurde das Protein in den periplasmatischen Raum des Bakteriums sekretiert und aus diesem anschließend durch Zellfraktionierung und Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert.

Das rekombinante Protein wurde mittels SDS-PAGE, N-terminaler Sequenzierung, Massenspektrometrie sowie CD-Spektroskopie charakterisiert. Ausführliche Bindungsstudien mittels Fluoreszenztitration wurden mit Substanzen, die als natürliche Liganden des ApoD in Frage kamen, durchgeführt, um die biochemische Aktivität des rekombinanten ApoD zu analysieren. Diese Untersuchungen bestätigten eine bereits bekannte Affinität des ApoD zu dem Steroidliganden Progesteron (Komplex-Dissoziationskonstante $K_D = 1,71 \pm 0,02 \mu\text{M}$ bei pH 7) sowie zu Arachidonsäure ($K_D = 3,25 \pm 0,22 \mu\text{M}$ bei pH 6). Dagegen konnte für die Verbindungen Bilirubin, *E*-3-Methyl-2-hexensäure, Pregnenolon und Testosteron entgegen früheren Hinweisen aus der Fachliteratur keine Affinität nachgewiesen werden.

Zur Generierung von künstlichen Bindungsproteinen auf der Grundlage des rekombinanten humanen ApoD wurden anhand eines theoretischen Strukturmodells für dieses Lipocalin insgesamt 24 Aminosäurepositionen in den vier Peptidschleifen am Eingang der Ligandenbindungstasche (sowie angrenzenden Faltblattbereichen) ortsgerichtet randomisiert und unter Verwendung der *Phage Display*-Methode eine Varianten-Bibliothek erzeugt. Zur konzentrierten Mutagenese des ApoD-Gens wurde eine zweistufige Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von Oligodesoxynukleotiden mit degenerierten Kodons an den gewünschten Positionen eingesetzt. Dabei wurden in einem ersten PCR-Schritt zwei Gen-Fragmente des ApoD erzeugt, die für die Proteinabschnitte mit den vorderen beiden bzw. den hinteren beiden Peptidschleifen kodierten. Im zweiten Schritt wurden diese Fragmente zu der für die ApoD-Varianten kodierenden vollständigen Sequenz verknüpft. Um die genetische Bibliothek durchmustern zu können, wurden die ApoD-Varianten monovalent auf Phagemiden

präsentiert, indem diese als Fusionsproteine mit dem kompletten Phagenhüllprotein pIII exprimiert wurden.

Die genetische Bibliothek wurde dazu auf dem Phasmidvektor pApoD19 kloniert und für die Phagemidproduktion im *E. coli* eingesetzt. Eine erste hergestellte Phagenbibliothek besaß eine Komplexität von $1,5 \cdot 10^8$ Varianten. Anreicherungsversuche bezüglich des Antigens Nogo-A, dessen in *E. coli* hergestelltes Fragment NiFr2 für diese Versuche eingesetzt wurde, blieben allerdings erfolglos. Eine zweite Bibliothek wurde unter optimierten Bedingungen hergestellt und wies eine auf $1,7 \cdot 10^9$ Varianten gesteigerte Diversität auf. Diese Bibliothek wurde auf Varianten mit Bindungsaffinität zu humanem Hämoglobin durchmustert. Im Verlauf eines Anreicherungsverfahrens mit der Phagemidbibliothek, bei dem das Antigen auf einer Kunststoffoberfläche adsorbiert worden war, konnten sieben ApoD-Varianten isoliert werden, die auch in einem anschließenden „Colony Screening-Assay“ Bindung zu Hämoglobin zeigten.

Eine dabei zweifach aufgefundene Variante – als HbgA bezeichnet – wurde hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften genauer untersucht. Dazu wurde das Protein in löslicher Form in *E. coli* produziert und mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (Biacore) die Bindung an kovalent auf einer Sensoroberfläche immobilisiertes Hämoglobin analysiert. Dabei zeigte sich, daß die Variante HbgA das Hämoglobin komplexierte, wobei die Komplex-Dissoziationskonstante durch Messung der Gleichgewichts-Resonanzsignale bei unterschiedlichen Konzentrationen des HbgA zu $K_D = 2,16 \pm 0,36 \mu\text{M}$ bestimmt wurde. Im Gegensatz dazu konnte eine Affinität des rekombinanten Wildtyp-ApoD zu Hämoglobin nicht nachgewiesen werden. Eine schwache Wechselwirkung von HbgA mit Myoglobin wurde allerdings beobachtet und ist vermutlich auf die strukturelle Verwandtschaft von Myoglobin und Hämoglobin zurückzuführen.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals ein künstliches Rezeptorprotein auf der Basis eines humanen Lipocalins mit Bindungsaffinität zu einem Protein-Antigen hergestellt werden. Solche Bindungsmoleküle, die durch *Protein Engineering* von Mitgliedern der Strukturfamilie der Lipocaline erzeugt worden sind, werden als Anticaline bezeichnet. Die in dieser Arbeit exemplarisch gezeigte Fähigkeit eines humanen Anticalins, Protein-Antigene spezifisch zu binden, eröffnet weitere Anwendungsmöglichkeiten für diese Klasse neuartiger Bindungsproteine, nicht nur in Analytik und Diagnostik, sondern insbesondere auch für potentielle humantherapeutische Anwendungen.

