

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Strukturbiologische Untersuchungen an humanen Lipocalinen und deren Varianten mit neuartigen Bindespezifitäten

Dipl.-Biochem. Dorian Leo Schönfeld

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra

2. Univ.-Prof. Dr. B. Küster

Die Dissertation wurde am 08.04.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.08.2010 angenommen.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Arne Skerra für die interessante und herausfordernde Themenstellung, seine vielfältigen Hilfestellungen sowie sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Lorenz Chatwell, welcher mich in brillanter Weise in die Tiefen der Proteinkristallographie einführte und mir bei der Lösung zahlreicher Probleme kompetent und äußerst freundlich helfen konnte.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie in Weihenstephan danke ich für die angenehme und sehr kollegiale Arbeitsatmosphäre, welche so manche Rückschläge im Laboralltag besser ertragbar machten.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Gabriele Matschiner (Pieris AG), welche durch die freundliche Bereitstellung des Anticalins O10 diese Arbeit zu großen Teilen erst ermöglichte. Der Firma Pieris AG danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Zu großem Dank bin ich Dr. Uwe Müller (BESSY, Berlin) und Dr. Raimond Ravelli (ESRF, Grenoble) für die Phasierung des AGP-Datensatzes per UV-RIP verpflichtet.

Ich danke Dr. A. Schiefner für seine Hilfe bei der Suche und Einpassung des zusätzlichen Liganden in die Kristallstruktur des AGP.

Ich möchte N. Bischoff, D. Breustedt, M. Demler, M. Distel und Dr. A. Nasreen für die Klonierung einiger humaner Lipocaline danken.

Ich danke Walter Stelzer (Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Weihenstephan) für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Mein Dank geht an Anjali Karande (Indian Institute of Science, Bangalore, Indien) für die freundliche Überlassung des Plasmides pRSETAGd.

Ein riesiger Dank geht an meine gesamte Familie und insbesondere an meine Frau Dorothea, die mich auch in schwierigen Zeiten ertragen und nie aufgegeben haben!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die humanen Lipocaline	1
1.2	Das humane α_1 - Acid Glycoprotein (AGP)	4
1.3	Die ANTICALIN [®] Technologie	6
1.3.1	Anticaline als alternative Gerüststrukturen zu Antikörpern	6
1.3.2	Der humane Rezeptor CTLA4 als Zielstruktur für die Immuntherapie	8
1.3.3	Entwicklung eines Anticalins gegen CTLA4	9
1.4	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Materialien	11
2.1.1	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	11
2.1.2	Oligodesoxynukleotide	12
2.1.3	Enzyme und sonstige Proteine	14
2.1.4	Chemikalien	15
2.1.5	Standards, Kristallisations-Screens und Kits	17
2.1.6	Geräte	18
2.1.7	Sonstiges Material	21
2.1.8	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	27
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	28
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	29
2.2.3.1	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	29
2.2.3.2	Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA	30
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	31
2.2.4.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.4.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	32
2.2.4.3	Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	32
2.2.5	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	33
2.2.5.1	5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	33
2.2.5.2	Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel	34
2.2.5.3	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
2.2.5.4	Dephosphorylierung von DNA	35
2.2.5.5	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA	36
2.2.5.6	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	37
2.2.5.7	Ligierung von DNA-Fragmenten	37

2.2.5.8	Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	38
2.3	Gentechnische Methoden.....	38
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	38
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben.....	39
2.3.1.2	Periplasmatische Produktion von Protein im Laborfermenter.....	40
2.3.2	Proteinproduktion mit Selenomethionin-Substitution.....	42
2.4	Proteinchemische Methoden.....	42
2.4.1	Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern.....	42
2.4.2	Chromatographische Verfahren.....	43
2.4.2.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose.....	43
2.4.2.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie.....	44
2.4.2.3	Größenausschlusschromatographie.....	45
2.4.2.4	Ionenaustauschchromatographie.....	46
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.4.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	47
2.4.5	Konzentrierung von Proteinen.....	48
2.4.6	Western Blotting.....	49
2.5	Biophysikalische Methoden.....	49
2.5.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	49
2.5.2	Fluoreszenz-Titration von Proteinen mit Liganden.....	50
2.5.3	CD-Spektroskopie.....	52
2.5.4	Massenspektrometrie.....	53
2.6	Proteinkristallographische Methoden.....	54
2.6.1	Kristallisation von Proteinen.....	54
2.6.1.1	Suche nach Kristallisationsbedingungen.....	54
2.6.1.2	Optimierung von Kristallisationsbedingungen.....	54
2.6.2	Kryokristallographie.....	55
2.6.3	Datenauswertung.....	56
2.6.4	Phasenbestimmung.....	56
2.6.4.1	Phasierung mittels molekularem Ersatz.....	56
2.6.4.2	Phasierung mittels UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP).....	57
2.6.5	Modellbau und Verfeinerung.....	57
2.6.6	Strukturanalyse und graphische Darstellung.....	58
2.6.7	Modellierung von Liganden in Komplexen.....	58
2.7	Computerprogramme und Datenbanken.....	59

3	Ergebnisse	61
3.1	Strukturanalyse des humanen α_1-Acid Glycoproteins (AGP)	61
3.1.1	Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung von AGP	61
3.1.1.1	Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors	61
3.1.1.2	Optimierung der Expression von AGP	62
3.1.1.3	Produktion von AGP im 8 L Laborfermenter	64
3.1.2	Kristallisation von AGP	66
3.1.3	Sammlung von Röntgen-Beugungsdatensätzen	68
3.1.3.1	Datensatz an der Drehanode	68
3.1.3.2	Datensätze am Synchrotron	68
3.1.4	Phasierungsversuche	69
3.1.4.1	Phasierungsversuche durch molekularen Ersatz	69
3.1.4.2	Phasierungsversuche durch Multiple Anomalous Dispersion (MAD)	70
3.1.4.3	Phasierungsversuche durch Single Anomalous Dispersion (SAD)	74
3.1.5	Phasierung mit UV-RIP	75
3.1.6	Modellbau	77
3.1.7	Die Kristallstruktur des humanen α_1 -Acid-Glycoprotein	80
3.1.7.1	Gesamtstruktur	80
3.1.7.2	Die Bindungstasche	83
3.1.7.3	Liganden in der Kristallstruktur	84
3.1.7.4	Modellierung von Diazepam in der Bindungstasche	85
3.1.7.5	Modellierung von Progesteron in der Bindungstasche	88
3.1.7.6	Der Anteil an α -Helices an der Tertiärstruktur und die Rolle von His172	89
3.1.7.7	Vergleich mit anderen Lipocalinen	91
3.2	Vergleichende Liganden-Bindungsstudie mit humanen Lipocalinen	93
3.2.1	Klonierung von Glycodelin und Odorant Binding Protein auf pASK75-strepII	93
3.2.2	Optimierung der Expression von Glycodelin und Odorant Binding Protein	94
3.2.3	Rekombinante Produktion der rekombinanten Lipocaline in <i>E. coli</i>	95
3.2.4	Fluoreszenz-Titration der Lipocaline mit verschiedenen Liganden	98
3.2.5	Resultate der Bindungsstudien	99
3.3	Bakterielle Produktion der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4	101
3.3.1	Produktion des CTLA4 in monomerer Form (mCTLA4)	101
3.3.1.1	Klonierung und Expression mit pASK75-strepII	101
3.3.1.2	N-terminale Modifikation des Expressionskonstruktes	102
3.3.1.3	Aggregationsverhalten von mCTLA4 mit <i>Strep</i> -tag II	104
3.3.1.4	mCTLA4 mit His ₆ -tag	105
3.3.1.5	mCTLA4 ohne Reinigungs-Anhängsel	105
3.3.1.6	mCTLA4 mit C-terminalem Oktapeptid	106

3.3.2	Produktion des CTLA4 in dimerer Form (dCTLA4)	107
3.3.2.1	Klonierung auf pSA1	108
3.3.2.2	Expression und Rückfaltung von dCTLA4	108
3.3.2.3	Reinigung des dCTLA4	109
3.4	Komplexbildung und Kristallisationsversuche	111
3.4.1	Konstruktion eines Koexpressionsvektors für mCTLA4 und einem Anticalin	111
3.4.2	Komplexbildung von mCTLA4-StrepII mit dem Anticalin J08	112
3.4.3	Komplexbildung des mCTLA4-His ₆ mit dem Anticalin O10	113
3.4.4	Komplexbildung von dCTLA4 mit dem Anticalin O10	114
3.5	Kristallisation und Strukturlösung von O10 und dessen Komplex mit dCTLA4	116
3.5.1	Kristallisation der Apoform des Anticalins O10	116
3.5.2	Kristallisation des O10/dCTLA4-Komplexes	116
3.5.3	Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz und Modellbau	117
3.6	Die Kristallstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes	120
3.6.1	Apo-Struktur des Anticalins O10	120
3.6.2	Gesamtstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes	123
3.6.3	Erkennung der verschiedenen Regionen auf CTLA4	125
3.6.4	Spezifische Kontakte führen zu einer gerichteten Bindungsorientierung	127
3.6.5	Struktureller Vergleich des O10 in unkomplexierter und komplexierter Form	129
4	Diskussion	131
4.1	Strukturbiologische Analyse des humanen AGP	131
4.1.1	Kristallisation und Strukturlösung	131
4.1.2	Kristallstruktur des humanen AGP	133
4.1.3	Funktionelle Betrachtungen des humanen AGP	136
4.2	Ligandenbindung der humanen Lipocaline	137
4.3	Strukturbiologische Analyse des O10/CTLA4-Proteinkomplexes	144
4.3.1	Bakterielle Produktion des humanen CTLA4	144
4.3.2	Kristallisation und Strukturlösung	145
4.3.3	Strukturanalyse	146
4.3.4	Kontaktfläche im Proteinkomplex	148
4.3.5	Vergleich des Erkennungsmodus des Anticalins mit Antikörpern	150
5	Zusammenfassung	153
6	Abkürzungsverzeichnis	156
7	Literatur	158
8	Anhang	173

1 Einleitung

1.1 Die humanen Lipocaline

Die Lipocaline (Flower, 1996 ; Grzyb *et al.*, 2006) bilden eine relativ große und weit verbreitete Familie (Mikroorganismen, Pflanzen, Insekten, Tiere) kleiner extrazellulärer Proteine mit äußerst vielfältigen Funktionen. Als eines ihrer Hauptfunktionen zeichnen sie sich durch die Fähigkeit zur vielfältigen Bindung und zum Transport kleiner, meist hydrophober Liganden wie Steroide, Lipide, Vitamine oder Sekundärmetabolite aus. Die Bindung der meist schlecht wasserlöslichen Moleküle erfolgt in einer kelchartigen Bindungstasche des Proteins, welche namensgebend für die Proteinfamilie ist (lateinisch: *calix*; griechisch: *kalyx* = Kelch). Dabei zeigen die Lipocaline trotz sehr geringer (~ 20 %) Sequenzähnlichkeit eine äußerst starke Konservierung auf struktureller Ebene. Die Proteinarchitektur (Skerra, 2000) wird dabei von einem spezifischen Faltungsmuster aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen dominiert. Diese bilden als Supersekundärstruktur ein sogenanntes β -Fass (*β -barrel*) mit rundem bzw. leicht elliptischem Querschnitt aus. An einem Ende wird die konische Struktur durch kurze Schleifensegmente sowie einer kurzen 3_{10} -Helix nahe dem N-Terminus verschlossen. Die gegenüberliegende Seite des β -Fasses bildet den Eingang zur kelchförmigen Bindungstasche aus, die durch paarweise Verknüpfung der einzelnen Faltblattstränge mit vier längeren Peptidschleifen entsteht. An der Rückseite der Fass-Struktur befindet sich eine meist durch eine Disulfidbrücke verbundene, längere α -Helix.

Zur Zeit werden zwölf Lipocaline im menschlichen Körper beschrieben: *α_1 -Acid Glycoprotein* (AGP) (Ceciliani & Pocacqua, 2007), *Apolipoprotein D* (ApoD) (Rassart *et al.*, 2000), *Complement Component 8 γ* (C8 γ) (Schreck *et al.*, 2000), *Glycodelin* (GLY) (Seppala *et al.*, 2002), *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) (Kjeldsen *et al.*, 2000), *α 1-Microglobulin* (α 1m) (Åkerstrom *et al.*, 2000), *Odorant-Binding Protein* (OBP) (Briand *et al.*, 2002), *Retinol-Binding Protein* (RBP) (Newcomer & Ong, 2000), *Tear Lipocalin* (Tlc) (Redl, 2000) und *β -Trace Protein* (PGDS) (Urade & Hayaishi, 2000). Zusätzlich sind in letzter Zeit das humane epididymale Lipocalin *LCN6* (Hamil *et al.*, 2003) sowie das humane *Apolipoprotein M* (ApoM) (Luo *et al.*, 2004) der Proteinklasse der Lipocaline zugeordnet worden. Tabelle 1 gibt eine Zusammenfassung der zugehörigen Proteine und ihrer Eigenschaften.

Lipocalin	Gewebe	Aminosäuren	Oligomerisierung	Glycosylierung	Disulfidbrücken	Physiol. Liganden
α_1 -Acid Glycoprotein (AGP)	Leber	183	M	+	2	Unbekannt
Apolipoprotein D (ApoD)	Nebenniere Milz Plazenta Niere ZNS	169	M/H	+	2	Progesteron, Arachidonsäure
Apolipoprotein M (ApoM)	Leber Niere	188	M	+	3	unbekannt
Complement component 8 γ (C8 γ)	Leber	182	H	+	1	unbekannt
Epididymales Lipocalin (LCN6)	Nebenhoden	163	?	?	?	unbekannt
Glycodelin (GLY)	Endometrium Eileiter Gebärmutter Brust	162	D	+	2	unbekannt
α 1-Microglobulin (α 1m)	Leber Blutplasma Niere	183	M/H	+	1	Häm
Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL)	Neutrophile	178	M/D/H	-	1	Enterobactin
Odorant-Binding Protein (OBP)	Nasenepithel	155	M	-	1	unbekannt
Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase (PGDS)	ZNS	168	M	+	1	Prostaglandin D
Retinol-Binding Protein (RBP)	Leber	183	M/H	-	3	<i>All-trans</i> retinol
Tear Lipocalin (Tlc)	Tränendrüse	158	M/D	-	1	Stearinsäure, Palmitinsäure, Cholesterol, Laurinsäure, Triacylglycerine

Tabelle 1: Die Eigenschaften der zwölf humanen Lipocaline. M: monomer, D: Dimer, H: Heterodimer

Für sechs der humanen Lipocaline ApoD (Eichinger *et al.*, 2007), C8 γ (Ortlund *et al.*, 2002), NGAL (Goetz *et al.*, 2000), RBP, (Newcomer *et al.*, 1984), PGDS (Komasaka *et al.*, 2009), Tlc (Breustedt *et al.*, 2005) ergab die Röntgenkristallstruktur die beschriebene typische β -Fass-Struktur. Bei ApoD, RBP und NGAL befinden sich gebundene Liganden (Progesteron, Retinol, Enterobactin) in der Bindungstasche.

Neben den Transport- und Bindungseigenschaften ist eine weitreichende Zahl anderer Funktionen dieser Proteinfamilie bekannt. Dazu gehören die Immunregulation (AGP, Hocheppied *et al.*, 2003; α 1m ; GLY, Seppala *et al.*, 2002; C8 γ , Schreck *et al.*, 2000), die Regulation der Zellproliferation und deren Metabolismus (ApoD, Dilley *et al.*, 1990; α 1m, Åkerstrom *et al.*, 2000; NGAL, Kjeldsen *et al.*, 2000), der Geruchssinn (OBP, Briand *et al.*, 2002), der Transport von Retinol (RBP, Newcomer & Ong, 2000) und eine enzymatische Aktivität zur Synthese von Prostaglandin D (PGDS, Kumasaka *et al.*, 2009). Des Weiteren stellen Lipocaline im Serum oder Urin des menschlichen Körpers Marker zur Diagnostik von Entzündungsreaktionen (AGP, NGAL), Schwangerschaft (GLY, Waites & Bell, 1989) und Nierenversagen (α 1m). Im Folgenden wird kurz auf die Lipocaline Glycodelin und Odorant Binding Protein eingegangen, da diese neben AGP (Abschnitt 1.2) in dieser Arbeit bearbeitet wurden.

Das humane Glycodelin (GLY, Gd) kommt je nach Lokalisation im menschlichen Körper in drei verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen Glykosylierungsformen vor: GdA im weiblichen Fruchtwasser, GdF in der weiblichen Follikelflüssigkeit und GdS in der männlichen Spermaflüssigkeit, wobei auf Spermien eine spezifische Bindestelle für GdA entdeckt worden ist. Diese Bindung führt zu einer Unterdrückung der Interaktion zwischen Ei und Spermium (Oehninger *et al.*, 1995). Das im Fruchtwasser enthaltene GdA besitzt demnach empfängnisverhütende Eigenschaften. Allgemein wird allen bekannten Isoformen des Glycodelins eine bestimmende Rolle bei der menschlichen Befruchtung zugeschrieben (Halttunen *et al.*, 2000). Somit ergeben sich für dieses Protein interessante Möglichkeiten zum therapeutischen Einsatz in der Empfängnisverhütung und der Diagnostik. Des Weiteren zeigt Glycodelin immunsuppressive Funktionen mit direkten Auswirkungen auf die Aktivität von T-Zellen sowie die B-Zell- Proliferation (Seppala *et al.*, 2002).

Das humane Odorant Binding Protein (OBP) wird im Epithel der Nase produziert und befindet sich bevorzugt im menschlichen Nasenschleim. Als „Geruchsprotein“ transportiert das OBP kleine, meist hydrophobe Geruchsmoleküle durch das wässrige Milieu der Nasenflüssigkeit hin zu den Geruchsrezeptoren in der Nasenschleimhaut. Außerdem wird vermutet, dass die „Geruchsproteine“ durch Bindung der Geruchsstoffe auch zu deren

Inaktivierung beitragen und somit die Rezeptoren wieder reaktivieren. Die physiologischen Liganden des menschlichen OBP sind allerdings bis heute komplett unbekannt. Im Menschen sind bis jetzt zwei OBP-Gene (*hOBP_{IIa}*, *hOBP_{IIb}*) auf dem Chromosom 9q34 lokalisiert worden (Lacazette *et al.*, 2000). Die Sequenzidentität zwischen beiden Proteinen beträgt auf Aminosäure-Ebene etwa 90%. *hOBP_{IIa}* zeigt etwa 46 % Sequenzidentität zum *OBP-2* der Ratte und wird im Nasenepithel exprimiert. *hOBP_{IIb}* hingegen ist dem menschlichen Tränenlipocalin (Tlc) auf Sequenzebene zu 43 % identisch, wird allerdings überraschenderweise in der Genitalregion exprimiert. Verdrängungsexperimente mit zwei gebundenen fluoreszierenden Verbindungen (NPN und DAUDA) an rekombinantes *hOBP_{IIa}* (Briand *et al.*, 2002) durch unterschiedliche Verbindungen ergab eine Präferenz des Proteins für längere Fettsäuren mit bis zu 16 Kohlenstoffatomen. Auch das Homolog *OBP-2* der Ratte zeigte in vorangegangenen Studien Präferenzen für längere Fettsäuren (Löbel *et al.*, 1998). Kleinere Bindungskonstanten wurden für Aldehydfunktionen ermittelt, allerdings für kürzere Kettenlängen (bis zu 10 Kohlenstoffatome). Zusätzlich konnten Affinitäten für verschiedene Duftstoffe (Eugenol, β -Ionon, Vanillin) festgestellt werden. Die Ligandenspezifität des *hOBP_{IIb}* ist bis heute unbekannt.

1.2 Das humane α_1 - Acid Glycoprotein (AGP)

Im menschlichen Körper ist α_1 -Acid Glycoprotein (AGP oder auch orosomucoid (ORM) genannt) eines der wichtigsten „Entzündungsproteine“ (Cecilian & Pocacqua, 2007). Seine Konzentration im Blut (etwa 1 g/l) steigt während einer Entzündungsreaktion, meist ausgelöst durch Verwundung oder bakterielle Infektion bis auf das Fünffache an (Petersen *et al.*, 2004). Dabei wird AGP - wie die meisten anderen Entzündungsproteine - unter Kontrolle verschiedener Cytokine in der Leber synthetisiert. Neben der Leber wurde auch noch die Biosynthese in anderen Gewebearten beschrieben (Fournier *et al.*, 2000).

Humanes AGP ist das Produkt dreier benachbarter Gene, AGP-A, AGP-B und AGP-B', die auf dem menschlichen Chromosom 9 lokalisiert sind. Dabei codiert AGP-A (Dente *et al.*, 1988) für die Hauptfraktion des AGP (ORM1) mit zwei unterschiedlichen Varianten F1 und S (Mutation Q20R) und wird vorwiegend im Lebergewebe exprimiert. Bei AGP-B und AGP-B' handelt es sich um zwei annähernd identische Gene, welche für die Variante A kodieren (22 mutierte Aminosäurepositionen entgegen der Variante S). Deren Expression ist gegenüber AGP-A um den Faktor 100 schwächer.

Das aus 201 Aminosäuren bestehende Vorläuferprotein des AGP (ORM1) wird nach Synthese und Translokation aus der Zelle mithilfe einer Signalpeptidase geschnitten. Dabei

wird N-terminal eine Signalsequenz von 18 Aminosäuren entfernt (Schmid *et al.*, 1973). Somit besteht natives AGP aus 183 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von etwa 41 kDa. Innerhalb des Polypeptides werden zwei Disulfidbrücken zwischen den Cys-Resten 5-147 und 72-165 ausgebildet (Schmid *et al.*, 1974). CD-Spektroskopische Messungen (Kodicek *et al.*, 1995) und eine Studie mit Infrarot- und Ramanspektroskopie (Kopecky *et al.*, 2003) zeigten einen erhöhten Anteil an β -Faltblättern und offenbaren somit signifikante Eigenschaften der Lipocalinfamilie (vgl. Abschnitt 1.1). Schon 1993 wurde mithilfe des Computers eine dreidimensionale Struktur auf Basis des Lipocalins *Bilin Binding Protein* (BBP) aus dem Schmetterling „Großer Kohlweißling“ (*Pieris brassicae*) modelliert (Rojodomiguez & Hernandez-Arana, 1993).

Humanes AGP besitzt einen hohen Anteil von über 40 % der Proteinmasse an Glykosylierung. Verschiedene Kohlenhydrate sind über fünf Asparaginreste (Asn 15, 38, 54, 75 und 85) mit der Polypeptidkette assoziiert (Treuheit *et al.*, 1992). Massenspektrometrische Analysen zeigten zweifach, dreifach und vierfach verzweigte N-assoziierte Glykane auf der Moleküloberfläche (Nakano *et al.*, 2004). Diese Kohlenhydrate bestehen zu 12% aus Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure), womit die relativ negative Gesamtladung des Glykoproteins (pI 3.0) entgegen der schwächeren Ladung der reinen Polypeptidkette (pI 4.97 (Devereux *et al.*, 1984)) erklärt werden kann. Bei Entzündungsreaktionen finden extreme Veränderungen im Glykosilierungsstatus von AGP im Plasma statt. Dies betrifft die Zusammensetzung sowie den Verzweigungsgrad der verbundenen Kohlenhydrate. Dabei sind die auftretenden Veränderungen nicht nur auf inflammatorische Einflüsse limitiert, sondern können auch durch andere physiologische Bedingungen wie Schwangerschaft, Rheumatoide Arthritis, Leberzirrhose oder Hepatitis ausgelöst werden (Ceciliani & Pocacqua, 2007).

Die genaue biologische Funktion von AGP ist bis heute weitreichend unbekannt, allerdings wurden bis dato eine größere Zahl an Eigenschaften analysiert und direkte Beeinflussungen auf verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, Lymphozyten und Thrombozyten nachgewiesen (Hochepped *et al.*, 2003). Ein spezifischer Zelloberflächenrezeptor für dieses Protein ist bis heute aber unbekannt. Aufgrund seiner genannten Aktivitäten erfolgte eine Klassifizierung des AGP in die Gruppe der sogenannten Immunocaline, einer Untergruppe der Lipocalinfamilie mit immunregulatorischen Funktionen (Logdberg & Wester, 2000). Darüber hinaus kann AGP im Blut verschiedene Schutzfunktionen gegenüber pathogenen Erregern, wie *Mycoplasma pneumoniae* (Athamna *et al.*, 1996) und *Klebsiella pneumoniae* (Hochepped *et al.*, 2000), ausüben. Giftige Produkte von Mikroorganismen, wie zum Beispiel toxische Lectine (Frantz *et al.*, 2000) und Fragmente

des bakteriellen Lipopolysaccharides (LPS) (Moore *et al.*, 1997) werden von AGP gebunden. Daher ist AGP in der Lage, nach einer Infektion als generelles Schutzprotein gegen einen meist letalen septischen Schock zu wirken.

Zusammen mit dem Serumalbumin stellt AGP eines der wichtigsten Bindeproteine im menschlichen Plasma dar. Es konnte gezeigt werden, dass AGP die Fähigkeit besitzt, mehr als 300 verschiedenste, kleine Moleküle zu binden (Israili & Dayton, 2001). Dabei handelt es sich in der Mehrzahl um basische und wasserunlösliche Verbindungen mit überwiegend pharmakologischer Wirkung. Aufgrund der hohen Heterogenität und variablen Konzentration des AGP im Plasma sind dabei sehr unterschiedliche Effekte zu erwarten. Dies hat bei der Bestimmung freier Wirkstoffkonzentrationen bei klinischen Therapien wichtige Auswirkungen (Trainor, 2007 ; Wasan *et al.*, 2008). Bindungstests gegenüber AGP gehören mittlerweile zu den ersten grundlegenden Tests im Bereich der Wirkstoffforschung (Mathias & Jung, 2007 ; Parikh *et al.*, 2000).

Diese beschriebenen vielfältigen Funktionen machen das humane *α 1-Acid Glycoprotein* äußerst interessant für Struktur/Funktions-Studien. Gerade in Hinblick auf seine enorm breite Bindspezifität kleinerer hydrophober Verbindungen ist eine Untersuchung der dreidimensionalen Struktur dieses Proteins von großem Wert. Natives AGP wurde zwar bereits kristallisiert (McPherson *et al.*, 1984), aufgrund seiner Heterogenität waren die erhaltenen Kristalle aber für Versuche mit Röntgenbeugung ungeeignet, so dass bis heute keine Kristallstruktur des Proteins vorliegt.

1.3 Die ANTICALIN[®] Technologie

1.3.1 Anticaline als alternative Gerüststrukturen zu Antikörpern

Neben dem schon lange etablierten Einsatz niedermolekularer Wirkstoffe zu pharmazeutischen Zwecken kam es in den letzten zwei Jahrzehnten verstärkt zur Entwicklung von therapeutischen Antikörpern. Unter Ausnutzung ihrer natürlichen Eigenschaft als Bindeproteine in lebenden Systemen ließen sich durch die gezielte Veränderung und Selektion von Antikörpern neuartige, hochspezifische Wirkstoffe mit unterschiedlichen Funktionen für Therapie und Diagnostik generieren (Carter, 2006). Als Zielstrukturen dienen dabei vor allem zelluläre Rezeptoren auf menschlichen Zellen oder lösliche Faktoren. Zur Zeit sind mehr als 20 therapeutische Antikörper, hauptsächlich gegen Krebs- und Autoimmunkrankheiten, auf dem Markt. Weiterhin befinden sich mehrere hundert Kandidaten in der klinischen Entwicklung (Reichert & Valge-Archer, 2007).

Neu gewonnene Erfahrungen beim therapeutischen Einsatz von Antikörpern lassen allerdings einige fundamentale Nachteile erkennen. So bestehen diese Proteine aus vier kovalent verknüpften Polypeptidketten, unterliegen posttranslationalen Modifikationen und zeigen aufgrund ihrer extremen Größe äußerst schlechte Gewebepenetration. Auch erfordert ihre komplexe Architektur komplizierte Schritte bei der Klonierung und rekombinanten Expression sowie den Einsatz teurer eukaryotischer Produktionssysteme. Ihre Antigenbindestelle, bestehend aus je sechs hypervariablen Schleifen (*CDRs*), lässt sich bei der Konstruktion größerer Zufallsbibliotheken entsprechend schwer simultan manipulieren. Darüber hinaus kann die konstante Region (*Fc*) des Antikörpers beim Einsatz im menschlichen Körper unerwünschte immunologische Effekte zeigen. Zusätzlich zu den medizinisch-technischen Problemen sind bei der Entwicklung neuer Antikörper vielfältige patentrechtliche Fragestellungen zu beachten.

Aufgrund der beschriebenen Nachteile der Antikörper-Technologie wurde in letzter Zeit verstärkt die Entwicklung alternativer Proteingerüststrukturen vorangetrieben (Skerra, 2007a). Basierend auf dem Gerüst der Lipocaline wurden sogenannte Anticaline erzeugt (Schlehuber & Skerra, 2005). Diese lassen sich gezielt unter anderem für antagonistische Zwecke einsetzen, zum Beispiel zur spezifischen Blockade eines Zelloberflächenrezeptors oder als „Fähre“ mit Kopplung eines Toxins oder Enzyms zur gezielten Bekämpfung krankheitsrelevanter Zelltypen (z.B. Krebszellen). Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes begründet sich aus der Fähigkeit zur Erkennung kleinerer Moleküle. Anticaline lassen sich daher als Gegenmittel bei Vergiftungen einsetzen.

Mittels moderner Proteintechnologie lassen sich, basierend auf der β -Fass-Struktur der Lipocaline, neuartige Bindestellen für gewünschte Zielstrukturen generieren. Dabei erfolgt zunächst eine Randomisierung der Aminosäuresequenzen der vier variablen Schleifen am Eingang zur β -Fass-Struktur. Die somit konstruierte Zufallsbibliothek mit einer Komplexität von bis zu 10^{10} Varianten wird anschließend mithilfe des *Phage Display* (Proteinpräsentation auf einer Phagenoberfläche) auf initiale Kandidaten mit Bindeeigenschaften zur Zielstruktur durchsucht. Selektierte Anticalinvarianten werden auf ihr Bindevverhalten hin charakterisiert und gegebenenfalls anschließend gezielt durch Zufallsmutagenese optimiert. So ließen sich spezifische Anticaline für kleine Moleküle wie Fluorescein (Beste *et al.*, 1999) und Digoxigenin (Schlehuber *et al.*, 2000) mit Dissoziationskonstanten von 30 nM auf Basis des *Bilin Binding Proteins* (BBP) aus dem Schmetterling „Großer Kohlweißling“ (*Pieris brassicae*) konstruieren. Die Variante DigA16 und deren Weiterentwicklungen wies nebenbei auch hohe Affinität zu Digoxin auf und lässt sich damit zur therapeutischen Anwendung als

„Gegenmittel“ zum Herzglycosid „Digitalis“ (enthält Digoxin) bei erfolgter Überdosierung einsetzen (Schlehuber & Skerra, 2005).

In neuerer Zeit wurden verstärkt Anticaline für therapeutische Zwecke mit Proteinen als Zielstrukturen generiert (Skerra, 2007b). Zur Minimierung immunogener Effekte wurden in diesem Zuge humane Lipocaline (ApoD, NGAL, Tlc) als Gerüststrukturen verwendet. Für antagonistische Zwecke entwickelte die Firma Pieris AG in Freising/Weihenstephan ein Anticalin gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), einen Angiogenesefaktor im menschlichen Serum, welcher durch die Anregung der Blutgefäßbildung das Wachstum von Tumoren verstärkt. Durch eine Blockade des VEGF lässt sich das Tumorstadium entscheidend verlangsamen; dieses konnte bisher auch schon durch den klinisch zugelassenen Antikörper Avastin[®] gezeigt werden (Muhsin *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde ein antagonistisches Anticalin gegen den humanen T-Zelloberflächenrezeptor CTLA4 entwickelt.

1.3.2 Der humane Rezeptor CTLA4 als Zielstruktur für die Immuntherapie

Der humane Rezeptor *Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4* (CTLA4, CD152) ist ein Mitglied der CD28-B7 Proteinfamilie mit immunregulatorischen Funktionen (Greenwald *et al.*, 2005) und wird auf menschlichen T-Zellen exprimiert. CTLA4 interagiert mit den beiden Rezeptoren B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf der Oberfläche von B-Zellen. Diese beiden Moleküle werden bei Infektionen oder Verwundungen des Körpers unter dem Einfluss von Cytokinen stark hochreguliert. Zunächst erhält die T-Zelle ihr stimulierendes Signal durch die Interaktion seines T-Zellrezeptors (TCR) mit dem das passende Antigen präsentierenden *Major Histocompatibility Complex* (MHC) auf einer B-Zelle. Zusätzlich benötigt die Aktivierung der T-Zelle ein kostimulierendes Signal, welches durch die Bindung von B7.1 bzw. B7.2 an den Rezeptor CD28 auf der T-Zelle vermittelt wird. Zwei bis drei Tage nach der Aktivierung erfolgt die Hochregulation von CTLA4 auf der T-Zelloberfläche. Dieser Rezeptor zeigt eine bis zu 500fach höhere Affinität zu B7.1 und B7.2 als CD28 und induziert die nachfolgende Deaktivierung der T-Zelle. Die Interaktion der extrazellulären Region von CTLA4 mit B7.1 und B7.2 ist durch vorhandene Kristallstrukturen im Detail belegt worden (Schwartz *et al.*, 2001 ; Stamper *et al.*, 2001). Außerdem konnte der Effekt als negativer Schlüsselregulator der CD28-abhängigen T-Zell-Aktivierung in bemerkenswerter Weise an einer CTLA4-defizienten Maus gezeigt werden (Waterhouse *et al.*, 1995), welche aufgrund der unbegrenzten Teilung von T-Lymphozyten eine maximale Lebensdauer von vier Wochen aufwies. Im Gegensatz zu CD28 besitzt CTLA4 allerdings nur eine kurze Lebensdauer auf

aktivierten T-Zellen, um deren erneute Aktivierung zu ermöglichen. Die Balance zwischen stimulierenden und inhibitorischen Signalen kontrolliert die direkte T-Zellantwort des Immunsystems bei Infektion mit Pathogenen oder bei Tumorerkrankungen. Daher bietet eine spezifische Blockade des CTLA4 Rezeptors durch geeignete Reagenzien potentielle Chancen zur Verstärkung von immunologischen Anti-Tumor-Antworten im menschlichen Körper (Allison, 2005). Mittlerweile konnte dies schon für unterschiedliche Krebsarten durch die Entwicklung verschiedener CTLA4-spezifischer Antikörper wie auch eines RNA-Aptamers (Santulli-Marotto *et al.*, 2003) in präklinischen und klinischen Untersuchungen (Peggs *et al.*, 2006) gezeigt werden. Der Einsatz der Therapeutika erfolgte dabei stets in Kombination mit anderen Maßnahmen, wie Radiotherapie, Chemotherapie oder der Gabe von immunstimulierenden Adjuvantien.

1.3.3 Entwicklung eines Anticalins gegen CTLA4

Basierend auf der Gerüststruktur des humanen NGAL (Goetz *et al.*, 2002) wurde in Kooperation der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra mit der Firma Pieris AG in Freising/Weihenstephan eine kombinatorische Zufallsbibliothek mit 20 randomisierten Aminosäurepositionen in den vier Schleifenregionen des Lipocalins entworfen (Skerra, 2007b). Die Selektion aus der Bibliothek mit einer Komplexität von 2×10^{10} Varianten erfolgte mithilfe eines Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4 mit dem Fc-Teil eines menschlichen Antikörpers unter Verwendung der *Phage Display*-Methode. Initiale Anticalinvarianten zeigten Dissoziationskonstanten von 10 - 100 nM. Die Varianten wurden mithilfe von ELISA und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie auf ihre Epitopspezifität überprüft; einige Kandidaten bewirkten die komplette Blockade der Interaktion von CTLA4 mit B7.1 bzw. B7.2. Durchflusszytometrische Untersuchungen mit CTLA4 exprimierenden Zellen zeigten zudem eine Bindung des Fluoreszenz-markierten Anticalins an den Zelloberflächenrezeptor. Nach Affinitätsmaturierung durch Zufallsmutagenese (*Error Prone PCR*) und nachfolgende Selektion unter stringenteren Bedingungen wurde eine stabilere Anticalinvariante O10 mit einer Affinität von 9.0 nM (41,4 nM für das Maus-Epitop) zu CTLA4 erhalten. Durch weiterführende Optimierungen konnte eine Affinität bis zu 240 pM für das menschliche CTLA4 erreicht werden. Verschiedene Untersuchungen konnten die gewünschte antagonistische Aktivität des Anticalins im Hinblick auf eine Verstärkung der T-Zellstimulation *in vitro* und *in vivo* zeigen.

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit waren strukturelle Untersuchungen an humanen Vertretern der Lipocalinfamilie. Insbesondere in Hinblick auf deren physiologische Transportfunktion sollten die Ligandenbindespezifitäten für vier Modellliganden (Retinol, Retinsäure, 11-(5-(Dimethylamino)-1-Naphthyl-Sulfonylamino)-Undecansäure (DAUDA) und 8-Anilino-1-Naphthyl-Sulfonsäure (ANS)) untersucht sowie die Röntgenkristallstruktur des humanen α_1 -Acid Glycoprotein (AGP) als wichtigen Vertreter mit besonders breiter Ligandenspezifität aufgeklärt werden. Hierzu mußte zunächst die gentechnische Produktion und Reinigung einiger Lipocaline etabliert werden, um proteinchemische Analysen und Kristallisationsexperimente zu ermöglichen.

Eine strukturelle Analyse einer künstlichen Variante (Anticalin) des menschlichen *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) im Komplex mit seinem neuen Target CTLA4 sollte neue, strukturelle Einblicke in den Erkennungsmodus eines solchen artifiziellen Bindeproteins liefern. Dazu musste die extrazelluläre Domäne des humanen CTLA4 in löslicher Form produziert und der entsprechende Proteinkomplex zur anschließenden Kristallisation und Strukturaufklärung präpariert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

E. coli K12-Stämme (Sammlung Prof. A. Skerra, TU-München)

B834 (DE3)	hsd, metB, (DE3) (Budisa <i>et al.</i> , 1995)
BL21 (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, (DE3) (Studier <i>et al.</i> , 1990)
CJ236i	dut, ung, thi, relA1 [F': proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987, Fiedler & Skerra, 1999)
JM83	ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), λ80, lacZΔM15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
KS272	F ⁻ , ΔlacX74, galE, galK, thi, rpsL (strA), ΔphoA (pvuII) (Meerman & Georgiou, 1994)
MC4100Δskp	araD, Δ(argF ⁻ lac), U169, rpsL, relA, flbB, deoC, ptsF, rbsR, ΔSKP (Schäfer <i>et al.</i> , 1999), von M. Müller, Universität Freiburg
W3110	F ⁻ , λ ⁻ (Bachmann, 1972)
XL1-Blue	endA1, hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺), supE44, thi-1, λ ⁻ , recA1, gyrA96, relA1, Δ(lacZYA-argF)U169 [F': proAB, lacI ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

Bakteriophagen

VCS-M13 Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg

Plasmide

pApoD27	von Dr. A. Nasreen, Labor von Prof. A. Skerra, TU München
pASK75-strepII	(Voss & Skerra, 1997), Labor von Prof. A. Skerra, TU München
pASK75-His	von I. Neumaier, Labor von Prof. A. Skerra, TU München
pASK112	Labor von Prof. A. Skerra, TU München
pASK IBA4	Labor von Prof. A. Skerra, TU München
phNGAL37-Q13	von G. Matschiner, Pieris AG, Freising
pRSETAGd-sig	(Dutta <i>et al.</i> , 1998), von Anjali Karande, Indian Institute of Science, Bangalore, Indien
pSA1	(Schmidt & Skerra, 1994), Labor von Prof. A. Skerra, TU München

Übersicht: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide

pAGP1	wie pASK75-strepII; mit ompA-AGP1-strepII
pApoD27	<i>tet_{p/o}</i> ; ompA-ApoD-his6; <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK75-strepII	<i>tet_{p/o}</i> ; ompA-PL-strepII; <i>bla/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pASK75-His	wie pASK75-strepII; mit ompA-PL-his6
pASK112	<i>tet_{p/o}</i> ; ompA-PL-strepII; <i>cam/tetR</i> als Transkriptionsfusion
pCTLA4-1	wie pASK75-strepII; mit ompA-CTLA4(QV5-V116)-strepII
pCTLA4-2	wie pASK75-strepII; mit ompA-CTLA4(EM3-V116)-strepII
pCTLA4-3	wie pASK IBA4; mit ompA-strepII-CTLA4(EM3-V116)
pCTLA4-4	wie pASK112; mit ompA-CTLA4(EM3-V116)-strepII
pCTLA4-5	wie pASK75-His; mit ompA-CTLA4(EM3-V116)-his6
pCTLA4-6	wie pASK75-strepII; mit ompA-CTLA4(EM3-V116)
pCTLA4-7	wie pASK75-strepII; mit ompA-CTLA4(EM3-S125,C122S)-DYKDDDDK
pCTLA4-8	wie pSA1; mit CTLA4(M3-D126)
pCTLA4-9	wie pASK75-His; mit ompA-CTLA4(H4-V116)-his6
pCTLA4-10	pASK75-His; mit ompA-CTLA4(EM3-V116,M88Q)-his6
pCTLA4-11	pASK75-His; mit ompA-CTLA4(EM3-V116,V10T,L12N,M88Q)-his6
pCTLA4-Q13	wie pASK75-strepII; mit ompA-CTLA4(EM3-V116)-strepII-RBS-ompA-anticalinQ13-stop
pGly1	wie pASK75-strepII; mit ompA-Gly-strepII
pGly2	wie pASK75-strepII; mit ompA-Gly(Δ M1)-strepII
phNGAL37-Q13	wie pASK75-strepII; mit ompA-anticalinQ13-strepII
phOBP1	wie pASK75-strepII; mit ompA-hOBP-strepII
phOBP2	wie pASK75-strepII; mit ompA-hOBP(C99S)-strepII
pSA1	wie pRSET5a; <i>T7^p</i> ; streptavidin; <i>t_φ</i> ; <i>bla</i>

2.1.2 OligodesoxynukleotideOligodesoxynukleotide für die Sequenzierung (aus dem Labor von Prof. Skerra)

D20:	5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'
F83:	5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
PR1:	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'
pRSetBack:	5'-ATT GCT CAG CGG TGG CA-3'
SaM5:	5'-ACC ACA ACG GTT TCC CTC-3'

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen IBA, Göttingen oder ThermoFisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Bonn) in HPLC-gereinigter Form bezogen.