6 Literatur

- Åkerstrom, 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.
- Åkerstrom, B. & Lögdberg, L. (1990) An intriguing member of the lipocalin protein family: α_1 -microglobulin. *Trends Biochem. Sci.* 15, 240-243.
- Åkerstrom, B., Flower, D. R. & Salier, J.-P. (2000a) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 1-8.
- Åkerstrom, B., Lögdberg, L., Berggård, T., Osmark, P. & Lindqvist, A. (2000b) α_1 -Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 172-184.
- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. & Plückthun, A. (2001) *In vitro* display technologies: novel developments and applications. *Curr. Opin. Biotech.* 12, 400-405.
- Andersen, J. F., Weichsel, A., Balfour, C. A., Champagne, D. E. & Montfort, W. R. (1998) The crystal structure of nitrophorin 4 at 1.5 Ångstrom resolution: transport of nitric oxide by a lipocalin-based heme protein. *Structure* 6, 1315-1327.
- Arnold, F. H. (1991) Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology* 9, 151-156.
- Arnold, F. H. & Haymore, B. L. (1991) Engineered metal-binding proteins: purification to protein folding. *Science* 252, 1796-1797.
- Aspinall, J. O., Bentel, J. M., Horsfall, D. J., Haagensen, D. E., Marshall, V. R. & Tilley, J. (1995) Differential expression of apolipoprotein D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J. Urol.* 154, 622-628.
- Ayrault-Jarrier, M., Levy, G. & Polonovski, J. (1963) Etude des alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 45, 703-713.
- Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *E. coli* K-12. *J. Bacteriol. Rev.* 36, 525-557.
- Balbín, M., Freije, J. M. P., Fueyo, A., Sánchez, L. M. & López-Otín, C. (1990) Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J.* 271, 803-807.
- Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z. H., Bernlohr, D. A., Cowan, S. & Jones, T. A. (1994) Lipid binding proteins – a family of fatty-acid and retinoid transport proteins. *Adv. Protein Chem.* 45, 89-151.
- Barbas, C. F., 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.
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001) Phage Display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Bass, S., Greene, R. & Wells, J. A.** (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* 8, 309-314.
- Baumann, U., Bauer, M., Letoffe, S., Delepelaire, P. & Wandersman, C.** (1995) Crystal-structure of a complex between *Serratia marcescens* metalloprotease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* 248, 653-661.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E.** (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
- Beste, G.** (1998) Evolutes Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β -Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. & Skerra, A.** (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. 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. *Nat. Struct. Biol.* 3, 934-939.
- Bishop, R. E., Penfold, S. S., Frost, L. S., Höltje, J.-V. & Weiner, J. H.** (1995) Stationary phase expression of a novel *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein and its relationship with mammalian apolipoprotein D. *J. Biol. Chem.* 270, 23097-23103.
- 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.
- Blanco-Vaca, F., Via, D. P., Yang, C., Massey, J. B. & Pownall, H. J.** (1992) Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. *J. Lipid. Res.* 33, 1785-1796.
- Blombäck, B.** (1968) Derivatives of glutamine in peptides. *Methods Enzymol.* 11, 398-411.
- Boder, E. T. & Wittrup, K. D.** (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15, 553-557.
- 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.
- Borghini, I., Barja, F., Pometta, D. & James, R. W.** (1995) Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 192-200.
- Boyles, J. K., Notterpek, L. M. & Anderson, L. J.** (1990) Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. *J. Biol. Chem.* 265, 17805-17815.

- 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 E. coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio/Techniques* 5, 376-378.
- Busby, W. H., Quackenbush, G. E., Humm, J., Youngblood, W. W. & Kizer, J. S.** (1987) An enzyme that converts glutamyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 8532-8536.
- Cardamone, M. & Puri, N. K.** (1992) Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* 282, 589-593.
- Casson, L. P. & Manser, T.** (1995) Evaluation of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody V_H region. *J. Immun.* 155, 5647-5654.
- Cavaggioni, A. & Mucignat-Caretta, C.** (2000) Major urinary proteins, α_{2U} -globulins and aphrodisin. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 218-228.
- Chen, E. Y. & Seeburg, P. H.** (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* 4, 165-170.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F. & Schwab, M. E.** (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439.
- Chester, K. A. & Hawkins, R. E.** (1995) Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* 13, 294-300.
- Chiswell, D. J. & McCafferty, J.** (1992) Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? *Trends Biotechnol.* 10, 80-84.
- Chu, S.-T., Lin, H.-L. & Chen, Y.-H.** (1997) Complex formation between a formyl peptide and 24p3 protein with a blocked N-terminus of pyroglutamate. *J. Peptide Res.* 49, 582-585.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G.** (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, 624-628.
- Clackson, T. & Wells, J. A.** (1994) *In vitro* selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol.* 12, 173-184.
- Clackson, T. & Wells, J. A.** (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science* 267, 383-386.
- 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, 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.

- Coia, G., Ayres, A., Lilley, G. G., Hudson, P. J. & Irving, R. A.** (1997) Use of mutator cells as a means for increasing production levels of a recombinant antibody directed against hepatitis B. *Gene* 201, 203-209.
- Coles, M., Diercks, T., Muehlenweg, B., Bartsch, S., Zölzer, 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.
- Creighton, T. E.** (1997) How important is the molten globule for correct protein folding? *Trends Biotechnol.* 22, 6-10.
- Cull, M. G., Miller, J. F. & Schatz, P. J.** (1992) Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C-terminus of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1865-1869.
- Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barret, R. W. & Dower, W. J.** (1990) Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382.
- Dall'Acqua, W. & Carter, P.** (1998) Antibody engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 443-450.
- Danse, J. M., Rowan, E. G., Gasparini, S., Ducancel, F., Vatanpour, H., Young, L. C., Poorheidari, G., Lajeunesse, E., Drevet, P., Ménez, R., Pinkasfeld, S., Boulain, J. C., Harvey, A. L. & Ménez, A.** (1994) On the site by which α -dendrotoxin binds to voltage-dependent potassium channels: site-directed mutagenesis reveals that the lysine triplet 28-30 is not essential for binding. *FEBS Lett.* 356, 153-158.
- Davies, J. & Riechmann, L.** (1995) Antibody VH domains as small recognition units. *Bio/Technology* 13, 475-479.
- Deng, L. W., Malik, P. & Perham, R. N.** (1999) Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* 253, 271-277.
- Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L. A.** (2002) Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043.
- Devereux, J., Haeblerli, P. & Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Devlin, J. L., Panganiban, L. C. & Devlin, P. E.** (1990) Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* 249, 404-406.
- Diaz, C., Serra, F., Vizoso, F., Lamelas, J. C., Rodriguez, L. O., Gonzalez, L. O., Baltasar, A. & Medrano, J.** (1999) Expression and clinical significance of apolipoprotein D in male breast cancer and gynaecomastia. *Br. J. Surg.* 86, 1190-1197.
- Dickerson, R. E. & Geis, I.** (1983) Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology, The Benjamin/Cummings publishing company, Menlo Park, CA, USA.

- Dilley, W. G., Haagensen, D. E., Cox, C. E. & Wells, S. A.** (1990) Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res. Treat.* 16, 253-260.
- 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.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L., Wion, K. & Lawn, R.** (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 261, 16535-16539.
- Driessen, A. J. M., Manting, E. H. & van der Dries, C.** (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat. Struct. Biol.* 8, 492-498.
- Duan, J., Dahlbäck, B. & Villoutreix, B. O.** (2001) Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 499, 127-132.
- Dufour, E. & Haertlé, T.** (1990) Alcohol induced changes of β -lactoglobulin-retinol-binding stoichiometry. *Protein Eng.* 4, 185-190.
- Ellis, K. E. & Morrison, J. F.** (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzym.* 87, 405-426.
- Elshourbagy, N. A., Walker, D. W., Boguski, M. S., Gordon, J. I. & Taylor, J. M.** (1986) The nucleotide and derived amino acid sequence of human apolipoprotein A-IV mRNA and the close linkage of its gene to the genes of apolipoproteins A-I and C-III. *J. Biol. Chem.* 261, 1998-2002.
- 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.
- Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R. & Cesarini, G.** (1991) Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222, 301-310.
- Fiedler, M. & Skerra, A.** (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* 274, 111-118.
- Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M. E. & Skerra, A.** (2002) An engineered IN-1 Fab fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng.* 15, 931-941.
- Fielding, P. E. & Fielding, C. J.** (1980) A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3327-3330.

- Fischer, W. H. & Spiess, J.** (1987) Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutaminyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3628-3632.
- 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., North, A. C. T. & Attwood, T. K.** (1993) Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* 2, 753-761.
- Flower, D. R.** (1994) The lipocalin family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* 354, 7-11.
- Flower, D. R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1-14.
- Flower, D. R.** (2000) Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 327-336.
- 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.
- Fujii, I., Fukuyama, S., Iwabuchi, Y. & Tanimura, R.** (1998) Evolving catalytic antibodies in a phage-displayed combinatorial library. *Nat. Biotechnol.* 16, 463-467.
- Fujimori, E.** (1960) On the emission of tryptophan. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 251-256.
- Gao, C., Mao, S., Low, C.-H. L., Wirsching, P., Lerner, R. A. & Janda, K. D.** (1999) Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodynamic arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6025-6030.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P.** (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *Bio/Techniques* 5, 786-791.
- Gibson, T. J.** (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Cambridge University, Cambridge, UK.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Glasel, J. A.** (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm / 280 nm absorbance ratios. *Bio/Techniques* 18, 62-63.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. & Plückthun, A.** (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin F_v-fragments. *Biochemistry* 29, 1362-1367.
- Gram, H., Marconi, L.-A., Barbas, C. F., Collet, T. A., Lerner, R. A. & Kang, A. S.** (1992) *In vitro* selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3576-3580.
- Gray, C. W., Brown, R. S. & Marvin, D. A.** (1981) Adsorption complex of filamentous fd viruses. *J. Mol. Biol.* 146, 621-627.
- Green, N. M.** (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 184, 51-67.

- Greenwood, J., Willis, A. E. & Perham, R. N.** (1991) Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* 220, 821-827.
- 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 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.
- Haagensen, D. E., Mazoujian, G., Dilley, W. G., Pedersen, C. E., Kister, S. J. & Wells, S. A.** (1979) Breast gross cystic disease fluid analysis. Isolation and radioimmunoassay for a component protein. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 239-247.
- Haagensen, D. E. & Mazoujian, G.** (1986) Biochemistry and immunohistochemistry of fluid proteins of the breast in gross cystic disease. *Diseases of the breast*, 3rd edn., Saunders, Philadelphia, PA, 474, 500.
- 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.
- Harris, J. M., Martin, N. E. & Modi, M.** (2001) Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 539-551.
- 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.
- 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.
- Henzel, W. J., Rodriguez, H., Singer, A. G., Stults, J. T., Macrides, F., Agosta, W. C. & Niall, H.** (1988) The primary structure of aphrodisin. *J. Biol. Chem.* 263, 16682-16687.
- 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 metal chelat adsorbent. *Bio/Technology* 6, 1321-1325.
- 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.

- Holliger, P., Riechmann, L. & Williams, R. L.** (1999) Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. *J. Mol. Biol.* 288, 649-657.
- Holmquist, L., Vesterberg, O. & Persson, B.** (1993) Apolipoprotein D and α_1 -microglobulin in human urine: effect of cadmium exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 64, 469-472.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, S. K., 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.
- Hoogenboom, H. R.** (1997) Designing and optimizing selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* 15, 62-70.
- Hoogenboom, H. R., de Bruijne, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J.-W. & Roovers, R. C.** (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4, 1-20.
- Huber, A., Demartis, S. & Neri, D.** (1999) The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *J. Mol. Recognit.* 12, 198-216.
- Huber, A. & Schwab, M. E.** (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol. Chem.* 381, 407-419.
- 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 the insect *Pieris brassicae* at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198, 499-513.
- Jin, L., Fendly, B. M. & Wells, J. A.** (1992) High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions. *J. Mol. Biol.* 226, 851-865.
- Johnson, W. C.** (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 17, 145-166.
- Jones, P.** (1998) Display of antibody chains on filamentous bacteriophage. *Methods Mol. Biol.* 80, 449-459.
- Jönsson, U., Fägerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenberg, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H. & Malmqvist, M.** (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Bio/Techniques*, 11, 620-627.
- Jung, S., Honegger, A. & Plückthun, A.** (1999) Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* 294, 163-180.
- 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. & Gilbert, L. I., eds.) 10, 367-415, Pergamon Press, New York.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B. & Borregaard, N.** (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 272-283.
- Knappik, A. & Plückthun, A.** (1995) Engineered turns of a recombinant antibody to improve its *in vivo* folding. *Protein. Eng.* 8, 81-89.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhöfer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.** (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody 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.
- Kontopidis, G., Holt, C. & Sawyer, L.** (2002) The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: evidence for a function? *J. Mol. Biol.* 318, 1043-1055.
- Korndörfer, I. P., Schlehuber, S. & Skerra, A.** (2003) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J. Mol. Biol.* 330, 385-396.
- Kraulis, P. J.** (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946-950.
- 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.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157, 105-132.
- 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.) Academic Press, San Diego, 155-156.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagarde, M.** (1988) in: *Prostaglandins, biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids*, Curtis-Prior, P. B., Churchill-Livingstone, 147-151.

- Lea, O. A., Kvinnsland, S. & Thorsen, T.** (1987) Progesterone-binding cyst protein in human breast tumor cytosol. *Cancer Res.* 47, 6189-6192.
- Lea, O. A.** (1988) Binding properties of progesterone-binding cyst protein, PBCP. *Steroids* 52, 337-338.
- Levitan, B.** (1998) Stochastic modeling and optimization of phage display. *J. Mol. Biol.* 277, 893-916.
- Leung, D. W., Chen, E. & Goeddel, D. V.** (1989) A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique (Philadelphia)* 1, 11.
- Löfås, S. & Johnsson, B.** (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21, 1526-1528.
- López-Boado, Y. S., Tolia, J. & López-Otin, C.** (1994) Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 269, 26871-26878.
- 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.
- Lowman, H. B. & Wells, J. A.** (1991) Monovalent phage display: a method for selecting variant proteins from random libraries. *Methods: Companion Methods Enzymol.* 3, 205-216.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A.** (1998) The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat. Struct. Biol.* 5, 140-147.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A.** (1999) Filamentous-phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure*, 7, 711-722.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. & Mathur, E. J.** (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- Mägert, H. J., Hadrys, T., Cieslak, A., Gröger, A., Feller, S. & Forssmann, W. G.** (1995) cDNA sequence and expression pattern of the putative pheromone carrier aphrodisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2091-2095.
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C. & Weisgraber, K. H.** (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25, 1277-1294.
- Makrides, S. C.** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *E. coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.