Die Primer CTLA4-7 und CTLA4-9 wurden vor Gebrauch mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4) gereinigt.

A22-K-1	5'-CCT TCA CCT CCT GGC ACC GGC CCT TG-3'
AGP-1	5'-CCC AGA TCC CAT TGT GTG C*C-3'
AGP-1-K	5'-CCC CTC CTC CTG TTT CCT CTC CTT CTC GTG C-3'
AGP-2	5'-GCT TTC CCC CTC CTC CTG TTT C*C-3'
CTLA4-1	5'-CCC AAG TGG CCC AGC CTG CTG T*G-3'
CTLA4-2	5'-GCT TAC ATA AAT CTG GGT TCC GTT GC*C-3'
CTLA4-3	5'-CCG AGA TGC ATG TGG CCC AGC CTG CTG T*G-3'
CTLA4-4	5'-ACC GTA GGC GCC ATG CAT GTG GCC CAG CCT GCT GT*G-3'
CTLA4-5	5'-TCA CCC AAG CTT AGT TCG TTA CAT AAA TCT GGG TTCCGT T*G-3'
CTLA4-6	5'-TTA CAC ATA AAT CTG GGT TCC-3'
CTLA4-7	5'-AAT TTT ATC ATC ATC ATC TTT ATA ATC AGA ATC TGG GCT CGG TTC TGG ATC AAT TAC ATA AAT CTG GGT TCC G-3'
CTLA4-8	5'-GGA ATT CCA TAT GCA TGT GGC CCA GCC T-3'
CTLA4-9	5'-CAG GTC AAG CTT AGT CAG AAT CTG GGC ACG GTT CTG GAT CAA TTA CAT AAA TCT GGG TTC CG-3'
CTLA4-10	5'-CCC ATC ATC ATC ATC ATC ATG TGG CCC AGC CTG CT-3'
CTLA4-11	5'-GTG GCC CAG CCT GCT ACT GTA AAC GCC AGC AGC CGA GGC ATC G-3'
CTLA4-12	5'-CGA TGC CTC GGC TGC TGG CGT TTA CAG TAG CAG GCT GGG CCA C-3'
CTLA4-13	5'-CAA GGA CTG AGG GCC CAG GAC ACG GGA CTC TAC-3'
CTLA4-14	5'-GTA GAG TCC CGT GTC CTG GGC CCT CAG TCC TTG-3'
CTLA4-K-1	5'-GGG TGA GAC CAA GCT TAT TTA TCA TCA TCA TCT TT-3'
CTLA4Q13-1	5'-CCG CAG TTC GAA AAA TAG ATA ACG AGG GCA AAA AAT GAA AAA GAC AGC-3'
CTLA4Q13-2	5'-TGC ACC AAG CTT GAG ACG TTA GCC GTC GAT ACA CTG GTC-3'
Gly1	5'-CCA TGG ACA TCC CCC AGA C*C-3'

Gly-K-1	5'-GAA CTT CTT TGG ATT CCC AGT CTT CTC TCC AAG G-3'
Gly2	5'-GCT GAA ACG GCA CGG CTC TTC C*A-3'
Gly-K-2	5'-GAA CTG CGG GTG AGA CCA AGC GCT GAA ACG GCA CGG C-3'
Gly-K-3	5'-CTT GGT CTG GGG GAT ATC GGC CTG CGC TAC GGT-3'
O13-K-2	5'-GCT CCC TGG AGA GCA GGT TTC GCT CTG CC-3'
OBP-K-1	5'-GAC GTT GGT CTT TGC TAT AAA ACA CAT AGT CAT C-3'

*: Phosphothioatmodifikation an der 3'-terminalen Phosphodiesterbindung

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
Benzonase [®] , Reinheitsgrad I, 25 U/μL	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol GmbH, Hamburg
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
DNase I aus Rinderpankreas, 2000 U/mg, Reinheitsgrad I	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, (5 u/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 u/μl)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach;
	MBI Fermentas, St. Leon-Roth;
	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptavidin-Alkalische Phosphatase- Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA-Polymerase (3 units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 Polynukleotidkinase (10 units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien zur Kristallisation von Proteinen wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; E. Merck KGaA, Darmstadt; Riedel de Haen, Hannover; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; oder Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff- Gele (Sequagel Concentrate & Diluent)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na ₂ -Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein;
Ammoniumacetat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Merck KGaA, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A-Stammlösung	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Borsäure	E. Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol GmbH, Hamburg

dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure-Na ₂ -2H ₂ O (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure, Pufferan (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isopropyl-thiogalactosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Phenol, 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L(+)-Selenomethionin	Acros Organics, Geel, Belgien
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.5 Standards, Kristallisations-Screens und Kits

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
1 kb DNA Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Kristallisations-Screens:

LBS 1-5	480 Bedingungen, AG Prof. Skerra
<i>Additive Screen</i>	Hampton Research, CA, USA
<i>Heavy Atom Screen</i> (Pt, Hg, Au, M1, M2)	Hampton Research, CA, USA

Kits zur DNA-Isolierung:

JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
QIAprep Plasmid Midiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

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

2.1.6 Geräte

ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
---------------------------------	---

Brutschränke:

BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Friocell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing

CD-Spektropolarimeter Jasco J-810	Jasco, Tokyo, Japan
-----------------------------------	---------------------

Durchflußdetektoren:

2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Elektroblot-Apparatur	Eigenbau
-----------------------	----------

Elektrophoresekammern	Eigenbau; Biometra, Göttingen
-----------------------	-------------------------------

Fermenter:

10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluss-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach

Fluoreszenzphotometer LS 50 B	Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA
-------------------------------	--------------------------------

Fraktionssammler:

Gradi Frac / Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

French-Press:

French press	Spectronic Unicam, Cambridge, UK
--------------	----------------------------------

Geltrockner:

Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
-----------------	---------------------

Heizrührer:

IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München

HPLC:

ÄKTA [®] -Explorer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA [®] -Purifier	

Kristall-Imaging-System:

RockImager	Formulatrix Inc., MA, USA
------------	---------------------------

Kristallisationsroboter:

FreedomEvo	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
------------	------------------------------------

Metallblockthermostate:

Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
------------------------	--------------------------

Massenspektrometer:

Q-TOF Ultima Global	Waters S.A.S, Saint-Quentin, Frankreich
---------------------	---

Netzgeräte:

Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen

PCR-Gerät

Master Cycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
------------------------	---------------------------------------

Peristaltische Pumpen:

P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
----	--

pH-Meter:

Inolab, pH level 1

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
GmbH & Co. KG, Weilheim

Pipettierhilfen:

accu-jet / accu-jet pro

Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200
P1000Abimed Analysen-Technik GmbH,
Langenfeld

Röntgen-Generator:

RU-300 Drehanoden-Generator
Konfokale Optik
Mar345 Detektor
Stickstoff-KühlstromRigaku, Tokyo, Japan
Osmic, Troy, MI, USA
MarResearch, Hamburg
Oxford Cryosystems, Oxford, UK

Rollenmischer

Roller Mixer SRT1

Stuart Scientific, Redhill, UK

Signalschreiber:

REC 112

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

SE 120

ABB Goerz AG, Wien, Österreich

2210

LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Schüttelapparate:

Typ 3012 / Typ 3017

Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25

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

Multitron

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Spektrophotometer:

Ultrospec 2000

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Ultrospec 3000

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Speed-Vac-Konzentrator

Univapo UVC 150H

UniEquip, Martinsried

UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpen:	
Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Varioklav Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen:	
Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 A	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
2001 MP2	Sartorius GmbH, Göttingen
1202 MP	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbäder:	
Haake F6/K20	Thermo Haake, Karlsruhe
Zentrifugen:	
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode
Sigma 4K15C	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 5B, RC 5C Plus, Evolution RC mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Mini Spin	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
2.1.7 Sonstiges Material	
Dialyseschläuche:	
Spectra/Por [®] , MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol GmbH, Hamburg
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen

Reaktionsgefäße

0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL(Safelock)

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH,
Hamburg

SDS-PAGE:

Apparaturen, Glasplatten, Spacer,
Dichtungen, Kämmen

Biometra, Göttingen

Größenausschlusschromatographie-Säulen:

Superdex 75 HR 10/30

Amersham Pharmacia Biotech Europe
GmbH, Freiburg

Superdex 200 HR 10/30

Superdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade*Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade*

Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Konzentratoren:

Amicon Ultra (5K, 10K, 30K)

Millipore Inc., MA, USA

Klebefolie für die Proteinkristallographie:

Crystal Clear

Hampton Research, CA, USA

Kristallisationsplatten:

CrystalQuick Platte 96well

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Linbro-Plate

Hampton Research, CA, USA

Cryscem-Plate

Hampton Research, CA, USA

Kunststoffröhrchen:

Kulturröhrchen, 13 mL

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

PP-Röhrchen, 15 mL

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

PP-Röhrchen, 50 mL

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Membran:

Nitrocellulose-Membranfilter

Schleicher & Schuell, Dassel

Pipetten-Spitzen:

blau (200-1000 µL)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

gelb (5-200 µL)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

kristallklar (0,5-10 µL)

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH,
Hamburg;

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Quarzküvetten:

Typ 108.002 QS (Absorption)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 108 QS (Fluoreszenz)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 110 QS (CD)	Hellma, Müllheim, Baden

Sterilfilter:

Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Membransterilfilter (0,45 µm; Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Spin-X (0,45 µm) Costar	Corning, NY, USA
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Zentrifugenbecher für Sorvall- Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Nalgene Company, New York, USA

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden vor Gebrauch entweder durch Filtration oder im Autoklaven sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore-Wasser hergestellt, und sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Kulturplatten wurden bei 4°C gelagert. Antibiotikallösungen wurden den Flüssigmedien erst kurz vor deren Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

Folgende Antibiotika-Stammlösungen wurden für die Herstellung von Selektivmedien verwendet (wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert; 0,45 µM):

- Ampicillin (Amp) 100 mg/mL in H₂O (1:1000 zum Medium)
- Chloramphenicol (Cam) 30 mg/mL in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
- Kanamycin (Kan) 35 mg/mL in Wasser (1:500 zum Medium)
- Lagerung bei -20 °C

Induktor-Stammlösungen:

- Anhydrotetracyclin (aTc) 2 mg/mL in DMF (1:10.000 zum Medium)
oder 5 mg/mL in DMF (1:10.000 zum Medium)
- Isopropyl-thiogalactosid (IPTG) 0,5 M in H₂O (1:1000 zum Medium)
- Lagerung bei -20 °C

LB-Medium:

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

mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.

Lösungen für die Selenomethionin-Substitution von Proteinen:A) „Neues-Minimal-Medium“ (Budisa *et al.*, 1995):

22,5 mM KH_2PO_4	3,06 g/L
50 mM K_2HPO_4	11,41 g/L
7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,99 g/L
8,5 mM NaCl	0,5 g/L
1 mM Mg SO_4	0,25 g/L

B) 1000x Spurenelementlösung:

CaCl_2	1 g/L
FeCl_3	1 g/L
CuCl_2	1 mg/L
MnCl_2	1 mg/L
ZnSO_4	1 mg/L
Na_2MoO_4	1 mg/L

C) 100x Aminosäurelösung (ohne Met):

Alle L-Aminosäuren (außer Met) je 0,5 g/L (sterilfiltriert)

Lösungen für die Fermentation:

A) Mineralsalzlösung:

31 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,51 g/L
19 mM KH_2PO_4	2,58 g/L
25 mM NH_4Cl	1,33 g/L
5 mM $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,47 g/L

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

B) Glucoselösungen:

- 20 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)
- 50 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)

- C) MgSO₄-Stammlösung:
1 M MgSO₄ (separat autoklavieren)
- D) Thiamin-Stammlösung:
10,0 mg/mL Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)
- E) FeCl₃-Stammlösung:
35,0 g/L FeCl₃ • 6 H₂O
(mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)
- F) Zn-Acetat-Stammlösung:
8,0 g/L Zn-Acetat • 2 H₂O (sterilfiltriert)
- G) Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):
- | | |
|--|---------|
| MnCl ₂ • 4 H ₂ O | 3,0 g/L |
| CuCl ₂ • 6 H ₂ O | 0,3 g/L |
| H ₃ BO ₃ | 0,6 g/L |
| CoCl ₂ • 6 H ₂ O | 0,5 g/L |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O | 1,2 g/L |
| EDTA | 4 mM |
- H) Weitere Lösungen für die Fermentation:
12,5 % (w/v) NH₃ zur pH-Regulierung
Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

<u>TAE-Puffer</u>		<u>TBE-Puffer:</u>	
Tris	40 mM	Tris	89 mM
Essigsäure	20 mM	Borsäure	89 mM
EDTA	1 mM	EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

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

Puffer für die SDS-PAGE:

1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson:

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

4x Lower-Tris:

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

4x Upper-Tris:

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

5x Auftragspuffer:

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

Färbelösung:

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

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, ohne Coomassie
Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

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

Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol:

Kristallines Phenol 99% (unter Schutzgas destilliert) wurde bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit ½ Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

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

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4,5:

3 M Na-Acetat wurde mit Eisessig auf pH 4,5 eingestellt

Sonstige Puffer:AP-Puffer:

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

PBS:

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

Periplasma-Aufschlusspuffer:

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

PBS/T:

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

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

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

TB-Puffer (zur Transformation):

Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH 6.7 mit KOH einstellen	

TE-Puffer:

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

2.2 Molekularbiologische 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. Durch den Zusatz entsprechender Antibiotika zum Nährmedium erfolgte die Selektion auf mit Plasmiden transformierte Zellen. Kulturplatten mit Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und für maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Bis zu einem Volumen von 50 mL wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 L wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Sofern

nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation dieser Vorkulturen bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Die Messung der Zelldichte wurde in einer 1 cm Kunststoffküvette durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD_{550}) im Spektralphotometer vorgenommen. Bei optischen Dichten größer als 0,8 wurden passende Verdünnungen der Zellsuspension in entsprechendem Medium vermessen. Die Messwerte wurden stets gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von mit Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 mL hitzesterilisiertem 50 % v/v Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

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

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch *E. coli* erfordert zunächst die Überführung der Zellen in eine transformationskompetente Form. Dazu wurde die klassische $CaCl_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca. 10^5 bis 10^6 Transformanden pro μg Plasmid-DNA erhalten werden. 50 mL LB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Kultur in ein 50 mL-Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4°C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 mL eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 mL eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 mL 50 mM $CaCl_2$, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 μL entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurde 200 μL Zellsuspension mit typischerweise 1 ng Plasmid-DNA oder 10 μL eines Ligierungsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 1 min auf 42 °C erwärmt, anschließend mit 0,8 mL LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 μL auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Eine höhere Transformationseffizienz liefert die DMSO-Methode (Inoue *et al.*, 1990). Hierbei werden je nach *E. coli*-Stamm bis zu 10^9 Transformanden pro μg Plasmid-DNA erhalten. In einem 500 mL Kolben wurden 100 mL SOB-Medium ohne Antibiotikum mit 1 mL einer stationären Übernachtskultur inokuliert und bei 22 °C inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{550} = 0,6$ wurde der Kulturkolben für 10 min auf Eis abgekühlt und

die Zellen anschließend durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 2500 g, 4°C, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 30 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 8 mL TB-Puffer resuspendiert und 600 µL wasserfreies DMSO zugegeben (~7 % v/v Endkonzentration). Aliquots der Zellsuspension von 200 µL wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Die Transformation wurde analog der CaCl₂-Methode durchgeführt.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Fällung der Proteine, gefolgt von einer selektiven Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA durch eine Verschiebung des pH-Wertes.

Plasmid-Präparation aus 4 mL-Kulturen (analytischer Maßstab)

Zur Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden oder der ortsgerichteten Mutagenese erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA aus stationären 4 mL Übernachtkulturen unter Verwendung des Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Genomed (Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit) nach Herstellerangaben präpariert und für Restriktions- und Sequenzanalysen wie auch zur Transformation und zur Neukonstruktion von Plasmiden eingesetzt. Bei der Präparation wurden typischerweise 10 bis 20 µg DNA in 75 µL TE-Puffer erhalten. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Plasmid-Präparation aus 50 mL-Kulturen (präparativer Maßstab)

Um größere DNA-Mengen für präparative Zwecke zu gewinnen wurde mithilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits gemäß Herstellerangaben ausgehend von einer stationären 50 ml-Kultur die Plasmid-DNA präpariert. Die DNA-Ausbeute betrug in der Regel ca. 100 µg in 150 µL TE-Puffer. Anschließend wurde zur vollständigen Entfernung von Exonukleasen zusätzlich eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Fällung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.5.6). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Die für die Mutagenese nach Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987) benötigte zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des filamentösen Phagen ϕ 1 trugen, präpariert. Durch Infektion des mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stamms CJ236i mit dem VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen wurde die Plasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemiden verpackt. Aus den sezernierten Phagemiden konnte die ssDNA daraufhin isoliert werden (Geisselsoder *et al.*, 1987). Die dabei als Verunreinigung mitisolierte ssDNA des Helferphagen mit einem Anteil von < 5 % störte bei der Mutagenese nicht. Der verwendete Stamm CJ236i trägt ein mittels Tetracyclinresistenz selektierbares F'-Plasmid (Fiedler & Skerra, 1999) und kann somit die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen vom Typ M13 benötigten Sex-Pili ausbilden. Darüber hinaus bewirken die chromosomalen Mutationen *dut*⁻ und *ung*⁻ den partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA.

3 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stamms CJ236i, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser stationären Kultur wurden 20 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von etwa 0,26 (ca. $1,6 \cdot 10^8$ Zellen/mL) geschüttelt. Dieser Kultur wurde 1 mL entnommen, mit VCS-M13 Helferphage entsprechend einer *multiplicity of infection* (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 mL LB/Kan-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (SS-34, 12100 g, 4 °C, 10 min), der Überstand in ein neues SS-34 Gefäß überführt und mit 10 µL einer 10 mg/mL RNaseA-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Phagemidpartikel durch Zugabe von 5 mL einer frisch angesetzten Lösung von 3,5 M Ammoniumacetat, 20 % PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (SS-34, 17200 g, 4 °C, 15 min), das Präzipitat in 200 µL Hochsalz-Puffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Eppendorf, 16100 g, 4 °C, 3 min) entfernt. Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde der Überstand zweimal mit 200 µL Phenol und je einmal mit 200 µL Phenol/Chloroform und 200 µL Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.5.6). Um die bei der Extraktion auftretenden Verluste an DNA gering zu halten, wurden die organischen Phasen in der gleichen Reihenfolge mit 100 µL TE-Puffer

rückextrahiert. Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 μL), und die ssDNA durch Zugabe von 30 μL (1/10 Volumen) 3 M Natriumacetat und 750 μL (2,5 Volumina) Ethanol für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Das nach der Zentrifugation (Eppendorf, 16100 g, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min) erhaltene Pellet wurde mit 200 μL 70 % v/v Ethanol gewaschen (Eppendorf, 16100 g, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min) und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 μL TE-Puffer gelöst und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Abschätzung der isolierten DNA-Menge sowie zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurde 1 μL einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Die erhaltenen Ausbeuten lagen je nach Plasmid zwischen 10 und 100 μg ssDNA.

2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Größe erfolgte mithilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid. Sie diente sowohl zur Restriktionsanalyse von Plasmiden im analytischen Maßstab sowie als auch für präparative Zwecke zur Isolierung von DNA-Fragmenten. Zur Auftrennung von Oligodesoxynukleotiden zum Zweck der Reinigung wurde dagegen die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde eine 0,8 % oder 1 % w/v Suspension von Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen homogenisiert, mit 1/10.000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das nach Erstarren der Lösung erhaltene Gel war typischerweise 10,5 cm lang und 7,5 cm breit bei einer Dicke von ca. 0,5 cm. Anschließend wurde das Gel in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Tasche mit 5-10 μL DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 45 min bei einer konstanten Spannung von 90 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente anhand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur präparativen Agarose-Gelelektrophorese wurde „*Low Melting Point*“-Agarose verwendet. Je 0,5 g wurden in 50 mL TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und nach Zugabe von 1/10.000 Volumen 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung in eine Gelkammer gegossen. Das Gel wurde mit ca. 2 cm breiten Taschen versehen, die mit der gesamten Reaktionsmischung (bis zu 50 µL) aus DNA und Restriktionsenzym bzw. dem gesamten PCR-Ansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer gefüllt wurden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 70 V für ca. 90 min durchgeführt. Zur Vermeidung von Strahlenschäden durch das UV-Licht erfolgte die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente bei verminderter Intensität. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde schnellstmöglich mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Zur Befreiung der DNA von der Agarose wurde der JETsorb Gel Extraction 150 Kit der Firma Genomed verwendet und nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Dabei wurde die DNA nach Verflüssigung der Agarose vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 µL TE-Puffer eluiert. DNA-Konzentrationen wurden schließlich durch analytische Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der DNA-Größenstandards abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Ausgehend von einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff, 25 % w/v Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 (Sequagel Concentrate), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (Sequagel Diluent) sowie 10 x TBE wurde eine Mischung mit 16 % w/v Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE hergestellt. Durch Zugabe von 40 µL TEMED (unter schnellem Rühren) und 1 mL 10 % w/v APS zu 100 mL dieser Lösung wurde die Polymerisation gestartet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TBE verwendet. Oligodesoxynukleotide wurden durch vertikale Gelelektrophorese in 1,5 mm starken Gelen gereinigt. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit entsprechenden Abstandshaltern durch Klammern fixiert, die polymerisierende Gellösung in die entstandene Gelkammer gefüllt und ein Geltaschenformer mit 6 Taschen eingebracht.

Zur Auftrennung der einzelsträngigen DNA-Fragmente wurden 20 μL des entsprechenden Oligo-Syntheseansatzes (2 nmol) mit 20 μL Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Lösung (à 20 μL) auf zwei Taschen des Polyacrylamid-Harnstoffgels als möglichst schmale Zone aufgetragen und die Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 40 W für ca. 4 h durchgeführt bis der Bromphenolblau-Marker das Gelende erreicht hatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor einem fluoreszierenden Hintergrund sichtbar gemacht. Die Hauptproduktbande wurde dann möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung des Gelstücks wurde dieses in eine 1 mL-Einwegspritze überführt, deren Spitze vorher über einer Flamme zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 mL TE-Puffer wurde das Gelstück durch die Bohrung gepreßt und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Gelmasse wurde mithilfe einer Spin-X-Filtereinheit abgetrennt (Eppendorf, 16100 g, RT, 5 min) und das Filtrat (ca. 0,9 mL) dreimal mit je 1 mL 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 400 μL eingengt wurde. Nach Zugabe von 40 μL 3 M Natriumacetat pH 4,8, 4 μL 1 M MgCl₂ und 1 mL Ethanol (p. a.) wurde die DNA bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Eppendorf, 16100 g, 4 °C, 30 min), das Präzipitat mit 500 μL 70 % v/v Ethanol gewaschen, im Vakuum für 2 min getrocknet und schließlich in 50 μL H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

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

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden und von ungeschnittenen PCR-Fragmenten ermöglicht deren kovalente Verknüpfung mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls durch T4-Ligase. Dies kann z.B. für die Zirkularisierung des durch DNA-

Polymerase *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig sein (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Die Phosphorylierung erfolgte mithilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK). Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente (200 pmol) wurden hierzu mit 3 μL 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (500 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl_2 , 50 mM Dithiothreitol, DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA), 1,3 μL 10 mM ATP und 0,5 μL (5 u) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 μL für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Polynukleotidkinase für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Der Teil des phosphorylierten Oligonukleotides bzw. PCR-Fragments, der nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese bzw. Ligierung eingesetzt wurde, wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Vorschrift von Geisselsoder (Geisselsoder *et al.*, 1987) entsprechend der Methode von Kunkel (Kunkel *et al.*, 1987) angewendet. Zunächst wird ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschten Substitutionen trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert. In der sich anschließenden Polymerase-Reaktion dient das Oligodesoxynukleotid als *Primer* für die Synthese des zweiten DNA-Strangs, der mithilfe einer DNA-Ligase schließlich kovalent zirkularisiert wird. Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.3.2) und dem damit verbundenen partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*⁺-Stammes (z. B. JM83, XL1-Blue) mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf den neu synthetisierten Strang mit der kodierten Mutation selektiert.

Die Hybridisierung erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 10 μL mit 1 μL 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl_2), ca. 200 ng einzelsträngiger DNA (Abschnitt 2.2.3.2) und 3,3 pmol des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids (Abschnitt 2.2.5.1). Der Ansatz wurde für 5 min auf 80 °C erhitzt und über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Neusynthese des zweiten DNA-Strangs wurde die Lösung zunächst auf Eis mit 1 μL 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM MgCl_2 , 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 3 U T4 DNA-Polymerase (New England Biolabs) sowie 3 U T4 DNA-Ligase (Fermentas) versetzt. Nach 5 min auf Eis wurde zunächst für 5 min bei Raumtemperatur und dann schließlich für

90 min bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion wurden anschließend 2 µL des Reaktionsansatzes auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Danach wurde eine entsprechende Menge (1-10 µL) in *E. coli* JM83 transformiert und die erhaltenen Klone durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung (Abschnitt 2.2.5.8) auf die gewünschte Mutation hin analysiert.

2.2.5.3 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden und zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt. Bei analytischen Verdaus wurden typischerweise ca. 0,2 µg Plasmid-DNA mit 2 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µL für 1 h inkubiert. Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µL für 1-2 h durchgeführt. Hierfür wurden 2-10 µg Plasmid-DNA und 20 U eines jeden Restriktionsenzymen eingesetzt. Isolierte PCR-Fragmente wurden ebenso in einem 50 µL Ansatz mit 20 U des jeweiligen Restriktionsenzymen gespalten. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.2) oder mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben isoliert.

2.2.5.4 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*Blunt Ends*) wurde das Vektorfragment zur Erhöhung der Ausbeute an korrektem Ligierungsprodukt mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. Auf diese Weise lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer unerwünschten Rezirkularisierung des geschnittenen Vektors vermindern. Hierzu wurde die Alkalische Phosphatase – unter Verwendung des vom Hersteller für die Nuklease empfohlenen Puffers – direkt nach Restriktionsverdau (Abschnitt 2.2.5.3) in den präparativen Reaktionsansätzen

eingesetzt. 1 μL (1 U) Alkalische Phosphatase wurde 1 h nach Beginn der Restriktionsspaltung zugegeben und der Ansatz weiter für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch zehnmütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und im Verlauf der Reinigung der DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

2.2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die rasche und effektive Amplifizierung spezifischer Sequenzen aus passenden DNA-Matrizen. Die terminalen Überhänge der Primerpaare boten zusätzlich eine elegante Möglichkeit, neue Restriktionsschnittstellen in die flankierenden Regionen einzuführen und somit den nachfolgenden Transfer auf das gewünschte Vektorsystem (Plasmid) zu erleichtern.

Die Amplifizierung eines zu klonierenden Gens aus cDNA erfolgte nach folgendem Ansatz: Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (*Primer*) flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Durch den Einsatz der *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, die sich aufgrund ihrer „*Proofreading*“-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurde der Einbau von fehlerhaften Basenpaarungen minimiert. Die eingesetzten *Primer* wurden vor der 3' - 5' - Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt, indem modifizierte *Primer* verwendet wurden, die an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphothioatbindung tragen (Skerra, 1992).

Für die weniger anspruchsvolle Amplifizierung von Sequenzen aus Plasmiden wurde auf die einfachere *Taq* DNA-Polymerase zurückgegriffen. Ein Standard-Reaktionsansatz für eine PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 μL 0,01-1 μg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 μL 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 μL MgCl_2 (25 mM) sowie 4 μL dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, wurden 5 μL des mitgelieferten 10x *Pfu*-Puffers (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA) verwendet, in dem bereits MgCl_2 enthalten war. Nach Auffüllen mit H_2O auf 50 μL wurde der Reaktionsansatz fest verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Nach Erhitzen auf 94 °C für zwei Minuten wurde das Enzym zugegeben (*Hot Start*) und die PCR in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 45 bis 65 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA

bei 72 °C für die entsprechende Zeit, je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 25 mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

2.2.5.6 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Phenol/Chloroform-Extraktion

Um die DNA im Anschluss an eine der oben beschriebenen Umsetzungen von den Enzymen oder bei der Präparation von Plasmid-DNA von restlichen Zellproteinen (z. B. verbliebene Exonukleasen aus dem *E. coli*-Stamm JM83) zu befreien, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µL 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,5) versetzt und das Volumen mit H₂O auf 400 µL eingestellt. Nach Zugabe von 400 µL Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (Eppendorf, 16100 g, RT, 2 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µL Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation wie zuvor abgetrennt.

Ethanol-Fällung

Zur Abtrennung von restlichem Phenol wurde die wässrige Phase mit 1 mL eiskaltem Ethanol gemischt und die DNA mindestens für 1 h bei -20 °C gefällt. Das nach Zentrifugation (Eppendorf, 16100 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µL 70 % v/v Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Abhängig von der weiteren Verwendung wurde das Präzipitat in 20-100 µL TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die Konstruktion neuer Plasmide erfolgte durch kovalente Verknüpfung der mit Restriktionsendonukleasen gespaltenen, gereinigten DNA-Fragmente mithilfe der T4 DNA-Ligase. Für einen Standardansatz wurden dazu in einem Gesamtvolumen von 15 µL 1,5 µL 10x Ligase-Puffer (400 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP; Fermentas), 0,5 µL T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µL; Fermentas) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Als Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz ohne Zugabe der zu

inserterenden DNA. 5 µL des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

2.2.5.8 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Dabei wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985) nach einer Methode, die auf dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) basiert, verwendet.

Für die Analyse von DNA-Abschnitten mithilfe des ABI PRISM[®]310-Sequenzierautomaten wurde der ABI PRISM[®]BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Durch Zugabe von mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelten Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) wird die naszierende DNA-Kette einer PCR abgebrochen und die entstehenden Fragmente gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert (Rosenblum *et al.*, 1997). In der folgenden Kapillar-Elektrophorese erfolgte eine Trennung der markierten DNA-Einzelstränge mit anschließender Detektion der Fluoreszenz mithilfe eines Lasers. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera erfasst und als digitales Signal an einen Computer weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe der Software ABI PRISM[®]DNA Sequencing Analysis 3.3 interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Überproduktion eines heterologen Proteins erfolgte je nach verwendetem Expressionssystem im Cytosol oder periplasmatischen Raum des Bakteriums *E. coli*. Die Fusion des Strukturgens des zu produzierenden Proteins mit einer bakteriellen Signalsequenz (OmpA) führte zu einer Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum der Zelle (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression ließ sich die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewinnen. *Inclusion Bodies* von intrazellulär produziertem Protein wurden dagegen durch den kompletten Ausschluss der Zellen mithilfe einer *French Press* gewonnen. Als Standard dienten Schüttelkulturen mit einem Volumen von 2 L; wurden größere Mengen an Protein benötigt, so erfolgte die Produktion im Laborfermenter.

2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

Als Vorkultur wurden 50 mL LB/Amp- bzw. LB/Cam-Medium mit einer Kolonie eines entsprechend transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 30 - 37 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Der Start der Hauptkultur erfolgte durch Transfer dieser Vorkultur im Verhältnis 1:50 auf 2 L LB/Amp- bzw. LB/Cam-Medium in einem 5 L-Erlenmeyerkolben. Die Hauptkultur wurde bei Verwendung eines periplasmatischen Expressionssystems bei 22 °C, ansonsten bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Durch stündliche Probenentnahme und Messung der Optischen Dichte (OD₅₅₀) wurde das Wachstum kontinuierlich verfolgt. Bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5 wurde mit 200 µg/L Anhydrotetracyclin (aTc) bzw. 0,5 mM IPTG die Genexpression induziert.

Zur Gewinnung des periplasmatischen Extraktes wurde die Kultur nach der gewünschten Zeit zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 5.000 rpm). Nach vollständiger Abnahme des Medienüberstands wurden die sedimentierten Zellen unter Kühlung in insgesamt 20 mL eiskaltem Saccharose-Augschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) vorsichtig mithilfe einer 25 mL Glaspipette resuspendiert und in einem 50 mL Kunststoffröhrchen für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C, 15 min sowie SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 15 min). Der periplasmatische Extrakt wurde daraufhin zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert (siehe Abschnitt 2.4.2) oder zur Lagerung bei - 20 °C eingefroren.

Der Gesamtzellaufschluss einer Kultur mit intrazellulär produziertem Protein wurde mithilfe einer Hochdruckzelle (*French Press*) durchgeführt. Hierzu wurde ebenfalls nach entsprechender Induktionsdauer die Kultur auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und für 15 min bei 5.000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, 4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen in 20 mL Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM DDT) resuspendiert und bei dreimaligem Durchgang durch die große Druckzelle (35 mL Probenvolumen) einer *French Press* bei 16.000 psi bis zum Erreichen eines klaren Lysates komplett aufgeschlossen. Die festen Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) wurden durch Zentrifugation (SS-34, 17.000 rpm, 4 °C, 20 min) abgetrennt und anschließend solubilisiert (Abschnitt 2.4.1).

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurden der Kultur während des Wachstums jeweils Proben entnommen und Gesamtzellextrakte im kleinen Maßstab wie folgt präpariert:

1 mL der Kultur wurde dazu in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 4 °C, 2 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µL Benzonase-Lösung (12,5 U/mL in Benzonasepuffer) resuspendiert. Die Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 20 µL 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE erreicht. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert. Danach wurde das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei - 20 °C eingefroren.

2.3.1.2 Periplasmatische Produktion von Protein im Laborfermenter

Zur Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein zum Zwecke der Kristallisation wurden die Bakterienzellen in einem 10 Liter-Fermentergefäß in einem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- sowie Glukose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurde (Schiweck & Skerra, 1995). Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet. Als Wirtszellen wurden dabei die *E. coli*-Stämme KS272 und MC4100 Δ skp verwendet.

Als Vorvorkultur wurden 2 mL mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 360 mL Mineralsalzlösung, welcher 40 mL 20 % (w/v) Glucose, 4 mL 1 M MgSO₄, je 400 µL Antibiotika-Stammlösung und 400 µL Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden war. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD₅₅₀ = 1,5 - 2,0.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 L Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert, auf dem Magnetrührer fixiert und auf 30 °C temperiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurden ihr über einen Trichter 800 mL 20 % (w/v) Glucose, 80 mL 1 M MgSO₄, je 8 mL der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 mL FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 10 mL Spurenelement-Lösung sowie 200 µL 30 %ige Antifoam-A-Lösung hinzugegeben. Zunächst sorgte Druckluft für die Belüftung, worauf dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert ≤ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak wurde der pH-Wert bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm. Das Medium

wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (400 mL) angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C abgesenkt und nochmals 600 µL Antifoam A zugegeben. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zudosiert:

Ab einer Zelldichte von OD ₅₅₀	= 7,5	Zugabe mit	14 mL/h
	= 12,5	"	20 mL/h
	= 18,5	"	30 mL/h
	= 22,5	"	40 mL/h

Weiterhin wurden der Kultur bei OD₅₅₀ = 13 nochmals je 4 mL Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 10 mL der Spurenelement-Lösung zugesetzt.

Bei Erreichen einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 20 wurde durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg Anhydrotetracyclin je L Kultur die Genexpression induziert und die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt. Die Zellernte erfolgte nach kompletter Abkühlung des Fermentationsgefäßes auf 4 °C, dann zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A- Rotor, 4°C, 20 min, 5.000 rpm). Der folgende Periplasmaaufschluss wurde im Kältelabor (4 °C) durchgeführt. Die sedimentierten Zellen wurden in ein 1000 mL-Becherglas überführt und in Periplasma-Augschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) für 10 min auf einem Magnetprüher (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug dabei 2 mL L⁻¹ OD⁻¹. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg Lysozym/mL (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/mL in Augschlusspuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500- Rotor, 4 °C, 20 min, 11.500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt. Die so erhaltene Proteinlösung wurde entweder zur Chromatographie gegen das 100fache Volumen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit einem entsprechenden Schlauch (Cut off mindestens 5 kDa kleiner als die Proteingröße) dialysiert oder bei - 20 °C eingefroren.

2.3.2 Proteinproduktion mit Selenomethionin-Substitution

Zur Lösung des Phasenproblems in der Röntgenkristallographie mittels des wellenlängenabhängigen anomalen Signals kann die Substitution der Schwefelatome der Methioninreste des Proteins durch das Schweratom Selen verwendet werden. (Hendrickson *et al.*, 1988) Diese hier angewandte Methode basiert auf der Kultivierung des für Methionin auxotrophen *E. coli*-Stammes B834 (DE3) in Gegenwart von Selenomethionin (Budisa *et al.*, 1995).

Eine 5 mL Vorkultur wurde in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C für 10 Stunden angezogen. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet zweimal mit 2 mL Mineralsalzmedium (Abschnitt 2.1.8) gewaschen und anschließend in 1 mL Mineralsalzmedium resuspendiert. 2 L „Neues Minimal Medium“ wurden mit 8 mL/L 50 % Glucose, 1 mL/L 1000x Spurenelementlösung, 1 mL/L 1000x Thiamin/Biotinlösung, 10 mL/L 100x Aminosäurelösung (ohne Met), 25 mg/L L-Selenomethionin, 1 mL/L Ampicillin versetzt, mit 1 mL der resuspendierten Vorkultur angeimpft und bei 30 °C und 170 rpm über Nacht geschüttelt. Die stationäre Kultur ($OD_{550} \approx 1,6$) wurde mit 250 µg/L aTc für 14 Stunden induziert und die Kulturen unter Verwendung von je 30 mL Augschlusspuffer wie unter Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben geerntet. Der periplasmatische Extrakt (ca. 30 mL) wurde anschließend zur Reinigung des rekombinanten Proteins über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert und mittels Streptavidinaffinitätschromatographie mit anschließender Größenausschlusschromatographie gereinigt (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.3).

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern

Bei starker Überproduktion rekombinanter Proteine im Cytoplasma von *E. coli* ist eine korrekte Faltung der Polypeptidketten durch die Zellmaschinerie meist nicht mehr möglich. Es bilden sich sogenannte Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) unter Ablagerung großer Mengen an unlöslichem, partiell ungefaltetem Protein. Diese lassen sich durch Zentrifugation bequem isolieren und weisen nach denaturierender Solubilisierung oft bereits hohe Reinheit an rekombinantem Protein auf. Zur Gewinnung von funktionellem Protein ist anschließend die Entwicklung eines passenden Protokolls zur Rückfaltung des gelösten Proteins notwendig.

Im Fall des bakteriell produzierten CTLA4 wurden die durch Zentrifugation (Abschnitt 2.3.1.1) abgetrennten Einschlusskörper dreimal mit Augschlusspuffer (50 mM

Tris/ HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM DTT) gewaschen und anschließend gewogen. Die Solubilisierung erfolgte daraufhin unter Rühren über Nacht bei 4 °C in 20 mL 50 mM Tris/ HCl pH 8,5, 6 M Guanidin/HCl pro g Einschlusskörper. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (SS-34, 15.000 rpm, 4 °C, 15 min) entfernt und die Lösung zur Rückfaltung vorsichtig unter Rühren in das 20fache Volumen 50 mM Tris/HCl pH 9,5, 0,6 M Guanidin/HCl, 0,3 mM DTT eingetropt. Dieser Ansatz wurde 3 Tage bei 4 °C gerührt um eine langsame Oxidation durch Luftsauerstoff zu gewährleisten und somit die Bildung der Disulfidbrücken zu ermöglichen. Anschließend wurde zweimal über Nacht gegen das 20fache Volumen 20 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert, präzipitiertes Protein durch Zentrifugation (SS-34, 17200 g, 4 °C, 15 min) entfernt, die Proteinlösung filtriert (0,45 µm) und bis zur Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie bei 4 °C gelagert.

2.4.2 Chromatographische Verfahren

2.4.2.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Rekombinante Proteine aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt & Skerra, 2007) wurden mithilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Die Periplasmafraktion (siehe Abschnitt 2.3.1.1) wurde dazu über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997) - entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/mL - wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (Absorption bei 280 nm (A_{280})) mit SA-Puffer gespült. Bis zu einem Volumen von 30 mL Periplasmafraktion wurde ein Bettvolumen von 2 mL verwendet. In diesem Fall wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flussrate von 30 mL/h betrieben. Bei größeren Volumina (bis zu 300 mL Periplasmafraktion aus der Fermentation) wurde eine Säule mit 15 mL Bettvolumen bei einer konstanten Flussrate von 120 mL/h betrieben.

Nach dem Auftragen der Periplasmafraktion auf die Säule wurde diese mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das fusionierte *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung an D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert und in Fraktionen gesammelt. Zur Regenerierung der Säule erfolgte eine Spülung mit 5 mM HABA in SA-Puffer, um das gebundene D-Desthiobiotin zu verdrängen. Die Bindung von HABA an das Material konnte anhand einer intensiven Orangefärbung der Säule verfolgt werden. Schließlich wurde das

gebundene HABA durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm und SDS-PAGE ermittelt, entsprechend vereinigt und zur weiteren Verwendung (üblicherweise für die Größenausschlusschromatographie) bei 4 °C gelagert.

2.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) beruht auf der Bindungswechselwirkung zwischen funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche - vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten - und immobilisierten Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich eingeführten Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli, 1988). Die Immobilisierung der Übergangsmetallionen erfolgt üblicherweise durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert sind. Hier wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner eingesetzt, und als Übergangsmetallion wurde Zn^{2+} verwendet (Skerra 1994a). Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente ein C-terminales His₆-Tag.

Um ein rekombinantes Protein aus 20 mL Periplasmaextrakt zu isolieren wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 (4) mL verwendet (Angaben für Fermentationsansätze in Klammern). Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mithilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert. Zur Entfernung des Komplexbildners EDTA wurde der periplasmatische Proteinextrakt (siehe Abschnitt 2.3.1.1) zunächst gegen 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 oder PBS-Puffer dialysiert, und sterilfiltriert (0,45 µm). Die Säule wurde mithilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer Flussrate von 30 (60) mL/h betrieben und mit 20 (40) mL Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde mit 10 (20) mL 10 mM ZnSO₄ beladen, mit 20 (40) mL Wasser nachgespült und schließlich mit 20 (40) mL des entsprechenden Puffers äquilibriert. Nach dem Auftragen der periplasmatischen Proteinfraction wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 (60) mL von 0 bis 300 mM Imidazol/HCl in entsprechendem Puffer. Das Eluat wurde mithilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 2 (4) mL aufgefangen und zur Unterdrückung von metall-induzierter Aggregation des eluierten Proteins in jeder Fraktion eine EDTA-Konzentration von 5 mM eingestellt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE

ermittelt, entsprechend vereinigt und zur weiteren Verwendung (üblicherweise für die Größenausschlusschromatographie) bei 4 °C gelagert.

Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn^{2+} -Ionen mit 20 (40) mL Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und anschließend mit 20 (40) mL Wasser gespült.

2.4.2.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen für die Kristallisation sowie für die Analyse und Isolierung von Protein-Protein Komplexen verwendet.

Die Chromatographie erfolgte unter Verwendung eines ÄKTA[®] - FPLC-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech (ÄKTA-Purifier; ÄKTA-Explorer). Als Säulen dienten für analytische Zwecke die Superdex 75 HR 10/30 bzw. Superdex 200 HR 10/30 und für präparative Reinigungen größerer Proteinmengen die Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade bzw. Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade. Das Superdex 75 Material besitzt einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa, das Superdex 200 Material einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa. Die verwendeten Chromatographie-Puffer wurden vor Benutzung sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast.

Die beiden analytischen Säulen mit einem Bettvolumen von 24 mL wurden zunächst mit 50 mL Chromatographie-Puffer äquilibriert und maximal mit 500 µL einer Proteinprobe (maximal 2 % Bettvolumen bei 1 mg Gesamtprotein) durch eine angebrachte Probenschleife beladen. Anschließend wurde mit mindestens einem Gesamtsäulenvolumen bei einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. Für die beiden präparativen Säulen mit 124 mL Bettvolumen war eine Äquilibration mit 180 mL Chromatographie-Puffer nötig, bevor eine Proteinprobe bis zu 2 mL (maximal 1,5 % Bettvolumen bei 20 mg Gesamtprotein) aufgetragen wurde. Der Betrieb der präparativen Säulen erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min. Fraktionen wurden gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit des entsprechenden Proteins untersucht.

Zur Eichung der Säulen wurden Proteine (Sigma Chemie GmbH, Reinheit > 95 %) mit bekannter Molekülgröße verwendet. Dazu wurden Proteinlösungen von 1 mg/mL im entsprechenden Puffersystem angesetzt. Abschließend wurden die Säulen durch Spülen mit einem Säulenvolumen an 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert.

2.4.2.4 Ionenaustauschchromatographie

Ein Ionenaustauscher wurde zur Isolierung von rekombinantem Protein ohne Affinitätsanhängsel aus periplasmatischen Extrakten (Abschnitt 2.3.1.1) und aus Rückfaltungsansätzen (Abschnitt 2.4.1) verwendet. Die Chromatographie erfolgte mithilfe eines ÄKTA[®] - FPLC-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech (ÄKTA-Purifier; ÄKTA-Explorer) mit einem Gradientenmischer unter Verwendung eines Zweipumpensystems. Die verwendeten Chromatographie-Puffer wurden vor Benutzung sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast.

Zunächst wurde die Anionentauscher-Säule (RESOURCE Q, 1 mL Bettvolumen) mit 10 mL des entsprechenden Chromatographie-Puffers ohne Salz voräquilibriert und anschließend die Proteinprobe (sterilfiltriert, 0,45 µm) mit einer Flussrate von 2 mL/min aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 15 mL Chromatographie-Puffer ohne Salz wurde die Flussrate auf 1 mL/min herabgesetzt und ein Salzgradient (20 mL) in Chromatographie-Puffer von 0 - 0,5 M bzw. 0 - 1 M NaCl angelegt. Fraktionen von 0,5 mL wurden gesammelt, mittels SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit des entsprechenden Proteins untersucht und bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde durch Spülen mit je 10 mL 0,5 M NaOH, 0,1 M HCl und mit Wasser gereinigt und in 20 % Ethanol gelagert.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinmischungen sowie Protein-Protein-Komplexe wurden mittels diskontinuierlicher SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines speziellen Puffersystems (Fling & Gregerson, 1986) analysiert. Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich daher annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins.

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5 cm und einer Dicke von 0,75 mm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten mit Abstandhaltern und einer Gummidichtung mittels Klammern zusammengebaut, mit 4,8 mL einer Trenngelmischung befüllt und mit 1 mL Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 mL enthielt 1,25 mL 4x Lower-Tris, 1,25 mL Wasser sowie 2,5 mL einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Zum Polymerisationsstart wurden 1,3 µL TEMED und 25 µL 10 % (w/v) APS zugegeben. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 45 min) wurde das Wasser abgossen. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 0,5 mL

Acrylamid-Stammlösung und 0,75 mL 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 mL aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5 µL TEMED und 25 µL 10 % (w/v) APS wurde die Lösung auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Klammern sowie die Gummidichtung vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 1 - 20 µL Proteinlösung mit 5 µL 5x Auftragspuffer versetzt und auf ein Volumen von 25 µL mit Wasser aufgefüllt. Nach dem Erhitzen der Proben für 5 min auf 95 °C wurde dann je 20 µL in die Probentaschen des vollständig polymerisierten Gels pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA betrieben. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker des Auftragspuffers die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde die Gelkammer geöffnet, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel bis zur Trocknung in Aufbewahrungslösung gelagert.

2.4.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine zur Kristallisation oder für die Fluoreszenztitration (Abschnitt 2.5.2) wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm (nach Abzug der Eigenabsorption des verwendeten Puffers) mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

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

Dabei stellt E die Extinktion, ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten, c die Konzentration (g/L) und d die Schichtdicke (cm) der Küvette dar. Die notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden unter Zuhilfenahme der Computerprogramme TRANSLATE und PEPTIDESORT aus dem GCG-Programmpaket (Wisconsin Software Package, Genetics Computer Group; (Devereux *et al.*, 1984)) errechnet (siehe Tabelle 2). Diese werden dabei näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren der vollständig entfalteten Polypeptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989).

Protein	Molmasse [Da]	ϵ_{280} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
AGP-cStrepII	22671	36960
CTLA4-cStrepII	13561	14770
CTLA4-c6His	13186	9080
CTLA4	12363	9020
CTLA4-c8As	14296	10360
dCTLA4	26606	18220
GLY-cStrepII	19851	28000
hOBP1	19015	19150
hOBP2	19120	18998

Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm und Molmassen der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.

2.4.5 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente, insbesondere zur Kristallisation, wurden Lösungen mit erhöhter Proteinkonzentration benötigt. Auch für die Größenausschlusschromatographie war in der Regel eine vorhergehende Konzentration der Probe notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein mittels einer Konzentratoreinheit (Millipore, Vivaspin) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Zur Schonung des Proteins wurde die Zentrifugation alle 5 min unterbrochen und die Lösung mit einer Pipette gut durchmischt, um sehr hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden. Nach Filtration des Konzentrates (0,45 µm, Einheit mit 4 mL oder 15 mL Gesamtvolumen) wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm unter Verwendung des errechneten Extinktionskoeffizienten (siehe Tabelle 2) die exakte Proteinkonzentration bestimmt und die Probe bei 4 °C gelagert. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen, wurde zusätzlich auch der Proteingehalt des Filtrats untersucht.

2.4.6 Western Blotting

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch wurde die Methode des *Western Blotting* verwendet. Das Proteingemisch wird zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein schließlich in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben durchgeführt und das Trenngel anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % v/v Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran. 4 Blätter Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) wurden mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektrobloßapparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 4 Blätter mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm²) betrieben. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 15 min in 10 mL PBS/T geschwenkt. Der immunchemische Nachweis erfolgte direkt oder anhand des *Strep*-Tag II Affinitätsanhängsels. Hierzu wurden 10 µL eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats (oder eines entsprechenden Antikörpers) in 10 mL PBS/T zugegeben und für 1 h geschwenkt. Danach erfolgte dreimaliges Waschen der Membran für 5 min mit je 10 mL PBS/T. Bei Verwendung eines primären Antikörpers folgte anschließend die Inkubation mit 10 µL des Detektionsantikörpers in 10 mL PBS/T. Zur selektiven Anfärbung der rekombinanten Proteine wurde die mit PBS/T gewaschene Membran in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) getränkt. Durch Inkubation in 20 mL AP-Puffer unter Zusatz von 10 µL NBT (75 mg/mL in 70 % DMF) und 60 µL BCIP (50 mg/mL in DMF) wurden die Proteinbanden sodann sichtbar gemacht (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran schließlich zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Um die konformationelle Homogenität der Proteinkomplexe und deren Stabilität bei Zugabe von Detergenzien zu untersuchen, wurden Experimente mit dynamischer Lichtstreuung

(Nobmann *et al.*, 2007) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die Messung der Verteilung kleiner Partikelgrößen in Lösungen. Aus dem Streuverhalten von eingestrahltm Licht durch eine Lösung und der daraus resultierenden Fluktuation der Lichtintensität bei fixiertem Detektionswinkel lässt sich bei bekannter Viskosität der hydrodynamische Radius enthaltener Teilchen errechnen. Bei dieser Berechnung wird eine globuläre Struktur der Partikel angenommen. Mithilfe der Geräte-Software ließen sich aus einer Datenbank die Molekulargewichte der Proteine aus den gemessenen Partikelgrößen ermitteln.

Alle Experimente wurden mit dem Gerät Zetasizer Nano-S durchgeführt. Die verwendeten Proben wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (SpinX Filter, 0,45 µm) und in einer 50 µl-Quarzküvette im Gerät vermessen. Jede Messung beinhaltete zehn Wiederholungen mit anschließender Mittelung der Resultate. Die angegebene Verteilung der Partikelgrößen wurde anschließend durch die Geräte-Software einer Volumenkorrektur für die erhaltenen Peaks unterzogen. Dieses ist nötig, da die individuelle Größe jedes Partikels die Signalstärke beeinflusst (größere Partikel erzeugen größere Signalstärken). Nach vollzogener Korrektur ließ sich somit der Reinheitsgrad von Proteinlösungen für die Kristallisation bestimmen.

Lösungen des Protein Komplexes O10/mCTLA4-His6 wurden auch mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 %, 1 %, 5 % w/v) der Detergenzien β -Octylglucosid (β -OG), n-Dodecylmaltosid (nDM) und Trimethylamin-N-oxid (TMAO) versetzt und auf Stabilität des Komplexes getestet.

2.5.2 Fluoreszenz-Titration von Proteinen mit Liganden

Die Fluoreszenztitration wurde durchgeführt, um die Bindungskonstanten verschiedener niedermolekularer Liganden zu den Lipocalinen zu bestimmen. Dabei macht man sich zunutze, dass sich bei der Bildung des Komplexes von Protein und Ligand die Fluoreszenzeigenschaften mindestens eines der beiden Bindungspartner verändern. Es wurden 2 mL der entsprechenden gereinigten Proteinlösung (gegen 25 mM Na-Phosphat pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA dialysiert) mit einer Konzentration von 1 µM unter Rühren in einer Quarzküvette in einem Spektrofluorimeter LS 50 B bei 25 °C vorgelegt. Während der Messung der Proteinfluoreszenz wurde zur Anregung der Tyrosin- und Tryptophan-seitenketten eine Wellenlänge von 280 nm eingestellt und bei 340 nm detektiert. Bei Messung der Ligandenfluoreszenz von all-trans Retinol, ANS bzw. DAUDA wurde bei 334 nm, 370 nm bzw. 345 nm (Spaltbreite jeweils 4 nm) angeregt und das Fluoreszenzsignal bei 455 nm, 475 nm bzw. 490 nm (Spaltbreite jeweils 4,5 nm) detektiert.

Nach Äquilibrierung der Proteinlösung wurde die Fluoreszenz der reinen Proteinlösung abgelesen (Startwert ohne Ligand). Anschließend wurden sequentiell unterschiedliche Mengen (1 - 8 μL) an Ligandenlösung zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Küvette zur Einstellung eines konstanten Fluoreszenzwertes im Gerät dunkel gehalten (für 1 - 15 min) und danach das Fluoreszenzsignal über 10 s gemittelt gemessen. Die geringe Volumenzunahme um 40 μL bis zum Ende der Titration wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Von allen erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerten wurde anschließend die Fluoreszenz des reinen Puffers abgezogen.

Messung der Proteinfluoreszenz:

Im Fall der Titration mit Retinsäure wurde zur Korrektur des inneren Filtereffekts (Eigenabsorption des Liganden) eine zusätzliche Titration einer 5 mM N-acetyltryptophanamid-Lösung vorgenommen. Die gemessenen Fluoreszenzwerte ließen sich dann mit folgender Formel (1) korrigieren:

$$F = F_{\text{app}} \cdot 10^{\varepsilon_{\text{app}} c_L} \quad (1)$$

Dabei stellt F_{app} die gemessene apparente Fluoreszenz, ε_{app} den apparenten Extinktionskoeffizienten der Retinsäure aus der Kontrolltitration und c_L die Retinsäurekonzentration in jedem einzelnen Titrationsschritt dar. Nach erfolgter Korrektur wurden die Daten auf 100 % des Startwertes skaliert und gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen.

Messung der Ligandenfluoreszenz:

Zur Ermittlung der Eigenfluoreszenz des jeweiligen Liganden (*all-trans* Retinol, ANS bzw. DAUDA) wurde eine Titration in 2 mL Puffer bei entsprechenden Wellenlängen (siehe oben) durchgeführt. Aus der konzentrationsabhängigen linearen Zunahme der Ligandenfluoreszenz in Abwesenheit des Proteins konnten entsprechend der Steigung der Regressionsgeraden die Fluoreszenz-Koeffizienten der Liganden (f_L) mit 2,3579 M^{-1} , 0,4872 M^{-1} bzw. 3,4005 M^{-1} bestimmt werden.

Bei Messung der Ligandenfluoreszenz wurden die Fluoreszenzwerte nach Abzug des Pufferwertes direkt gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen (keine Skalierung). Die erhaltenen Datenpunkte wurden jeweils durch nicht-lineare Regression mit dem Programm KaleidaGraph unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie an eine Kurve angepasst (2):

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

Dabei stellen $[P]_t$ and $[L]_t$ die totale Konzentration des Proteins (konstant) und des Liganden (bei jedem Titrationsschritt) dar. f_P , f_L und f_{PL} repräsentieren die relativen molaren Fluoreszenz-Koeffizienten des freien Proteins, des freien Liganden und des Protein-Ligand-Komplexes; K_D ist die Dissoziationskonstante. f_{PL} und K_D werden durch das Programm als freie Parameter angepasst.

Die oben wiedergegebene Formel (2) ließ sich im Fall der Messung der Proteinfluoreszenz durch $f_L = 0$ vereinfachen, da der gemessene Ligand (hier Retinsäure) bei gegebener Wellenlänge keine intrinsische Fluoreszenz zeigte. Für die Messungen der Ligandenfluoreszenz ließ sich $f_P = 0$ setzen, da das Protein bei den eingestellten Emissionswellenlängen vernachlässigbare Fluoreszenz zeigte. Für f_L wurden die oben bestimmten Fluoreszenz-Koeffizienten der Liganden verwendet.

2.5.3 CD-Spektroskopie

Cirkulardichroismus beschreibt die unterschiedliche Abschwächung von rechts- und linkshändig zirkular polarisiertem Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives, absorbierendes Medium, was 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.

Zur Aufnahme der Spektren wurden die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigten Proteine zweimal gegen Messpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5; 50 mM Kaliumsulfat) dialysiert. Die Proteinlösung (ca. 25 μ M bis 80 μ M) wurde in eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm gefüllt und für 20 min bei 20 °C im Probenhalter des Spektropolarimeters (Jasco J-810) temperiert. CD-Spektren wurden im Bereich von 190 bis 250 nm aufgezeichnet, wobei bis zu 20 Spektren akkumuliert wurden (Geräteeinstellungen: response = 1 s; band width = 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_{MWR} mit Hilfe der folgenden Gleichung umgerechnet:

$$\Theta_{\text{MWR}} = \frac{\Theta_{\text{obs}} \times M_R}{c \times d \times N_A} \quad (3)$$

Dabei bezeichnet M_R die Molmasse des untersuchten Proteins, c dessen Konzentration in mg/mL, d die Schichtdicke in cm sowie N_A die Anzahl der Aminosäuren.

2.5.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der in *E. coli* produzierten Proteine erfolgte mithilfe eines ESI-Q-TOF-Massenspektrometers (ESI-Q-TOF = *Electron Spray Ionisation - Quadrupol - Time of Flight*) (Strupat, 2005) mit einer micro-ESI-Quelle und wurde freundlicherweise von Walter Stelzer am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, TU München durchgeführt. Das Verfahren ermöglicht die zerstörungsfreie Überführung von Proteinmolekülen in die Gasphase. Unter Atmosphärendruck wird aus einer Kapillare kontinuierlich mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Analytlösung (mit Acetonitril als Lösungsmittel) in ein elektrisches Feld injiziert (*Spray*). Dabei erfolgt die Bildung kleiner geladener Tröpfchen. Die stetige Verdampfung des Lösungsmittels und die daraus resultierende Erhöhung der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche führen zur Bildung von stark geladenen Mikrotröpfchen, die statistisch nur noch je ein Proteinmolekül enthalten. Nach kompletter Desolvatisierung werden die geladenen Proteinmoleküle entsprechend ihres Molmasse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) im Hochvakuum eines Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometers analysiert. Durch die Bildung einer Verteilung mehrfachgeladener Ionen ist eine Rekonstruktion des einfach geladenen Molekülspektrums und die Ableitung der resultierenden Molekülmassen mithilfe eines Computerprogrammes (MassLynx Software 4.0, Waters S.A.S.) notwendig.

Für die Messungen wurden die Proteinkonzentration auf 0,1 mg/mL eingestellt, die Proben (100 μL) in Mikrodialysiereinheiten (Millipore, 10 kDa MWCO) zur Entfernung von störenden Ionen gegen 200 mL Millipore Wasser oder 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 dialysiert, mit Lösungsmittel (90 % v/v Acetonitril, 0,4 % Ameisensäure) verdünnt und anschließend im Gerät vermessen.

2.6 Proteinkristallographische Methoden

2.6.1 Kristallisation von Proteinen

2.6.1.1 Suche nach Kristallisationsbedingungen

Zur Ermittlung geeigneter Kristallisationsbedingungen für das entsprechende Protein bzw. den entsprechenden Protein-Protein-Komplex wurde das Prinzip der „Sparse Matrix“-Suche (Jancarik & Kim, 1991) verwendet. Hierzu standen am Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München 480 einzigartige Fällungsmittel-Bedingungen in fünf Mikrotiter-Platten mit je 96 Vertiefungen zur Verfügung. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in 96well CrystalQuick-Platten der Firma Greiner BioOne durchgeführt. Dazu wurden mithilfe eines Kristallisationsroboters (FreedomEvo) 0,1 - 0,2 μL einer konzentrierten Proteinlösung mit 0,1 μL des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 150 μL Reservoirlösung äquilibriert. Die Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear) verschlossen und der Kristallisationsverlauf mithilfe eines RockImagers über mehrere Monate bei 20 °C und bei 4°C verfolgt.

2.6.1.2 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Initiale Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Proteinkonzentration; Konzentration des Fällungsmittels; pH-Wert; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur) optimiert. Hierzu erfolgte der Ansatz der Bedingungen in der Regel in 24well Linbro-Platten durch Mischen von 1 μL Proteinlösung mit 1 μL Reservoirlösung und Äquilibrierung gegen 400 μL Reservoirvolumen.

Zur Generierung streufähiger Kristalle des CTLA4-bindenden Anticalins O10 war eine zusätzliche Suche nach einem geeigneten Additiv sowie Ermittlung dessen optimaler Konzentration erforderlich. Volatile Additive (*Additive Screen*, Hampton Research) wurden vor der Mischung mit dem Proteintropfen in das Reservoir gegeben, andere nach Mischung des Proteintropfens mit der Reservoirlösung dem Tropfen direkt zugegeben.

Kristalle für AGP wurden in CrysChem Platten mit hängendem Tropfen und 500 μL Reservoirvolumen optimiert. 1,5 μL Proteinlösung wurden mit 1 μL Reservoirlösung auf einem silanisiertem Deckgläschen gemischt, dieses umgedreht auf dem Reservoir plaziert und mit einer Öl/Vaseline-Mischung abgedichtet.

2.6.2 Kryokristallographie

Zur Vermeidung von Strahlenschäden des Kristalls durch die hochenergetische Röntgenstrahlung wurden Diffraktionsdaten stets bei einer Temperatur von 100 K gesammelt. Zunächst mußte eine geeignete Frierbedingung ermittelt werden, um eine Zerstörung des geordneten Kristallgitters durch Bildung von Eis auszuschließen. Hierzu wurde die Reservoirlösung der entsprechenden Kristallisationsbedingung mit steigenden Konzentrationen von schützenden Agenzien (Glycerin, PEG400, Ethylenglycol) versetzt und im Röntgenstrahl auf Bildung von Eiskristallen untersucht. Anschließend wurde die niedrigste noch eisfreie Konzentration (Frierbedingung) für die Diffraktionsexperimente benutzt.

Mit einem so genannten "Cryo-Loop", bestehend aus einem magnetischen Halter und einer kleinen Schlaufe aus synthetischer Faser, wurden die Kristalle aus dem Kristallisationstropfen geholt, zum Austausch der Mutterlauge durch einen 2 µL Tropfen der ermittelten Frierlösung gezogen und direkt auf dem Goniometerkopf im Gasstrom eines Stickstoff-Kühlaggregates auf 100 K abgekühlt. Gefrorene Kristalle wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Messungen erfolgten mit monochromatisierter CuK α -Strahlung ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) eines Drehanodengenerators. Beugungsreflexe wurden auf einer mar345 Imaging Plate detektiert. Alle hochauflösenden Daten wurden an der Messstation ID23-1 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble sowie der Messstation 14.1 am Berliner Elektronen Speicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY), Berlin aufgenommen.

Vor der Aufnahme eines jeden Datensatzes wurden stets anhand mehrerer Einzelbilder bei verschiedenen Winkeln die Kristallorientierung, Mosaizität und die Raumgruppe bestimmt. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Datensatzes in Schritten zu 1 ° mit größtmöglicher Vollständigkeit der zu sammelnden Reflexe.

Um spezifische UV-induzierte Strahlenschäden für die Phasierung auszunutzen (UV-RIP; Nanao & Ravelli, 2006, Abschnitt 3.1.5), wurde nach Aufnahme eines Datensatzes an der Messstation 14.1 am BESSY, Berlin der Kristall im Stickstoffstrom für fünf Minuten mit einem UV-Laser (266 nm, 6kHz, 2 mW, microchip LASER, TEEM Photonics, Grenoble) bestrahlt und anschließend ein weiterer Datensatz aufgenommen. Zur Verminderung zusätzlicher röntgen-induzierter Strahlenschäden wurde dabei jeweils eine möglichst geringe Intensität der Röntgenstrahlung verwendet.

2.6.3 Datenauswertung

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) oder XDS (Kabsch, 1993). Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 Programmpakets (Bailey, 1994) oder des HKL-Programmpakets (Otwinowski & Minor, 1997) durchgeführt.

2.6.4 Phasenbestimmung

2.6.4.1 Phasierung mittels molekularem Ersatz

Für die Phasierung gesammelter Beugungsdaten durch molekularen Ersatz wurde die Programme EPMR (Kissinger *et al.*, 1999), Molrep (Vagin & Teplyakov, 1997) und PHASER (McCoy, 2007) verwendet. Um die benötigte Anzahl an Suchmolekülen zu ermitteln war zunächst die Zahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit zu bestimmen. Hierzu wurde der Matthews-Koeffizient herangezogen. Dieser beschreibt das Verhältnis von Zellvolumen zu molekularer Masse und liegt typischerweise im Rahmen von 1,6 - 3,6 Å³ / Dalton (Matthews, 1968). Mit der so ermittelten Anzahl an Suchmolekülen wurden durch das Programm mehrere Rotations- und Translationssuchen im Patterson-Raum gegen die integrierten und skalierten Daten durchgeführt (McCoy *et al.*, 2005). Relevante Lösungen hoben anhand der berechneten *z-Scores* sowie der *LL-gains* klar vom Hintergrund ab.

Die Phasierung des CTLA4-bindenden Anticalins O10 erfolgte mithilfe der monomeren Struktur des humanen Lipocalins NGAL ohne Liganden (PDB-Code: 1DFV) als Suchmodell. Nach Auswertung des Datensatzes O10_27 und Bestimmung des Matthews-Koeffizienten wurden durch das Programm PHASER acht Moleküle des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit plaziert. Dabei wurde aufgrund der eingeführten Mutationen eine Sequenzidentität von 85 % vorgegeben.

Der Datensatz OC_11 des Proteinkomplexes aus dem Anticalin O10 und der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4 wurde unter Verwendung der vorhandenen Struktur des Rezeptors (PDB-Code: 1I85, Kette C) sowie der schon gelösten, verfeinerten Struktur des Anticalins phasiert. Hierzu erfolgte nach Bestimmung des Matthews-Koeffizienten die Platzierung der Suchmodelle zunächst für ein Molekül der CTLA4-Domäne und anschließend für ein Molekül des Anticalins. Als Sequenzidentität wurde unter Beachtung der zu erwartenden Flexibilität der Moleküle für beide Suchmodelle nur 90 % angegeben.

Für AGP wurden zahlreiche Suchabläufe mit den nativen, beschnittenen und mit poly-alanin substituierten Suchmodellen durchgeführt (Programme EPMR, Molrep und PHASER). Um die Anzahl an Ergebnissen zu minimieren, wurde der erlaubte Abstand der erhaltenen Lösungen vom Hintergrund variiert. Die Zulassung einer bestimmten Anzahl an Struktur-Überlagerungen (*Clashes*) erlaubte Lösungen, bei der sehr flexible Bereiche einer Umlagerung im Kristall unterliegen und somit mehrere Moleküle des verwendeten Suchmodells miteinander „kollidieren“. Beim Programm Phaser wurde zusätzlich der Wert für die Sequenzidentität zwischen Modell und Zielstruktur variiert (Modulierung der Stringenz bei Rotations- und Translationssuche).

2.6.4.2 Phasierung mittels UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP)

Die Phasierung des Datensatzes für das α_1 -Acid Glycoprotein (AGP) wurde freundlicherweise von Dr. Raimond Ravelli (ESRF, Genoble) und Dr. Uwe Müller (BESSY, Berlin) mit der neuartigen UV-RIP-Methode (Nanao & Ravelli, 2006) durchgeführt. Eine genauere Beschreibung erfolgt im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 3.1.5).

2.6.5 Modellbau und Verfeinerung

Nach initialer Phasierung (Abschnitt 2.6.4) wurde eine erste Elektronendichte berechnet und das Atommodell mithilfe der Programme O (Jones *et al.*, 1991) oder COOT (Emsley & Cowtan, 2004) eingepaßt. Darauf folgten Zyklen mit Verfeinerung (Energiminimierung, „*Simulated Annealing*“ und gruppierter Temperatur-Faktor-Verfeinerung) durch das Programm CNS (Brünger *et al.*, 1998). Nach jedem Verfeinerungszyklus erfolgte eine visuelle Inspektion und manueller Modellbau. Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor (4) minimiert.

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} \quad (4)$$

Vor Beginn der Verfeinerungszyklen wurden 5 % der Reflexe als TEST-Satz ausgewählt und in die anschließende Verfeinerung nicht mit einbezogen. Der daraus berechnete sogenannte freie R-Faktor (Brünger 1992) – im Regelfall maximal 5 % höher als der kristallographische R-Faktor – warnt dabei vor einer Überanpassung des Atommodells an die gemessenen Daten. Das Modell wurde unter Beobachtung des freien R-Faktors bis zur Konvergenz verfeinert. Anschließend wurden die benutzten Ligandenmodelle (Fragment des Additives Anapoe-

X405) mit dem PRODRG-Server generiert, in das Atommodell eingebaut und der Komplex einmalig verfeinert. Schließlich wurde eine Verfeinerung individueller Temperaturfaktoren durchgeführt und mithilfe von CNS automatisch Wassermoleküle eingebaut. Nach visueller Inspektion wurden weitere Wassermoleküle manuell eingebaut und das Modell abschließend einem letzten Verfeinerungszyklus unterworfen.

2.6.6 Strukturanalyse und graphische Darstellung

Die Qualität der modellierten Strukturen wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und dem „NIH MBI Structure Validation Server“ kontrolliert. Bei Abweichungen der Parameter (z.B. ϕ/ψ -Winkel, Planarität von aromatischen Ringen) von Standardwerten wurden entsprechende Aminosäuren anhand der Elektronendichte nochmals überprüft und gegebenenfalls nachbearbeitet.

Alle Grafiken von Proteinstrukturen wurden mithilfe des Programms PyMOL (DeLano, 2002) erstellt. Die Zuordnung von Sekundärstrukturelementen erfolgte mit DSSP (Kabsch & Sander, 1983). Die Überlagerung von Proteinstrukturen – in der Regel anhand definierter c_{α} -Atompositionen – wurde mittels der Funktion „*pair_fit*“ in PyMOL oder mit dem Programm LSQMAN (Jones, 1992) durchgeführt. Berechnungen von Proteinoberflächen und Interaktionsflächen erfolgten mit dem Programm AREAIMOL (Bailey, 1994) bei einem verwendeten Radius von 1,4 Å. Elektrostatische Oberflächen wurden mit dem Programm DelPhi (Rocchia *et al.*, 2001) berechnet und mit PyMOL dargestellt. Zur Nachbearbeitung und Beschriftung von Abbildungen und deren Konvertierung kam das Programm Adobe Photoshop zur Anwendung.

2.6.7 Modellierung von Liganden in Komplexen

Die Liganden Diazepam (PDB-Eintrag: DZP) und Progesteron (PDB-Eintrag: STR) für α_1 -Acid Glycoprotein wurden in idealisierter Form aus der Protein Data Bank (PDB) bezogen und zunächst visuell in der Bindungstasche der verfeinerten Proteinstruktur platziert. Anschließend wurde mithilfe des Programmpackets Insight II (Modul AFFINITY, Accelrys, San Diego, CA) unter Verwendung der „*GRID Docking*“-Funktion eine Computermodellierung durchgeführt. Hierbei wurde ein Radius von 10 Å um den Liganden verwendet und modellierte Strukturen bis 10 kcal/mol akzeptiert. Das Modell mit der geringsten Energie wurde danach mit dem Modul DISCOVER nochmals energieminiert und die resultierenden Koordinaten gespeichert.

2.7 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE und PEPTIDESORT aus dem GCG-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt.

Die graphische Auswertung von Messwerten erfolgte mithilfe des Programms Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA). Die nicht-lineare Regression für die Fluoreszenztitration wurde unter der Option *General Curve Fit* mit Gleichung (2) durchgeführt (Abschnitt 2.5.2). Die anzupassenden Parameter wurden dazu als $K_D = m1$, $f_{PL} = m2$, und $[P]_t = m3$ substituiert. $[L]_t = m0$ wurde als unabhängige Variable eingesetzt.

In dieser Arbeit verwendete kristallographische Software:

Programm	Version	Referenz
AREAIMOL	v.1	Bailey, 1994
CCP4	5.0.1	Bailey, 1994
Coot	0.5.2	Emsley & Cowtan, 2004
CNS	1.1	Brünger <i>et al.</i> , 1998
DelPhi	v.4	Rocchia <i>et al.</i> , 2001
Denzo/Scalepack	1.97.8	Otwinowski & Minor, 1997
EPMR	2.5	Kissinger <i>et al.</i> , 1999
HKL2000	1.98.5	Otwinowski & Minor, 1997
InsightII	2005	Accelrys Inc., CA, USA
LSQMAN	030402 -9.4.1	Jones, 1992
Molrep	9.2	Vagin & Teplyakov, 1997
O	v9	Jones <i>et al.</i> , 1991
Phaser	1.3.3	McCoy, 2007
Pymol	0.99rc6	DeLano, 2002
Refmac	5.5.0072	Bailey, 1994
SHARP	BESSY, Berlin	La Fortelle & Bricogne, 1997
SHELXD	BESSY, Berlin	Sheldrick <i>et al.</i> , 1993

Gele aus der SDS-PAGE wurden mithilfe von Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., USA) digitalisiert und das erhaltene Bild nur hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden aus folgenden im *World Wide Web* zugänglicher Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb
ExPASy Server	http://www.expasy.ch
NIH - Structure Validation	http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS
CLUSTAL W	http://npsa-pbil.ibcp.fr
ProDRG-Server	http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr
Restriktionsanalysen	http://www.fermentas.com/en/home http://www.neb.com/nebecomm/default.asp

3 Ergebnisse

3.1 Strukturanalyse des humanen α_1 -Acid Glycoproteins (AGP)

3.1.1 Klonierung, Expression, Reinigung und Charakterisierung von AGP

3.1.1.1 Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors

Aufgrund des erhöhten Anteils des Genproduktes von AGP-A (Dente *et al.*, 1988) im humanen Plasma von mehr als dem Faktor 100 gegenüber AGP-B und AGP-C wurde dessen cDNA als Grundlage für die folgende Strukturanalyse gewählt.

Um die funktionelle Bildung der beiden Disulfidbrücken des humanen Serumproteins AGP bei bakterieller Produktion zu gewährleisten wurde eine Expressionsstrategie mit Transport des rekombinanten Proteins in das Periplasma von *E. coli* gewählt. Als Vektorsystem diente das Plasmid pASK75-strepII (Voss & Skerra, 1997), welches die Fusion des unter Kontrolle eines Tetracyclinpromotors stehenden Gens mit der OmpA-Signalsequenz ermöglicht. Bei der Translokation des Genproduktes über die innere Membran der Bakterienzelle wird das Signalpeptid abgespalten, so dass das mature rekombinante Protein aus dem periplasmatischen Zellextrakt isoliert und anhand des mit dem C-Terminus fusionierten *Strep-tag II* (Schmidt & Skerra, 2007) gereinigt werden kann.

Die Gensequenz von AGP-A wurde mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares AGP-1/AGP-2 aus einer cDNA-Präparation humaner Leberzellen (zur Verfügung gestellt von D. Breustedt, AG Prof. Skerra) amplifiziert. Nach Phosphorylierung und Reinigung des PCR-Fragmentes wurde dieses in den mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *Eco47III* geschnittenen Vektor pASK75-strepII inseriert. Dabei wurde durch die verwendeten Primer das terminale Codon (Alanin) der OmpA-Sequenz sowie das erste Codon (Serin) des *Strep-tag II*, auf dem entstehenden Plasmid rekonstituiert.

Aus jeweils 10 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* analysiert. Durch zusätzlichen Verdau mit *XbaI* und *Eco47III* wurde die richtige Orientierung der inserierten Sequenz kontrolliert (Wiederherstellung der Erkennungssequenz von *Eco47III*). Die Kontrolle eines positiven Klones erfolgte durch Sequenzierung mit den Primern D20 und PR1. Die Sequenz zeigte eine Punktmutation von Guanin zu Cytosin. Dies führt zu einer unerwünschten Mutation der Aminosäureposition 176 von Arginin zu Serin (Swiss-Prot: P02763). Um die in der Literatur beschriebene Aminosäuresequenz wiederherzustellen, wurde mittels des Primers AGP-1-K eine ortsgerichtete Mutagenese (Kunkel *et al.*, 1987) durchgeführt. Nach abschließender

Kontrolle durch Sequenzierung wurde das generierte Expressionsplasmid als pAGP1 bezeichnet.

3.1.1.2 Optimierung der Expression von AGP

Die bakterielle Produktion des AGP (Aminosäuren 1-183; Schmid *et al.*, 1973) erfolgte zunächst im 2 L - Maßstab bei 22 °C im *E. coli* Stamm JM83 wie im Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben. Nach dreistündiger Induktion mit 200 µg/L aTc wurde die Kultur geerntet (OD₅₅₀ zum Zeitpunkt der Ernte ~1,0), die periplasmatische Proteinfraction präpariert, das rekombinante Protein durch Streptavidinaffinitätschromatographie isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (ohne Abbildung). Die beobachtete Wachstumskurve zeigte starke Lyse der Zellen bereits nach 2,5 Stunden Induktionszeit, was zur Verunreinigung des rekombinanten Proteins und zu ungenügend prozessiertem *Precursor*-Protein führte. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Induktionszeit zunächst auf 2,5 Stunden zu verkürzen.

Trotz wiederholter Versuche konnte die Lyse der Zellen kaum vermindert werden. Die periplasmatische Fraction zeigte weiterhin eine starke Verunreinigung mit intrazellulären Proteinen und das von der Streptavidinsäule eluierte Protein (MW_{AGP}: 22671 Da) bildete eine Mischung mit dem *Precursor* (Spur 7, Abbildung 1A). Des Weiteren war eine Verunreinigung mit einem Protein mit einer apparenten Molmasse von 17,5 kDa zu beobachten. Aus Erfahrungen der Arbeitsgruppe Prof. A. Skerra handelte es sich hierbei höchstwahrscheinlich um das SKP (*Seventeen Kilodalton Protein*) von *E. coli* (Schlupschy *et al.*, 2004), ein periplasmatisches Chaperon-Protein, welches bevorzugt mit Proteinen der äußeren Membran interagiert und die Stabilisierung von Faltungsintermediaten übernimmt (Jarchow *et al.*, 2008). Bei der Überproduktion rekombinanter Proteine im periplasmatischen Raum wurde schon des Öfteren eine „Mitreinigung“ dieses Proteins festgestellt. Zur Umgehung des beschriebenen Problems wurde der *E. coli* Stamm MC4100 mit einer Deletion des SKP (Schäfer *et al.*, 1999) verwendet. Abbildung 1B zeigt deutlich, dass die entsprechende Verunreinigung auf diese Art vermieden werden konnte. Allerdings trat auch bei Verwendung dieses Stammes das Problem der verstärkten Zelllyse nach fortgeschrittener Induktionszeit auf. Die Ausbeute nach 2,5- stündiger Induktion betrug 125 µg AGP pro Liter Kultur.

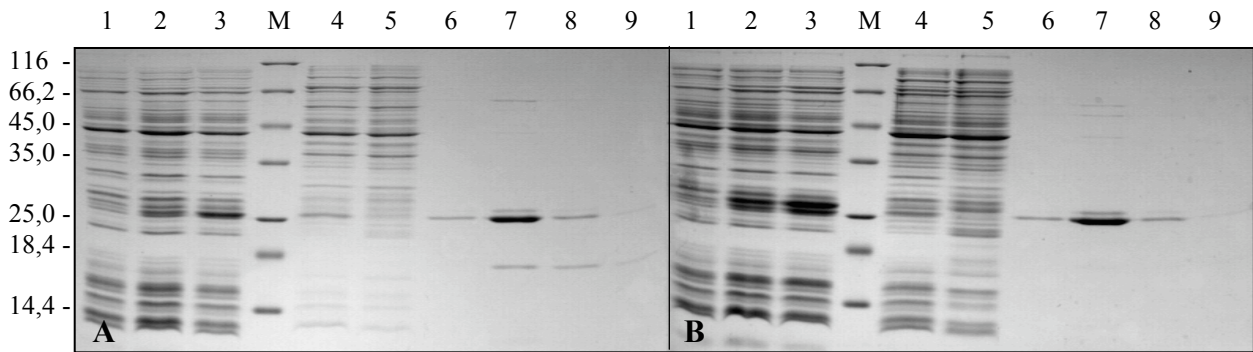


Abbildung 1: Expression und Reinigung von AGP in *E. coli* JM83 (A) und MC4100Δskp (B). Reduzierende 15 % SDS-PAGE von entsprechenden Proben. Spuren 1-3: Gesamtzellaufschlüsse nach 1, 2 und 2,5 h Induktion; Spur 4: periplasmatische Fraktion nach 2,5 h Induktion; Spur 5: Durchlauf der Streptavidinsäule; Spuren 6-9: Elutionsfraktionen; M: Proteinmarker, Größen in kDa.

Durch den Einsatz des „Helferplasmids“ pTUM3 konnte die Lyse der Zellen minimiert und damit die Proteinausbeute deutlich gesteigert werden. Später wurde das verbesserte Plasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) verwendet, welches vergleichbare Ergebnisse lieferte. pTUM4 trägt den p15a Replikationsursprung und ein Chloramphenicol-Resistenzgen und ist daher mit den verwendeten Expressionsvektoren, die Ampicillinresistenz vermitteln, kompatibel. Dieses „Helferplasmid“ codiert für vier periplasmatische Faltungshelfer-Proteine aus *E. coli*, jeweils unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Dazu gehören die beiden Thiol Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC, welche die Isomerisierung und somit die korrekte Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma ermöglichen, und die beiden Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerasen FkpA und SurA.

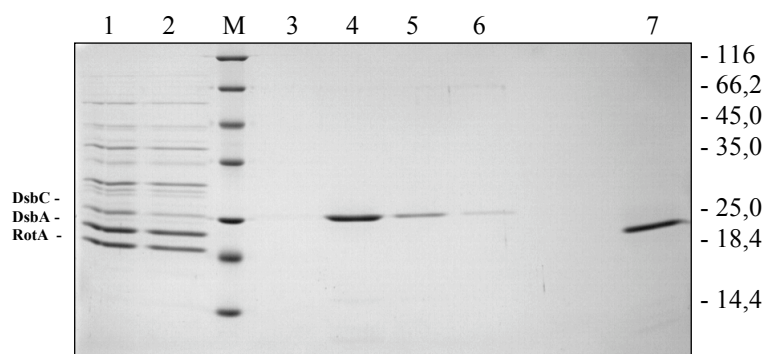


Abbildung 2: Expression und Reinigung von AGP in *E. coli* MC4100Δskp unter Verwendung von pTUM3. Reduzierende 15 % SDS-PAGE von entsprechenden Proben. pTUM3 führt zur Expression der drei Faltungshelfer DsbA, DsbC und RotA (siehe Spuren 1 & 2). Spur 1: periplasmatische Fraktion nach 2,5 h Induktion; Spur 2: Durchlauf der Streptavidinsäule; Spuren 3-6: Elutionsfraktionen unter reduzierenden Bedingungen; Spur 7: Fraktion 2 unter nicht reduzierenden Bedingungen; M: Proteinmarker, Größen in kDa.

Zellen des *E. coli* Stammes MC4100 Δ skp wurden mit den Plasmiden pAGP-1 und pTUM4 cotransformiert und die Proteinproduktion im 2 L-Schüttelkolben bei 22 °C für 2,5 Stunden durchgeführt. Nach Präparation des periplasmatischen Extrakts wurde das rekombinante Protein mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Abbildung 2 zeigt saubere Fraktionen des rekombinanten AGP (Spuren 4-6) mit einem Molekulargewicht von 22,7 kDa. Die einzelne Proteinbande unter nicht reduzierenden Bedingungen in Spur 7 zeigt mit ihrem beschleunigten Laufverhalten die richtige Verknüpfung der beiden Disulfidbindungen im AGP.