- 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.
- Martin, F., Toniatti, C., Salvati, A. L., Ciliberto, G., Cortese, R. & Sollazzo, 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.
- Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R. & Dower, W. J.** (1994) An *in vitro* display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022-9026.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J.** (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McConathy, W. J. & Alaupovic, P.** (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D; a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* 37, 178-182.
- McConnell, S. J. & Hoess, R. H.** (1995) Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.* 250, 460-470.
- Meerman, H. J. & Georgiou, G.** (1994) Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology* 12, 1107-1110.
- Miller, J. H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Milne, R. W., Rassart, E. & Marcel, Y. L.** (1993) Molecular biology of apolipoprotein D. *Curr. Opin. Lipidol.* 4, 100-106.
- Missiakas, D. & Raina, S.** (1997) Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471.
- Model, P. & Russel, M.** (1988) Filamentous bacteriophage, in *The bacteriophages*, Vol. 2, 375-456, Plenum Publishing, New York.
- 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.
- Monaco, H. L.** (2000) The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochem. Biophys. Acta* 1482, 65-72.
- Montfort, W. R., Weichsel, A. & Andersen, J. F.** (2000) Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochem. Biophys. Acta* 1482, 110-118.
- Morais Cabral, J. H., Atkins, G. L., Sánchez, L. M., López-Boado, Y. S., López-Otin, C. & Sawyer, L.** (1995) Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.* 366, 53-56.

- Movva, N. R., Nakamura, K. & Inoye, M.** (1980) Amino acid sequence of the signal peptide of *ompA* protein, a major outer membran protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 27-29.
- Müller, H. N. & Skerra, A.** (1993) Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in *E. coli*: ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J. Mol. Biol.* 230, 725-732.
- Müller, H. N. & Skerra, A.** (1994) Grafting of a high-affinity Zn(II)-binding site on the β -barrel of retinol-binding protein results in enhanced folding stability and enables simplified purification. *Biochemistry* 33, 14126-14135.
- Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C. & de Vos, A. M.** (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7192-7197.
- Mullet, W. M., Lai, E. P. C. & Yeung, J. M.** (2000) Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods* 22, 77-91.
- Murray, N. E.** (2000) Type I restriction systems: sophisticated molecular machines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 412-434.
- Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. & Hayaishi, O.** (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionary differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4020-4024.
- Newcomer, M. E., Jones, T. A., Åqvist, 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. & Ong, D. E.** (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochem. Biophys. Acta* 1482, 57-64.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C. & Plückthun, A.** (1997) Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved *in vivo* folding and physical characterization of an engineered scF_v fragment. *Prot. Eng.* 10, 435-444.
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. & Winter, G.** (1994) Antibody fragments from a single pot phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* 13, 692-698.
- Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlén, M. & Nygren, P.-Å.** (1995) A combinatorial library of an α -helical bacterial receptor domain. *Prot. Eng.* 8, 601-608.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 15, 772-777.
- Nygren, P.-Å., Eliasson, M., Palmcrantz, E., Abrahmsén, L. & Uhlén, M.** (1988) Analysis and use of the serum albumin binding domains of streptococcal protein G. *J. Mol. Recognit.* 1, 69-74.

- 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., Lindbergh, M. & Uhlén, M.** (1987) Structure and evolution of the repetitive gene encoding streptococcal protein G. *Eur. J. Biochem.* 168, 319-324.
- Ørum, H., Andersen, P. S., Øster, A., Johanson, L. K., Riise, E., Bjørnward, M., Svendsen, I. & Engberg, J.** (1993) Efficient method for constructing comprehensive murine F_{ab} antibody libraries displayed on phage. *Nucleic Acids Res.* 21, 4491-4498.
- Padlan, E. A.** (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31, 169-217.
- Paesen, G. C., Adams, P. I., Harlos, K., Nutall, P. A. & Stuart, D. I.** (1999) Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell.* 3, 661-671.
- Parmley, S. E. & Smith, G. P.** (1988) Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318.
- Pearlman, W. H., Guériguian, J. L. & Sawyer, M. E.** (1973) A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid. *J. Biol. Chem.* 248, 5736-5741.
- Pedersen, H., Hölder, S., Sutherlin, D. P., Schwitter, U., King, D. S. & Schultz, P. G.** (1998) A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10523-10528.
- Peitsch, M. C. & Boguski, M. S.** (1990) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol.* 2, 197-206.
- 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.
- Pervaiz, S. & Brew, K.** (1985) Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein and protein HC. *Science* 228, 335-337.
- Pervaiz, S. & Brew, K.** (1987) Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J.* 1, 209-214.
- 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.
- Pohl, T., Zimmer, M., Mugele, K. & Spiess, J.** (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10059-10063.
- Porath, J., Carlsson, J. Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.

- Provost, P. R., Weech, P. K., Tremblay, N. M., Marcel, Y. L., Rassart, E.** (1990) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res.* 31, 2057-2065.
- Provost, P. R., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Weech, P. K. & Rassart, E.** (1991) Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett.* 290, 139-141.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. & Milne, R.** (2000) Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 185-198.
- Reiter, Y. & Pastan, I.** (1998) Recombinant F_v immunotoxins and F_v fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis. *Trends Biotechnol.* 16, 513-520.
- Riechmann, L. & Holliger, P.** (1997) The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 90, 351-360.
- Roberts, R. W. & Szostak, J. W.** (1997) RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12297-12302.
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R. & Chen, S. M.** (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* 25, 4500-4504.
- Ruan, B., Hoskins, J., Wang, L. & Bryan, P. N.** (1998) Stabilizing the subtilisin BPN' pro-domain by phage display selection: how restrictive is the amino acid code for maximum protein stability? *Protein Sci.* 7, 2345-2353.
- 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.
- Salen, G., Berginer, V., Shore, V., Horak, I., Horak, E., Tint, G. S. & Shefer, S.** (1987) Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. Effect of chenodeoxycholic acid. *New Eng. J. Med.* 316, 1233-1238.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sato, A., Ida, N., Fukuyama, M., Miwa, K., Kazami, J. & Nakamura, H.** (1996) Identification from a phage display library of peptides that bind to toxic shock syndrome toxin-1 and that inhibit its binding to major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. *Biochemistry* 35, 10441-10447.
- Sawyer, L. & Kontopidis, G.** (2000) The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482, 136-148.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C. & Marks, J. D.** (1996) Isolation of picomolar affinity