Die optische Dichte der Kultur betrug 1,5 bei Ernte, und die Zellen zeigten keinerlei Lyse. Der Einsatz von pTUM3 verbesserte also die Zellstabilität und deren Wachstum. Eine Erhöhung der Proteinausbeute konnte leider nicht erreicht werden, allerdings erhöhte sich die Ausbeute beim späteren Einsatz von pTUM4 auf etwa 220 µg AGP pro Liter Kultur, was in etwa einer Verdopplung entspricht (120 µg AGP pro Liter Kultur für pTUM3).

3.1.1.3 Produktion von AGP im 8 L Laborfermenter

Um größere Mengen an rekombinanten AGP zu gewinnen, wurde ein Fed-Batch Fermentationsverfahren mit einem Glucose-Minimalmedium verwendet. Dieses war bereits erfolgreich zur funktionellen Produktion von Antikörperfragmenten eingesetzt worden (Schiweck & Skerra, 1995). Nach der Transformation von *E. coli* MC4100 Δ skp mit den Plasmiden pAGP1 und pTUM3 wurden diese in 200 mL Fermentationsmedium bei 30 °C mit den Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol kultiviert und das Wachstum protokolliert. Der verwendete Stamm zeigte unter den gegebenen Bedingungen ausreichend schnelles Wachstum und erreichte nach etwa 22 Stunden die stationäre Phase.

Die Fermentation erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit 8 L Nutzvolumen und einsetzbarem Rührwerk mit Umwurfzylinder (siehe Abschnitt 2.3.1.2). Durch die integrierte Meß- und Regeltechnik wurde während des Fermentationsverlaufs die Temperatur bei 25 °C, der pH-Wert bei 6,9 und der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei mindestens 30 % Luftsättigung konstant gehalten. Als Medium wurde ein Mineralsalz-Medium mit 20 % Glucose, essentiellen Spurenelementen und den Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol verwendet. Dabei war Glucose die einzige Kohlenstoffquelle, während die zur Regelung des pH-Wertes zugesetzte 12,5 %ige (w/v) Ammoniaklösung gleichzeitig als Stickstoffquelle diente. Die Zellen zeigten reproduzierbares exponentielles Wachstum und hatten nach ca. 20 Stunden eine optische Dichte (OD_{550}) von 20 erreicht. Nun erfolgte die Induktion mit 0,5 mg/L aTc. Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen typischerweise bei $OD_{550} = 32$ geerntet und die

periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Reinigung erfolgte mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie. Das Profil der Gelfiltration (Abbildung 3) zeigte einen prominenten Peak für das AGP mit einem Elutionsvolumen von 70,6 mL entsprechend der erwarteten Größe für das Monomer. Die Ausbeute an gereinigtem Protein aus einer Fermentation im 8 L-Maßstab betrug etwa 16 mg.

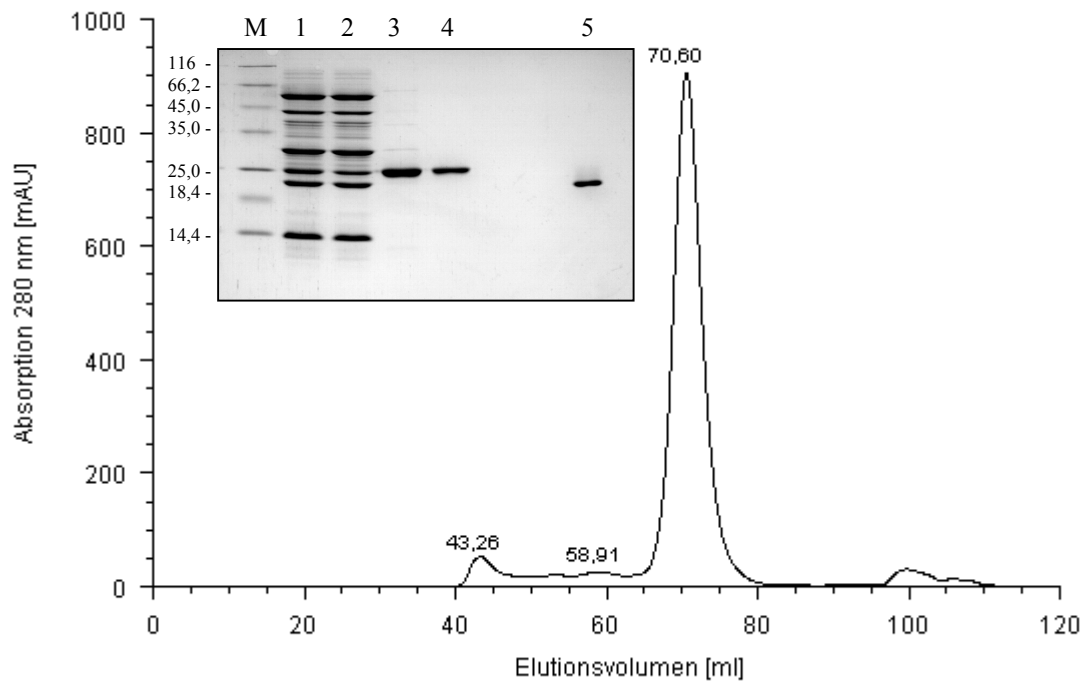


Abbildung 3: Reinigung von AGP aus der Fermentation. Größenausschlusschromatographie von AGP (Superdex 75 HiLoad 16/60) mit 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl als Laufpuffer und Analyse durch reduzierende 15 % SDS-PAGE; M: Proteinmarker, Größen in kDa; Spur 1: Periplasmaextrakt; Spur 2: Durchlauf der Streptavidinsäule; Spur 3: Elutionsfraktion nach SA-Chromatographie; Spur 4: Elutionsfraktion nach Größenausschlusschromatographie; Spur 5: Elutionsfraktion nach Größenausschlusschromatographie unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Das gereinigte rekombinante Protein wurde vor den folgenden Kristallisationsversuchen und Bindungsstudien mithilfe der Massenspektrometrie untersucht (siehe Abschnitt 2.5.4). Das erhaltene Massenspektrum (Abbildung 4) zeigte einen Hauptpeak mit einer korrespondierenden Masse von 22668 Da, die innerhalb von drei Einheiten mit der berechneten Masse von AGP (22671 Da) übereinstimmte.

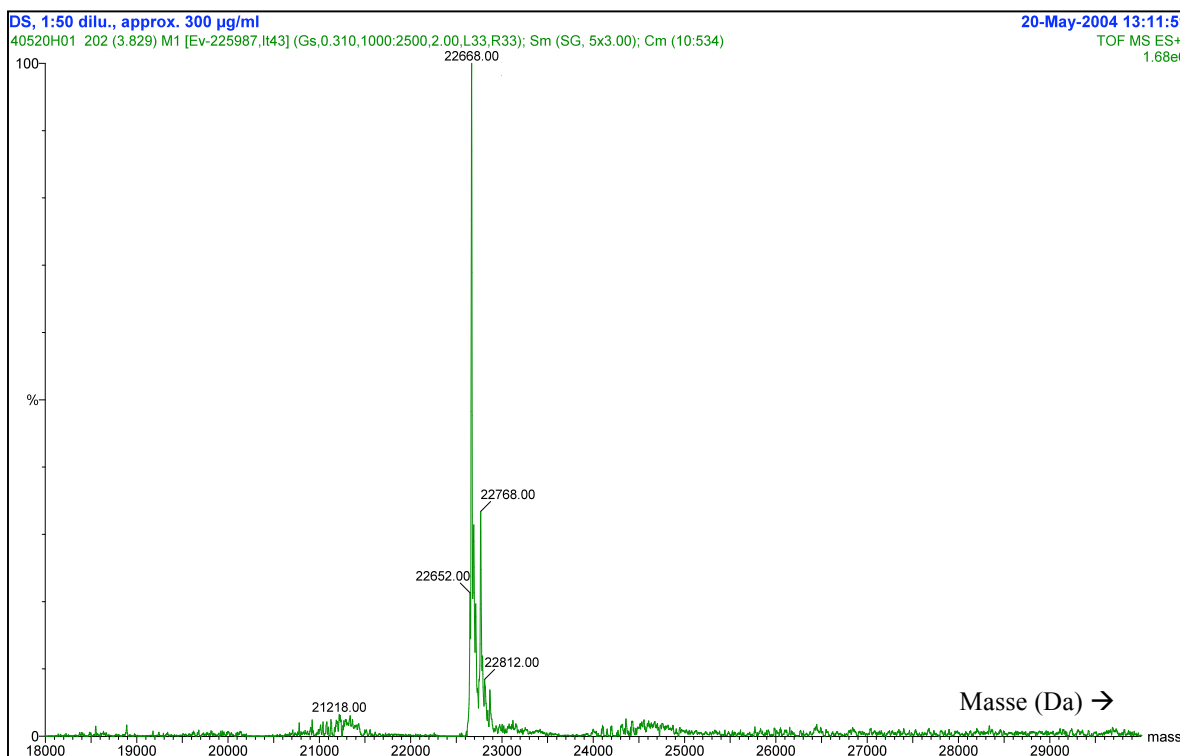


Abbildung 4: ESI-Q-TOF-Massenspektrum des gereinigten rekombinanten AGP. Die Konzentration der verdünnten Proteinprobe betrug ~ 300 µg/mL in Tris/HCl pH 7,5.

3.1.2 Kristallisation von AGP

Mit dem gereinigten und aufkonzentrierten AGP (16,4 mg/mL in 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl) wurden Kristallisationsversuche unter 192 unterschiedlichen Bedingungen am hängenden Tropfen durch Dampfdiffusion unternommen (siehe Abschnitt 2.6.1). Es wurde je 1 µL der Proteinlösung mit 1 µL der Reservoir-Lösung gemischt. Nach fünf Tagen wurden Kristalle (Abbildung 5) bei 20 °C unter folgenden Bedingungen erhalten:

- 2 M Na/K-Phosphat pH 6,9; 0,1 M Imidazol/HCl pH 8,0; 0,2 M NaCl
- 2 M Na/K-Phosphat pH 6,9; 0,1 M Natrium-Acetat pH 4,5
- 2 M Na/K-Phosphat pH 6,9; 0,1 M Na-Phosphat/Citrat pH 4,7

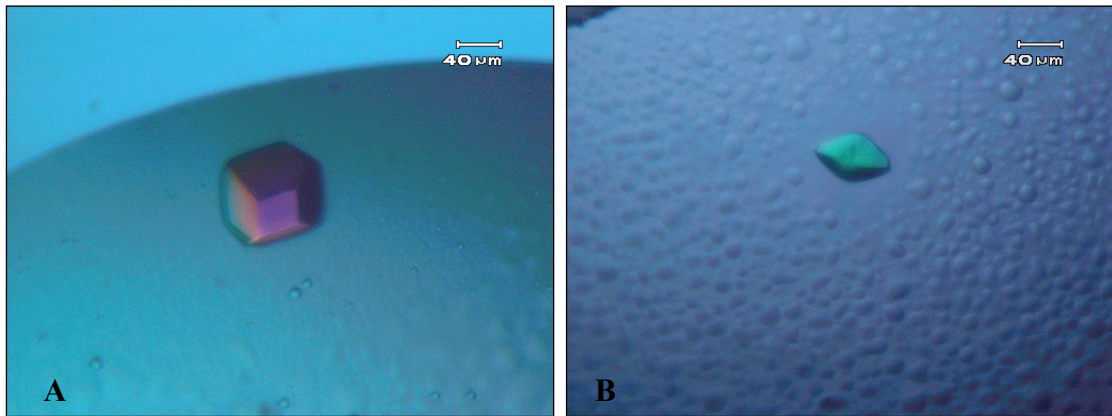


Abbildung 5: Initiale Kristalle des humanen AGP im hängenden Tropfen bei 20 °C. Kristallisationsbedingungen: [A] 2M Na/K-Phosphat pH 6,9; 0,1 M Imidazol/HCl pH 8,0; 0,2 M NaCl. [B] 2M Na/K-Phosphat pH 6,9; 0,1 M Na-Phosphat/Citrat pH 4,7

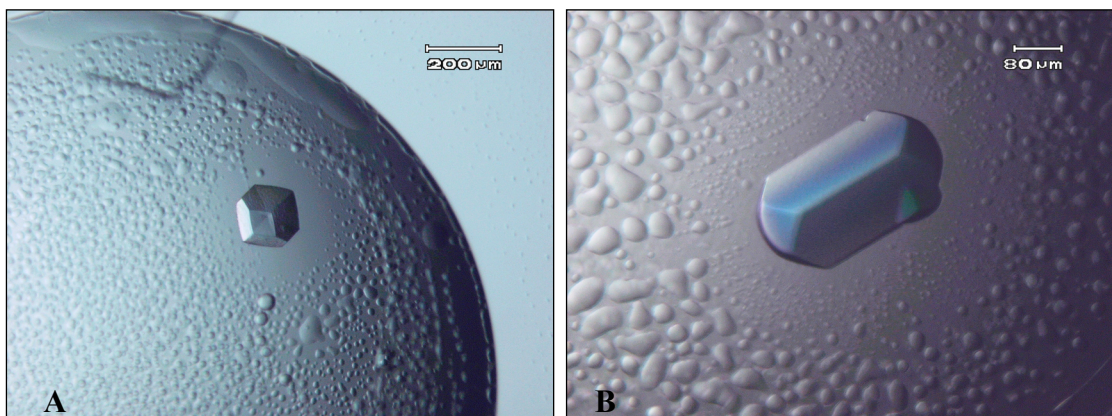


Abbildung 6: Optimierte Kristalle des humanen AGP im hängenden Tropfen bei 20 °C. Kristallisationsbedingungen: [A] 2,1 M Na/K-Phosphat pH 6,8; [B] 1,9 M Na/K-Phosphat pH 6,4

Die aufgefundenen Bedingungen wurden anschließend hinsichtlich Größe und Streufähigkeit der Kristalle optimiert. Angesichts der dominanten Pufferwirkung des hoch konzentrierten Fällungsmittels Phosphat wurde entschieden, die zusätzlichen Pufferkomponenten (Imidazol, Acetat, Phosphat/Citrat) nicht weiter zu benutzen. So wurden nach Optimierung des pH-Werts im Bereich von pH 6,4 - 6,9 und Na/K-Phosphat-Konzentrationen von 1,9 - 2,2 M sowie einer Änderung des Tropfenverhältnisses (1,5 µL Protein zu 1 µL Reservoirlösung) bei 20 °C größere streufähige Einzelkristalle mit typischen Größen von 200 x 100 x 100 µm³ erhalten (Abbildung 6). Versuche der weiteren Kristalloptimierung unter Einsatz von Additiven (Cudney *et al.*, 1994) waren nicht erfolgreich.

3.1.3 Sammlung von Röntgen-Beugungsdatensätzen

Zunächst war eine optimale Frierbedingung für die vorliegenden AGP-Kristalle zu ermitteln. Durch Zugabe eines Anteils von 25 % v/v Glycerin zur entsprechenden Reservoirlösung konnte die Bildung von Eis vermieden werden. Kristalle wurden direkt mithilfe einer Nylonschleife aus dem Tropfen geholt, durch die vorbereitete Frierlösung gezogen und bei 100 K eingefroren (Abschnitt 2.6.2). Eine signifikante Erhöhung der Streufähigkeit der Kristalle konnte durch den Zusatz von 0,5 M NaCl (Endkonzentration) zur Frierlösung erreicht werden. Kristalle wurden hierzu für etwa eine Minute im Tropfen mit der Frierlösung belassen bevor sie eingefroren wurden.

3.1.3.1 Datensatz an der Drehanode

Mithilfe des Drehanodengenerators RU-300 am Lehrstuhl für Biologische Chemie konnte ein kompletter (99,1 %) Datensatz bei 100 K mit einer Auflösung bis 3,1 Å gesammelt werden (Bezeichnung AGP63). Es wurden 120 Bilder mit 1° Drehung pro Bild aufgenommen.

3.1.3.2 Datensätze am Synchrotron

An der Messstation ID14.4 des ESRF in Grenoble, Frankreich konnte ein kompletter (98,0 %) Datensatz bei 100 K mit einer höheren Auflösung bis 2,5 Å gesammelt werden (Bezeichnung AGP24). Es wurden 180 Bilder mit 1° Drehung pro Bild aufgenommen.

Hochauflösende Daten (bis 1,8 Å mit 97,7 % Vollständigkeit) wurden an der Messstation ID23 des ESRF erhalten (Bezeichnung AGP193 = AGP_{native}). Der benutzte Protein-Kristall wurde, wie oben beschrieben, unter erhöhter Salzkonzentration (0,5 M NaCl) eingefroren. Es wurden 180 Bilder mit 1° Drehung pro Bild aufgenommen.

Um zu versuchen, die Phaseninformation mittels Schwefel-SAD (*Single Wavelength Anomalous Dispersion*, Ramagopal *et al.*, 2003) zu ermitteln, wurde an der Messstation 14.1 des BESSY bei niedriger Strahlungsintensität ein kompletter (99,2 %) Datensatz bis 2,6 Å Auflösung mit hoher Redundanz (24,9) der gemessenen Reflexe gesammelt (Bezeichnung AGP_BZA2_SAD). Hierzu wurden 360 Bilder mit 1° pro Bild aufgenommen.

Zur Verwendung spezifischer UV-induzierter Strahlenschäden für die Phasierung (UV-RIP; Nanao & Ravelli, 2006; Abschnitt 3.1.5) wurden zwei komplette Datensätze an der Messstation 14.1 des BESSY aufgenommen (Bezeichnung AGP_{before}, AGP_{after}). Die Messung wurde dabei durch eine fünfminütige Bestrahlung des Kristalls mit einem UV-Laser unterbrochen. Es wurden jeweils 90 Bilder mit 1° pro Bild und einer Vollständigkeit von 99,2 bzw. 99,6 % gesammelt.

3.1.4 Phasierungsversuche

3.1.4.1 Phasierungsversuche durch molekularen Ersatz

Die Methode des molekularen Ersatzes (auch Faltmolekülmethode genannt) (Huber 1965; McCoy *et al.*, 2005) basiert auf einer bekannten Kristallstruktur mit hinreichender Ähnlichkeit zum gesuchten Modell. Die bekannte Kristallstruktur muß durch Rotation und Translation hinsichtlich der gemessenen Beugungsdaten in der Gitterzelle korrekt positioniert werden, um zu initialen Phasen zu gelangen. Hierzu wird die Pattersonfunktion (5) verwendet, welche die getrennte Variation von Rotations- und Translationsfreiheitsgraden zur Positionierung des Modells ermöglicht:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\bar{F}_{hkl}|^2 \cdot \cos(2\pi \cdot (hx + ky + lz)) \quad (5)$$

Die Maxima dieser Funktion entsprechen jedoch nicht den Atompositionen, sondern stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Für die Rotation werden aus dem Suchmodell die Strukturaktoren (F_{calc}) und daraus wiederum die Pattersonfunktion berechnet. Diese wird sodann mit der Pattersonfunktion des gemessenen Datensatzes verglichen und auf Übereinstimmung mithilfe des Korrelationskoeffizienten überprüft. Dabei entscheidet die maximale Überlappung der intramolekularen Differenzvektoren (hauptsächlich Pattersonvektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße) über die korrekte Orientierung (Rotationslösung) des Modells. Für die anschließende Translation wird eine Übereinstimmung sowohl anhand des Korrelationskoeffizienten als auch des kristallographischen R-Faktors (Abschnitt 2.6.5) untersucht (Translationslösung).

Sekundärstrukturvorhersagen aus der Aminosäuresequenz des humanen AGP (Pervaiz & Brew, 1987) ergaben klare Hinweise auf die Zugehörigkeit zur Lipocalinfamilie. Daher wurde eine Lösung des Phasenproblems zunächst durch molekularen Ersatz mit schon bekannten Lipocalinstrukturen versucht. Als Suchmodelle wurden folgende Lipocalinstrukturen aus der PDB-Datenbank ausgewählt:

PDB	Name (Organismus)	PDB	Name (Organismus)
1a3y	Odorant binding protein (Schwein)	1lf7	Complement protein C8γ (Mensch)
1bbp	Bilin binding protein (Schmetterling)	1mup	Major Urinary protein (Maus)
1beb	β-lactoglobulin (Rind)	1rbp	Retinol binding protein (Mensch)
1bj7	Lipocalin Allergen Bos D 2 (Rind)	1xki	Tear lipocalin (Mensch)
1dfv	Neutrophil gelatinase associated lipocalin (Mensch)	2hzz	Apolipoprotein D (Mensch)
1epa	Epididymal Retinoic Acid-binding Protein (Ratte)		

Tabelle 3: Für den molekularen Ersatz verwendete Lipocalin-Suchmodelle

Da bei Verwendung des molekularen Ersatzes eine größtmögliche strukturelle Ähnlichkeit zwischen Modell und Zielstruktur vorliegen muß, erweisen sich flexible Bereiche einer Proteinstruktur, insbesondere Schleifen-Strukturen, als nicht vorteilhaft. Die Lipocalinstruktur besitzt mehrere dieser flexiblen Schleifen-Strukturen, welche die β -Faltblattstränge vor allem im Bereich der Bindungstasche verbinden. Dementsprechend wurden die vier oberen dieser sogenannten *Loops* entfernt und zusätzlich alle Aminosäurereste vollständig durch Alanin substituiert, um die Flexibilität der Seitenketten zu unterdrücken. Zusätzlich wurden alle Suchmodelle auch unbearbeitet verwendet. Die Phasierungsversuche von AGP durch molekularen Ersatz wurden zunächst mit dem niedrig aufgelösten Datensatz *AGP63*, später dann mit den besser aufgelösten Datensätzen *AGP24* und *AGP193* durchgeführt.

Signifikante Lösungen konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Einige wenige, auffällige Lösungen wurden einer Verfeinerung unterworfen. Dabei konnten allerdings keine kristallographischen R-Faktoren von besser als 50 % beobachtet werden, was auf mangelnde Signifikanz der erhaltenen Lösung hindeutete.

3.1.4.2 Phasierungsversuche durch Multiple Anomalous Dispersion (MAD)

Eine weitere Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems bietet das Phänomen der anomalen Streuung. Normalerweise werden die Elektronen, an denen die Streuung des Röntgenstrahls erfolgt, näherungsweise als freie Elektronen beschrieben (elastische Streuung). In der Nähe der Absorptionskante eines Elementes (*Peak*) gilt dieses aber nicht mehr, da nun auch innere Elektronen betroffen sind. Bei der Bestimmung von Proteinphasen durch Multiple Anomale Dispersion (*Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*, MAD) wird die Eigenschaft von Schweratomen als anomale Streuzentren in Proteinkristallen ausgenutzt. Bei Verwendung von Synchrotronstrahlung entsprechender Wellenlänge kommt es zu einer Phasenverschiebung (anomale Streuung oder Dispersion), die sich von der Phasenverschiebung der elastischen Streuung unterscheidet. Bei dieser Methode wird sowohl die dispersive Differenz des Atomformfaktors, die analog zur isomorphen Differenz eine Änderung des realen Streubeitrages darstellt, als auch die anomale Differenz, die durch die Phasenverschiebung entsteht, zur Ermittlung der Phaseninformation ausgenutzt. Diese beiden Differenzen werden durch Messung bei verschiedenen Wellenlängen optimiert.

Der atomare Streufaktor eines anomal streuenden Atoms f_{anom} lässt sich als Summe der von der Wellenlänge unabhängigen Anteile (f_0) und der abhängigen Anteile $f(\lambda)$ darstellen:

$$f_{\text{anom}} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + i \cdot f''(\lambda) \quad (6)$$

Der von der Wellenlänge abhängige Anteil führt aufgrund von Absorptionseffekten sowohl zu einer Verringerung der Streukraft $f'(\lambda)$, als auch zur Phasenverschiebung $i \cdot f''(\lambda)$. Die dispersive Differenz beruht auf den unterschiedlichen Werten von $f'(\lambda)$. Die anomale Differenz hebt in Abhängigkeit von der Größe $i \cdot f''(\lambda)$ die Friedel-Symmetrie innerhalb eines Datensatzes auf. Beide Differenzen sind proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratom-Modells und da beide Terme voneinander unabhängig sind, kann man mit ihnen auch das Phasenproblem eindeutig lösen. Praktisch werden drei Datensätze eines Kristalls bei unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. Einer bei maximalem f'' (*Peak*), einer bei minimalem f' und, um die dispersiven Differenzen zu maximieren, der dritte bei einer weit von der Absorptionskante des entsprechenden Schweratoms entfernten Wellenlänge (*Remote Point*), bei der f' nahe Null ist. Aus den Amplitudendifferenzen (Bijovet-Differenzen) der gemessenen Reflexe kann eine Patterson-Synthese errechnet werden, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen lässt.

Zur Einführung eines Schweratoms in AGP wurde vorerst die Methode der Substitution von Methionin mit Selenomethionin (Hendrickson *et al.*, 1988; Budisa *et al.*, 1995) gewählt. AGP trägt an Aminosäureposition 111 ein Methionin, dessen Schwefelatom unter Verwendung des *E. coli*-Stammes B834(DE3) und Zugabe von L-Selenomethionin wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben durch Selen ersetzt werden konnte. Der erfolgreiche Einbau wurde mittels Massenspektrometrie des gereinigten Proteins bestätigt. Die Gesamtausbeute betrug dabei allerdings nur 785 µg gereinigtes Protein aus 6 x 2 L Schüttelkultur. Das Protein wurde auf 15,7 mg/mL konzentriert (50 µL Gesamtvolumen) und Kristallisationsversuche am hängenden Tropfen durch Mischung von 1,5 µL Proteinlösung und 1 µL Reservoirlösung bei 20 °C durchgeführt. Dabei wurden die unter Abschnitt 3.1.2 beschriebenen optimierten Kristallisationsbedingungen leicht variiert. Auch nach einer Wartezeit von mehreren Monaten konnten in keiner Bedingung Kristalle beobachtet werden.

Die niedrige Ausbeute des mit Selenomethionin substituierten rekombinanten AGP machte die Suche nach einer komplett neuen Kristallisationsbedingung annähernd unmöglich. Daher wurde versucht, die vorhandenen nativen Kristalle durch Zugabe unterschiedlicher

Schwermetalllösungen zu derivatisieren (*Soaking*). Schwermetalle – wie zum Beispiel Quecksilber – sind in der Lage, sich isomorph im Gitter eines Proteinkristalls anzulagern. Dies geschieht bevorzugt durch koordinative Wechselwirkungen mit schwefelhaltigen Seitenketten. Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Schwermetall-Verbindungen:

$\text{KAu}(\text{CN})_2$	HgCl_2	Thimerosal (Hg)	$(\text{NH}_4)_2\text{OsBr}_6$	$(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_4$	$\text{K}_2\text{Pt}(\text{SCN})_6$	TiCl_3
AuCl_3	K_2HgI_4	K_2IrCl_6	$\text{Pb}(\text{oAc})_2$	K_2PtCl_6	PIP (Hg)	Na_2WO_4
KAuBr_4	$\text{Hg}(\text{oAc})_2$	K_2OsCl_6	K_2PtCl_4	PtCl_2 ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)	K_2ReCl_6	$(\text{NH}_4)_2\text{WS}_4$
CdCl_2	Mersalyl säure (Hg)	OsCl_3	$\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$	$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{NO}_2)_2$	KReO_4	NaBr

Tabelle 4: Überblick über verwendete Verbindungen zur Derivatisierung von AGP-Kristallen. Schwermetallatome sind hervorgehoben. Je 0,2 μL einer 50 mM Lösung in Mutterlauge (2,05 M Na/K-Phosphat, pH 6,8) wurden den Kristallisationstropfen (2 μL) zugesetzt. Kristalle wurden nach unterschiedlichen Zeiten (4 h, 24 h, 7 Tage, 1 Monat) eingefroren und am Drehanodengenerator auf Streufähigkeit und Datenqualität untersucht.

Streufähige Kristalle wurden am Synchrotron mit Röntgenstrahlung an der jeweiligen Absorptionskante des Schweratoms vermessen und die Daten mithilfe des Programms SHELXC (Sheldrick *et al.*, 1993) auf anomale Signale überprüft. Dabei wurde der Kristall mit der längsten Derivatisierungsdauer jeweils zuerst verwendet. Im Allgemeinen waren die ermittelten anomalen Signale dabei stets nur schwach ausgeprägt und sehr nahe am Hintergrundrauschen der gemessenen Intensitäten. Nur bei den drei Verbindungen Thimerosal, OsCl_3 und $\text{Hg}(\text{oAc})_2$ wurden Datensätze bei drei unterschiedlichen Wellenlängen gesammelt. Nach Integration und anomaler Skalierung der Daten wurde versucht, die Schweratomlagen mit den Programmen SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) und SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997) zu bestimmen. Alle mit diesen Programmen erhaltenen Lösungen lieferten jedoch keine klaren Schweratompositionen.

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung eines Schweratoms in das Kristallgitter bietet die Behandlung (*Soaking*) des nativen Kristalls mit einem bekannten Liganden des Proteins, welcher ein oder mehrere schwere Atome enthält. Dieser ist in der Lage, durch die Wasserkanäle des Kristalls einzudiffundieren und sich spezifisch an eine Bindungsstelle anzulagern. Hierzu ist allerdings essentiell, dass der Zugang nicht durch die Kristallpackung versperrt ist. Im Falle des AGP wurde der Ligand Bromazepam (7-Brom-5-(2-pyridyl)-3H-1,4-benzodiazepin-2(1H)-on; Abbildung 7) gewählt, welcher mit einer Dissoziationskonstante von 50 μM (Maruyama *et al.*, 1992) an das Protein bindet. Bromazepam, gehörig zur

Stoffklasse der Diazepine, einer Gruppe von starken Beruhigungsmitteln, enthält ein Brom-Atom. Um die Assoziation der Substanz an das rekombinant hergestellte AGP zu bestätigen, wurde zunächst eine Protein-Fluoreszenz Titration wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde mit einer gemessenen K_D von $49,96 \mu\text{M}$ die publizierte Dissoziationskonstante praktisch reproduziert (Abbildung 7).

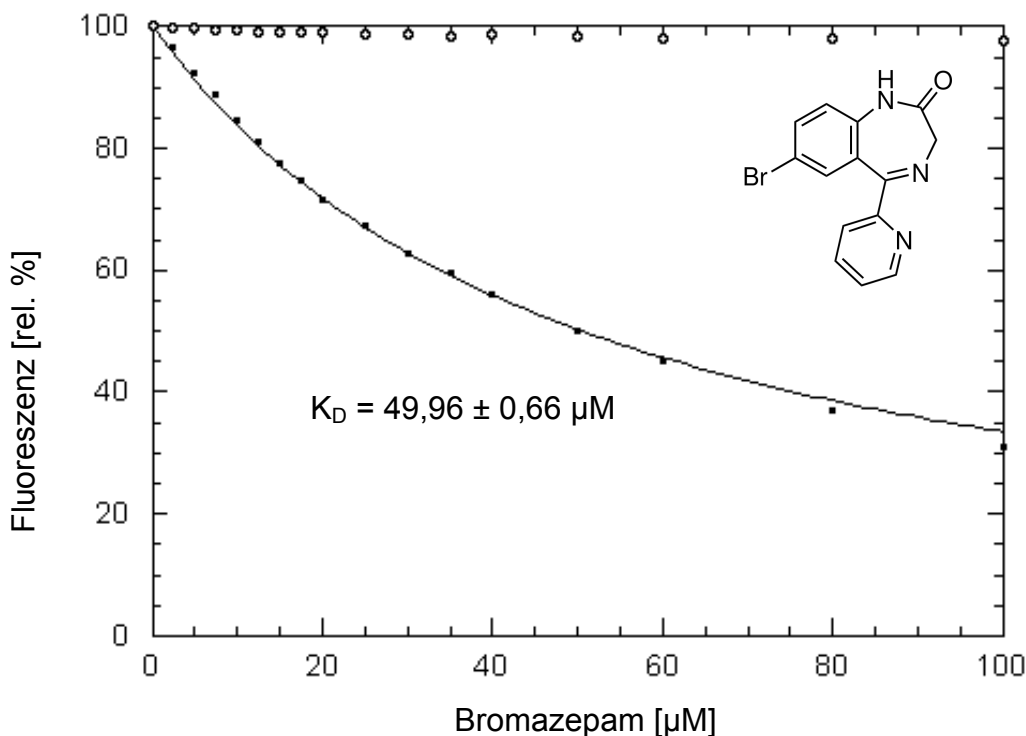


Abbildung 7: Protein-Fluoreszenztitration von AGP mit Bromazepam. Eine $1 \mu\text{M}$ Proteinlösung wurde mit 5 mM Bromazepam in Ethanol bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ titriert. Die Proteinfluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und bei 340 nm detektiert. [●] Fluoreszenzabnahme bei Zugabe von Bromazepam. [○] Kontrolltitration von AGP mit dem Lösungsmittel Ethanol ohne Ligand.

Native Kristalle des AGP wurden durch Zugabe des in DMF gelösten Bromazepam ($250 \mu\text{M}$ Endkonzentration im Kristallisationstropfen) für bis zu vier Wochen behandelt und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Messungen der Absorption von Röntgenstrahlung im gesamten Wellenlängenspektrum mit den behandelten Kristallen am Synchrotron zeigten keine für Brom spezifische Absorptionskante. Somit war eine definierte Bindung des Liganden an das Protein im Kristall auszuschließen und es wurden keine Beugungsdaten gesammelt.

3.1.4.3 Phasierungsversuche durch Single Anomalous Dispersion (SAD)

Die Methode des SAD (*Single Wavelength Anomalous Dispersion*) liefert eine gute Möglichkeit, das Problem der Strahlenschädigung eines Kristalls bei Messung mehrerer Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen – wie im Fall der Phasierung durch MAD notwendig – zu minimieren. Mithilfe dieser Methode lassen sich größere, für biologische Makromoleküle typische Atome (P, S, Cl) zur Phasierung verwenden. Häufig wird dabei Schwefel benutzt (S-SAD; Ramagopal *et al.*, 2003). Da aber die Absorptionskante des Schwefels bei etwa 5 Å liegt, ist eine Messung von Diffraktionsdaten aufgrund der hohen Absorption der Röntgenstrahlung bei dieser Wellenlänge durch die Luft stark eingeschränkt. In der Praxis werden daher Wellenlängen um die 2 Å gewählt und ein möglichst qualitativ hochwertiger Datensatz bei geringer Intensität und größtmöglicher Redundanz aufgenommen. Da bei der verwendeten Wellenlänge das anomale Signal unter 1 % beträgt, sollte das zu vermessende Protein möglichst viele Schwefelatome aufweisen und es ist auf größtmögliche Datenqualität und die Vermeidung von Strahlenschäden im Verlauf der Messung zu achten.

Für AGP wurde ein kompletter 2,6 Å Datensatz (AGP_BZA2_SAD) mit 360 Bildern mit Schritten von 1° bei einer Wellenlänge von 1,8 Å aufgenommen. Nach Integration und Skalierung mithilfe des Programms SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) wurde versucht, die Lage der Schwefelatome zu bestimmen. Hierzu wurden dem Programm deren erwartete Anzahl sowie die Anwesenheit von zwei Disulfidbrücken vorgegeben. Klare Signale über dem Rauschen mit einem klaren Abfall der Besetzungszahl der Schwefelpositionen nach fünf Atomen (AGP enthält fünf Schwefelatome) waren mit dieser Methode nicht zu erhalten. Dazu ist zu bemerken, dass die Anzahl von nur fünf Schwefelatomen im Molekül sehr gering ist und damit das schon extrem abgeschwächte Signal höchstwahrscheinlich im Rauschen der Daten untergeht.

Neben der weiter oben beschriebenen Derivatisierung von nativen Proteinkristallen unter Verwendung von Schwermetallatomen lassen sich auch die beiden schweren Edelgase Xenon und Krypton verwenden (Sauer *et al.*, 1997). Unter Druck der entsprechenden Edelgasatmosphäre (50 bar) werden diese meist in unpolare Kavitäten des Proteins eingelagert. Bei Erhalt des Kristallgitters ist in diesem Fall eine Phasierung mittels SAD möglich. Unter Annahme der Lipocalinfaltung für das AGP ist die Möglichkeit einer Bindung innerhalb der β -Fass-Struktur im Prinzip gegeben. Zwei native AGP-Kristalle wurden jeweils für zwei bzw. zehn Minuten unter 40 bar Xenon-Druck gehalten und danach in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden komplette Datensätze bis 2,5 Å aufgenommen und mit dem Programm SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) versucht, die Xenon-Positionen zu finden. Auch

hier hob sich das anomale Signal nur minimal vom Hintergrundrauschen ab. Xenon-Positionen ließen sich mit den gesammelten Daten nicht ermitteln. Daraus lässt sich schließen, dass es zu keiner Einlagerung eines Xenon-Atoms im Kristall kam.

3.1.5 Phasierung mit UV-RIP

Angeichts des mangelnden Erfolgs der bisherigen Phasenbestimmungsversuche wurde eine Ermittlung der Phasen mittels induzierter Strahlenschäden (RIP; Ravelli *et al.*, 2003) versucht. Bei dieser Methode werden die durch den Bruch labiler chemischer Bindungen und gegebenenfalls Oxidation auftretenden Unterschiede der Strukturfaktoren verwendet. Allerdings erfolgen durch die hohe Intensität des Röntgenstrahls viele kleinere weitere Schädigungen des Kristalls und auch des umgebenden Lösungsmittels, welche das Auffinden spezifischer Veränderungen und die anschließende Phasierung erheblich erschweren. Zur Umgehung dieser Probleme wurde die verbesserte Methode UV-RIP (Nanao & Ravelli, 2006) entwickelt. Schädigungen des Kristalls werden hierbei sehr spezifisch mithilfe eines UV-Lasers induziert. Durch die Wahl der Wellenlänge lassen sich selektiv die Disulfidbrücken spalten und die veränderten Schwefelpositionen zur Phasenbestimmung ausnutzen, was mit sechs Modellproteinen bereits gezeigt werden konnte (Nanao & Ravelli, 2006).

Nach der Aufnahme von zwei Datensätzen (Bezeichnung AGP_ANS1) vor und nach Bestrahlung eines AGP-Kristalls (siehe Abschnitt 3.1.3.2) wurde die Phasierung freundlicherweise von Dr. Raimond Ravelli (ESRF, Genoble) und Dr. Uwe Müller (BESSY, Berlin) durchgeführt. Die Datensätze wurden zunächst mit XDS und XSCALE (Kabsch, 1988) prozessiert und die unvereinigten (*unmerged*) Daten anschließend mittels SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002) einer Suche nach veränderten Positionen (*Damaged Sites*) mit 50 verschiedenen Skalierungs-Faktoren (K-Faktoren) von 0,97 - 1,01 unterzogen. Es konnten neun verschiedenen positive Differenzen für $K = 0,9940$ (mit $CC_{\text{best}} = 22,0\%$) gefunden werden. Zusätzlich ließen sich drei negative Differenzen ausmachen. Die Einbindung aller 12 resultierenden Differenzen mit anschließender iterativer Verfeinerung der Elektronendichte mit SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997) und SOLOMON (Bailey, 1994) lieferte eine interpretierbare initiale Elektronendichte (Abbildung 9). In diese ließen sich mit dem Programm ARP/wARP (Perrakis *et al.*, 2001) auf Anhieb 166 der 183 Aminosäurereste mit Valinseitenketten mit $R / R_{\text{free}} 24.6 / 34.4 \%$ einbauen. Die Phasierungsstatistiken sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die spätere Zuordnung der Differenzpositionen und deren Lage in der Kristallstruktur zeigte, dass alle vier Disulfid-Schwefelatome betroffen waren. Weitere

Differenzen umfassten die Carboxylgruppen der Aminosäuren E64, E140, D163 und die OH-Gruppen von T77 und S30 (Abbildung 8)

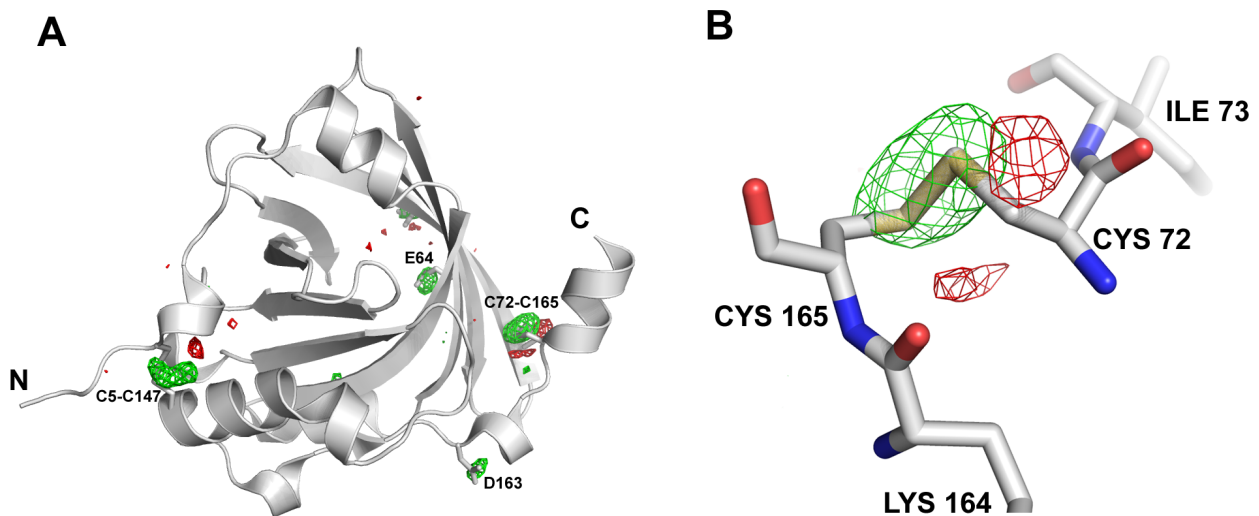


Abbildung 8: Positive und negative Differenz-Positionen (*Damaged Sites*) in der AGP-Struktur nach UV-RIP. [A] Blick von seitlich unten in die β -Fass-Struktur mit positiver Differenzdichte ($+4,5 \sigma$) in grün und negativer Differenzdichte ($-4,5 \sigma$) in rot. **[B]** Der Ausschnitt der terminalen Disulfidbindung (C72-C165) zeigt das Auftreten von zwei neuen positiven Positionen für beide Schwefelatome bei gleichzeitigem Verlust an korrespondierender Elektronendichte. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Uwe Müller, BESSY, Berlin).