- anti-c-erbB-2 single-chain F_v by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antigen binding site. *J. Mol. Biol.* **263**, 551-567.
- Schindler, P. A., Settineri, C. A., Collet, X., Fielding, C. J. & Burlingame, A. L.** (1995) Site-specific detection and structural characterization of the glycosylation of human plasma proteins lecithin:cholesterol acyltransferase and apolipoprotein D using HPLC/electrospray mass spectrometry and sequential glycosidase digestion. *Protein Sci.* **4**, 791-803.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1995) Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallisation through constant domain shuffling. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **23**, 561-565.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1997) The rational construction of an antibody against cystatin: lessons from the crystal structure of an artificial Fab fragment. *J. Mol. Biol.* **268**, 934-951.
- Schlehuber, S.** (2001) Evolutes Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A.** (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* **297**, 1105-1120.
- Schmidt, A. M.** (1998) Untersuchungen zur Proteinfaltung durch Protein Design am Retinol-Bindungsprotein. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität, Darmstadt.
- 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, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Schmidt, F. S. & Skerra, A.** (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*: cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* **219**, 855-863.
- Schmidt, T. G. 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.** (1994) Generierung und Charakterisierung künstlicher Peptid-Streptavidinerkennung: Entwicklung eines C-terminalen Affinitätspeptides für den Nachweis und die Reinigung rekombinanter Proteine. Dissertation, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- 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.
- Schuck, Peter** (1997) Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 541-566.

- Scott, J. K., & Smith, G. P.** (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249, 386-390.
- Sieber, V., Plückthun, A. & Schmidt, F. X.** (1998) Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotechnol.* 16, 955-960.
- Singer, A. G., Macrides, F., Clancy, A. N. & Agosta, W. C.** (1986) Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J. Biol. Chem.* 261, 13323-13326.
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin F_v fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A.** (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Skerra, A., Dreher, M. L. & Winter, G.** (1991) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal. Biochem.* 196, 151-155.
- Skerra, A.** (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 20, 3551-3554.
- 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. *Biochem. 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.
- Skerra, A.** (2001) 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *Rev. Mol. Biotech.* 74, 257-275.
- Smith, G. P.** (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, G. P.** (1991) Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr. Opin. Biotech.* 2, 668-673.
- Smith, G. P., Patel, S. U., Windass, J. D., Thornton, J. M., Winter, G. & Griffiths, A. D.** (1998) Small binding proteins selected from a combinatorial repertoire of knottins displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 277, 317-332.
- Söderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A. M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. & Borrebaeck, C. A.** (2000) Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 18, 852-856.

- Soumillion, P., Jespers, L., Bauchet, M., Marchard-Brynaert, J., Sartiaux, P., Fastrez, J.** (1994) Phage display of enzymes and *in vitro* selection for catalytic activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47, 175-190.
- Spielman, A. I., Zeng, X. N., Leyden, J. J., Preti, G.** (1995) Proteinaceous precursors of human axillary odor: isolation of two novel odor-binding proteins. *Experientia* 51, 40-47.
- Spreyer, P., Schaal, H., Kuhn, G., Rothe, T., Unterbeck, A., Olek, K. & Müller, H. W.** (1990) Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* 9, 2479-2484.
- Ståhl, S. & Uhlén, M.** (1997) Bacterial surface display: trends and progress. *Trends Biotechnol.* 15, 185-192.
- Steinrücke, P., Steffens, G. C. M., Pankus, G., Buse, G. & Ludwig, B.** (1987) Subunit II of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* 167, 431-439.
- Stemmer, W. P. C.** (1994) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370, 389-391.
- 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.
- Suresh, S., Yan, Z., Patel, R. C., Patel, Y. C. & Patel, S. C.** (1998) Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J. Neurochem.* 70, 242-251.
- Sykes, P. A., Watson, S. J., Temple, J. S. & Bateman, R. C.** (1999) Evidence for tissue-specific forms of glutaminyl cyclase. *FEBS Letters* 455, 159-161.
- Tabor, S. & Richardson, C. C.** (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.
- Tabor, S. & Richardson, C. C.** (1995) A single residue in DNA polymerases of *Escherichia coli* DNA polymerase family I is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6339-6343.
- Talmadge, K. & Gilbert, W.** (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1830-1833.
- Tegoni, M., Ramoni, R., Bignetti, E., Spinelli, S. & Cambillau, C.** (1996) Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat. Struct. Biol.* 3, 863-867.
- Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. & Cambillau, C.** (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 229-240.

- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R. & Rassart, E.** (1998) Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* 71, 1643-1650.
- Thomas, E. A., Dean, B., Pavey, G. & Sutcliffe, J. G.** (2001) Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 4066-4071.
- Tung, W. L. & Chow, K. C.** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 11, 128-129.
- Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 259-271.
- Vanthof, W., Blankenvoorde, M. F. J., Veerman, E. C. I. & Amerongen, A. V. N.** (1997) The salivary lipocalin Von Ebner's gland protein is a cystein proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 272, 1837-1841.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 14, 309-314.
- Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. & Tempest, P. R.** (1998) Human antibodies by design. *Nat. Biotechnol.* 16, 535-539.
- Vieira, J. & Messing, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153, 3-11.
- Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K. C., Wellnhofer, G. & Moroney, S. E.** (1994) Trinucleotide phosphoamidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22, 5600-5607.
- Virtanen, T., Zeiler, T. & Mäntyjärvi, R.** (1999) Important animal allergens are lipocalin proteins: why are they allergenic? *Int. Arch. Allergy Immunol.* 120, 247-258.
- 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.
- 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.
- Wickner, W. & Leonard, M. R.** (1996) *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* 271, 29514-29516.
- 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.

- Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M. & Smith, M.** (1982) Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. *Nature* 299, 756-758.
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., van Heerikhuizen, H. & de Leij, L.** (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 74, 160-170.
- Xu, N. & Dahlbäck, B.** (1999) A novel human apolipoprotein (apoM). *J. Biol. Chem.* 274, 31286-31290.
- Yang, C. Y., Gu, Z. W., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S. J., Yang, M., Massey, J. B., Gotto, A. M. & Pownall, H. J.** (1994) Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33, 12451-12455.
- 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.
- Yokoyama, S., Obata, J., Fujie, T. & Nakagaki, M.** (1993) Effect of temperature on the surface properties of aqueous solution of arachidonic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 6-11.
- Zahn, G., Skerra, A. & Höhne, W.** (1999) Investigation of a tetracycline-regulated phage display system. *Protein Eng.* 12, 1031-1034.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R.** (1979) Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry* 18, 5567-5571.
- Zeng, C., Spielman, A. I., Vowels, B. R., Leyden, J. J., Biemann, K. & Preti, G.** (1996) A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93, 6626-6630.