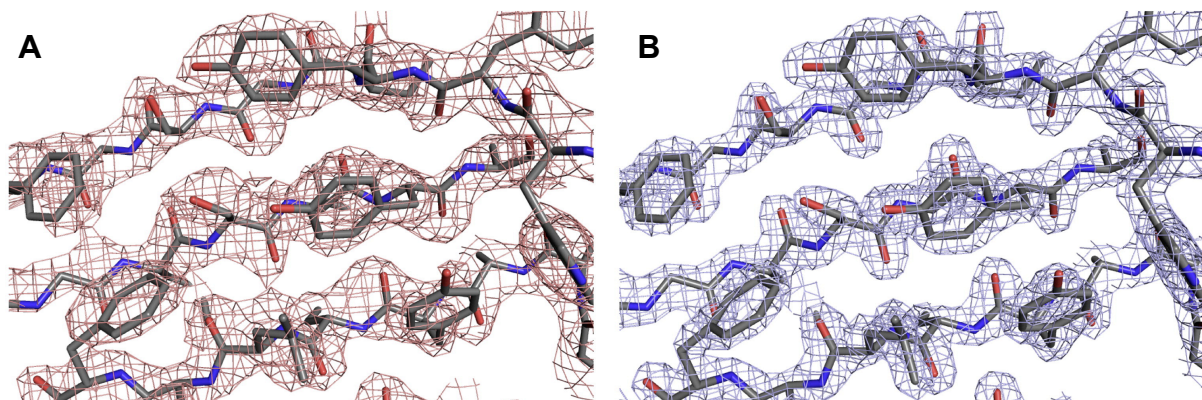


Abbildung 9: Initiale und finale Elektronendichte für AGP. [A] Initiale $2,1 \text{ \AA}$ Elektronendichte nach Verfeinerung mit SHARP und SOLOMON für die Stränge A,H,G bei $1,3 \sigma$ (Datensatz AGP_ANS1). **[B]** Finale $1,8 \text{ \AA}$ Elektronendichte des identischen Ausschnitts nach der Verfeinerung mit CNS bei 2σ (Datensatz AGP193) (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Uwe Müller, BESSY, Berlin).

FIND/DSUL	2/2
Resolution SHELXD (Å)	3.0
Expanded to (Å)	2.1
K-factor best CC	0.9940
CC _{best} (%) [#]	22.0
CC _{weak} (%) [#]	10.7
PATFOM [#]	13.2
Contrast*	0.75
Connectivity*	0.89
Pseudo-free CC (%) [*]	54.6
Number of positive sites [*]	9
Number of negative sites [*]	3
R _{cullis} (acen/cen) SHARP	0.8/0.79
Phasing Power (acen/cen) SHARP	0.84/0.75

Tabelle 5: UV-RIP Phasierungsstatistiken der Programme SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002), SHELXE (Sheldrick, 2002) und SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997) für AGP. [#] Beste SHELXD-Lösung aus 1000 Versuchen mit größtem CC_{best}. ^{*} Beste SHELXE-Lösung mit größtem pseudo-free CC.

3.1.6 Modellbau

Das initiale Strukturmodell des AGP, welches mit dem Programm ARP/WARP nach der erfolgreichen Phasierung erstellt worden war, enthielt zunächst für alle Aminosäurepositionen nur Valin-Reste. Nach Berechnung der korrespondierenden Elektronendichte bis 2,3 Å für den Datensatz AGP_ANS1 vor der UV-Bestrahlung (*AGP_before*) wurden zunächst die Seitenketten entsprechend der Sequenz korrigiert, soweit eine klare Orientierung ersichtlich war. Danach erfolgte eine erste Minimierung mit dem Programm CNS und anschließender gruppenweiser B-Faktorverfeinerung. In mehreren Verfeinerungszyklen (Abschnitt 2.6.5) wurden nach und nach alle Seitenketten eingebaut mit abschließender Hinzufügung von Wassermolekülen. Das finale Strukturmodell des humanen AGP mit einer Auflösung bis 2,3 Å enthielt die Aminosäuren 1-174 des Proteins und konnte bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 22,4 % (bzw. 25,7 % für den freien R-Faktor) verfeinert werden (Tabelle 6). Eine Analyse der Qualität des Strukturmodells mit dem Programm PROCHECK ergab, dass 89,3 % der Aminosäurereste in favorisierten Bereichen und 10,7 % in erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots lagen.

Anschließend wurde dieses Strukturmodell gegen den besser aufgelösten (1,8 Å) nativen Datensatz AGP 193 (*AGP_native*) verfeinert. Dazu wurden zunächst die Wassermoleküle entfernt und eine initiale Elektronendichte berechnet. Danach wurde das Modell schrittweise mit dem Programm CNS verfeinert mit abschließendem Einbau des Wassers und eines Tris-Moleküls. Das finale Strukturmodell bis 1,8 Å enthielt die Aminosäuren 1-172 des Proteins und wurde bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 21,7 % (bzw. 23,6 % für den freien R-Faktor) verfeinert (Tabelle 6). Dabei war für folgende Reste keine Elektronendichte für die Seitenkette zu beobachten: E35, E36, K39, E43, Q69, Q95, Thr107, K108, K120, E132, K135, E136, R149, K161 und K170. Sie wurden im finalen Modell nach dem C β -Atom abgeschnitten. Die Analyse mit dem Programm PROCHECK ergab eine Verbesserung mit 93,6 % der Aminosäurereste in favorisierten Bereichen und 6,4 % in den erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots. Dieser Koordinatensatz wurde in der Protein Data Bank (PDB) unter dem Code 3BX6 abgelegt.

Bei genauerer Betrachtung erwies sich die Zuordnung der Elektronendichte in der Bindungstasche des AGP zu einem Tris-Molekül als nicht optimal. Andere Komponenten aus der Fällungslösung waren ebenfalls nicht passend. Daraufhin wurde eine Reihe von physiologischen Verbindungen in Betracht gezogen, die dem in *E. coli* gentechnisch hergestellten Protein noch anhaften konnten. Die Wahl fiel schließlich auf Glycerinacetat, mit dem die Form der Elektronendichte am besten erklärt werden konnte. Mit diesem Liganden wurde eine erneute Verfeinerung mit dem Programm REFMAC (Bailey, 1994) durchgeführt. Dabei wurden auch einige Proteinseitenketten neu platziert, die zuvor in der Elektronendichte nicht klar genug zuzuordnen waren. Das finale Strukturmodell bis 1,8 Å (Abbildung 10) enthielt die Aminosäuren 1-175 des Proteins und wurde bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 20,2 % (bzw. 24,0 % für den freien R-Faktor) verfeinert (Tabelle 6). Die Analyse mit dem Programm PROCHECK ergab 98,8 % der Aminosäurereste in favorisierten Bereichen und 1,2 % in den zusätzlich erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots. Dieser Koordinatensatz wurde in der Protein Data Bank (PDB) unter dem Code 3KQ0 abgelegt.

	"AGP_before"	"AGP_after"	"AGP_native"	"AGP_final"
Datensammlung				
Messstation	BESSY 14.1	BESSY 14.1	ESRF ID23-1	ESRF ID23-1
Wellenlänge [Å]	0,9184	0,9184	1,0054	1,0054
Auflösung [Å]	21,7-2,1 (2,2-2,1)	21,7-2,1 (2,2-2,1)	20 – 1,80 (1,86 – 1,80)	20 – 1,80 (1,86 – 1,80)
Reflexe	125050	125496	259777	259777
Unabhängige Reflexe	18058	18067	26679	26679
Vollständigkeit [%]	99,2 (96,9)	99,6 (99,1)	97,7 (82,3)	97,7 (82,3)
Multiplizität	6,9 (5,4)	6,9 (5,6)	9,5 (6,9)	9,5 (6,9)
I / $\sigma(I)$	16,7 (2,9)	15,9 (2,4)	31,5 (3,0)	31,5 (3,0)
Rsym [%]	8,2 (63,3)	9,2 (75,8)	5,9 (40,6)	5,9 (40,6)
Mosaizität	0,40	0,40	0,40	0,40
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zell-Konstanten [Å]	a = b = 79,0 c = 94,3 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = b = 79,0 c = 94,3 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = b = 78,9 c = 93,4 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a = b = 78,9 c = 93,4 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Verfeinerung				
Auflösung [Å]	20 – 2,3		20 – 1,8	20 – 1,8
R / R _{free} [%]	22,4 / 25,7		21,7 / 23,6	20,4 / 24,0
Mittlere B-Faktoren [Å ²]:				
Protein	37,0		30,4	30,9
Lösungsmittel	39,1		39,0	36,9
Ligand	57,6		59,5	55,83
Rmsd-Abweichungen:				
Bindungslängen [Å]	0,006		0,015	0,027
Bindungswinkel [°]	1,224		1,390	2,076
Anzahl vorhandene Aminosäuren	183		183	183
Anzahl sichtbare Aminosäuren	174		172	174
Anzahl Ligand-Moleküle	1		1	1
Anzahl Lösungsmittel-Moleküle	78		137	143
Ramachandran Analyse				
Favorisiert [%]	89,3		93,6	98,8
Erlaubt [%]	10,7		6,4	1,2
Erweitert erlaubt [%]	-		-	-
Verboten [%]	-		-	-

Tabelle 6: Kristallographische Statistiken für AGP. Die Datensätze *AGP_before* und *AGP_after* (AGP_ANS1) entsprechen den Beugungsdaten vor und nach der UV-Bestrahlung des Kristalls. *AGP_native* und *AGP_final* (AGP_193) besitzen eine höhere Auflösung und wurden zur folgenden Analyse der Proteinkristallstruktur herangezogen. *AGP_final* beinhaltet zusätzlich den Liganden Glycerinacetat in der Bindungstasche. Daten in Klammern repräsentieren die höchstauflöste Schale.

3.1.7 Die Kristallstruktur des humanen $\alpha 1$ -Acid-Glycoprotein

3.1.7.1 Gesamtstruktur

Die vorliegende Kristallstruktur des AGP zeigt die typische Faltung eines Lipocalins mit einem β -Fass aus acht antiparallelen Strängen und einer α -Helix an der Rückseite (Abbildung 10). Dabei sind 174 der 183 Aminosäurereste anhand der Elektronendichte in der Struktur sichtbar. Wie in anderen Lipocalinen (Skerra, 2000) verbinden vier unterschiedlich lange Schleifen (*Loops*) die β -Stränge A/B (#1), C/D (#2), E/F (#3), und G/H (#4), welche den Eingang zur Ligandenbindungstasche an der geöffneten Seite des Fasses formen. Die acht β -Stränge umfassen dabei folgende Reste: 24-32, 45-54, 58-68, 71-82, 86-92, 95-103, 109-114 und 123-128. Nach der typischen α -Helix (Positionen 135-148) auf der Rückseite der Struktur folgt ein C-terminales Segment mit ebenfalls helikalen Eigenschaften (Position 165-174). Die nachfolgenden 10 Aminosäurereste sowie das C-terminale *Strep*-tag II sind in der Kristallstruktur ungeordnet und damit in der Elektronendichte nicht sichtbar. Der N-terminale Glutaminrest liegt in Form eines Pyroglutamates vor. Diese Form der terminalen Zyklisierung ist für natives AGP bereits durch Edmann-Analyse der resultierenden Fragmente aus Chymotrypsin- und Trypsinverdau nach Behandlung mit Pyroglutamat-Aminopeptidase beschrieben worden (Schmid *et al.*, 1973).

Der untere Teil des β -Fasses wird vom N-Terminus des Proteins mit einer 3_{10} -Helix (Positionen 15-20) verschlossen. Hier befindet sich auch der Rest Trp25 (Abbildung 10) als Teil des charakteristischen GXW-Motivs (Flower, 1996), einer der wenigen konservierten Sequenzpositionen in der Familie der Lipocaline. Beide Enden des Polypeptidstranges sind durch jeweils eine Disulfidbrücke mit der Fass-Struktur verbunden. Cys5 bildet dabei eine Disulfidbindung mit Cys147. Diese fixiert den N-Terminus mit der seitwärts angeordneten α -Helix. Die Disulfidbrücke von Cys72 zu Cys165 verbindet dagegen den C-Terminus des Proteins mit dem Strang D des Fasses. Beide Disulfidbrücken wurden bereits von Schmid aufgrund biochemischer Analysen in richtiger Weise postuliert (Schmid *et al.*, 1974).

Eine genauere Betrachtung der Schleifen (*Loops*) an der Oberseite der Fasses offenbart zwei extrem kurze Schleifen, so genannte Haarnadelschleifen (*Hairpins*) für die Schleifen #2 und #3. Die beiden Schleifen #1 und #4 sind dagegen erheblich länger, wobei Schleife #1 ausgeprägten α -helikalen Charakter (Reste 35 - 43) besitzt, was in bereits vorliegenden Lipocalinstrukturen in diesem Ausmaß bis heute nicht zu beobachten war. Die α -Helix beinhaltet eine der fünf Glykosylierungsstellen des Proteins (Asn38), deren Rolle unter Abschnitt 4.1.3 genauer diskutiert wird.

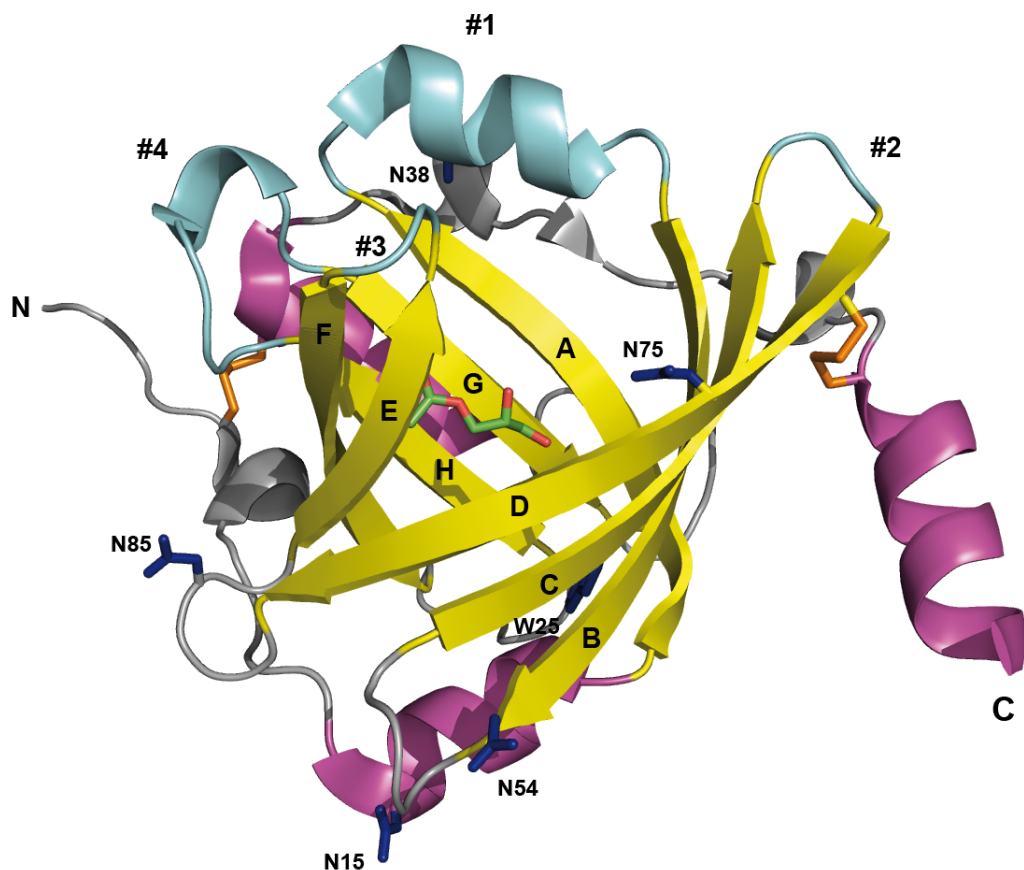


Abbildung 10: Die verfeinerte Kristallstruktur des humanen α_1 -Acid Glycoprotein. Sekundärstrukturelemente sind farblich markiert (α -Helices pink, β -Stränge gelb, *coil*-Strukturen grau). Beide Disulfidbrücken (orange, Cys5 - Cys147 und Cys72 - Cys165) sind hervorgehoben. Die vier flexiblen Schleifenregionen (#1 - #4) am offenen Ende des β -Fasses sind cyan eingefärbt. Alle fünf Glykosylierungsstellen (Asn15, Asn38, Asn54, Asn75, Asn85) sowie der konservierte Tryptophan-Rest (Trp25) sind markiert. In der Mitte der Tasche befindet sich der gebundene Ligand Glycerinacetat, welcher höchstwahrscheinlich aus der Proteinpräparation resultierte.

Wie für ein Serumprotein mit niedrigem *pI* zu erwarten, ist die Oberfläche des AGP überwiegend negativ geladen (Abbildung 11). Dies zeigt sich insbesondere durch exponierte Asp- und Glu-Reste an der Außenseite des β -Fasses. Zusätzlich zeigen die Umgebung der Stränge E/F und der α -Helix (135-148) bevorzugt negative Ladungen. Diese beiden Bereiche des Proteins werden nicht durch die angehängten Kohlenhydrate auf der Oberfläche abgeschirmt.

Durch den hohen Anteil der Proteinmasse an Kohlenhydraten von über 40 % (bezogen auf das konjugierte Protein) sind größere Oberflächenbereiche des AGP durch Glykosylierung bedeckt. Wegen des verwendeten bakteriellen Expressionssystems enthält die vorliegende Kristallstruktur allerdings keine Kohlenhydrate. Drei der fünf Glykosylierungsstellen sind an

der unteren Seite des Proteins in den kürzeren Verbindungsschleifen (Asn54 zwischen den Strängen B/C, Asn85 zwischen den Strängen D/E) sowie der 3_{10} -Helix (Asn15) lokalisiert (Abbildung 10 und Abbildung 11). An jeder dieser drei Stellen ist ausreichend Platz für die Assoziation der großen mehrfach verzweigten N-Glykane an der Unterseite des Proteins. Der überwiegend unpolare Strang D sollte im nativen Protein wahrscheinlich durch Kohlenhydrate abgeschirmt sein und möglicherweise in veränderter Konformation vorliegen, da die vierte Glykosylierungsstelle Asn75 zentral darin gelegen ist (Abbildung 10). Asn38 ist, wie schon erwähnt, ein Teil der α -helikalen Schleife #1, und es ist anzunehmen, dass die daran verknüpften Kohlenhydrate die Gestaltung des Bindungstascheneingangs massiv beeinflussen (Vergleich Abschnitt 4.1.3).

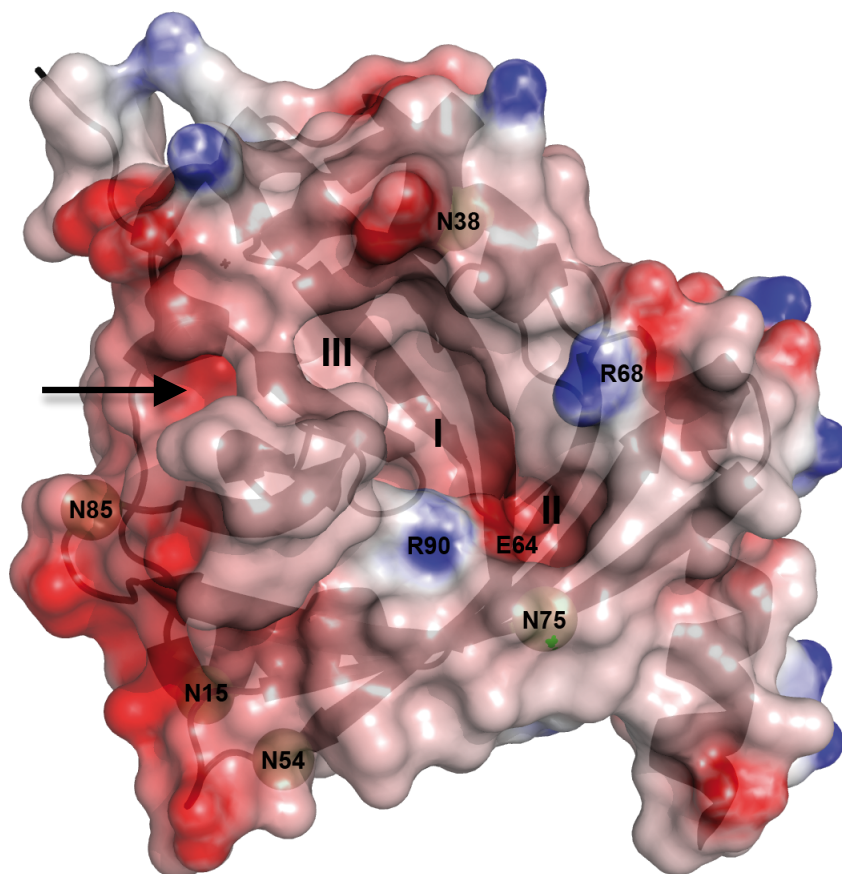


Abbildung 11: Elektrostatistische Oberflächenrepräsentation des humanen AGP. Blick von oben in die β -Fass-Struktur mit Färbung der Moleküloberfläche nach Ladung (von -10 kBT/e in rot, bis +10 kBT/e in blau). Die Seitenketten-Stickstoffatome der fünf Glykosylierungsstellen sind in grün hervorgehoben. Der Pfeil markiert den zusätzlichen, seitlichen Eingang zur hauptsächlich nach oben offenen Bindungstasche.

3.1.7.2 Die Bindungstasche

Der Eingang zur länglichen, kelchartigen Bindungstasche des unglykosylierten AGP wird durch die vier oberen Schleifen des Fasses gebildet. Er besitzt einen Durchmesser von etwa 9-12 Å und trägt an einer Seite zwei exponierte positive Reste, Arg68 und Arg90 (Abbildung 11). Die ansonsten überwiegend unpolare Tasche ist annähernd 18 Å tief und wird insbesondere durch folgende Aminosäureseitenketten ausgebildet: Tyr27, Phe49, Phe51, Leu62, Leu79, Ile88, Leu101, Tyr110, Leu112 und Tyr127. Den Taschenboden bilden die unpolaren Reste Ile13, Leu18 und Val81. Bei genauerer Betrachtung lässt sich die Bindungstasche in drei unterschiedliche, kleinere Taschen I - III unterteilen (Abbildung 11, Abbildung 12). Die tiefe Haupttasche I ist am größten, komplett unpolar und sollte genügend Platz für Liganden bereithalten. An dessen Seite befindet sich die ebenfalls unpolare Tasche III, welche eine zusätzliche kleine Öffnung von 5 Å Durchmesser an einer Seite des Proteins besitzt (Pfeil in Abbildung 11). Die Tasche II ist dagegen wesentlich kleiner und durch die Seitenkette von Glu64 partiell negativ geladen. Darüber befinden sich am Eingang zur Bindestelle die beiden schon erwähnten Argininreste.

Die besondere Geometrie der Bindungstasche zusammen mit der beschriebenen strukturellen Flexibilität von Schleife #1 einschließlich seiner Glykosylierung erklärt die ausgeprägte Eigenschaft des AGP, verschiedenste unpolare und basische Liganden mit Ringsystemen zu binden (Israili & Dayton, 2001). Vorangegangene Untersuchungen deuteten bereits auf eine Hauptbindestelle für Liganden mit drei sich überlappenden Bereichen für basische und azide Moleküle sowie einer Steroidhormon-Bindestelle hin (Matsumoto *et al.*, 2002). Ältere Verdrängungsexperimente mit unterschiedlichen Molekülen lieferten Hinweise auf eine flexible „Ligandenbindungsregion“ mit überlappenden Spezifitäten (Maruyama *et al.*, 1990). Diese Erkenntnisse lassen sich anhand der Kristallstruktur gut einordnen. Die vorliegende Unterteilung in drei kleinere Taschen mit ihren unterschiedlichen Größen und Polaritäten lässt verschiedenen Anordnungen von potentiellen Liganden zu. Die klare Präferenz zu hydrophoben Ringsystemen (Israili & Dayton, 2001) ergibt sich aus den vorherrschend unpolaren Seitenketten in der gesamten Tasche. Dagegen ist die negative Tasche II in der Lage, die Ladung basischer Seitengruppen eines Liganden zu kompensieren. Dabei ist die Orientierung des Liganden in der Tasche entscheidend. Für azide Liganden ergeben sich Kompensationsmöglichkeiten durch die Anordnung der beiden flexiblen positiven Seitenketten von Arg68 und Arg90 am Eingang der Bindungstasche.

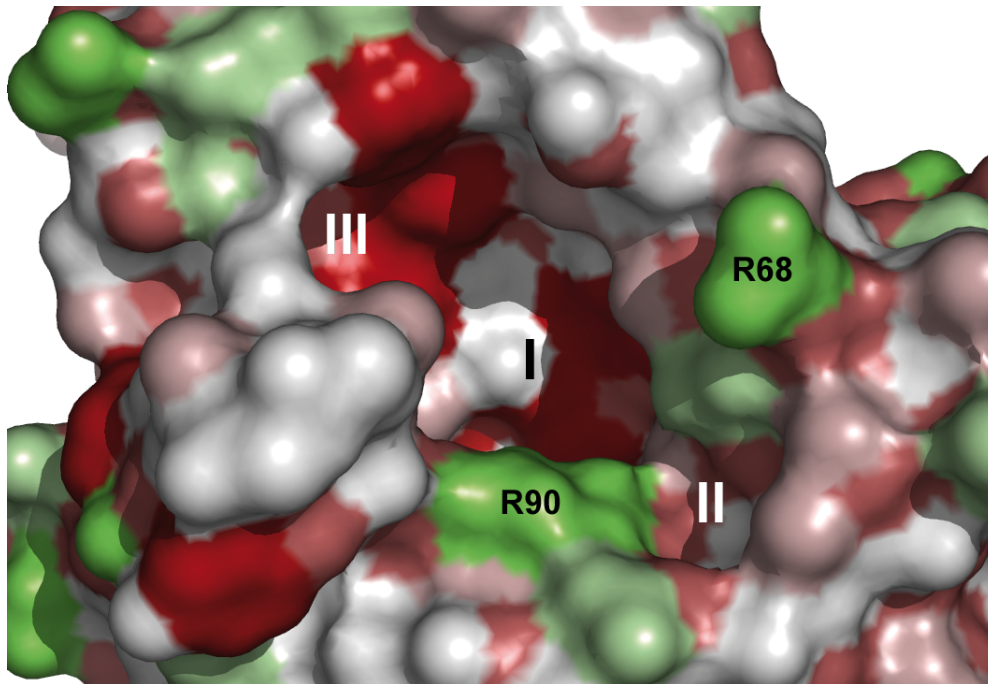


Abbildung 12: Die Bindungstasche des humanen AGP. Die drei unterschiedlichen Taschen sind mit I - III beschriftet (siehe Text). Färbung der Oberfläche nach Hydrophobizität (Eichinger *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 1999) von grün (hydrophil) über grau (neutral, inclusive Polypeptid-Rückgrat) bis braun (hydrophob).

3.1.7.3 Liganden in der Kristallstruktur

Da es sich beim humanen AGP, wie für viele Lipocaline postuliert, um ein Transportprotein handelt, wurde versucht, die Kristalle mit verschiedenen Liganden zu inkubieren (*Soaking*). Dabei wurden neben Bromazepam (Abbildung 7) die Verbindungen Chlorpromazin, Diazepam und ANS in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Nebenbei wurden Kokristallisationsversuche des Proteins mit den erwähnten Liganden durchgeführt. Es konnten allerdings weder durch *Soaking* noch durch Kokristallisation eine Protein-Ligand-Komplexstruktur erhalten werden. Dies lässt sich nach genauerer Betrachtung der Kristallpackung für das native Protein leicht erklären. Im vorliegenden Kristallgitter steckt der N-Terminus des AGP (Aminosäuren 1 - 4) im Eingang zur Bindungstasche des Nachbarmoleküls und versperrt somit dort komplett den Zugang für potentielle Liganden. Zusätzlich befindet sich in der Bindungstasche ein gebundenes Molekül, welches offenbar aus der Proteinpräparation resultierte. In die entsprechende Elektronendichte konnte die Verbindung Glycerinacetat eingepasst werden. Der Ligand sitzt quer in der Bindungstasche am Eingang zur tieferen Tasche I. Dabei zeigt der Acetylrest in Richtung der kleineren Tasche III, dringt aber aufgrund der Kürze des Moleküls nicht bis in diese vor. Direkte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäureseitenketten sind nicht auszumachen. Als einzige

Ausnahme lässt sich hier die Interaktion des Sauerstoffs am C2-Atom des Glycerins mit dem Stickstoffatom der Seitenkette von Arg90 am Eingang der Bindungstasche nennen. Allerdings ist deren Entfernung von 3,2 Å schon recht groß. Bei den anderen Kontakten handelt es sich überwiegend um Wechselwirkungen des Glycerinesters mit eher unpolaren Seitenketten im Inneren der Kavität (Phe49, Phe51, Ile88, Leu112, Phe114 und Tyr127).

Zum besseren Verständnis des Ligandenbindemechanismus des AGP wurden zwei pharmakologisch und physiologisch interessante Moleküle (Diazepam und Progesteron) ausgewählt und durch Computersimulation in die Bindungstasche modelliert.

3.1.7.4 Modellierung von Diazepam in der Bindungstasche

Diazepam gehört zur Familie der Benzodiazepine, einer klinisch wichtigen Gruppe bicyklischer Verbindungen, welche direkte Wirkung auf das Zentralnervensystem ausüben, indem sie die Bindungsstelle des γ -Aminobuttersäure-Rezeptors modulieren und somit die Aktivität eines Chlorid-Ionenkanals positiv beeinflussen. Dies führt zu einer geringeren Erregbarkeit der Nervenzellen und führt zu angstlösender, krampflösender und beruhigender Wirkung auf den menschlichen Körper. Diazepam wird zum Beispiel unter dem Handelsnamen Valium[®] gegen Epilepsie, zur Behandlung von Angstzuständen in der Psychiatrie und als Schlafmittel eingesetzt.

Die Affinität der Serumproteine HSA (*Humanes Serum-Albumin*) und AGP zu verschiedenen Benzodiazepinen ist schon länger bekannt. AGP bindet Diazepam mit einer Dissoziationskonstante von etwa 4 μ M (Maruyama *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu HSA wird von AGP (ORM1, Variante F1) allerdings bevorzugt die P-Konformation des Moleküls gebunden, was anhand von CD-spektroskopischen Messungen (Fitos *et al.*, 2007) gezeigt werden konnte. Daher wurde hier das P-Konformer ausgewählt und wie unter Abschnitt 2.6.7 beschrieben in der Bindungstasche des AGP modelliert (Abbildung 13).

Aus der berechneten Komplexstruktur lässt sich eine Erklärung für die Präferenz zur P-Konformation von Diazepam ableiten. Wie erwartet, befindet sich der planare Phenylring dabei tief in der unpolaren Tasche I. Durch diese Orientierung befindet sich der Diazepinring in der polaren Tasche II und kann somit zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit seinem Carbonylsauerstoff zu den Seitenketten von Glu64 und Gln66 ausbilden (Abbildung 13A). Zusätzlich ergeben sich Wasserstoffbrücken der Ringstickstoffe zu Arg90 und Tyr127. Der Chlorphenylring erstreckt sich hinüber zur geladenen Tasche III, welche das große Chloratom in sich aufnehmen kann. Insgesamt zeigt sich eine optimale Positionierung des P-Konformers in der Bindungstasche von AGP ohne nennenswerte sterische Konflikte. Die Ausbildung der

besprochenen Wasserstoffbrücken ist für die M-Konformation des Diazepam in dieser Form nicht möglich.

Affinitätsmessungen verschiedener Verbindungen mit beiden AGP-Isotypen (ORM1 und ORM2; Herve *et al.*, 1998) ergaben unterschiedliche Präferenzen. Im Detail zeigte sich für Disopyramid, Imipramin und Methadon eine Selektivität zu ORM2, für Dipyridamol, Quinidin und Mifepriston dagegen eine Selektivität zu ORM1. Progesteron, Propranolol und Chlorpromazin zeigten keine Selektivität. In einer Studie mit Charakterisierung der Bindestelle für Diazepam mit beiden Isoformen (Chuang *et al.*, 2005) konnte ebenfalls keine Selektivität in Bezug auf ORM1 und ORM2 festgestellt werden. Für ORM2 konnte nur ein Verlust der oben beschriebenen P-Konformer-Selektivität gezeigt werden (Fitos *et al.*, 2007). Dies lässt sich ebenfalls mit einem Blick auf die modellierte Struktur erklären. Nur drei der 22 veränderten Aminosäurepositionen zwischen ORM1 und ORM2 kommen in direkten Kontakt mit dem gebundenen Diazepam. Allerdings ermöglichen genau diese drei unterschiedlichen Mutationen (V92E, L112F and F114S, Abbildung 13A) verschiedene Positionen für das Chloratom. Durch den Phenylring an Position 112 von ORM2 wird dieses in Richtung der kleineren Seitenkette von Ser114 gedrückt. Dies sollte die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken ermöglichen. Die P/M-Selektivität wird somit in ORM2 aufgehoben.

Die Modellierung des Liganden Diazepam kann also sowohl die beschriebene Affinität des Proteins bestätigen als auch den direkten Einfluß von Mutationen in der Bindungstasche auf die Präferenz verschiedener Konformere erklären.

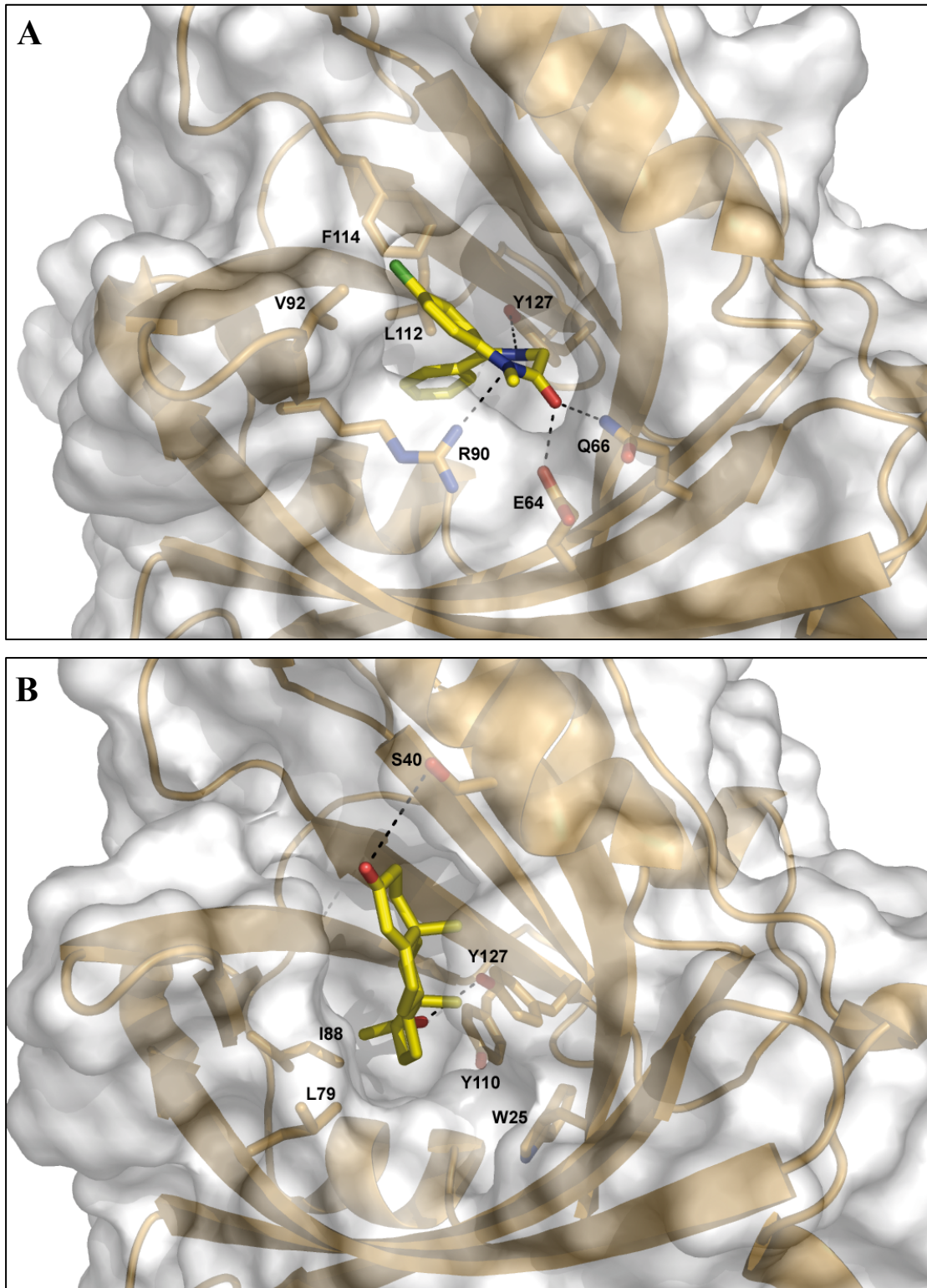


Abbildung 13: Modellierung von Liganden in der Bindungstasche des humanen AGP. Wichtige Aminosäureseitenketten sowie deren Interaktionen sind hervorgehoben. **[A]** Diazepam. **[B]** Progesteron.

3.1.7.5 Modellierung von Progesteron in der Bindungstasche

Als zweiter Modell-Ligand wurde das Steroid Progesteron ausgewählt, dessen Eigenschaft von AGP gebunden zu werden, ebenfalls schon biochemisch untersucht worden ist. Eine Studie mittels Infrarot-, und Ramanspektroskopie sowie einer Computermodellierung des AGP mit Progesteron (Kopecky *et al.*, 2003) deutete auf eine Erhöhung des Anteils an β -Strängen im Protein bei Komplexierung des Steroids hin. Dabei wurde postuliert, dass sich die α -Helix in Schleife #1 in einen zusätzlichen β -Strang transformiert. Diese Modellierung des AGP weist eine weitgehend ähnliche Anordnung der Sekundärstrukturelemente wie in der Kristallstruktur auf, allerdings mit signifikanten Unterschieden in der Orientierung der Seitenketten (mit bis zu 180° Drehung des Rückgrates). Dies führt jedoch zu großen Abweichungen, insbesondere von spezifischen Kontakten zwischen Seitenketten des Proteins und Progesteron und somit auch bei den Eigenschaften der Bindungstasche.

Interessanterweise zeigte die hier vorgenommene Modellierung des Progesterons in der Bindungstasche der Kristallstruktur allerdings auch schon für den „ α -helikalen Zustand“ der Schleife #1 eine hervorragende Einpassung des Moleküls in die größere, hydrophobe Tasche I, ohne sterische Notwendigkeit einer strukturellen Transformation (Abbildung 13B). Die ausgeprägte Flexibilität der Schleife wird dennoch durch das Auftreten signifikant höherer Temperaturfaktoren (B-Faktoren bis zu 50) in diesem Segment der Kristallstruktur unterstrichen. Grundsätzlich entspricht die Orientierung des modellierten Liganden der zuvor von Kopecky *et al.* beschriebenen. Dabei steckt das Ende des Ringsystems mit der Acetylgruppe tief in der hydrophoben Bindungstasche, während die Ketofunktion im Ring A nach außen zeigt. Folgende Kontakte des Liganden mit dem Protein sind besonders hervorzuheben (Abbildung 13B): eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff der Acetylgruppe und der Seitenkette von Tyr127 am Boden der Tasche; hydrophobe Kontakte der Acetylgruppe mit Leu79 und Ile88; allgemeine hydrophobe Kontakte des Steroid-Ringsystems mit den Aminosäureseitenketten der Tasche I. Durch Drehung der Hydroxylgruppe von Ser40 könnte die Entfernung zum terminalen Ketosauerstoff entscheidend verringert werden und die Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücke wäre möglich.

Eine ältere Studie beschreibt den direkten Einfluß der Modifikation von Lys39 mit Trinitrobenzonsulfonsäure oder Aryl-Isocyanat auf die Affinität des Proteins zu Progesteron (Kute & Westphal, 1976). Ein direkter Kontakt mit diesem Aminosäurerest war im durchgeführten Modellierungsexperiment jedoch nicht feststellbar, da die Seitenkette des Lys39 zur Proteinaußenseite zeigt.

Neuere Studien mittels Fluoreszenzspektroskopie (Albani, 2006) weisen darauf hin, dass Progesteron nahe eines Tryptophanrings (Trp25 oder Trp122) in der Bindungstasche gebunden wird. Mit Blick auf die vorliegende Proteinstruktur kann eine Interaktion des Steroids mit Trp122 ausgeschlossen werden, da dessen Seitenkette nach außen zeigt. Dieses bestätigen auch die Ergebnisse von CD/UV-Studien (Zsila & Iwao, 2007), welche durch Untersuchung an den beiden AGP-Mutanten W25A und W122A die Seitenkette von Trp25 als Interaktionsstelle ausmachten. Ein direkter Kontakt des Progesterons mit Trp25 ist in der Kristallstruktur allerdings nicht möglich, da dieser durch die Seitenkette von Tyr110 (Abbildung 13B) blockiert wird. Eine Drehung dieser Seitenkette würde jedoch eine Interaktion ermöglichen.

3.1.7.6 Der Anteil an α -Helices an der Tertiärstruktur und die Rolle von His172

Vergleicht man den Anteil der Sekundärstrukturelemente in der ermittelten Kristallstruktur (27,3 % α -Helix, 39,3 % β -Strang und 35 % *Coil*-Strukturen) mit publizierten, biochemischen Daten, so ergeben sich einige wichtige Unterschiede. Die schon erwähnte spektroskopische Studie (Kopecky *et al.*, 2003) ermittelte Anteile von 15 % α -Helix, 41 % β -Strang und 12 % *Coil*-Strukturen für das glykosylierte AGP. Eine andere Studie (Nishi *et al.*, 2006) beobachtete eine deutliche Erhöhung des Gehalts an α -Helix von 13,4 % auf 30 % bei Reduktion der beiden Disulfidbindungen sowie bei Kontakt mit biologischen Membranen. Die vorliegende unglykosylierte Kristallstruktur zeigt hingegen trotz geschlossener Disulfidbindungen den höheren Anteil an α -Helices (27,3 %), wie er nur unter reduzierenden Bedingungen beschrieben worden ist. Dies könnte möglicherweise durch eine induzierte α -helikale Strukturierung des terminalen Bereichs (Reste 152-172) während der Kristallisation erklärt werden. Vernachlässigt man diese Aminosäurereste (152-154, 160-162, 166-172) bei der Kalkulation, so ergibt sich ein α -helikaler Anteil von 18,6 %, was dem Wert von Kopecky *et al.*, 2003 recht nahe kommt (15 %).

Interessanterweise konnten Nishi *et al.*, 2006 durch systematische Mutationsanalyse der terminalen Histidinreste (H97A, H100A, H172A) zeigen, dass insbesondere His172 essentiell für die Erhöhung des Anteils an α -Helices ist. Betrachtet man den α -helikalen C-Terminus der AGP-Kristallstruktur (Abbildung 14), so stellt sich die entscheidene Rolle des His172 klar heraus. Neben der Disulfidbrücke (Cys72/Cys165) und einer Wasserstoffbrücke zwischen Glu169 und Tyr50 vermittelt die Seitenkette von His172 den Kontakt der α -Helix mit der β -Fass-Struktur durch eine Wasserstoffbrücke zu Tyr65. Im Kristallgitter wird die

Konformation der terminalen Helix zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Gln171 und Asn85 in einem Nachbarmolekül stabilisiert. Bei geschlossener Disulfidbrücke reichen diese beschriebenen Interaktionen (außer der Kristallpackung) jedoch anscheinend nicht aus, um die terminale α -Helix in Lösung zu stabilisieren, was einen reduzierten α -helikalen Anteil (15-18 %) erklären kann. Aus der Kristallstruktur ist nur schwer abzuleiten, dass die Spaltung der Disulfidbrücken (Nishi *et al.*, 2006) diesen Anteil auf 30 % erhöhen soll. Die Interaktion mit einer biologischen Membran könnte hier allerdings, ähnlich wie die Kristallpackung, eine zusätzliche Stabilisierung erbringen.

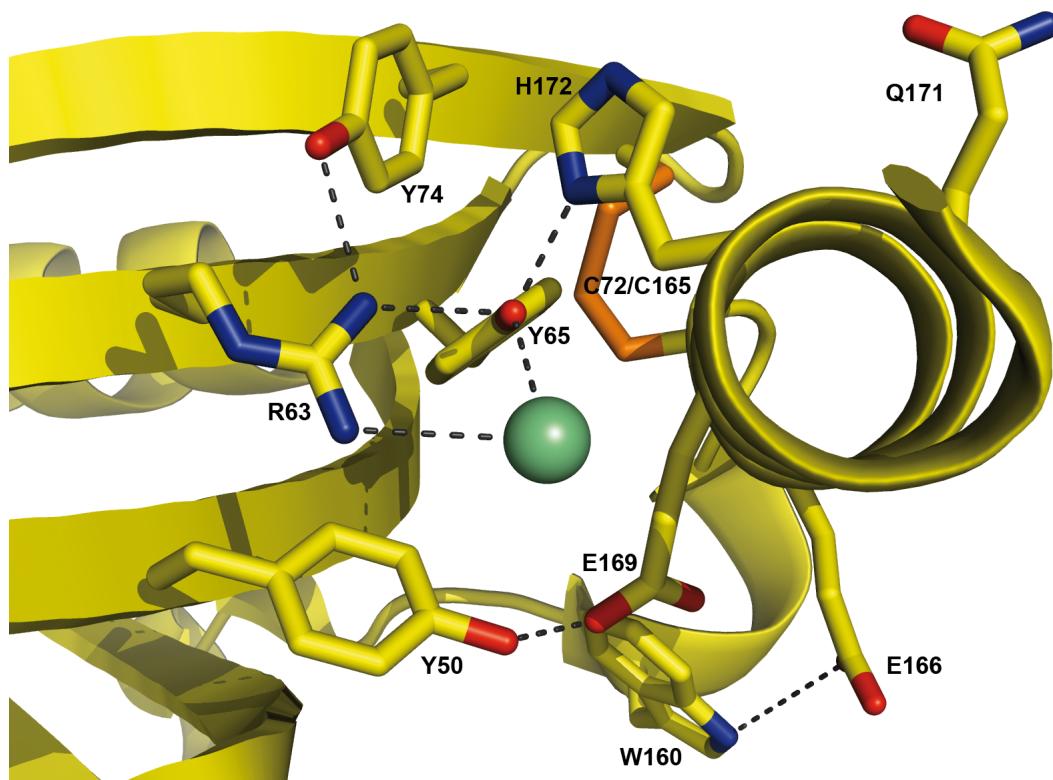


Abbildung 14: Der α -helikale C-Terminus des humanen AGP. Blick von der Rückseite des β -Fasses auf die strukturelle Umgebung von His172. Wichtige Aminosäureseitenketten und deren Interaktionen zur Fixierung der Helix sind eingeblendet. Beteiligte Wassermoleküle der Kristallstruktur sind grün eingefärbt.

3.1.7.7 Vergleich mit anderen Lipocalinen

Wie eingangs beschrieben, zeichnet sich die Proteinfamilie der Lipocaline durch sehr geringe Sequenzidentität bei gleichzeitig hoher Ähnlichkeit auf Strukturebene aus. Die Suche nach strukturell verwandten Einträgen in der Protein Data Bank (PDB) mithilfe des DALI Programms (Holm & Sander, 1993) ermittelte den humanen Komplement-Faktor c8 γ (PDB: 1IW2; Ortlund *et al.*, 2002) als Proteinstruktur mit höchstem Ähnlichkeitsgrad (z -score = 15,7). Dieser gehört, wie erwartet, zur Familie der Lipocaline und ist ein wichtiger Teil des Membranangriffskomplexes im Komplementsystem des menschlichen Immunsystems. Auch die zwei folgenden Proteinstrukturen des epididymalen Retinsäure-Bindeproteins der Ratte (PDB: 1EPA; Newcomer, 1993; z -score = 14,7) und des *Major Urinary Protein* der Maus (PDB: 1MUP; Bocskei *et al.*, 1992; z -score = 14,3) gehören zur Lipocalinfamilie.

Ein direkter Vergleich der Sequenzen von AGP mit c8 γ ergibt nur 12,2 % Identität auf Aminosäureebene. Bezieht man konservative Austauschungen mit ein, so steigt der Wert auf 35,5 %, welches leicht über dem Mittelwert (ca. 20 %, Flower, 1996) für diese Proteinfamilie liegt. Dennoch lässt die niedrige Homologie nicht unbedingt auf eine strukturelle Ähnlichkeit schließen. Eine direkte Überlagerung von 58 C α -Positionen zwischen AGP (22-31+47-53+59-65+73-80+87-90+96-103+109-115+122-128) und c8 γ (28-37+53-59+63-69+77-84+91-94+103-110+115-121+126-132) nach Skerra, 2000 zeigte dagegen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit einem Rmsd von 1,71 Å (Abbildung 15). Dabei besitzen beide Fass-Strukturen ungefähr den gleichen Durchmesser mit nahezu identischer Anordnung der β -Stränge A-D. Für die Stränge E-H ergeben sich kleinere Abweichungen bedingt durch deren verschiedene Länge, was insbesondere zu Veränderungen in den Konformationen der beiden kürzeren Schleifen #3 und #4 führt. Schleife #1 ist in der c8 γ -Struktur komplett ungeordnet. Interessanterweise befindet sich gerade in dieser Schleife des c8 γ der freie Cys-Rest 40, welcher an der Interaktion mit c8 α während der Bildung des Membranangriffskomplexes essentiell beteiligt ist. Dies legt eine Bedeutung dieser Region auch für AGP nahe, da hier die Glykosylierungsstelle des Asn38 in Schleife #1 zu finden ist. Dessen mögliche Rolle in Bezug auf den Zugang zur Bindungstasche wird unter Abschnitt 4.1.3 diskutiert.

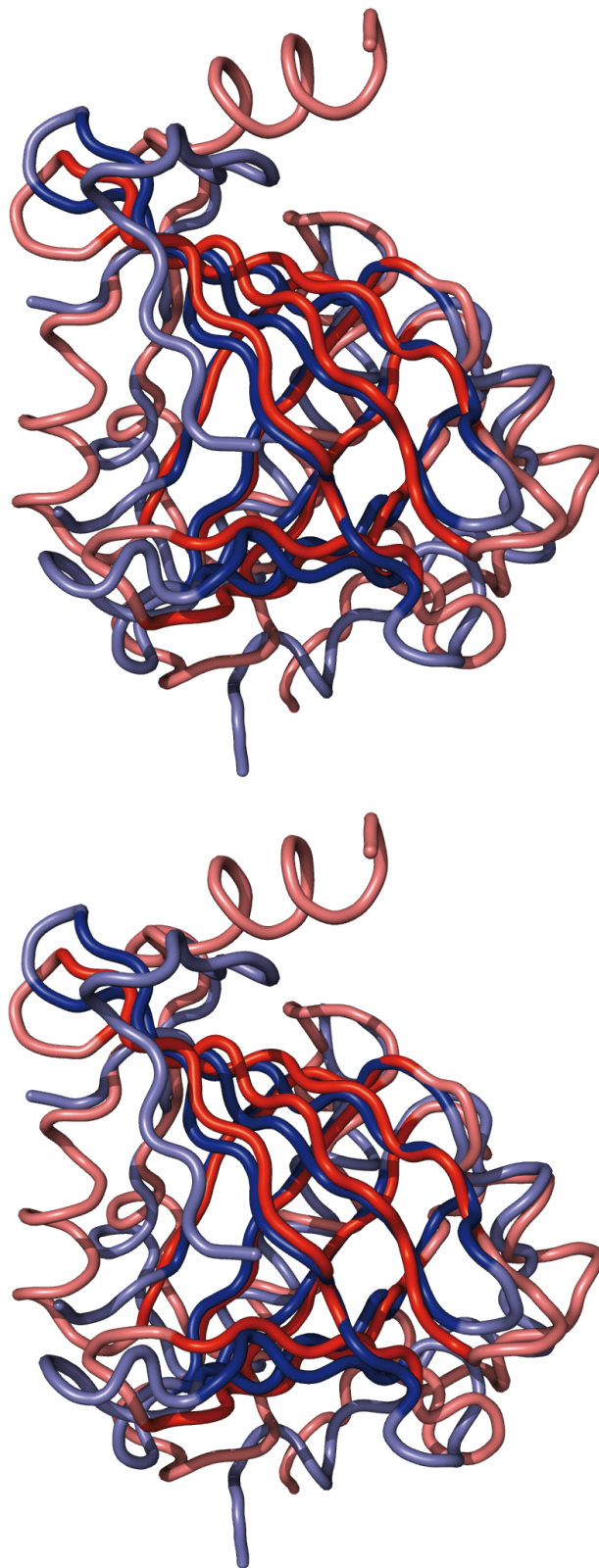


Abbildung 15: Überlagerung der Proteinstrukturen von AGP und c8γ (PDB 1IW2) in stereo. Es ist nur das Proteinrückgrat dargestellt. Die AGP-Struktur ist rot, die c8γ-Struktur blau eingefärbt. Die für die Überlagerung verwendeten 58 konservierten C α -Positionen (siehe Text) sind durch einen intensiveren Farbton hervorgehoben (Rmsd: 1.71 Å).

3.2 Vergleichende Liganden-Bindungsstudie mit humanen Lipocalinen

3.2.1 Klonierung von Glycodelin und Odorant Binding Protein auf pASK75-strepII

Zum Vergleich der Ligandenspezifitäten wurden die beiden humanen Lipocaline GLY und OBP ebenfalls auf das Plasmid pASK75-strepII (Voss & Skerra, 1997) kloniert. Die anderen humanen Vertreter der Proteinfamilie waren bereits in vorangegangenen Arbeiten (N. Bischoff, D. Breustedt, M. Distel, Dr. A. Nasreen) auf diesem Vektor kloniert worden. Das verwendete Vektorsystem ermöglicht, wie schon unter Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben, den Transport des rekombinanten Proteins in das Periplasma von *E. coli*. Bei der Translokation des Genproduktes über die innere Membran der Bakterienzelle wird das Signalpeptid (OmpA) abgespalten, so dass das mature rekombinante Protein aus dem periplasmatischen Zellextrakt isoliert und über das an den C-Terminus fusionierte *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) gereinigt werden kann.

Die Amplifizierung der Gensequenz von GLY (GdA; Seppala *et al.*, 2002) mittels PCR erfolgte mithilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase unter Verwendung des Primerpaares Gly1 / Gly2 aus einer klonierten cDNA des humanen Glycodelins (pRSETAGd-sig; Dutta *et al.*, 1998). Das PCR-Fragment wurde in den mit den Restriktionsenzymen *Stu*I und *Eco*47III geschnittenen Vektor pASK75-strepII inseriert. Dabei wurden durch die verwendeten Primer das terminale Codon (Alanin) der OmpA-Sequenz und das erste Codon (Serin) des *Strep*-tag II, welche beide durch das Aufschneiden des Vektors entfernt wurden, im Plasmid rekonstituiert.

Die Gensequenz des humanen OBP_{I α} (Lacazette *et al.*, 2000) mit flankierenden *Ecl*136II- und *Eco*47III-Schnittstellen wurde in synthetischer Form (Entelechon GmbH, Regensburg) auf dem Vektor phOBP (basierend auf pUC) bezogen. Nach Restriktion dieses Vektors mit *Ecl*136II und *Eco*47III, Reinigung und Phosphorylierung des DNA-Fragmentes wurde dieses in den mit den Restriktionsenzymen *Stu*I und *Eco*47III geschnittenen Vektor pASK75-strepII ligiert. Aus jeweils 10 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *Xba*I und *Hind*III analysiert. Durch zusätzlichen Verdau mit *Xba*I und *Eco*47III wurde die richtige Orientierung der inserierten Sequenz kontrolliert (Wiederherstellung der Erkennungssequenz von *Eco*47III). Die Kontrolle je eines positiven Klones erfolgte durch Sequenzierung mit den Primern D20 und PR1. Für GLY zeigten die Sequenzierdaten eine Deletion von zwei Basenpaaren in der *Eco*47III Schnittstelle sowie eine Punktmutation von Guanin zu Adenin. Dies führte zur unerwünschten Mutation der Aminosäureposition 77 von Glycin zu Glutaminsäure. Beide Mutationen wurden anschließend durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.2.5.2) unter Verwendung der Primer Gly-K-1 und Gly-K-2 korrigiert. Nach abschließender Kontrolle mittels

Sequenzierung wurde das generierte Expressionsplasmid als pGly1 bezeichnet. Die durchgeführte Sequenzierung für OBP war fehlerfrei, und das Plasmid wurde phOBP1 genannt. Anschließend wurde ein Austausch des freien Cys-Restes an Position 99 des OBP gegen Serin durchgeführt. Eine ortsgerichtete Mutagenese mit dem Primer OBP-K-1 lieferte das Expressionsplasmid phOBP2.

3.2.2 Optimierung der Expression von Glycodelin und Odorant Binding Protein

Die bakterielle Produktion von GLY (pGly1) und OBP (phOBP1, phOBP2) erfolgte zunächst im 2 L - Maßstab bei 22°C im *E. coli* Stamm JM83 (Abschnitt 2.3.1.1.) Nach dreistündiger Induktion mit 200 µg/L aTc wurde die Kultur geerntet, die periplasmatische Proteinfraction präpariert, das rekombinante Protein mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und durch SDS-PAGE analysiert (ohne Abbildung).

Für GLY lag die Proteinausbeute unter diesen Bedingungen bei unter 5 µg an rekombinantem Protein je Liter Kultur. Deshalb wurde die Expression bei verschiedenen Temperaturen (22 °C, 30 °C und 37 °C) und mit unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen (BL21, HM125, MC4100Δ*skp*) getestet, wobei allerdings keine nennenswerte Verbesserung festgestellt wurde. Auch durch den Einsatz des Helferplasmides pTUM3 (Schlapschy *et al.*, 2006) ließ sich die Proteinausbeute nicht merklich steigern. Die Effizienz der bakteriellen Signalpeptidase lässt sich durch Wahl der der Signalsequenz folgenden Aminosäuren entscheidend beeinflussen. Negativ geladene Aminosäuren in Folge der Signalsequenz begünstigen dabei die Translokation des Genproduktes (Geller *et al.*, 1993). Aus diesem Grund wurde mithilfe einer ortsgerichteten Mutagenese unter Verwendung des Primers Gly-K-3 das N-terminale Methionin deletiert. Der OmpA-Signalsequenz folgte somit die negativ geladene Asparaginsäure. Die eingeführte Mutation wurde mittels Sequenzierung mit den Primern D20 und PR1 bestätigt und das neue Expressionplasmid als pGly2 bezeichnet. Durch diese Änderung der N-terminalen Sequenz ließ sich die Proteinausbeute (*E. coli* JM83, 22 °C, dreistündige Induktion) auf 70 µg je Liter Kultur steigern. Für die anschließende Liganden-Bindungsstudie wurde eine Fermentation in *E. coli* W3110 im 8 L-Maßstab durchgeführt (Abschnitt 2.3.1.2). Diese lieferte etwa 7 mg reines Protein nach Streptavidin-Affinitätschromatographie. Bei nachfolgender Gelfiltration in 25 mM Na-P_i, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA zeigte das unglykosylierte, rekombinante GLY eine starke Tendenz zur Aggregation, was zu einem Verlust von etwa 50 % des Proteins führte.

Die Expression des OBP mit dem freien Cys99 lieferte unter den oben gewählten Bedingungen (*E. coli* JM83, 22 °C, dreistündige Induktion) eine Ausbeute von 250 µg

rekombinantem Protein je Liter Kultur. Diese konnte durch die Mutation C99S und den Einsatz von pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) auf 1,4 mg je Liter Kultur auf mehr als das Fünffache gesteigert werden.

3.2.3 Rekombinante Produktion der rekombinanten Lipocaline in *E. coli*

Für eine vergleichende Liganden-Bindungsstudie wurden zehn humane Lipocaline – sowie als Kontrolle das Insektenlipocalin BBP (Schmidt & Skerra, 1994) – in *E. coli* produziert und gereinigt. Dabei wurden bei allen Lipocalinen konsequent freie Cysteinreste durch Serin oder Alanin substituiert (Tabelle 7). Die Expression wurde vorwiegend im *E. coli*-Stamm JM83 durchgeführt. Für AGP wurde, wie unter Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben, zur Verhinderung der SKP-Bindung der Stamm MC4100 Δ skp verwendet. NGAL und PGDS wurden im Stamm BL21 hergestellt, welcher das eisenaffine Siderophor Enterobactin nicht produziert. Durch den Einsatz des Helferplasmids pTUM4 konnte bei AGP, ApoD, OBP2, RBP und PGDS eine Erhöhung der Proteinausbeute erreicht werden. Tabelle 7 gibt eine Zusammenfassung der rekombinanten Lipocaline und ihrer Expressionsbedingungen:

Lipocalin	Expressionsvektor	<i>E. coli</i> Stamm	Seitenketten Austausch	pTUM4	Ausbeute (mg/L _{Kultur})
AGP	pAGP1	MC4100 Δ skp	-	+	2,0
ApoD	pApoD25	KS272	L23P, W99H, C116S, I118S, L120S, P133V, N134A	+	0,4
C8 γ	pC8g2	JM83	C40S	-	0,4
GLY	pGly2	W3110	Δ M1	-	0,9
α 1m	pa1m2	W3110	C34S	-	0,1
NGAL	phNGAL14	BL21	C87S	-	1,1
OBP	phOBP2	JM83	C99S	+	1,4
PGDS	pPGDS (C43A/C145S)	BL21	C43A, C145S	+	1,5
RBP	phRBP-A	JM83	-	+	0,4
Tlc	pTlc3	JM83	Δ HLL1-4, C101S	-	1,5
BBP	pBBP21	JM83	N1D	-	1,8

Tabelle 7: Übersicht über die Expressionsbedingungen zur bakteriellen Produktion von zehn humanen Lipocalinen in *E. coli*.

Die *E. coli*-Stämme wurden mit den entsprechenden Expressionsplasmiden (Tabelle 7) transformiert und eine Kultivierung in 2 L LB-Medium mit Antibiotikum durchgeführt. Nach dreistündiger Induktion mit 200 µg/L aTc wurde die Kultur geerntet und die periplasmatische Proteinfraktion präpariert. Wegen sehr geringer Proteinausbeuten war für ApoD, α1m und GLY eine Produktion im 8 L Fermenter notwendig. Das rekombinante Protein wurde jeweils mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und anschließend zur Feinreinigung einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Um vergleichbare Bedingungen für die folgenden Bindungsexperimente zu schaffen, wurde dabei für alle Lipocaline das gleiche Puffersystem (25 mM Na-P_i pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) verwendet. Die monomere Proteinfraktion (apparente Molmasse um die 20 kDa) wurde gesammelt und durch reduzierende und nicht reduzierende SDS-PAGE untersucht (Abbildung 16). Abschließend wurde die Proteinkonzentration durch Absorption bei 280 nm bestimmt.

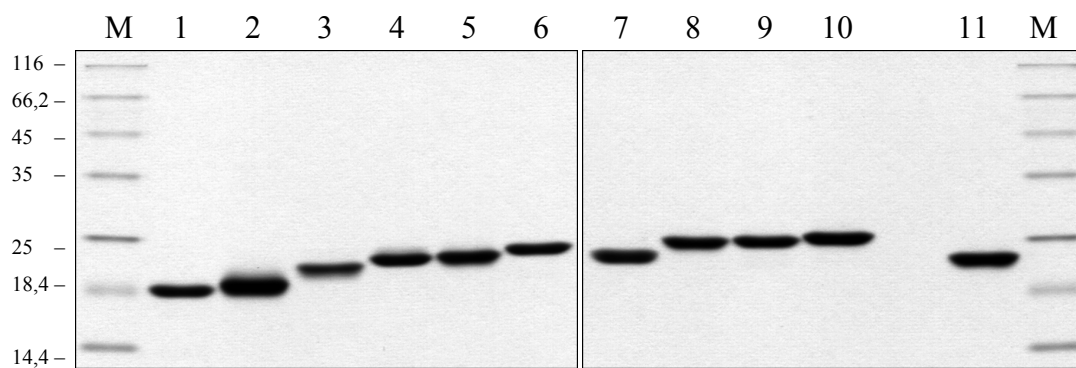


Abbildung 16: Zehn rekombinante humane Lipocaline. Reduzierende 15 %ige SDS-PAGE nach Reinigung durch Streptavidinaffinitäts- und Größenausschlusschromatographie. 1: Tlc, 2: OBP, 3: GLY, 4: NGAL, 5: PGDS, 6: C8 γ , 7: ApoD, 8: AGP, 9: α 1m, 10: RBP, 11: BBP (als Kontrolle), M: Proteinmarker.

Die korrekte Faltung mit intakter Sekundärstruktur ohne Glykosylierung ließ sich durch CD-Spektroskopie im Wellenlängenbereich von 190 - 250 nm nachweisen. Die aufgenommenen Spektren (Abbildung 17) zeigten jeweils die typischen Eigenschaften eines überwiegend aus β -Faltblättern bestehenden Proteins mit negativem Maximum zwischen 205 und 219 nm und positivem Signal unter 200 nm. Die individuellen Eigenschaften der verschiedenen Spektren waren mit bereits publizierten Spektren gut vergleichbar.

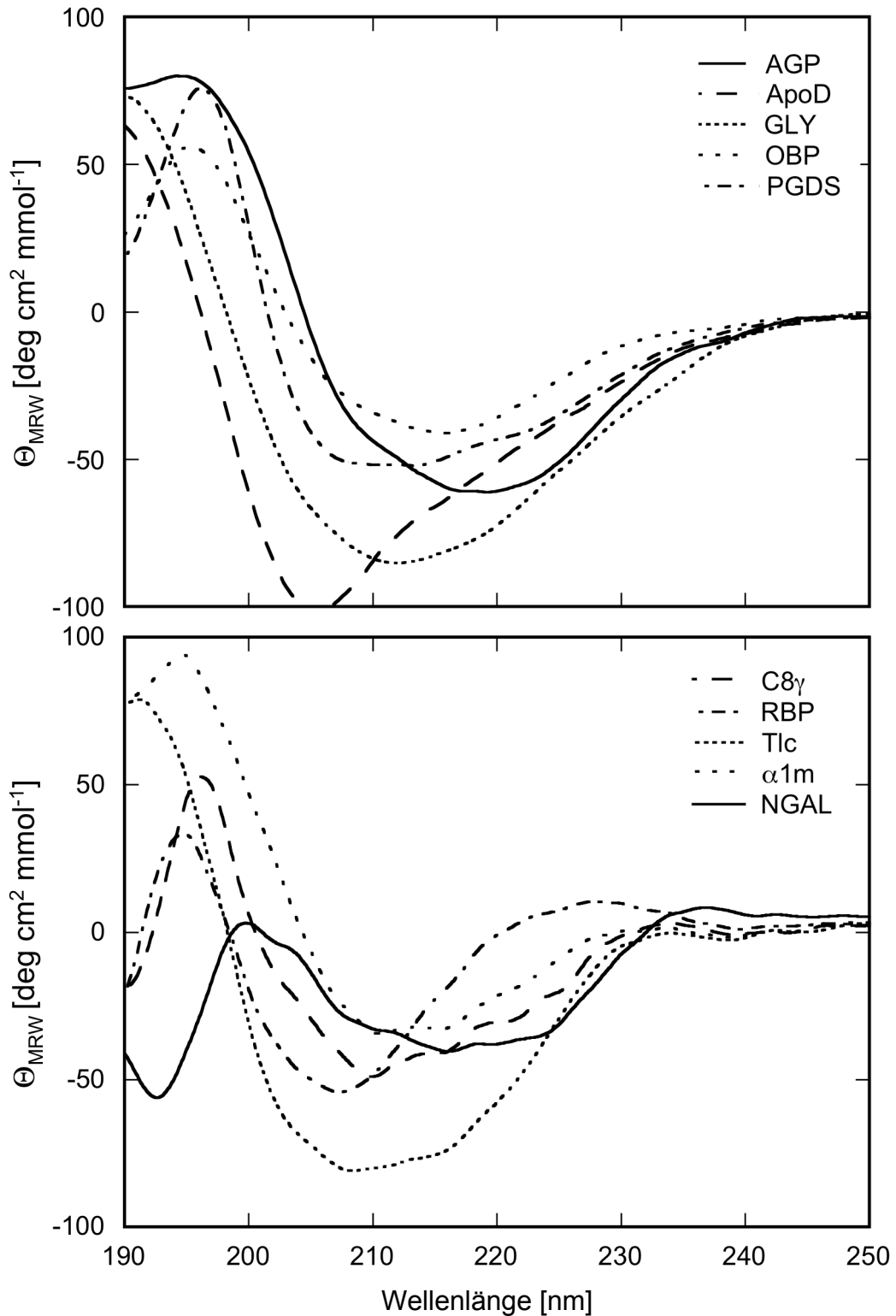


Abbildung 17: CD-Spektren zehn bakteriell produzierter Lipocaline. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm aufgenommen und für jedes Protein auf die molare Elliptizität Θ_{MRW} normiert. Die Proteinlösungen (ca. 25 μM bis 80 μM) lagen im Messpuffer (50 mM Kaliumsulfat, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) vor. Die Daten für C8 γ , α 1m, NGAL, RBP und Tlc wurden von Daniel Breustedt gemessen (Dissertation Breustedt, 2008) und mit freundlicher Genehmigung übernommen.

3.2.4 Fluoreszenz-Titration der Lipocaline mit verschiedenen Liganden

Da die physiologischen Liganden der meisten humanen Lipocaline bis heute nicht bekannt sind (vgl. Tabelle 1), wurden zur Untersuchung ihrer Bindespezifitäten neben den beiden natürlichen Liganden des RBP, Retinol und Retinsäure zwei synthetische Modell-Moleküle (ANS, DAUDA) ausgewählt.

Die relativ unpolare Verbindung 8-Anilino-1-naphthyl-sulfonsäure (ANS) lässt sich bei 370 nm zur Fluoreszenz anregen und wurde schon früher zur Charakterisierung der Bindungsstellen bzw. Oberflächeneigenschaften von Lipocalinen verwendet (Collini *et al.*, 2003). Die Bindung an hydrophobe Oberflächen des Proteins erzeugt eine Verschiebung des Fluoreszenz-Maximums von 512 nm zu 475 nm zusammen mit einer drastischen Erhöhung der Fluoreszenz-Quantenausbeute. 11-(5-(Dimethylamino)-1-naphthyl-sulfonylamino)-undecansäure (DAUDA), ein fluoreszierendes Fettsäureanalogon, wird zur Quantifizierung der Fettsäurebindungsselektivität von Proteinen verwendet. Auch hier wird bei Bindung in eine hydrophobe Proteintasche das Fluoreszenz-Maximum bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm signifikant verschoben. Für Tlc (Gasymov *et al.*, 1999) und OBP (Briand *et al.*, 2002) konnte eine Komplexierung dieses Liganden bereits festgestellt werden. Auch wurde DAUDA für Verdrängungsexperimente mit dem humanen OBP und diversen Liganden erfolgreich verwendet (Briand *et al.*, 2002).

Das in Wasser unlösliche *All-trans*-Retinol wird in der menschlichen Blutbahn durch das RBP zu den Geweben transportiert. Es zeigt bei Anregung mit einer Wellenlänge von 334 nm in unpolarer Umgebung, insbesondere bei Bindung in der Proteintasche des RBP, intensive Fluoreszenz bei 455 nm (Cogan *et al.*, 1976). Retinsäure besitzt indessen keine ausgeprägte Eigenfluoreszenz, wird aber ebenfalls von RBP gebunden. Es zeigte sich aber, dass die Bindung von Retinsäure zu einer signifikanten Abschwächung der Trp- und Tyr-Fluoreszenz des Proteins bei 280 nm Anregung führt (Müller & Skerra, 1993).

Wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, wurden alle gereinigten rekombinanten Lipocaline auf eine Konzentration von 1 μM eingestellt und bei den entsprechenden Anregungs- und Detektionswellenlängen eine Ligandenfluoreszenz- (ANS, DAUDA, Retinol) bzw. Proteinfluoreszenztitration (Retinsäure) durchgeführt (Abbildung 18) und anschließend ausgehend von den erhaltenen Kurven die Dissoziationskonstanten berechnet.

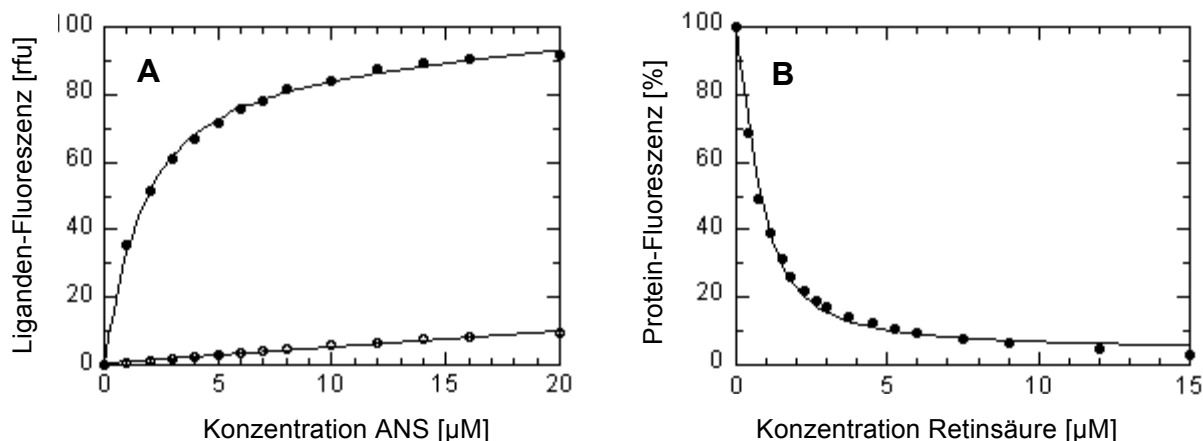


Abbildung 18: Zwei Beispiele für die Fluoreszenz-Titration der humanen Lipocaline. [A] Gefüllte Datenpunkte: Ligandenfluoreszenztitration von 1 µM humanem AGP mit ANS bei 370 nm Anregungswellenlänge und Detektion bei 475 nm. Offene Datenpunkte: Kontrolltitration zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz des Liganden ohne Protein. [B] Proteinfluoreszenztitration von 1 µM humanem PGDS mit Retinsäure bei 280 nm Anregungswellenlänge und Detektion bei 340 nm.

Die vorliegende Ligandenbindungsstudie wurde in Kooperation mit Daniel Breustedt (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) durchgeführt. Er bearbeitete fünf der zehn untersuchten Lipocaline (C8 γ , α 1m, NGAL, RBP und Tlc, Dissertation Breustedt, 2008).

3.2.5 Resultate der Bindungsstudien

Die durchgeführte Bindungsstudie mit vier unterschiedlichen Liganden lieferte zum ersten Mal vergleichbare Daten für zehn Vertreter der humanen Lipocalin-Proteinfamilie. Frühere Bindungsstudien sind stets jeweils mit unterschiedlichen Proteinpräparationen durchgeführt worden. Dabei wurde aus dem Serum oder Gewebe isoliertes Protein, teilweise mit unterschiedlicher Glykosylierung verwendet. Rekombinante Proteine wurden aus menschlichen Zelllinien oder Hefezellen gewonnen. Die Heterogenität der Proteinproben erschwert damit einen direkten Vergleich der publizierten Bindungsdaten erheblich. Das hier gewählte bakterielle, periplasmatische Expressionssystem sowie die einheitliche Produktion und Reinigung der Proteine ermöglicht dagegen einen gezielten Vergleich der ermittelten Daten. Eine Übersicht aller gemessenen Dissoziationskonstanten gibt Tabelle 8.

Wie schon in der Vergangenheit für verschiedene Lipocaline gezeigt werden konnte, ergab sich für die meisten Vertreter eine Affinität zu Retinoiden. Bemerkenswert war dabei die hohe Affinität der PGDS zu Retinol und Retinsäure, was in Einklang mit publizierten Daten für das Analogon aus der Ratte steht (Tanaka *et al.*, 1997). ApoD bindet Retinol überraschenderweise

mit hoher Affinität, was bisher nicht bekannt war, zeigt aber keine starke Bindung von Retinsäure.

Für die beiden Modell-Liganden ANS und DAUDA ergaben sich recht unterschiedliche Ergebnisse. Das einzige Lipocalin mit hoher Affinität zu ANS war AGP. Hier offenbart ein Blick in die aufgeklärte Kristallstruktur eine durchaus sterisch geeignete und hydrophobe Bindungstasche für das Ringsystem des ANS. Ob allerdings eine zweite niederaffine Bindestelle für ANS außerhalb der β -Fass-Struktur in allen humanen Lipocalinen existiert, ist zu diskutieren. Mithilfe des Fettsäureanalogons DAUDA ließ sich die Grundtendenz der Lipocaline, Lipide zu binden, bestätigen. Die stärksten Affinitäten zu DAUDA zeigten PGDS und ApoD, wobei für ApoD die Bindung einer Fettsäure (Arachidonsäure) bereits gezeigt werden konnte (Vogt & Skerra, 2001). Für OBP und Tlc wurde DAUDA ebenfalls bereits für Verdrängungsexperimente mit anderen Liganden verwendet (Gasymov *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2002). Interessanterweise kann RBP als einziges Lipocalin keinen dieser beiden Modell-Liganden binden. Dies lässt sich durch seine Transportfunktion für Retinol und die passgenaue Bindungstasche für dieses Molekül erklären.

Lipocalin	Retinsäure K_D [μ M]	Retinol K_D [μ M]	ANS K_D [μ M]	DAUDA K_D [μ M]
AGP	$3,85 \pm 0,05$	$0,52 \pm 0,14$	$1,07 \pm 0,06$	$1,07 \pm 0,03$
ApoD	$2,64 \pm 0,14$	$0,08 \pm 0,05$	$5,79 \pm 0,74$	$0,54 \pm 0,09$
C8 γ	$3,09 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,05$	$9,32 \pm 0,42$	$3,09 \pm 0,16$
GLY	$5,21 \pm 0,13$	$2,22 \pm 0,58$	$3,00 \pm 0,39$	n. b.
α 1m	$1,67 \pm 0,07$	$2,40 \pm 0,40$	$7,75 \pm 0,35$	$1,12 \pm 0,14$
NGAL	$5,58 \pm 0,23$	n. b.	$6,79 \pm 0,20$	n. b.
OBP	$1,80 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,11$	$6,07 \pm 0,45$	$4,05 \pm 0,10$
PGDS	$0,29 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,05$	$9,66 \pm 0,48$	$0,39 \pm 0,04$
RBP	$0,18 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,05$	n. b.	n. b.
Tlc	$2,17 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,09$	$10,94 \pm 0,44$	$1,64 \pm 0,11$
BBP	$3,55 \pm 0,03$	$0,39 \pm 0,12$	$9,04 \pm 0,36$	$6,69 \pm 0,12$

Tabelle 8: Affinitäten der zehn humanen Lipocaline für vier unterschiedliche Liganden. Proteinlösungen von 1 μ M wurden mit den entsprechenden Liganden titriert. Angegeben sind die aus den gemessenen Titrationskurven berechneten Dissoziationskonstanten (K_D) mit Angabe des Fehlers. „n. b.“: nicht bestimmt (im Falle der Ligandenfluoreszenz-Titration wurde kein K_D -Wert bestimmt, wenn die Fluoreszenz der Mischung von Protein und Ligand am Endpunkt der Titration weniger als 50 % über der intrinsischen Fluoreszenz des Liganden allein lag).

3.3 Bakterielle Produktion der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4

3.3.1 Produktion des CTLA4 in monomerer Form (mCTLA4)

3.3.1.1 Klonierung und Expression mit pASK75-strepII

Um die funktionelle Bildung der beiden Disulfidbrücken der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4 zu gewährleisten, wurde zunächst die gleiche Expressionsstrategie wie bei AGP gewählt. Das Plasmid pASK75-strepII (Voss & Skerra, 1997) erlaubt mittels der kodierten OmpA-Signalsequenz den Transport des rekombinanten Proteins in das oxidierende Milieu des Periplasmas von *E. coli*. Die C-terminale Fusion mit dem *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) ermöglicht eine einfache Reinigung des rekombinanten Proteins.

Zur bakteriellen Produktion der extrazellulären Domäne wurde der Aminosäureabschnitt Gln4 bis Val116 der maturen Sequenz (Swiss-Prot: P16410) gewählt. Der nachfolgende Cysteinrest 122 verbindet beide Monomere durch eine Disulfidbrücke. Durch die Verkürzung der klonierten Sequenz sollte daher die Produktion der Domäne in monomerer Form (mCTLA4) gewährleistet sein.

Die beschriebene Gensequenz wurde mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares CTLA4-1 / CTLA4-2 und einer cDNA-Präparation humaner CD19⁺-Zellen (von H. Zander, AG Prof. Skerra) amplifiziert. Nach Phosphorylierung und Reinigung des PCR-Fragmentes wurde dieses in den mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *Eco47III* geschnittenen Vektor pASK75-strepII ligiert. Aus jeweils 6 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* analysiert. Zwei positive Klone wurden anschließend zur Ermittlung der richtigen Orientierung der inserierten Sequenz mit den Endonukleasen *XbaI* und *Eco47III* verdaut. Die Kontrolle eines positiven Klones erfolgte abschließend durch Sequenzierung der Plasmid-DNA mit den Primern D20 und PR1. Das so generierte Expressionsplasmid wurde als pCTLA4-1 bezeichnet (Abbildung 19).

Die bakterielle Produktion des monomeren CTLA4 erfolgte im 2 L Maßstab bei 22°C in dem *E. coli* Stamm JM83 wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben. Nach dreistündiger Induktion mit 200 µg/L aTc wurde die Kultur geerntet (OD₅₅₀ zum Zeitpunkt der Ernte ~1,4), die periplasmatische Proteinfraction präpariert, das rekombinante Protein durch Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (ohne Abbildung). Bei Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau konnte weder in den Elutionsfraktionen noch in Periplasmaextrakt oder Gesamtzellaufschluss eine entsprechende Proteinbande (M_w mCTLA4: 13,3 kDa) nachgewiesen werden. Zwecks Erhöhung der Empfindlichkeit wurde

anschließend ein Western Blot mit Detektion des C-terminalen *Strep*-tag II durch Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Abschnitt 2.4.6) durchgeführt. Der Western Blot zeigte im Gesamtzellaufschluss nach dreistündiger Induktion das Auftreten zweier Proteinbanden entsprechender Größe, die auf unprozessiertes CTLA4 in Fusion mit der OmpA Signalsequenz und prozessiertes CTLA4 im Verhältnis von ungefähr 80 zu 20 hinwies. In der periplasmatischen Fraktion konnte die prozessierte CTLA4-Bande nur mit minimaler Intensität detektiert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass mit dem benutzten DNA-Konstrukt keine ausreichende Sekretion des Genproduktes stattfand.