7 Abkürzungen und Symbole

ABD	Albumin-Bindungsdomäne des Proteins G aus <i>Streptococcus</i> G148
Amb	<i>Amber</i> -Stoppkodon (TAG)
ApoD	Apolipoprotein D
BBP	Bilin-Bindungsprotein
bp	Basenpaar
c	Konzentration
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
E	Extinktion
ϵ_x	molarer Extintionskoeffizient bei der Wellenlänge x
F	Fluoreszenz
F _{ab}	Antigen-bindendes Immunglobulinfragment
F _v	Immunglobulinfragment, bestehend aus den variablen Domänen
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
IDA	Iminodiessigsäure
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
kDa	Kilodalton
K _D	Komplex-Dissoziationskonstante
moi	<i>Multiplicity of Infection</i>
pIII	Hüllprotein pIII des filamentösen Phagen M13
PDB	Protein-Datenbank
pfu	<i>Plaque Forming Units</i>
NaPi	Natriumphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RBP	Retinol-Bindungsprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz-Einheiten
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
ssDNA	einzelsträngige DNA
<i>tet</i> ^{p/o}	Tetracyclin-Promotor/Operator
u	Units
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der Vektoren

Vektor	Charakteristika
pApoD1	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD-strepII, bla (basiert auf pASK75strepII)
pApoD2	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116)-strepII, [bla]
pApoD3	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116)-strepII-abd, [bla]
pApoD4	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116)-his, [cat] (basiert auf pASK111)
pApoD5	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116)-strepII, [cat]
pApoD6	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116)-his, [cat]
pApoD10	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)-strepII, [cat]
pApoD12	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)-strepII-abd, [bla]
pApoD14	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)-strepII- <i>amber</i> - $\Delta\Delta$ pIII(217-406), [cat]
pApoD17	<i>tet^r/o</i> , ompA-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)-strep- <i>amber</i> -pIII(3-406), [cat]
pApoD18	<i>tet^r/o</i> , ompA(Δ K12)-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)- Δ pIII(68-406), [cat]
pApoD19	<i>tet^r/o</i> , ompA(Δ K12)-apoD(S116/ <i>Bst</i> XI)- <i>amber</i> -AlaGlyGlyAla-pIII(3-406), [cat]

8.2 Die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein OmpA-ApoD-Strep-tag II auf dem Plasmidvektor pApoD5

```

ATAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTTG
3 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 62
TATTGCGAGCCAACGGCGGCCCGCAAAAAATAACCGGTCTACTAATTAAGGATTA AAAAC

TTGACACTCTATCATTGATAGAGTTATTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTG
63 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 122
AACTGTGAGATAGTAACCTATCTCAATAAAAATGGTGAGGGATAGTCACTATCTCTTTTCAC
-35 -10

XbaI
AAATGAATAGTTCGACAAAAATCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATC
123 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 182
TTTACTTATCAAGCTGTTTTTAGATCTATTGCTCCCGTTTTTTTACTTTTTCTGTCGATAG
OmpA: MetLysLysThrAlaIle
-21

GCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTTCGTACCGTAGCGCAGGCCCAAGCATTTTCATCTT
183 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 242
CGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAAGCGATGGCATCGCGTCCGGGTTTCGTAAAGTAGAA
AlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaGlnAlaPheHisLeu
ApoD: +1

GGGAAGTGCCCAATCCTCCGGTGCAGGAGAATTTTGACGTGAATAAGTATCTCGGAAGA
243 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 302
CCCTTACGGGGTTAGGAGGCCACGTCCTCTTAAACTGCACCTTATTCATAGAGCCTTCT
GlyLysCysProAsnProProValGlnGluAsnPheAspValAsnLysTyrLeuGlyArg

TGGTACGAAATTGAGAAGATCCCAACAACCTTTGAGAATGGACGCTGCATCCAGGCCAAC
303 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 362
ACCATGCTTTAACTCTTCTAGGGTTGTTGGAACTCTTACCTGCGACGTAGGTCCGGTTG
TrpTyrGluIleGluLysIleProThrThrPheGluAsnGlyArgCysIleGlnAlaAsn

TACTCACTAATGGAAAACGGAAAGATCAAAGTGTTAAACCAGGAGTTGAGAGCTGATGGA
363 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 422
ATGAGTGATTACCTTTTGCCTTTCTAGTTTACAAATTTGGTCCTCAACTCTCGACTACCT
TyrSerLeuMetGluAsnGlyLysIleLysValLeuAsnGlnGluLeuArgAlaAspGly

ACTGTGAATCAAATCGAAGGTGAAGCCACCCAGTTAACCTCACAGAGCCTGCCAAGCTG
423 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 482
TGACACTTAGTTTAGCTTCCACTTCGGTGGGGTCAATTGGAGTGTCTCGGACGGTTTCGAC
ThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThrGluProAlaLysLeu

GAAGTTAAGTTTTCTGGTTTTATGCCATCGGCACCGTACTGGATCCTGGCCACCGACTAT
483 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 542
CTTCAATTCAAAAGGACCAAATACGGTAGCCGTGGCATGACCTAGGACCGGTGGCTGATA
GluValLysPheSerTrpPheMetProSerAlaProTyrTrpIleLeuAlaThrAspTyr

GAGAACTATGCCCTCGTGTATTCTGTACTaGtATCATCCAACCTTTTTACGTTGGATTTT
543 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 602
CTCTTGATACGGGAGCACATAAGGACATGatCaTAGTAGGTTGAAAAAGTGCACCTAAAA
GluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerIleIleGlnLeuPheHisValAspPhe

GCTTGGATCTTGGCAAGAAACCCTAATCTCCCTCCAGAAACAGTGGACTCTCTAAAAAAT
603 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 662
CGAACCTAGAACCCTTCTTTGGGATTAGAGGGAGGTCTTTGTACCTGAGAGATTTTTTA
AlaTrpIleLeuAlaArgAsnProAsnLeuProProGluThrValAspSerLeuLysAsn