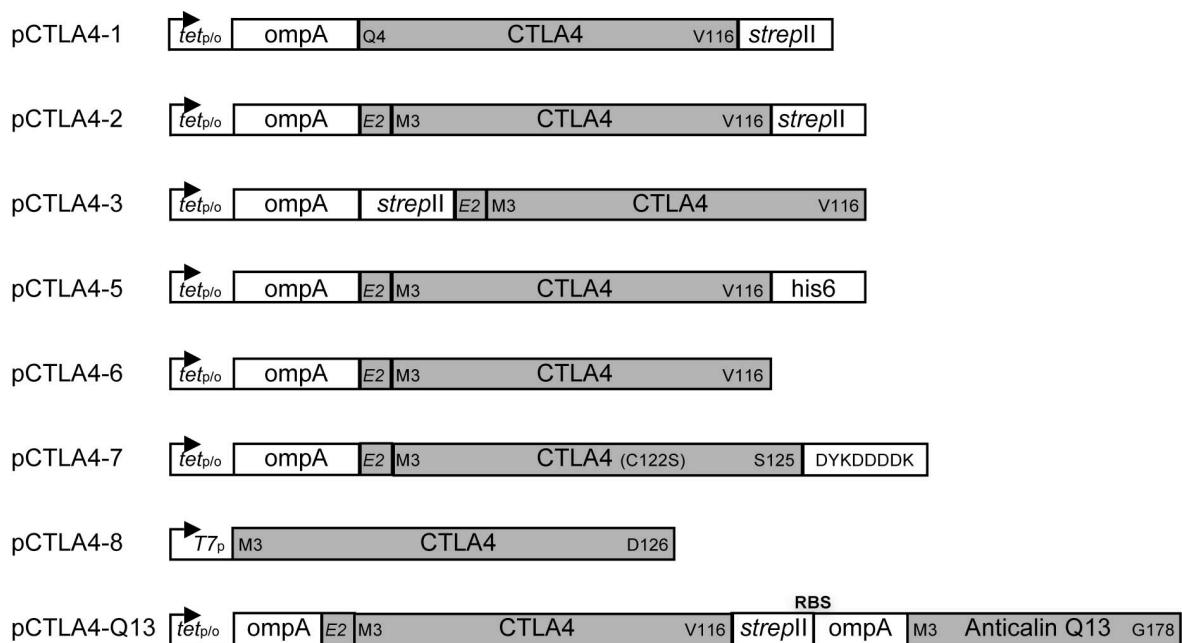


Abbildung 19: Übersicht über die Expressionskonstrukte zur bakteriellen Produktion von CTLA4. Dargestellt sind die Expressionskassetten der im Text beschriebenen Plasmide mit den entsprechenden Promotorregionen. Die Strukturgene sind in grau hervorgehoben und jeweils die erste und die letzte Aminosäure bezeichnet. ompA: Signalsequenz; E2: eingeführter Glutaminsäurerest am N-Terminus; *strepII*: *Strep*-Tag II; his6: His-Tag; RBS: Ribosomenbindestelle.

3.3.1.2 N-terminale Modifikation des Expressionskonstruktes

Limitierende Faktoren für die periplasmatische Sekretion von Proteinen in *E. coli* sind neben der Expressionsrate eine ausreichende Funktionalität des SecA-abhängigen Transportweges sowie der Signalpeptidase. Die Effizienz dieser Signalpeptidase lässt sich durch die Wahl der Signalsequenz und der ihr folgenden Aminosäuren beeinflussen. Es wurde beobachtet, dass neutrale und insbesondere negativ geladene Aminosäuren stromabwärts der OmpA-Signalsequenz die Translokation extrem begünstigen (Geller *et al.*, 1993). Aus diesem Grund

wurde eine Modifikation am N-terminalen Ende des Expressionskonstruktes vorgenommen. Die entsprechende Sequenz (Glu5 - Val116) wurde um zwei Aminosäuren verlängert (Met3 und His4) und zusätzlich auf die OmpA Sequenz folgend ein negativ geladener Glutaminsäure-Rest (E2) eingeführt.

Die Modifikation erfolgte mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares CTLA4-2/CTLA4-3 und des Plasmids pCTLA4-1 mit erneuter Klonierung auf pASK75-strepII (analog Abschnitt 3.3.1.1). Nach Kontrolle durch Sequenzierung wurde das so generierte Expressionsplasmid als pCTLA4-2 bezeichnet. Parallel dazu wurde ein weiteres Plasmid konstruiert, welches die gleiche Gensequenz (Met3 - Val116) enthielt, nun allerdings mit N-terminaler Fusion des *Strep*-tag II. Das *Strep*-tag II lieferte in diesem Fall einen schon bekannten und in der Praxis erprobten Abschnitt direkt in Verbindung mit der OmpA-Signalsequenz. Als Vektor diente dabei pASK-IBA4, welcher mit den Restriktionsenzymen *EheI* und *HindIII* geschnitten worden war. Das mittels PCR unter Verwendung des Primerpaares CTLA4-4 / CTLA4-5 und pCTLA4-1 amplifizierte DNA-Fragment wurde mit diesen Enzymen geschnitten und nach Reinigung mit dem Vektor ligiert. Die Analyse erfolgte durch Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA mit *EheI* und *HindIII*. Ein positiver Klon wurde durch Sequenzierung mit den Primern D20 und PR1 untersucht und das Plasmid als pCTLA4-3 bezeichnet (Abbildung 19).

Mit beiden Plasmiden wurden Expressionsversuche bei 22 °C im 2 L Schüttelkolben mit *E. coli* JM83 durchgeführt (Abschnitt 2.3.1.1). Nach dreistündiger Induktion mit 200 µg/L aTc wurden die Kulturen geerntet (OD₅₅₀ zum Zeitpunkt der Ernte ~1,4 für beide Plasmide), die periplasmatische Proteinfraction präpariert, die rekombinanten Proteine durch Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 20). Die Gele zeigten für beide Versuche eine prominente Proteinbande bei 14,4 kDa für die monomere extrazelluläre Domäne des CTLA4 (M_w mCTLA4: 13,3 kDa). Allerdings war bei Verwendung von pCTLA4-3 das Auftreten einer Verunreinigung bei etwa 18 kDa zu beobachten. Die Ausbeute an Protein war für pCTLA4-2 (C-terminales *Strep*-tag II) mit 160 µg je Liter Kultur mehr als doppelt so hoch wie für pCTLA4-3 (N-terminales *Strep*-tag II). Aufgrund der höheren Ausbeute und Reinheit wurde entschieden, pCTLA4-2 für Proteinpräparation in größerem Maßstab zu verwenden.

Eine Fermentation im 8 L Maßstab unter Verwendung des *E. coli* Stamms W3110 und dem Plasmid pCTLA4-2 lieferte nach Streptavidin-Affinitätschromatographie eine Gesamtausbeute von 17,7 mg an gereinigtem mCTLA4 mit C-terminalem *Strep*-tag II.

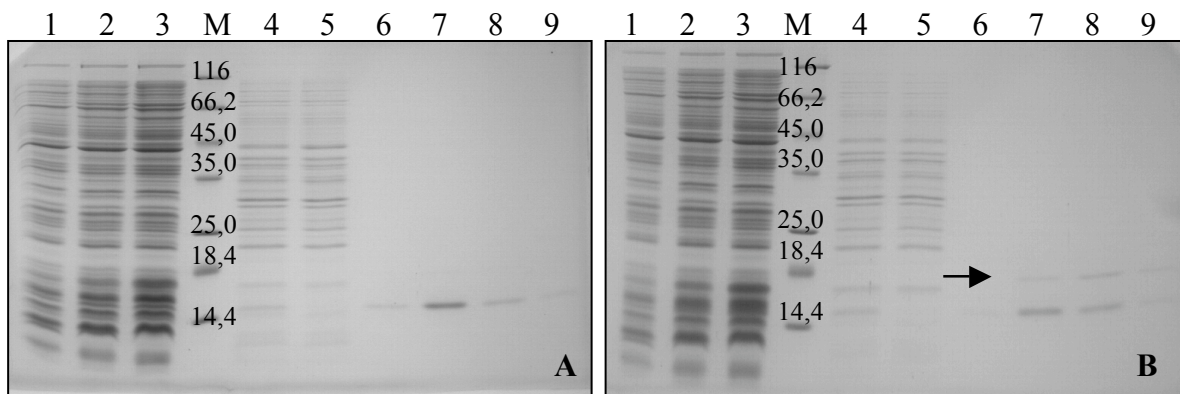


Abbildung 20: Expression und Reinigung von monomerem CTLA4 mit den Plasmiden pCTLA4-2 [A] und pCTLA4-3 [B]. Reduzierende 15 % SDS-PAGE von entsprechenden Proben. Spuren 1-3: Gesamtzellauflösungen nach 1, 2 und 3 h Induktion; Spur 4: periplasmatische Fraktion nach 3 h Induktion; Spur 5: Durchlauf der Streptavidinsäule; Spuren 6-9: Elutionsfraktionen; M: Proteinmarker, Größen in kDa. pCTLA4-2 trägt ein N-terminales und pCTLA4-3 ein C-terminales *Strep*-tag II. Das SDS-Gel mit pCTLA4-3 [B] zeigt in den Elutionsfraktionen eine Verunreinigung bei etwa 18 kDa (Pfeil).

3.3.1.3 Aggregationsverhalten von mCTLA4 mit *Strep*-tag II

Gelfiltrationsexperimente mit dem gereinigten Protein zeigten eine deutliche Aggregations-tendenz der produzierten extrazellulären Domäne in dem verwendeten Puffersystem (SA-Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA). Diese allgemeine Tendenz war auch schon in der Vergangenheit beschrieben worden (Cox *et al.*, 1999). Die Aggregation erhöhte sich bei Konzentrierung der Proben mit Ultrafiltrationseinheiten erheblich. Eine Lagerung des Proteins über mehrere Tage bei 4 °C war nicht möglich (Komplettverlust des Proteins). Zur Optimierung der Bedingungen wurde ein Puffersystem mit 20 mM Na-P_i bei pH 7,5 mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen (0, 10, 50, 100 150, 200, 500 mM NaCl) eingesetzt, 25 µL einer 400 µg/mL Lösung des mCTLA4 direkt nach Streptavidin-Affinitätschromatographie mit 175 µL des entsprechenden Puffers vermischt und über Nacht bei 4 °C gegen 50 mL dieses Puffers dialysiert. Die Analyse des Aggregationszustandes erfolgte am nächsten Tag mittels Gelfiltration unter Verwendung der analytischen Säule S75 HR10/30 in den jeweiligen Pufferbedingungen. Dazu wurde das Verhältnis zwischen Monomerpeak und Aggregationspeak (der Aggregationspeak erschien beim Ausschlussvolumen der Säule) bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten einen Abfall der Aggregationstendenz mit steigender Salzkonzentration bis zu 100 mM NaCl. Hierbei stieg das Verhältnis Monomerpeak / Aggregationspeak von 4 auf 35. Bei 150 mM Salz war wiederum ein Abfall auf 4, bei 200 mM auf 0,6 und bei 500 mM vollständige Aggregation zu beobachten. Demnach wurden nachfolgende Experimente (präparative Gelfiltrationen,

Bildung und Analyse des Proteinkomplexes Anticalin/mCTLA4, Kristallisation) stets unter Verwendung einer Salzkonzentration von 100 mM NaCl durchgeführt.

3.3.1.4 mCTLA4 mit His₆-tag

Um zu versuchen, die beschriebenen Aggregationsprobleme zu minimieren, wurde das C-terminale *Strep*-tag II durch ein His₆-tag ersetzt. Hierzu wurde die Sequenz (EM3 - V116) des mCTLA4 mithilfe der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Eco*47III aus dem Plasmid pCTLA4-2 herausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pApoD27 inseriert. Dabei wurde die auf diesen Vektor klonierte Sequenz des ApoD durch die des mCTLA4 ersetzt, welche auf diese Weise C-terminal mit dem His₆-tag des Vektors fusioniert wurde. Nach Isolierung der Plasmid-DNA von 10 Klonen wurden diese mit *Xba*I und *Eco*47III geschnitten, ein positiver Klon sequenziert und das neu konstruierte Expressionsplasmid als pCTLA4-5 bezeichnet (Abbildung 19).

Eine Fermentation im 8 L Maßstab in *E. coli* W3110 (Abschnitt 2.3.1.2) lieferte 4 mg rekombinantes mCTLA4-His₆ nach Metallchelate-Affinitätschromatographie. Durch Einsatz des Helferplasmides pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) und dem Wechsel des Expressionsstammes zu *E. coli* KS272 konnte die Ausbeute auf 15 mg annähernd vervierfacht werden. Die anschließende Analyse des Proteins durch Gelfiltration zeigte zunächst eine komplette Aggregation des gereinigten Proteins. Diese höchstwahrscheinlich metallinduzierte Aggregation ließ sich nach der zweiten, optimierten Fermentation durch sofortige Zugabe von 5 mM EDTA zum Eluat annähernd komplett unterdrücken.

Die Aggregationstendenz des mCTLA4-His₆ in Gegenwart von 100 mM NaCl war verglichen mit der Variante mCTLA4-*Strep*II wesentlich geringer. Rekombinantes Protein mit His₆-tag war bis zu 10 Tage bei 4° C lagerfähig und für weitere Experimente (präparative Gelfiltrationen, Bildung und Analyse des Proteinkomplexes Anticalin/mCTLA4, Kristallisation) gut geeignet.

3.3.1.5 mCTLA4 ohne Reinigungs-Anhängsel

Die Kristallisation von Makromolekülen mit flexiblen Bereichen ist meist erschwert, da die Bildung eines regelmäßigen Kristallgitters durch die erhöhte Anzahl an Freiheitsgraden energetisch benachteiligt ist. Daher wurde versucht, das mCTLA4 ohne flexibles Peptid-Anhängsel zu produzieren und zu reinigen.

Mithilfe des Primerpaares CTLA4-3 / CTLA-6 wurde die Sequenz EM3 - V116 durch PCR von dem Plasmid pCTLA4-2 amplifiziert und in den mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *Eco47III* geschnittenen Vektor pASK75-strepII inseriert. Dabei wurde durch die verwendeten Primer ein C-terminales Stopp-Codon vor der Sequenz des auf dem Vektor kodierten *Strep-tag II* eingeführt. Plasmid-DNA von 10 Klonen wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NcoI* und *HindIII* analysiert. Das neu konstruierte Expressionplasmid wurde als pCTLA4-6 bezeichnet (Abbildung 19).

Das mCTLA4 wurde durch Fermentation im 8 L Maßstab mit *E. coli* KS272 und Verwendung des Helferplasmids pTUM4 produziert. Vorhergehende Experimente in der 2 L Schüttelkultur ohne pTUM4 hatten eine geringe Expressionseffizienz und eine Tendenz der Zellen zur Lyse gezeigt. Zur Reinigung wurde ein Anionentauscher (Abschnitt 2.4.2.4) verwendet. Aufgrund des *pI* von 4,5 für mCTLA4 wurde ein Chromatographiepuffer mit pH 8,0 gewählt und der periplasmatische Extrakt über Nacht gegen 25 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert. Zur Optimierung der Elutionsbedingungen wurden verschiedene Konzentrationsgradienten von NaCl ausprobiert. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen wie auch des periplasmatischen Extraktes mittels SDS-PAGE zeigte nur geringe Mengen des mCTLA4. Zur Identifizierung der gesuchten mCTLA4-Proteinbande wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurde ein Maus-Antikörper gegen humanes CTLA4 und zur Detektion ein Anti-Maus-AP-Konjugat verwendet. Die Proteinbande des rekombinanten mCTLA4 konnte auf diese Weise eindeutig identifiziert werden. Aufgrund der unzureichenden Proteinausbeute (< 10 µg je Liter Kultur) wurde beschlossen, keine weiteren Optimierungsversuche in Hinsicht auf Ausbeute und Reinheit zu unternehmen.

3.3.1.6 mCTLA4 mit C-terminalem Oktapeptid

Die publizierte Kristallstruktur des nativen Komplexes aus CTLA4 und B7.1 (Stamper *et al.*, 2001) enthält die Sequenz M3 - S125 der extrazellulären Domäne des CTLA4. Zur Unterdrückung der kovalenten Dimerisierung wurde Cystein 122 durch Serin ersetzt. C-terminal folgt ein Oktapeptid (DYKDDDDK) mit einer Enterokinase-Schnittstelle, welche ursprünglich mit einem IgG1-Fc-Fragment fusioniert war. Das Antikörperfragment wurde nach Expression in CHO-Zellen durch Enterokinase abgespalten, bevor der Komplex mit der extrazellulären Domäne des B7.1 kristallisiert wurde. Zur Stabilisierung des mCTLA4 wurde hier versucht, das beschriebene Konstrukt (M3 - S125; C122S) in *E. coli* periplasmatisch ohne die IgG-Domäne und mit dem C-terminalen Oktapeptid zu produzieren.

Hierzu erfolgte eine Amplifizierung des Strukturgens mittels PCR aus pCTLA4-2 mit den Primern CTLA4-3 und CTLA4-7. Der Primer CTLA4-7 (zur Einführung des Oktapeptids) wurde aufgrund seiner Länge von 73 bp vor der PCR durch PAGE (Abschnitt 2.2.4.3) gereinigt. Das amplifizierte Fragment wurde isoliert und in den mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *Eco47III* geschnittenen Vektor pASK75-strepII inseriert. Die Plasmid-DNA von 10 Klonen wurde unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NcoI* und *HindIII* analysiert. Das neu konstruierte Expressionplasmid wurde als pCTLA4-7 bezeichnet (Abbildung 19).

Nach periplasmatischer Produktion im 2 L Schüttelkolben in *E. coli* JM83 wurde versucht, das rekombinante Protein durch Anionenaustauschchromatographie zu reinigen. Aufgrund des niedrigen *pI* von 4,06 wurde die Reinigung mit 25 mM BisTris/HCl-Puffer bei pH 6,0 durchgeführt. Zur Elution wurde ein Gradient von 0 - 0,5 M NaCl eingesetzt und die Säule anschließend mit 2M NaCl gewaschen. Dabei waren sämtliche eluierten Proteinmengen sehr gering. Die Analyse des periplasmatischen Extraktes, der gesammelten Fraktionen und des finalen Waschvorgangs durch SDS-PAGE ergab keine deutliche Zuordnung der Proteinbanden. Die Identifizierung mittels Western Blot (analog Abschnitt 3.3.1.5) zeigte keine Signale für CTLA4. Daraus ließ sich schließen, dass entweder keine ausreichende Expression des mCTLA4 mit dem Oktapeptid erfolgte oder dass das fusionierte Peptid die Bindung des Antikörpers an sein Epitop verhinderte. Weitere Versuche der Expression des mCTLA4 mit Oktapeptid wurden nicht unternommen.

3.3.2 Produktion des CTLA4 in dimerer Form (dCTLA4)

Bei genauerer Betrachtung der Kontaktflächen zwischen den beiden Monomeren in der nativen dimeren Struktur der extrazellulären Domäne des CTLA4 (im Komplex mit B7.2, Schwartz *et al.*, 2001) ergaben sich Hinweise auf die beschriebene Aggregationstendenz des mCTLA4. Folgende Reste einer Kette nehmen an der Interaktion der beiden Monomere teil: Val10, Leu12, Ala13, Ser15, Tyr115, Val116, Ile117, Asp118, Pro119, Glu120. Zusätzlich ist die verbindende Disulfidbrücke über Cys122 zu nennen. Diese relativ hydrophobe Kontaktfläche ist im Monomer zum Lösungsmittel exponiert und dürfte daher für die Aggregation verantwortlich sein. Zur Stabilisierung einer löslichen Form und zur Bereitstellung einer möglichst natürlichen Zielstruktur für die Kristallisation mit dem Anticalin wurde die bis in den Bereich der Disulfidbindung verlängerte, extrazelluläre Domäne des CTLA4 (Met3 - Asp126) intrazellulär in *E. coli* produziert. Das Dimer (dCTLA4) wurde anschließend durch Rückfaltung aus den erhaltenen Einschlusskörpern mit nachfolgender Anionenaustauschchromatographie gewonnen.

3.3.2.1 Klonierung auf pSA1

Der Vektor pSA1 (Schmidt & Skerra, 1994) trägt die Sequenz für Streptavidin unter Kontrolle des T7-Promotors zur Überexpression im Cytoplasma von *E. coli*. Mit dem Primerpaar CTLA-8 / CTLA4-9 erfolgte eine Amplifizierung der Sequenz von M3 - D126 aus pCTLA4-2. Dabei diente der Primer CTLA4-9 der benötigten Verlängerung des C-terminalen Endes. Aufgrund seiner Länge von 62 bp wurde dieser Primer vor Gebrauch mittels PAGE (Abschnitt 2.2.4.3) gereinigt. Aus dem Plasmid pSA1 wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *NdeI* und *HindIII* die kodierende Sequenz für Streptavidin entfernt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten, gereinigt und mit dem geschnittenen Plasmid ligiert. Aus 8 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit *NdeI* und *HindIII* kontrolliert. Ein positiver Klon wurde mit den Primern SAM5 und pRSetBack sequenziert und das erhaltene Expressionsplasmid als pCTLA4-8 bezeichnet (Abbildung 19).

3.3.2.2 Expression und Rückfaltung von dCTLA4

Das dimere CTLA4 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Expressionsvektor pCTLA4-8 unter Verwendung des Hilfsplasmides pLysE (Studier, 1991) produziert. Die Rückfaltung konnte durch Adaptation eines publizierten Protokolls (Cox *et al.*, 1999) durchgeführt werden. Die Zellen wurden mit beiden Plasmiden kotransformiert und im 2 L Schüttelkolben in Gegenwart von Ampicillin und Chloramphenicol kultiviert (Abschnitt 2.3.1). Bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5 wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG die Genexpression induziert. Nach 16 Stunden wurden die Kulturen geerntet, die Zellen in 20 mL 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 25 mM NaCl, 1 mM DTT gewaschen, in der *French Press* aufgeschlossen und die Einschlusskörper durch Zentrifugation isoliert. Nach deren Solubilisierung in 6 M Guanidin/HCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 6 mM DTT über Nacht erfolgte die Rückfaltung des dCTLA4 wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Die schnelle Verdünnung (1:10) der Proteinlösung in 0,6 M Guanidin/HCl, 50 mM Tris HCl pH 9,5, 0,3 mM DTT und die anschließende dreitägige Oxidation der Cysteinreste durch Luftsauerstoff führte zur korrekten Ausbildung der beiden intramolekularen Disulfidbindungen und der intermolekularen Disulfidbrücke, was mittels reduzierender und nicht reduzierender SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.2.3). Um das Guanidin zu entfernen und damit die folgende Reinigung durch Ionenaustauschchromatographie zu ermöglichen, wurde der Rückfaltungsansatz abschließend zweimal gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert.

3.3.2.3 Reinigung des dCTLA4

Nach Zentrifugation der dialysierten Proteinprobe wurde der gesamte Ansatz auf eine Anionentauschersäule (Resource Q) gebracht und mithilfe eines Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl eluiert. Abbildung 21 zeigt die selektive Elution des dimeren CTLA4 bei einer Konzentration von etwa 0,3 M NaCl. Die Analyse des Eluates mittels nicht reduzierender SDS-PAGE offenbarte ein Protein mit einer apparenten Molmasse von etwa 24 kDa (M_w dCTLA4: 26,6 kDa).

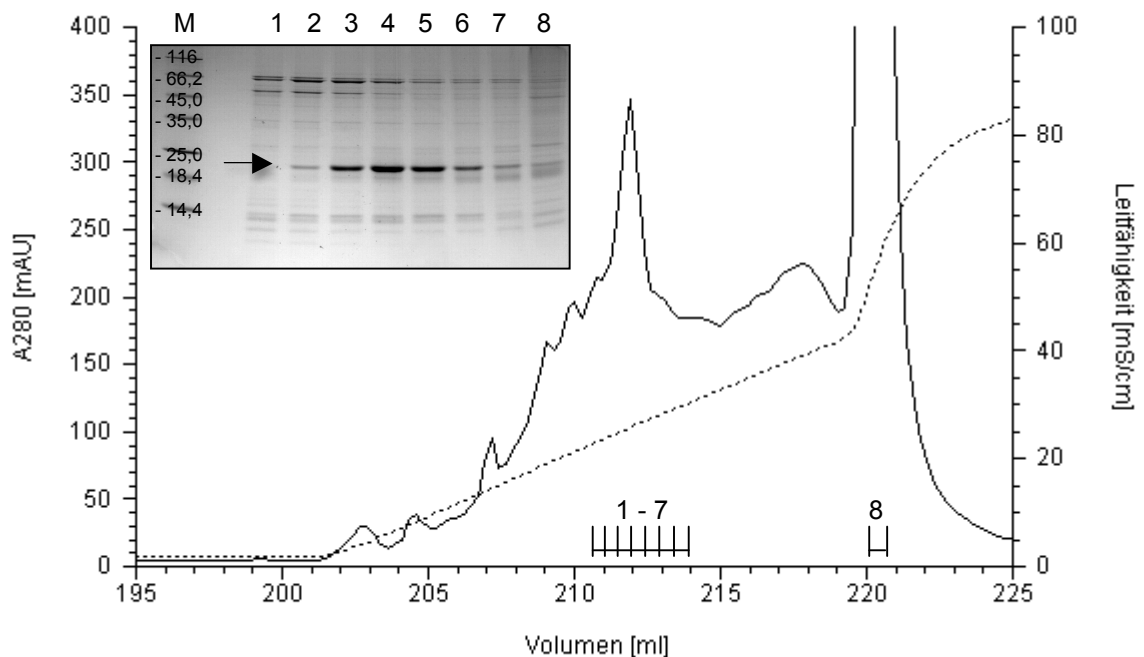


Abbildung 21: Reinigung des dCTLA4 durch Anionenaustauschchromatographie. 150 mL Proteinextrakt aus 8 L Schüttelkultur (Rückfaltungsansatz) in 20 mM Tris HCl pH 7,0 wurden auf eine 1 mL Resource Q Säule gegeben und mit 0 - 50 % 20 mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 M NaCl eluiert. Fraktionen 1 - 8 wurden durch 15 % SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Proteinbande des dCTLA4 ist mit einem Pfeil markiert. M: Proteinmarker in kDa.

Zur genaueren Analyse wurde eine analytische Gelfiltration der vereinigten Fraktionen 2 - 6 mit anschließender SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abbildung 22). Das erhaltene Gelfiltrationsprofil zeigte einen dem dimeren CTLA4 entsprechenden Proteinpeak mit einem Elutionsvolumen von 10,24 mL und einer apparenten Molmasse von 27,9 kDa (M_w dCTLA4: 26,6 kDa). Auf den SDS-Gelen war zu beobachten, dass die vorherrschende Proteinbande von etwa 25 kDa bei Zugabe von Mercaptoethanol verschwand und eine neue Bande bei etwa 14 kDa erschien (Vergleich

beider Gele in Abbildung 22). Dies deutete auf die Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücke hin, welche das Dimer verbindet. Die neu erscheinende Proteinbande entsprach dem monomeren CTLA4.

Somit konnte nach erfolgreicher Rückfaltung des dimeren Proteins mit den zwei beschriebenen Reinigungsschritten die dimere extrazelluläre Domäne des CTLA4 in ausreichender Menge und Reinheit (~ 1 mg gereinigtes Protein je Liter Kultur) gewonnen werden und erschien für Versuche zur Bildung eines Proteinkomplexes mit einem Anticalin vielversprechend. Dabei sollte die Komplexbildung als weiterer Reinigungsschritt dienen (siehe Abschnitt 3.4.4).

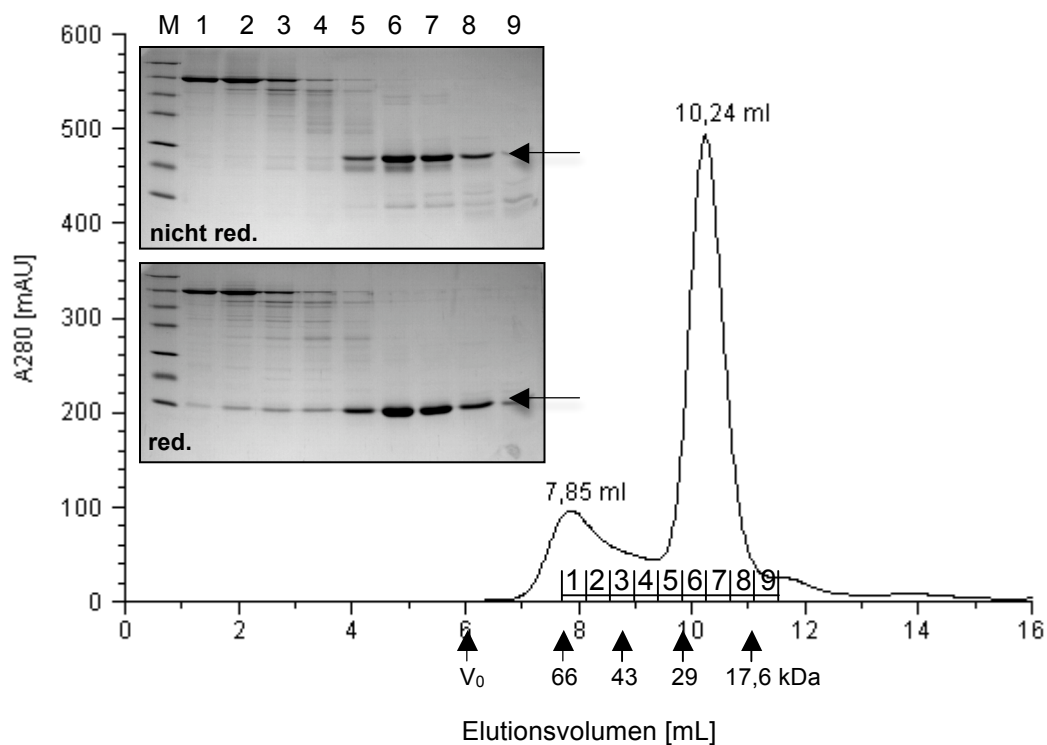


Abbildung 22: Analytische Gelfiltration des rückgefalteten dCTLA4. Fraktionen 2 - 6 der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie (Abbildung 21) wurden vereinigt und unter Einsatz der Säule S75 HR10/30 analysiert. Die unten angegebenen Molekulargewichte entstammen Läufen mit Proteinen entsprechender Größe. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen unter nicht reduzierenden (oben) und reduzierenden (unten) Bedingungen. M: Proteinmarker wie in Abbildung 21.

3.4 Komplexbildung und Kristallisationsversuche

3.4.1 Konstruktion eines Koexpressionsvektors für mCTLA4 und einem Anticalin

Es wurde zunächst die Strategie verfolgt, die beiden Komponenten simultan im Periplasma von *E. coli* zu produzieren und den gebildeten Proteinkomplex dann zu isolieren. Hierzu wurde ein bicistronisches Operon aus den beiden kodierenden Sequenzen für CTLA4 und das Anticalin (Q13) unter gemeinsamer Kontrolle des *tet*-Promotors konstruiert (Abbildung 19). Beide kodierenden Gen-Sequenzen trugen zur Sekretion eine N-terminale OmpA-Signalsequenz. Die Sequenz des CTLA4 enthielt zusätzlich C-terminal das *Strep*-tag II, über welches sich der Komplex durch Affinitätschromatographie isolieren lassen sollte.

Zunächst wurde der vorhandene Vektor pCTLA4-2 mit den Restriktionsenzymen *Bst*BI und *Hind*III geschnitten und das größere Fragment mittels Agarosegelelektrophorese isoliert. Mithilfe der Primer CTLA4Q13-1 und CTLA4Q13-2 wurde die Sequenz der Anticalin-invariante Q13 aus dem Vektor phNGAL37-Q13 (Pieris AG) amplifiziert. Dabei diente der Primer CTLA4Q13-1 der Einführung des C-terminalen *Strep*-tag II für das vorangehende CTLA4 sowie einer weiteren Ribosomenbindestelle und einer Schnittstelle für *Bst*BI. Der Primer CTLA4Q13-2 führte eine *Bsm*BI-Erkennungsstelle mit einem *Hind*III-kompatiblen Überhang ein. Nach Schnitt des PCR-Fragments mit den Restriktionsenzymen *Bst*BI und *Bsm*BI wurde dieses mit dem geschnittenen Vektor ligiert. Die erfolgreiche Konstruktion wurde mittels Sequenzierung kontrolliert und das so erhaltene Plasmid als pCTLA4-Q13 bezeichnet.

Expressionsversuche wurden in *E. coli* JM83, wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben, durchgeführt. Nach Reinigung aus dem periplasmatischen Extrakt durch Affinitätschromatographie ließen sich unterschiedliche Proteinbanden im Eluat beobachten (Analyse mit SDS-PAGE, Abbildung 23). Die prominenteste Bande konnte dem monomeren CTLA4 zugeordnet werden. Für das Anticalin zeigten sich bei höherer Molmasse drei Banden mit leicht unterschiedlichen Molekulargewichten, deren Intensität aber wesentlich geringer war. Da das Anticalin kein *Strep*-tag II trug, ließ sich somit auf eine Koreinigung des Anticalins und damit die Bildung des Komplexes im Periplasma schließen. Aufgrund der sehr schlechten Ausbeute an Komplex sowie der Inhomogenität des Anticalinpartners wurde diese Expressionsstrategie nicht weiter verfolgt.

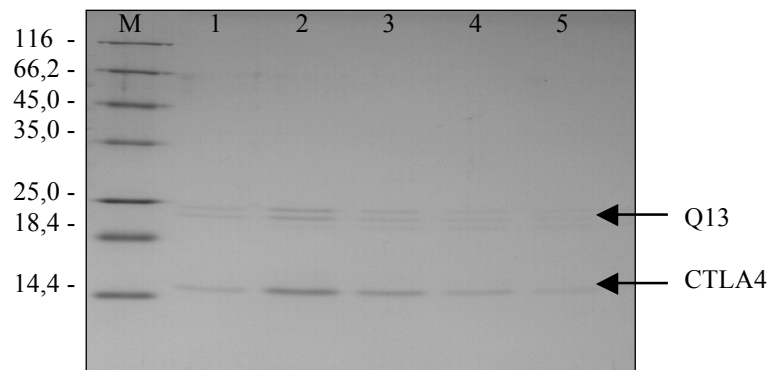


Abbildung 23: Koexpression von CTLA4 und Anticalin Q13 mit anschließender Reinigung des Proteinkomplexes mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie. Reduzierende 15 % SDS-PAGE der Elutionsfraktionen (Spuren 1-5) nach der Chromatographie; M: Proteinmarker, Größen in kDa. Die Komplexpartner CTLA4 und Anticalin Q13 sind durch Pfeile markiert, wobei Q13 drei unterschiedliche Proteinbanden zeigt.

3.4.2 Komplexbildung von mCTLA4-StrepII mit dem Anticalin J08

Nach der Produktion des monomeren CTLA4-StrepII im 8 L Fermenter (Abschnitt 3.3.1.2) wurde das gereinigte Protein mit einer Präparation der Variante J08 (Protein mit C-terminalem *Strep*-tag II, Probe bereitgestellt von der Pieris AG) im molaren Verhältnis 1:1 für 10 min bei 4 °C in PBS gemischt. Zur anschließenden Analyse des Proteinkomplexes mittels analytischer Gelfiltration wurde die Säule S75 HR 10/30 mit PBS als Puffer verwendet. Dabei wurden sowohl die Gelfiltrationsprofile der beiden Einzelkomponenten als auch das Profil des Komplexes analysiert. Im Gelfiltrationsprofil für den Komplex waren zusätzlich noch nicht gebundene Fraktionen der beiden Einzelkomponenten sichtbar. Das Mischungsverhältnis wurde deshalb zunächst auf maximale Größe des Komplexpeaks hin optimiert. Danach wurden unter dem optimierten Mischungsverhältnis größere Proteinmengen (mg) gemischt und der Komplex präparativ mittels Gelfiltration gereinigt. Fraktionen des Komplexpeaks wurden nach Analyse durch SDS-PAGE (Abbildung 24) vereinigt und zwecks Kristallisation auf 10 mg/mL konzentriert. Damit wurden Kristallisationsversuche am hängenden Tropfen bei 20 °C und 4 °C unter 240 unterschiedlichen Bedingungen angesetzt. Dies führte zu einer Ausfällung des Proteins in bis zu 90 % der Bedingungen. Daher wurden alle Versuche mit einer niedrigeren Proteinkonzentration von 5 mg/mL wiederholt. Somit ließ sich die Präzipitationstendenz auf etwa 75 % reduzieren. Proteinkomplekxkristalle konnten in allen Ansätzen auch nach längerer Zeit (zwölf Monate) nicht beobachtet werden.

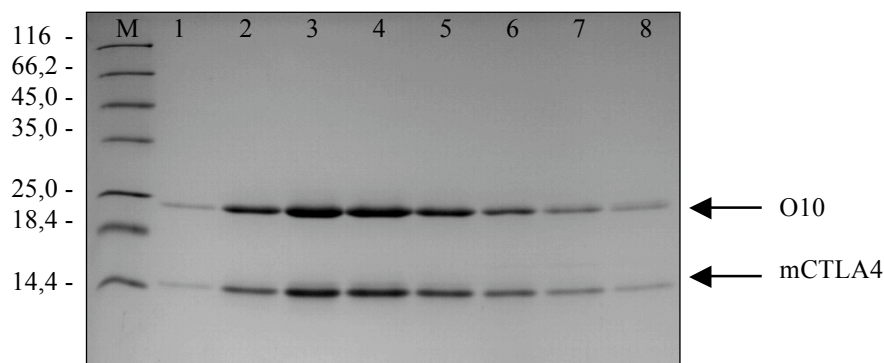


Abbildung 24: Präparative Komplexbildung von mCTLA4-StrepII mit dem Anticalin J08. Reduzierende 15 % SDS-PAGE der Fraktionen des Proteinkomplexes nach Gelfiltration (Spuren 1-8); M: Proteinmarker, Größen in kDa. Die Fraktionen 2-7 wurden vereinigt und zur anschließenden Kristallisation aufkonzentriert.

3.4.3 Komplexbildung des mCTLA4-His₆ mit dem Anticalin O10

Zur Komplexbildung mit dem monomeren CTLA-His₆ stand mittlerweile eine neue und verbesserte Variante des Anticalins (O10) von der Pieris AG zur Verfügung. Diese besaß eine verbesserte Affinität zu CTLA4 und wurde ohne Reinigungsanhängsel eingesetzt.

Das gereinigte mCTLA mit His-Tag (Abschnitt 3.3.1.4) wurde mit einer Präparation der Variante O10 (Protein ohne Tag, #743, bereitgestellt von der Pieris AG) im molaren Verhältnis 1:1 für 10 min bei 4 °C in PBS gemischt. Die anschließende Analyse des Proteinkomplexes mittels analytischer Gelfiltration zeigte ein analoges Bild wie im vorherigen Abschnitt 3.4.2. Nach der Optimierung des Mischungsverhältnisses wurden größere Proteinmengen (mg) gemischt und der Komplex präparativ mittels Gelfiltration isoliert. Fraktionen des Komplexpeaks wurden nach Analyse durch SDS-PAGE vereinigt und zur folgenden Kristallisation auf 5 mg/mL konzentriert. Sodann wurden Kristallisationsversuche im sitzenden Tropfen unter 480 unterschiedlichen Bedingungen (Screens LBS1-5) bei 20 °C und 4 °C mithilfe eines Kristallisationsroboters durchgeführt. In etwa 80 % der Ansätze fiel das Protein sofort aus. Zur Verringerung der Präzipitationstendenz wurden die Ansätze mehrmals unter Veränderung bestimmter Parameter (Proteinkonzentration, Fällungsmittelkonzentration, Tropfenverhältnis) wiederholt. Bessere Bedingungen mit etwa 60 % Ausfällung stellten sich bei Reduzierung der Proteinkonzentration auf 3 mg/mL, Halbierung der Fällungsmittelkonzentration in allen Ansätzen und einem Mischungsverhältnis von 2:1 (0,1 µL Protein und 0,2 µL Fällungsmittel) ein. Proteinkristalle konnten in allen Ansätzen auch hier nach längerer Zeit (sechs Monate) nicht beobachtet werden.

Eine Möglichkeit, die Bildung von amorphem Präzipitat zu reduzieren, bietet die Zugabe von Detergenzien. Im Folgenden wurde ein stabilisierender Effekt bei den Kristallisationsexperimenten unter Zugabe der Detergenzien β -Octylglucosid (β OG) und n-Dodecylmaltosid (nDM) untersucht. Dabei wurden Detergenzkonzentrationen über und unter der kritischen Micellenbildungskonzentration (CMC) gewählt. Zunächst wurde die Stabilität des Proteinkomplexes (O10/mCTLA4-His₆) bei Zugabe des Detergenz mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) gemessen. Die Analyse mit verschiedenen Konzentrationen beider Detergenzien (0,1; 1; 5 % (m/v)) in Kombination mit einer 3 mg/mL Proteinlösung zeigte jedoch keinerlei Beeinträchtigung der Proteinlösung. Es ergab sich jeweils ein Peak bei der erwarteten Partikelgröße des Komplexes. Anschließend wurden zum initialen Test 24 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen mit den genannten Konzentrationen an Detergenz (β OG + nDM) angesetzt. Eine Verringerung der Zahl an Bedingungen mit ausgefälltem Protein unter 60 % konnte damit nicht erreicht werden. Daher wurde darauf verzichtet, mehr Versuche anzusetzen. Proteinkristalle konnten in den 24 angesetzten Tropfen innerhalb von zwölf Monaten nicht beobachtet werden.

3.4.4 Komplexbildung von dCTLA4 mit dem Anticalin O10

Nach erfolgreicher Präparierung des dimeren CTLA4 (Abschnitt 3.3.2) wurde das Protein mit einer Präparation der Variante O10 (Protein ohne Tag, #743, bereitgestellt von der Pieris AG) im molaren Verhältnis 1:2 (dCTLA4/O10) für 10 min bei 4 °C in PBS gemischt. Die anschließende Analyse des Proteinkomplexes erfolgte mittels Gelfiltration (Säule S200 HR 10/30). Abbildung 25 zeigt eine Überlagerung der Gelfiltrationsprofile der beiden Einzelkomponenten (dCTLA4 26,6 kDa; O10 20,2 kDa) und des Komplexes. Das Elutionsvolumen des Komplexes von 14,25 mL (66,9 kDa für dCTLA4 mit 2 gebundenen Molekülen O10) war nahezu identisch mit dem als Eichprotein verwendeten BSA (66 kDa, 14,35 mL). Das SDS-Gel (Abbildung 25, oberes Gel) trennte den Komplex und zeigte zwei entsprechende Proteinbanden mit einem Intensitätsverhältnis von etwa 2:1. Durch Reduktion der Disulfidbrücken (Abbildung 25, unteres Gel) ließ sich das dimere CTLA4 zusätzlich in die monomere Form überführen.

Nachdem das Mischungsverhältnis optimiert worden war (maximale Ausbeute des Komplexpeaks), wurde der Komplex präparativ durch Gelfiltration isoliert (Säule S200 16/60, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl). Fraktionen wurden nach Analyse durch SDS-PAGE vereinigt und zur Kristallisation auf 9 mg/mL konzentriert.