```



```

ATCCTGACTTCTAATAACATTGATGTCAAGAAAATGACGGTCACAGACCAGGTGAACTGC
663 -----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 722
TAGGACTGAAGATTATTGTA ACTACAGTTCTTTTACTGCCAGTGTCTGGTCCACTTGACG
IleLeuThrSerAsnAsnIleAspValLysLysMetThrValThrAspGlnValAsnCys

                                     HindIII
CCCAAGCTCAGCGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAAGCTTGACCTGTGAAG
723 -----+-----+-----+-----+-----+-----+--- 782
GGGTTCGAGTCGCGAACCAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTTTATTATTTCGA ACTGGACACTTC
ProLysLeuSerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
          169          Strep-tag II

```

Der abgebildete Sequenzbereich enthält die *tet^D/o*-Region, wobei die -35 und -10 Konsensussequenzen gekennzeichnet sind (Skerra, 1994). Weiterhin sind die kodierenden Bereiche für die OmpA-Signalsequenz, das ApoD und das *Strep*-tag II dargestellt. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III sind unterstrichen. Die Numerierung der Basensequenz bezieht sich auf die Abfolge im Vektor pApoD5.

8.3 Die kodierende Sequenz für das Fusionsprotein OmpA-ApoD-Strep-tag II-pIII auf dem Phasmidvektor pApoD19

```

CAAGCATTTTCATCTTGGGAAGTGCCCCAATCCTCCGGTGCAGGAGAATTTTGACGTGAAT
228 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 287
GTTTCGTAAAGTAGAACCCCTCACGGGGTTAGGAGGCCACGTCCTCTTAAACTGCACTTA
  GlnAlaPheHisLeuGlyLysCysProAsnProProValGlnGluAsnPheAspValAsn
ApoD:  +1

          BstXI
AAGTATCCAGGAAGATGGTACGAAATTGAGAAGATCCCAACAACCTTTGAGAATGGACGC
288 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 347
TTCATAGGTCCTTCTACCATGCTTTAACTCTTCTAGGGTTGTTGGAAACTCTTACCTGCG
  LysTyrProGlyArgTrpTyrGluIleGluLysIleProThrThrPheGluAsnGlyArg

TGCATCCAGGCCAACTACTCATAATGGAAAACGGAAAGATCAAAGTGTTAAACCAGGAG
348 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 407
ACGTAGGTCCGGTTGATGAGTGATTACCTTTTGCCTTTCTAGTTTCACAATTTGGTCCTC
  CysIleGlnAlaAsnTyrSerLeuMetGluAsnGlyLysIleLysValLeuAsnGlnGlu

TTGAGAGCTGATGGAAGTGTGAATCAAATCGAAGGTGAAGCCACCCAGTTAACCTCACA
408 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 467
AACTCTCGACTACCTTGACACTTAGTTTACTTCCACTTCGGTGGGGTCAATTGGAGTGT
  LeuArgAlaAspGlyThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThr

GAGCCTGCCAAGCTGGAAGTTAAGTTTTCTGGTTTATGCCATCGGCACCGTACTGGATC
468 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 527
CTCGGACGGTTCGACCTTCAATTCAAAAGGACCAAATACGGTAGCCGTGGCATGACCTAG
  GluProAlaLysLeuGluValLysPheSerTrpPheMetProSerAlaProTyrTrpIle

CTGGCCACCGACTATGAGAACTATGCCCTCGTGTATTCTGTACTAGTATCATCCAACCT
528 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 587
GACCGGTGGCTGATACTCTTGATACGGGAGCACATAAGGACATGATCATAGTAGGTTGAA
  LeuAlaThrAspTyrGluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerIleIleGlnLeu

          BstXI
TTTCACGTGGATTTTGCTTGGATCTTGGCCAGAAACGTGGCTCTCCCTCCAGAAACAGTG
588 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 647
AAAGTGCACCTAAAACGAACCTAGAACCGGTCTTTGCACCGAGAGGGAGGTCTTTGTAC
  PheHisValAspPheAlaTrpIleLeuAlaArgAsnValAlaLeuProProGluThrVal

GACTCTCTAAAAAATATCCTGACTTCTAATAACATTGATGTCAAGAAAATGACGGTCACA
648 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 707
CTGAGAGATTTTTTATAGGACTGAAGATTATTGTAACCTACAGTTCTTTTACTGCCAGTGT
  AspSerLeuLysAsnIleLeuThrSerAsnAsnIleAspValLysLysMetThrValThr

GACCAGGTGAACTGCCCCAAGCTCAGCGCTGGTGGGCCTAGACTGTTGAAAGTTGTTTA
708 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 767
CTGGTCCACTTGACGGGGTTCGAGTCGCGACCACCCCGGATCTGACAACTTTCAACAAAT
  AspGlnValAsnCysProLysLeuSerAlaGlyGlyAlaEndThrValGluSerCysLeu
                                     169                Amb +3 (pIII)

GCAAAACCCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGAT
768 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 827
CGTTTTGGGGTATGTCTTTAAGTAAATGATTGCAGACCTTTCTGCTGTTTTGAAATCTA
  AlaLysProHisThrGluAsnSerPheThrAsnValTrpLysAspAspLysThrLeuAsp

```

CGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGT 828
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 887
 GCAATGCGATTGATACTCCCGACAGACACCTTACGATGTCCGCAACATCAAACATGACCA
 ArgTyrAlaAsnTyrGluGlyCysLeuTrpAsnAlaThrGlyValValValCysThrGly

 GACGAAACTCAGTGTACGGTACATGGGTTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAG 888
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 947
 CTGCTTTGAGTCACAATGCCATGTACCCAAGGATAACCCGAACGATAGGGACTTTTACTC
 AspGluThrGlnCysTyrGlyThrTrpValProIleGlyLeuAlaIleProGluAsnGlu
 68

 GGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAA 948
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1007
 CCACCACCGAGACTCCCACCGCCAAGACTCCCACCGCCAAGACTCCCACCGCCATGATTT
 GlyGlyGlySerGluGlyGlyGlySerGluGlyGlyGlySerGluGlyGlyGlyThrLys
 ($\Delta pIII$)

 CCTCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGC 1008
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1067
 GGAGGACTCATGCCACTATGTGGATAAGGCCCGATATGAATATAGTTGGGAGAGCTGCCG
 ProProGluTyrGlyAspThrProIleProGlyTyrThrTyrIleAsnProLeuAspGly

 ACTTATCCGCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCT 1068
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1127
 TGAATAGGCGGACCATGACTCGTTTTGGGGCGATTAGGATTAGGAAGAGAACTCCTCAGA
 ThrTyrProProGlyThrGluGlnAsnProAlaAsnProAsnProSerLeuGluGluSer

 CAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAA 1128
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1187
 GTCGGAGAATTATGAAAGTACAAAGTCTTATTATCCAAGGCTTTATCCGTCCCCCGTAAT
 GlnProLeuAsnThrPheMetPheGlnAsnAsnArgPheArgAsnArgGlnGlyAlaLeu

 ACTGTTTATACGGGCACCTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAAACCTTATTACCAGTAC 1188
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1247
 TGACAAAATATGCCCGTGACAAATGAGTTCCGTGACTGGGGCAATTTTGAATAATGGTCATG
 ThrValTyrThrGlyThrValThrGlnGlyThrAspProValLysThrTyrTyrGlnTyr

 ACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGC 1248
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1307
 TGAGGACATAGTAGTTTTCGGTACATACTGCGAATGACCTTGCCATTTAAGTCTCTGACG
 ThrProValSerSerLysAlaMetTyrAspAlaTyrTrpAsnGlyLysPheArgAspCys

 GCTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATCCATTTCGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCT 1308
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1367
 CGAAAGGTAAGACCGAAAATTACTCCTAGGTAAGCAAACACTTATAGTTCCGGTTAGCAGA
 AlaPheHisSerGlyPheAsnGluAspProPheValCysGluTyrGlnGlyGlnSerSer

 GACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGC 1368
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1427
 CTGGACGGAGTTGGAGGACAGTTACGACCGCCGCGAGACCACCACCAAGACCACCGCCG
 AspLeuProGlnProProValAsnAlaGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGly
 217 ($\Delta pIII$)

 TCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGT 1428
 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1487
 AGACTCCCACCACCGAGACTCCCACCGCCAAGACTCCCACCGCCGAGACTCCCTCCGCCA
 SerGluGlyGlyGlySerGluGlyGlyGlySerGluGlyGlyGlySerGluGlyGlyGly

```

TCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAG
1488 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1547
AGGCCACCACCGAGACCAAGGCCACTAAAATAACTTTTCTACCGTTTGCGATTATTC
SerGlyGlyGlySerGlySerGlyAspPheAspTyrGluLysMetAlaAsnAlaAsnLys

GGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCCAACTT
1548 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1607
CCCCGATACTGGCTTTTACGGCTACTTTTGCGCGATGTCAGACTGCGATTTCCGTTTGAA
GlyAlaMetThrGluAsnAlaAspGluAsnAlaLeuGlnSerAspAlaLysGlyLysLeu

GATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGC
1608 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1667
CTAAGACAGCGATGACTAATGCCACGACGATAGCTACCAAAGTAACCACTGCAAAGGCCG
AspSerValAlaThrAspTyrGlyAlaAlaIleAspGlyPheIleGlyAspValSerGly

CTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCTAAATGGCTCAA
1668 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1727
GAACGATTACCATTACCACGATGACCACTAAAACGACCGAGATTAAGGGTTTACCAGATT
LeuAlaAsnGlyAsnGlyAlaThrGlyAspPheAlaGlySerAsnSerGlnMetAlaGln

GTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTC
1728 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1787
CAGCCACTGCCACTATTAAGTGGAAATTACTTATTAAGGCAGTTATAAATGGAAGGGAG
ValGlyAspGlyAspAsnSerProLeuMetAsnAsnPheArgGlnTyrLeuProSerLeu

CCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCT
1788 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1847
GGAGTTAGCCAACTTACAGCGGGAAAACAGAAACCGCGACCATTTGGTATACTTAAAAGA
ProGlnSerValGluCysArgProPheValPheGlyAlaGlyLysProTyrGluPheSer

ATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCC
1848 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1907
TAACTAACACTGTTTTATTTGAATAAGGCACCACAGAAACGCAAAGAAAATATACAACGG
IleAspCysAspLysIleAsnLeuPheArgGlyValPheAlaPheLeuLeuTyrValAla

ACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATAA
1908 ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1967
TGAAAATACATACATAAAAGATGCAAACGATTGTATGACGCATTATTCCTCAGAATTATT
ThrPheMetTyrValPheSerThrPheAlaAsnIleLeuArgAsnLysGluSerEnd
406

```

Der dargestellte Sequenzbereich beginnt mit dem Strukturgen für das mature ApoD, gefolgt von einem Verbindungssegment aus vier Aminosäuren, dem *Amber*-Stoppkodon, sowie dem Phagenhüllprotein pIII mit dessen Aminosäuren 3 bis 406. Eingezeichnet sind außerdem die Erkennungssequenzen für *Bst*XI, welche die mutagenisierte Genkassette des ApoD flankieren, sowie die mit der Einfügung dieser Schnittstellen einhergehenden Aminosäuresubstitutionen (unterstrichen). Der gegen Ser ausgetauschte Rest Cys116 ist ebenfalls gekennzeichnet. Außerdem sind die verschiedenen Domänen des pIII bezeichnet (siehe Abschnitt 3.4).

Lebenslauf

Name Martin Vogt
Anschrift 451 Addison Avenue, Palo Alto, CA94301, USA
Geburtsdatum 30. Juni 1970
Geburtsort Frankfurt am Main

Schulbildung

1977 – 1981 Georg-Kerschensteiner-Grundschule, Schwalbach am Taunus
1981 – 1990 Liebigschule, Gymnasium der Stadt Frankfurt am Main

1990 – 1991 Zivildienst

Akademische Ausbildung

10/1991 Beginn des Chemiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt
10/1993 Diplomvorprüfung
06/1996 Abschluß des mündlichen Teils der Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Chemische Technologie, Organische Chemie und Physikalische Chemie
07/1996 – 12/1996 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Arne Skerra in der Abteilung Proteinchemie des Institutes für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt mit dem Thema: „Evolutives Design eines künstlichen Lipocalin-Proteins mit Bindungsaktivität für Oligohistidin-Sequenzen“
12/1996 Abschluß des Chemiestudiums an der Technischen Hochschule Darmstadt mit dem Grad eines Diplom-Ingenieurs in der Diplomfachrichtung Chemie
03/1997 Beginn der Doktorarbeit bei Prof. Dr. A. Skerra in der Abteilung Proteinchemie des Institutes für Biochemie an der Technischen Hochschule Darmstadt
03/1997 – 12/1998 Unterstützung durch ein Promotionsstipendium des Landes Hessen
02/1998 Auszeichnung durch die Dr.-Anton-Keller-Stiftung
01/1999 – 09/2001 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
seit 07/2002 Post-Doktorand bei Maxygen, Inc., Redwood City, CA, USA

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Martin Vogt

18. Juni 2003