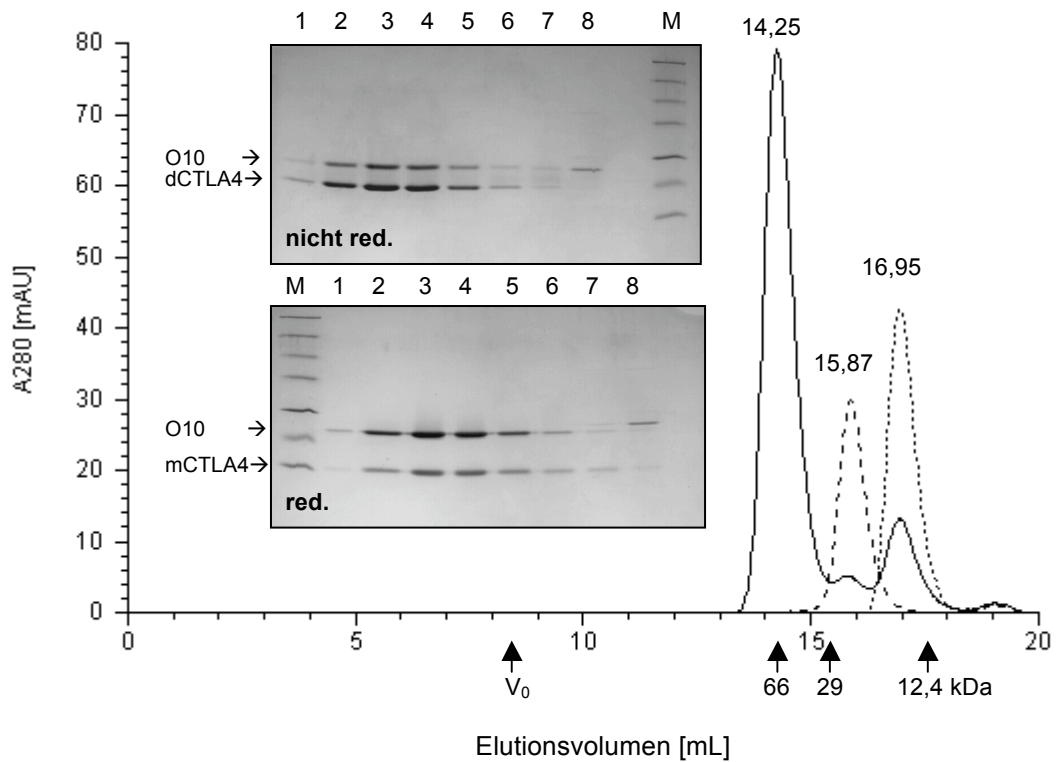


Abbildung 25: Komplexbildung von dCTLA4 mit dem Anticalin O10. Überlagerung der analytischen Gelfiltrationen unter Verwendung der Säule S200 HR10/30 mit dCTLA4 (---), dem Anticalin O10 (···) und dem Proteinkomplex dCTLA4/O10 (—). Die Beschriftung der einzelnen Peaks entspricht dem Elutionsvolumen in mL. Die darunter angegebenen Molekulargewichte entstammen Läufen mit Proteinen entsprechender Größe. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen 1 - 8 des Komplexpeaks unter nicht reduzierenden (oben) und reduzierenden (unten) Bedingungen. M: Proteinmarker wie in Abbildung 24.

3.5 Kristallisation und Strukturlösung von Anticalin O10 und dessen Komplex mit dCTLA4

3.5.1 Kristallisation der Apoform des Anticalins O10

Mit einer Proteinpräparation der Variante O10 (10 mg/mL, Protein ohne Tag, #743, bereitgestellt von der Pieris AG) wurden bei 20 °C mit 1,45 M Ammonium-Sulfat; 0,1 M Na-Cacodylat pH 5,45 nadelförmige Kristalle beobachtet. Erst die Zugabe von 0,1 % (v/v) des Detergenz Anapoe X-405 lieferte größere, streufähige Kristalle mit verbesserter Morphologie (Abbildung 26A). Ein Datensatz (genannt O10_27) bei 100 K wurde an der Messstation 14.1 des BESSY mit einer Auflösung bis 2,0 Å gesammelt.

3.5.2 Kristallisation des O10/dCTLA4-Komplexes

Mithilfe des Kristallisationsroboters wurden mit der Proteinpräparation des Komplexes (Abschnitt 3.4.4) Kristallisationsversuche im sitzenden Tropfen unter 480 unterschiedlichen Bedingungen (Screens LBS1-5) bei 20 °C und 4 °C angesetzt. Dabei wurde ein Volumenverhältnis von Proteinlösung zu Fällungsmittel von 2:1 verwendet, welches bei etwa 30 % der Ansätze zur Ausfällung des Proteins führte. Nach einer Woche wurden bei 20 °C unter folgenden Bedingungen Kristalle beobachtet:

- 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 M HEPES pH 7,5; 0,1 M NaCl
- 1,3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5
- 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05 M Tris/HCl pH 7,5; 0,01 M MgCl_2
- 2,4 M Na-Malonat pH 8,4

Dabei zeigten sich in den $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -haltigen Bedingungen Kristalle in Nadelform, die Malonat-haltige Bedingung enthielt voluminösere, kubische Kristalle. Mit den kubischen Kristallen (gewachsen unter 2,4 M Na-Malonat, pH 8,4) mit einer Größe von etwa 100 x 60 x 60 µm wurden Röntgendiffraktionsexperimente durchgeführt und diese konnten dadurch als Proteinkristalle identifiziert werden. Eine Indizierung ermittelte die trigonale Raumgruppe P3₂21 für den Kristall. Durch Optimierung der Bedingungen (1,4 M Na-Malonat, pH 8,4 bei 20 °C) wurden nach einer Woche größere Kristalle von 400 x 200 x 200 µm Größe erhalten (Abbildung 26B).

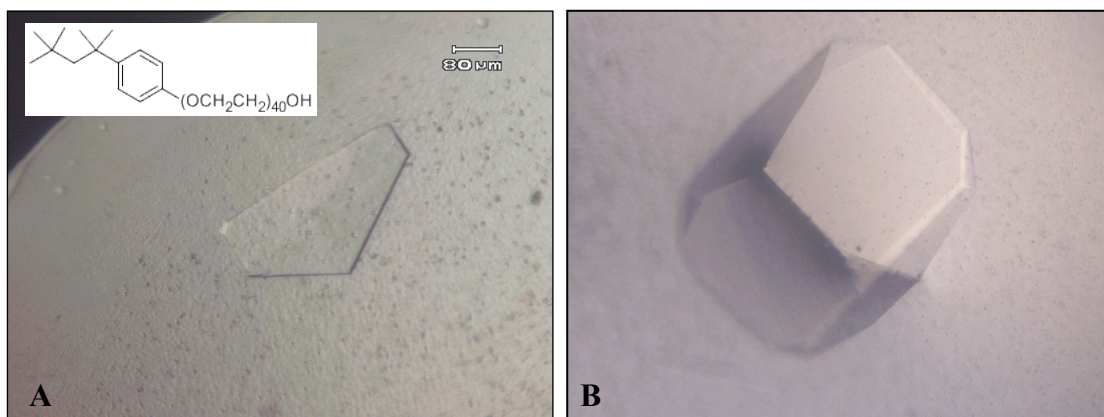


Abbildung 26: Kristalle des Anticalins O10 und seines Komplexes mit dCTLA4 im sitzendem Tropfen bei 20 °C. [A] Optimierter O10 Apo-Kristall in Gegenwart von 1,45 M Ammonium-Sulfat, 0,1 M Na-Cacodylat, pH 5,45, 0,1 % (v/v) Anapoe X-405 und Strukturformel des verwendeten Detergenzes. **[B]** Optimierter Kristall des Proteinkomplexes in Gegenwart von 1,4 M Na-Malonat pH 8,4

Mithilfe des Drehanodengenerators RU-300 am Lehrstuhl für Biologische Chemie wurde bei 100 K ein nahezu kompletter (98,9 %) Datensatz (genannt OC3) mit einer Auflösung bis 2,7 Å gesammelt. Zur Verbesserung der Auflösung wurde zusätzlich bei 100 K ein (98,9 %) Datensatz (genannt OC11) an der Messstation 14.1 des BESSY mit einer Auflösung bis 2,1 Å gesammelt.

3.5.3 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz und Modellbau

Zunächst wurden die Phasen für den Datensatz der Apostruktur (O10_27) mithilfe der Koordinaten des humanen NGAL (PDB: 1dfv) durch das Programm PHASER (McCoy *et al.*, 2005), wie unter Abschnitt 2.6.4.1 beschrieben, bestimmt. Dabei wurden acht Moleküle ohne Überlagerungen in der asymmetrischen Einheit platziert. Das so erhaltene initiale Strukturmodell wurde anschließend unter Berücksichtigung geometrischer Parameter (Engh & Huber, 1991) mit einer Auflösung bis 2,0 Å, wie unter Abschnitt 2.6.5 beschrieben, verfeinert. Nach Beendigung der Verfeinerung konnte ein kristallographischer R-Faktor von 25,1 % und ein freier R-Faktor von 28,2 % erreicht werden. Die Ramachandran-Analyse der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette mit dem Programm PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) zeigte, dass 84,8 % aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) im bevorzugten Bereich, 13,4 % im erlaubten Bereich, 1,8 % im erweitert erlaubten Bereich und keine Aminosäuren im verbotenen Bereich lagen (Tabelle 9).

Die Phasen des Datensatzes für den Protein-Komplex (OC11) ließen sich unter Verwendung der bekannten Struktur des CTLA4 (PDB-Code: 1185, Kette C) und der zuvor gelösten, verfeinerten Apo-Struktur des Anticalins O10 ebenfalls durch das Programm PHASER

bestimmen. Dabei wurde je ein Monomer CTLA4 und ein Molekül O10 ohne Überlagerungen in der asymmetrischen Einheit platziert. Das so generierte initiale Strukturmodell wurde anschließend ebenfalls unter Berücksichtigung geometrischer Parameter mit einer Auflösung bis 2,1 Å verfeinert. Aus der Verfeinerung resultierte ein kristallographischer R-Faktor von 20,9 % und ein freier R-Faktor von 22,5 %. Die Ramachandran-Analyse der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette mit dem Programm PROCHECK zeigte 90,1 % aller Aminosäuren (ausgenommen Glycin und Prolin) im bevorzugten Bereich, 9,1 % im erlaubten Bereich, 0,8 % im erweitert erlaubten Bereich und keine Aminosäuren im verbotenen Bereich. Die wichtigsten Statistiken beider Datensätze sowie die Ergebnisse der Verfeinerung sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die verfeinerten Koordinatensätze für OC11 und O10_27 wurden in der Protein Data Bank (PDB) unter den Eingangscodes 3BX7 bzw. 3BX8 abgelegt.

	O10 (O10_27)	O10/dCTLA4 (OC11)
Datensammlung		
Messstation	BESSY 14.1	BESSY 14.1
Anzahl Bilder / Drehung [°]	180 / 1	100 / 1
Auflösung [Å]	20 – 2,00 (2,07 - 2,00)	25 - 2,10 (2,18 - 2,10)
Reflexe	205 323	349 347
Unabhängige Reflexe	129 807	40 987
Vollständigkeit [%]	83,2 (46,9)	98,9 (96,8)
Multiplizität	1,9 (1,6)	8,6 (8,1)
I / $\sigma(I)$	16,2 (2,0)	30,0 (3,3)
Rsym [%]	3,2 (27,3)	4,9 (41,9)
Mosaizität	0,62	0,49
Raumgruppe	P1	P3 ₂ 21
Zellkonstanten	a = 61,5; b = 92,9, c = 98,8; $\alpha = 110,8^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 109,4^\circ$	a = b = 120,7, c = 83,0 $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Moleküle pro Zelle (Matthews, 1968)	8	1 + 1
Verfeinerung		
Auflösung [Å]	20 - 2,00	20 - 2,10
R / R _{free} [%]	25,1 / 28,2	20,9 / 22,5
Mittlere B-Faktoren [Å ²]:		
Protein	46,2	38,6
Lösungsmittel	41,6	44,6
Ligand	74,8	-
Rmsd-Abweichungen:		
Bindungslängen [Å]	0,007	0,006
Bindungswinkel [°]	1,313	1,318
Anzahl vorhandene Aminosäuren	178	178 + 120
Anzahl sichtbare Aminosäuren	167/166/167/168/ 162/158/161/161	173+120
Anzahl Ligand-Moleküle	8	-
Anzahl Lösungsmittel-Moleküle	327	186
Ramachandran Analyse		
Favorisiert [%]	84,8	90,1
Erlaubt [%]	13,4	9,1
Erweitert erlaubt [%]	1,8	0,8
Verboten [%]	-	-

Tabelle 9: Kristallographische Statistiken für das Anticalin O10 (Datensatz O10_27) und den Proteinkomplex O10/dCTLA4 (Datensatz OC11). Daten in Klammern gelten für die höchstauflösende Schale.

3.6 Die Kristallstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes

3.6.1 Apo-Struktur des Anticalins O10

Die acht Monomere in der asymmetrischen Einheit des Apo-Kristalls zeigen die typische Lipocalinfaltung aus dem antiparallelen β -Fass mit angelagerter α -Helix. Eine Überlagerung von 58 ausgewählten C α -Positionen des Fasses (28-37, 52-58, 63-69, 77-84, 91-94, 106-113, 118-124, 133-139; nach Skerra, 2000) der Struktur von Anticalin O10 (B Kette) mit der nativen Lipocalin-Struktur (NGAL, PDB: 1L6M) offenbart eine sehr geringe Abweichung (rmsd = 0,34 Å, Abbildung 28A). Daraus lässt sich die strukturelle Robustheit der Lipocalinfaltung ableiten, welche trotz des Austausches von 30 Aminosäuren äußerst stabil bleibt. Die Mutationen lagen hauptsächlich in den vier Schleifenregionen (20 Substitutionen, Abbildung 28B). Diese weisen deutliche Konformationsänderungen auf oder sind wegen ihrer Flexibilität in der Kristallstruktur teilweise ungeordnet. Dies betrifft insbesondere die längere Schleife #3 (Reste 97-103) und einige Seitenketten in der gesamten Schleifenregion. Die Schleifen #1 und #2 zeigen nur leichte Änderungen im Verlauf des Proteinerückgrats gegenüber dem natürlichen Lipocalin. Größere Unterschiede ergeben sich für Schleife #4 durch eine Drehung der beiden β -Stränge gegeneinander (Abbildung 28A). Insbesondere ist die Änderung der Lage der Seitenkette eines mutierten Phenylalanin-Restes (Y132F) zu erwähnen. Diese zeigt nun direkt in die Mitte des β -Fasses und interagiert dort mit einem Wassermolekül.

In allen acht O10-Molekülen wurde eine zusätzliche Elektronendichte im Inneren der Fass-Struktur beobachtet. Diese konnte als Fragment („Polyethylenglykol-Seitenkette“) des Detergenz Anapoe X-405 (Struktur siehe Abbildung 26) identifiziert werden, welches während der Kristallisation verwendet wurde. Der Fund dieses artifiziellen, hydrophoben „Liganden“ ist insofern nicht überraschend, da auch schon in der Erstpublikation der humanen NGAL Struktur eine gebundene Fettsäure beschrieben worden ist (Goetz *et al.*, 2000). Dabei stellen sich die interagierenden Seitenketten als nahezu identisch heraus (Y52, T54, Y56, F123, T136 und Y138; Abbildung 27). Die zusätzlich von Goetz *et al.*, 2000 beschriebenen Positionen Arg81 und Lys134 wurden im Anticalin O10 beide zu Alanin mutiert, um die Bindungsaktivität für das Molekül Enterobactin zu unterdrücken und mehr Raum für den „Proteinliganden“ zu schaffen. Enterobactin wurde als natürlicher Ligand des humanen NGAL entdeckt (Goetz *et al.*, 2002). Dieses Siderophor vom Katechol-Typ zeigt eine extrem hohe Affinität zu Eisen (K_D : 10^{-49} M) und erklärt damit die bakteriostatische Eigenschaft des humanen NGAL. Es wird vom Protein mit sehr hoher Affinität (K_D : 0,41 nM) mittels der positiven Aminosäureseitenketten Arg81, Lys125 und Lys 134 innerhalb der

Fass-Struktur gebunden. Alle diese Positionen sind im Anticalin O10 ersetzt worden (R81A, K125L, K134A).

Die gleichen Schlüsselpositionen (R81, K125 und K134) wurden in Zusammenhang mit der Bindung eines weiteren Siderophors Carboxymycobactin beschrieben (Holmes *et al.*, 2005). Dieses Siderophor zeigt in der Kristallstruktur eine analoge Orientierung wie Enterobactin. Die zusätzliche Fettsäureseitenkette „rollt“ sich unter dem Ringsystem in der Bindungstasche. Dies ist vergleichbar mit der beobachteten Ausrichtung der „PEG-Gruppe“ in der vorliegenden O10-Kristallstruktur (Abbildung 27).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Apostruktur des Anticalins O10 der des nativen humanen NGAL überraschend ähnlich ist. Das Protein offenbart die gleiche Faltung und die Disulfidbindung (C76-C175) ist geschlossen. Der Austausch von insgesamt 30 Aminosäurepositionen hat nur geringen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Anticalin-Variante O10, zumindest in Abwesenheit der neuen Zielstruktur CTLA4.

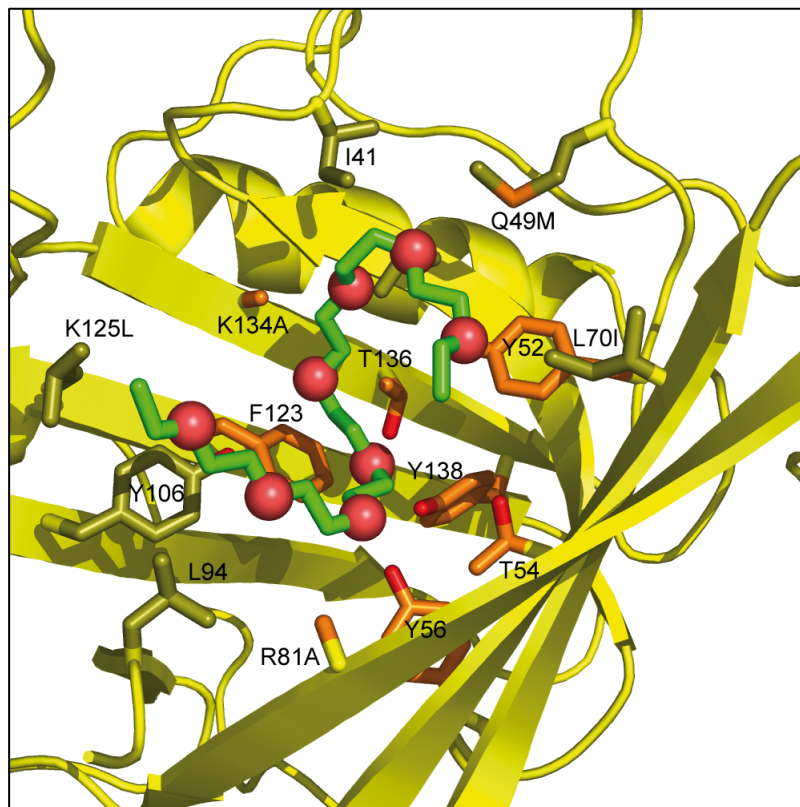
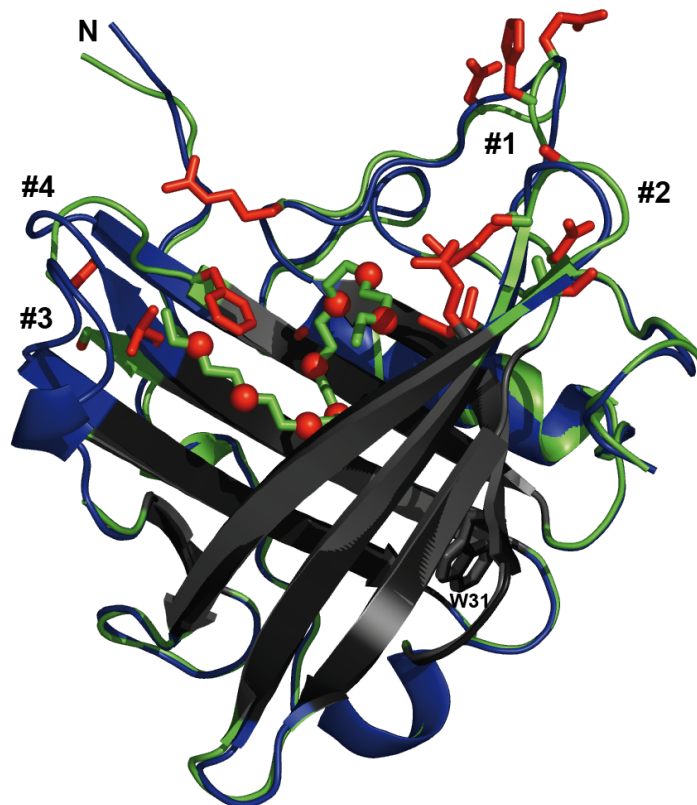


Abbildung 27: Das gebundene PEG-Fragment des Detergenz Anapoe X-405 in der Bindungstasche des Anticalins O10. Die Sauerstoffatome der PEG-ähnlichen Kette sind als rote Kugeln dargestellt. Wichtige Kontaktseitenketten mit dem Fragment (siehe Text) sind hervorgehoben und deren Mutationen im Anticalin dargestellt. Seitenketten in orange vermitteln auch den Kontakt zum nativen Liganden Enterobactin im humanen NGAL. Andere zusätzliche kontakt-vermittelnde Seitenketten sind oliv eingefärbt.

A



B

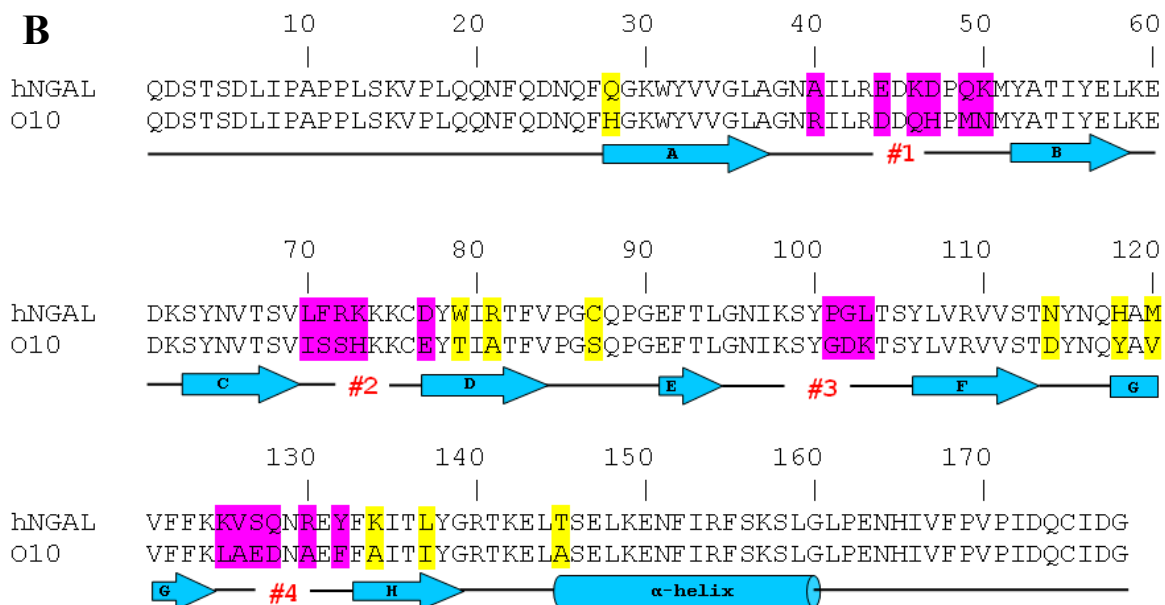


Abbildung 28: Vergleich des nativen humanen NGAL mit dem Anticalin O10. [A] Überlagerung der Proteinstrukturen. Von beiden Strukturen (humanes NGAL in grün, PDB 1L6M; Apostruktur des Anticalins O10 in blau) wurden die C α -Positionen der β -Fass-Strukturen (O10 dunkelgrau; NGAL hellgrau) überlagert. Die 20 mutierten Aminosäureseitenketten in den Schleifenregionen #1 - #4 sind in rot dargestellt. In der Mitte der Struktur befindet sich das gebundene Fragment des verwendeten Detergenz („PEG-Seitenkette“). [B] Sequenz-Überlagerung mit Sekundärstruktur. Die 30 Aminosäureaustausche gruppieren sich in 20 Schleifenmutationen (pink) und 10 Mutationen in anderen Regionen (gelb).

3.6.2 Gesamtstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes

Die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes beinhaltet ein Molekül des Anticalins (Kette A, Aminosäuren 6-178) zusammen mit einem Monomer der extrazellulären Domäne des humanen CTLA4 (Kette C, Aminosäuren 3-122). Die dimere Struktur des Proteinkomplexmodells lässt sich durch Zuhilfenahme der durch zweizählige Symmetrie verwandten kristallographischen Nachbarketten erzeugen. Damit ergibt sich für das CTLA4 das quasi native Dimer durch Verknüpfung der beiden Cys-Reste an Position 122 (Abbildung 29). Diese Disulfidbrücke verbindet beide Monomere des membranständigen Rezeptormoleküles auf der Oberfläche der T-Zelle (Linsley *et al.*, 1995). Die C-terminal folgende kurze Linkerregion (Aminosäuren 123-126) vor der fehlenden Transmembran-Domäne ist in der Kristallstruktur ungeordnet und somit nicht sichtbar.

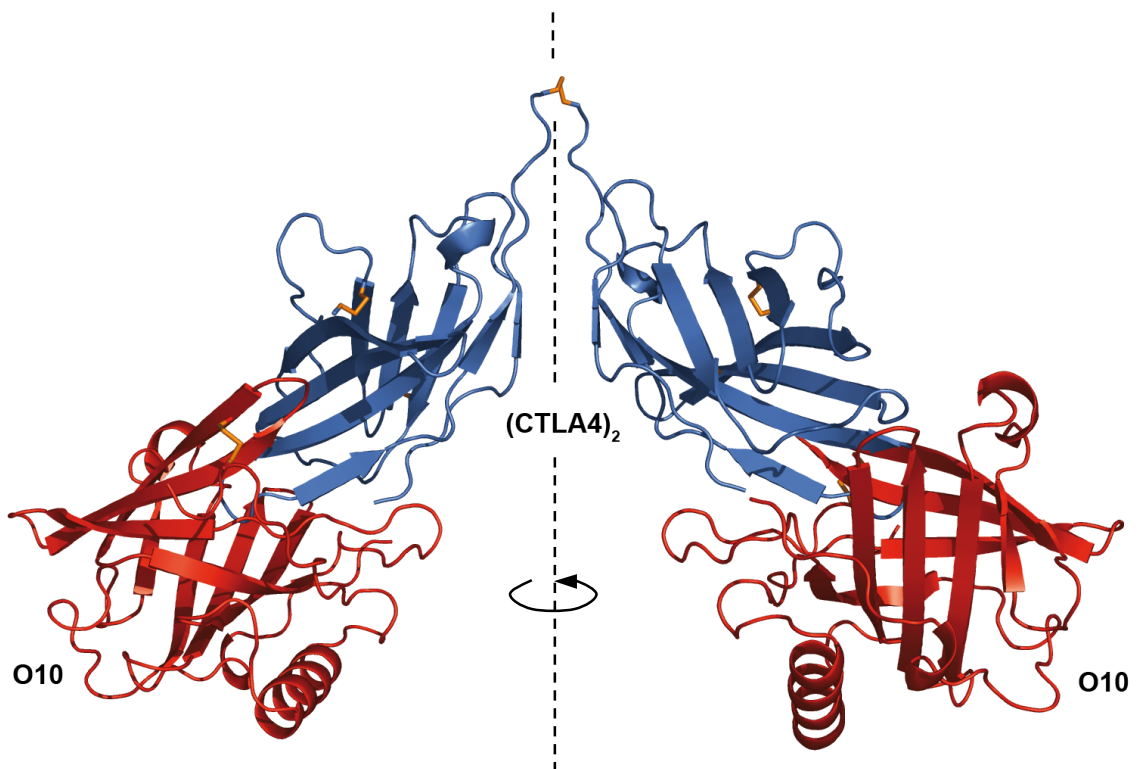


Abbildung 29: Das dimere CTLA4 bindet zwei Anticaline. Gesamtstruktur des O10/dCTLA4-Proteinkomplexes mit dimerem CTLA4 und zwei gebundenen Molekülen des Anticalins O10. Die zweizählige Symmetrieachse ist angedeutet. Disulfidbrücken sind orange markiert.

Die nahezu native Orientierung des CTLA4-Dimers ermöglicht die Bindung von zwei Anticalinen ohne gegenseitige sterische Behinderung der beiden Bindungspartner. Das zentrale Epitop des CTLA4 ist die Schleife zwischen den Strängen F und G (FG-Schleife, Aminosäuren 100-104, „*CDR3-like segment*“, Schwartz *et al.*, 2001) und vermittelt den Kontakt zum nativen Bindungspartner B7.1. Diese Schleife des humanen Rezeptors steckt

komplett in der Fass-Struktur des artifiziell generierten Bindeproteins. Die vier randomisierten Schleifen des Anticalins mit ihren 20 ausgetauschten Aminosäuren stehen in direktem Kontakt mit dem leicht verdrehten β -Sandwich des CTLA4 und dessen Regionen an einem Ende (FG- und BC-Schleife + CC'-Stränge). Spezifische Kontakte werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

Ein Vergleich der Dimerisierung des CTLA4 in diesem Komplex mit den bekannten Kristallstrukturen der extrazellulären Domäne alleine (Schwartz *et al.*, 2001; Stamper *et al.*, 2001) zeigt grundsätzlich die gleiche hydrophobe Kontaktfläche (Val10, Leu12, Ser15, Tyr115, Ile117, Glu120) der beiden Monomere (Abbildung 30). In den beiden CTLA4-Strukturen, die der PDB entnommen sind, ist die Disulfidbrücke allerdings nicht aufgelöst. Eine Betrachtung im Detail offenbart zudem deutliche Unterschiede zur Struktur von Schwartz *et al.*, 2001 ab dem Isoleucin-Rest 117. Der C-Terminus in der Struktur von Stamper *et al.*, 2001 hingegen folgt annähernd passgenau dem des O10/dCTLA4-Komplexes mit leicht veränderten Orientierungen der Seitenketten.

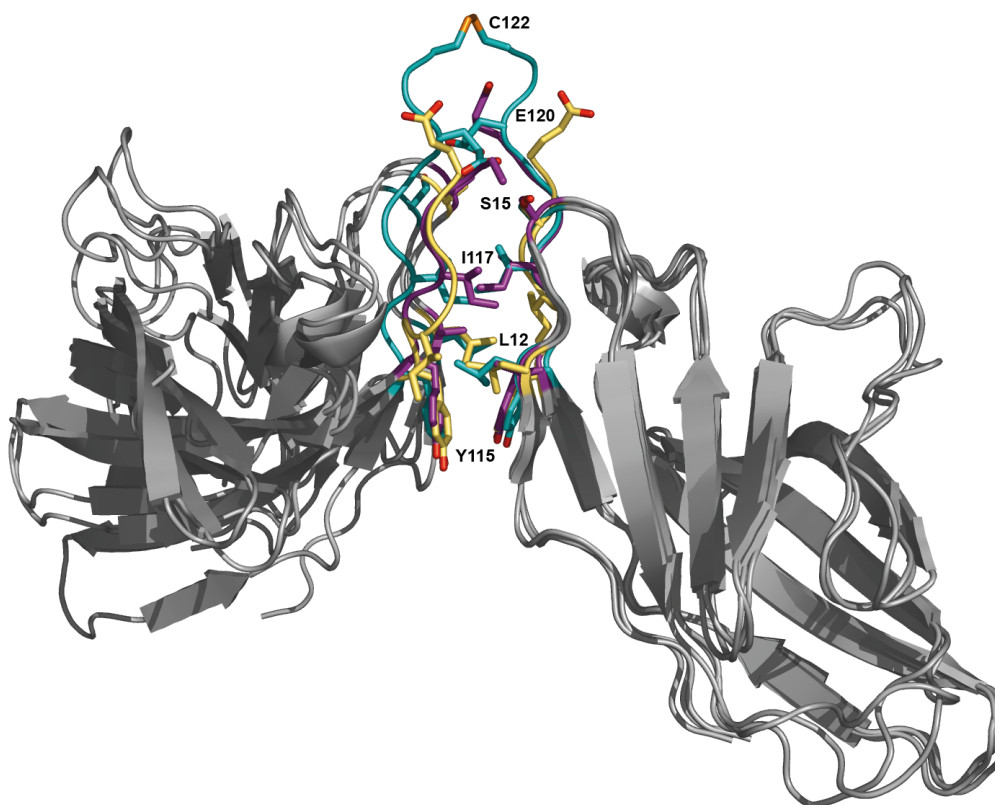


Abbildung 30: Überlagerungen des komplexierten dimeren CTLA4 mit den schon bekannten Kristallstrukturen. Die überwiegend unpolare Kontaktfläche ist farblich hervorgehoben. Überlagerung der dimeren CTLA4-Strukturen von Stamper *et al.*, 2001 (PDB: 118L) in violett, Schwartz *et al.*, 2001 (PDB: 1185) in gelb und der Komplexstruktur in cyan. Die Aminosäurepositionen der Kontaktfläche sind beschriftet. Die Position Val10 befindet sich auf der Rückseite des Moleküls.

3.6.3 Erkennung der verschiedenen Regionen auf CTLA4

Die FG-Schleife mit dem charakteristischen ⁹⁹MYPPYY¹⁰⁵ Motiv stellt, wie schon erwähnt, das Haupt-Epitop der extrazellulären Domäne von CTLA4. Dieses Motiv enthält drei aufeinanderfolgende Prolinreste in *cis-trans-cis* Konfiguration, was auch die strukturelle Basis für die Erkennung durch B7.1 liefert (Stamper *et al.*, 2001). Die gleiche Konfiguration wird durch das Anticalin erkannt. Die Schleife liegt zentral im β -Fass des veränderten Lipocalins und vermittelt zahlreiche Kontakte zu den Seitenketten der Kelchstruktur (Abbildung 31A). Im Besonderen geht Tyr106 (O10) eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat-Sauerstoff von Pro102 (CTLA4) ein, und der Phenylring von Phe123 (O10) interagiert mit der zyklischen Seitenkette von Pro103. Die Mutationen K125L und K134A im Anticalin schaffen den nötigen Platz für hydrophobe Interaktionen von Seitenketten des O10 mit Pro101 und Pro103 (CTLA4). Die zwei das PPP-Motiv flankierenden Tyrosinseitenketten Tyr100 und Tyr104 (CTLA4) werden über eine Wasserstoffbrücke zu Asn96 (O10) bzw. durch einen hydrophoben Kontakt mit Ile70 (O10) fixiert. Zusätzlich bildet Tyr52 (CTLA4) eine Wasserstoffbrücke zum Rückgrat-Stickstoff von Tyr104 (CTLA4) aus. Der darauf folgende Tyrosinrest Tyr105 (CTLA4) ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat-Stickstoff von Leu42 (O10) in Schleife #1 des Anticalins verbunden. Der Aminosäureaustausch D47H ermöglicht mit der Histidinseitenkette eine direkte Interaktion der Schleife #1 mit dem Rückgrat-Sauerstoff von Ile108 (CTLA4) (Abbildung 31C).

Die Erkennung der BC-Schleife erfolgt überwiegend durch die mutierten Schleifen #1 und #4 des Anticalins (Abbildung 31B). Die neue Seitenkette Glu127 (O10) in Schleife #4 bildet zwei Wasserstoffbrücken zum Rückgrat-Stickstoff von Lys30 und Ala31 (CTLA4) aus. Der eingeführte Rest Arg40 (O10) in Schleife #1 fixiert die BC-Schleife durch zwei Wasserstoffbrücken zum Rückgrat-Sauerstoff von Pro28 (CTLA4) sowie zur Hydroxylgruppe von Thr32 (CTLA4). Diese Kontakte führen zu einer signifikanten Verschiebung der BC-Schleife von etwa 6 Å im Vergleich zur Konformation in der Kristallstruktur von Stamper *et al.*, 2001 mit dem gebundenen B7.1. Die vorhandene Flexibilität der Epitopregion des nativen Rezeptormoleküles wird offenbar bei der molekularen Erkennung durch das veränderte Lipocalin ausgenutzt.

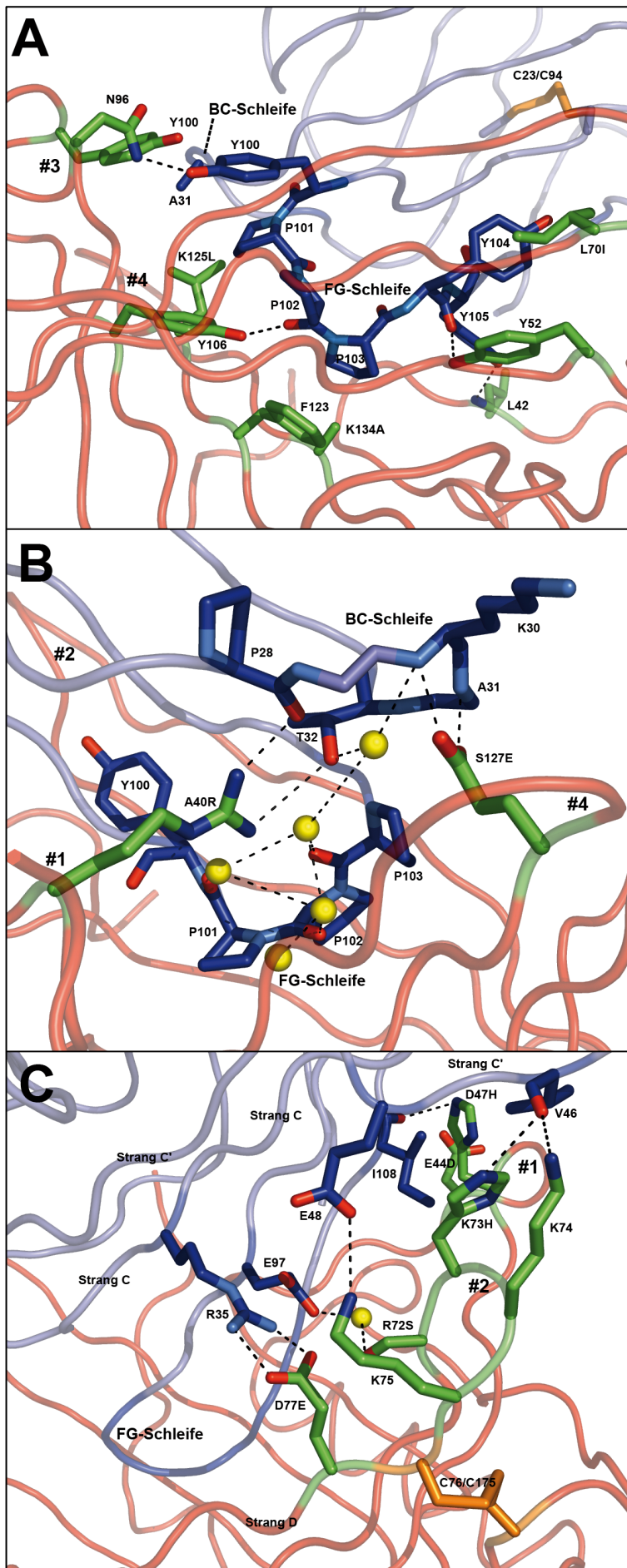


Abbildung 31: Spezifische Erkennung des Epitops auf CTLA4 durch das Anticalin O10. Darstellung des Proteinrückgrats mit wichtigen Seitenketten (CTLA4 in blau, Anticalin in rot). Die Schleifen #1 - #4 des Anticalins sind bezeichnet. Wassermoleküle sind als gelbe Kugeln dargestellt. [A] Blick von der Seite auf die FG-Schleife. [B] Blick von der Rückseite des Proteinkomplexes auf die BC-Schleife. [C] Blick von der Seite auf Schleife #2 des Anticalins mit den Strängen C und C' von CTLA4.

Als dritte Kontaktregion wird das in sich verdrehte β -Sandwich der Stränge C und C' in CTLA4 erkannt. Insbesondere sind hier Kontakte mit der Schleife #2 und dem Strang D des Anticalins hervorzuheben (Abbildung 31C). Die mutierte Seitenkette Glu77 (O10) in Strang D bildet eine doppelte Wasserstoffbrücke zu Arg35 (Strang C, CTLA4) aus. Lys75 (O10) vermittelt eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Glu48 (CTLA4). Lys74 (O10) und die neue Seitenkette His73 (O10) aus Schleife #2 formen eine Wasserstoffbrücke zum Rückgrat-Sauerstoff von Val46 (CTLA4). Der ausgetauschte Aminosäurerest Ser72 (O10) vermittelt zudem einen Kontakt zu Glu97 (CTLA4) über ein Wassermolekül. Alle letztgenannten Kontakte werden über den Strang C' von CTLA4 vermittelt. Weitere Kontakte stromaufwärts von Arg35 in Strang C (CTLA4) sind aufgrund des wachsenden Abstands zum Strang D des Anticalins in diese Richtung nicht mehr möglich.

3.6.4 Spezifische Kontakte führen zu einer gerichteten Bindungsorientierung

Wie für Serumproteine (NGAL) oder extrazelluläre Proteindomänen (CTLA4) zu erwarten, offenbart eine Analyse der Oberflächenhydrophobie der beiden Bindungspartner überwiegend hydrophile Oberflächen. Dagegen weist die Kontaktfläche beider Moleküle überwiegend Aminosäurereste mit hydrophobem Charakter auf (Abbildung 32). Wie schon beschrieben, ragt die FG-Schleife (⁹⁹MYPPPY¹⁰⁵) des CTLA4 tief in die β -Fass-Struktur des Anticalins. Folgende paarweise hydrophobe Kontakte sind zu benennen: Tyr100 (CTLA4) zu Tyr100 (O10); Pro101 (CTLA4) zu Leu125 (O10); Pro103 (CTLA4) zu Ala134 und Phe123 (O10); Tyr105 (CTLA4) zu Leu36 und Ile41 (O10); Tyr104 (CTLA4) zu Tyr52 und Ile70 (O10). Die gerichtete Orientierung des Rezeptorproteins in der Kelchstruktur des Anticalins wird durch überwiegend hydrophile Kontakte an der Oberkante der Fass-Struktur vermittelt. Vor allen Dingen Strang C und D (O10) und die mutierte Schleife #2 vermitteln Kontakte von Glu77 (O10) zu Arg35 (CTLA4); Lys74 (O10) zum Rückgrat-Sauerstoff von Val46 (CTLA4); Lys75 (O10) zu Glu48 (CTLA4) und Arg40 (O10) zu Pro28 (CTLA4) (siehe Abbildung 32).

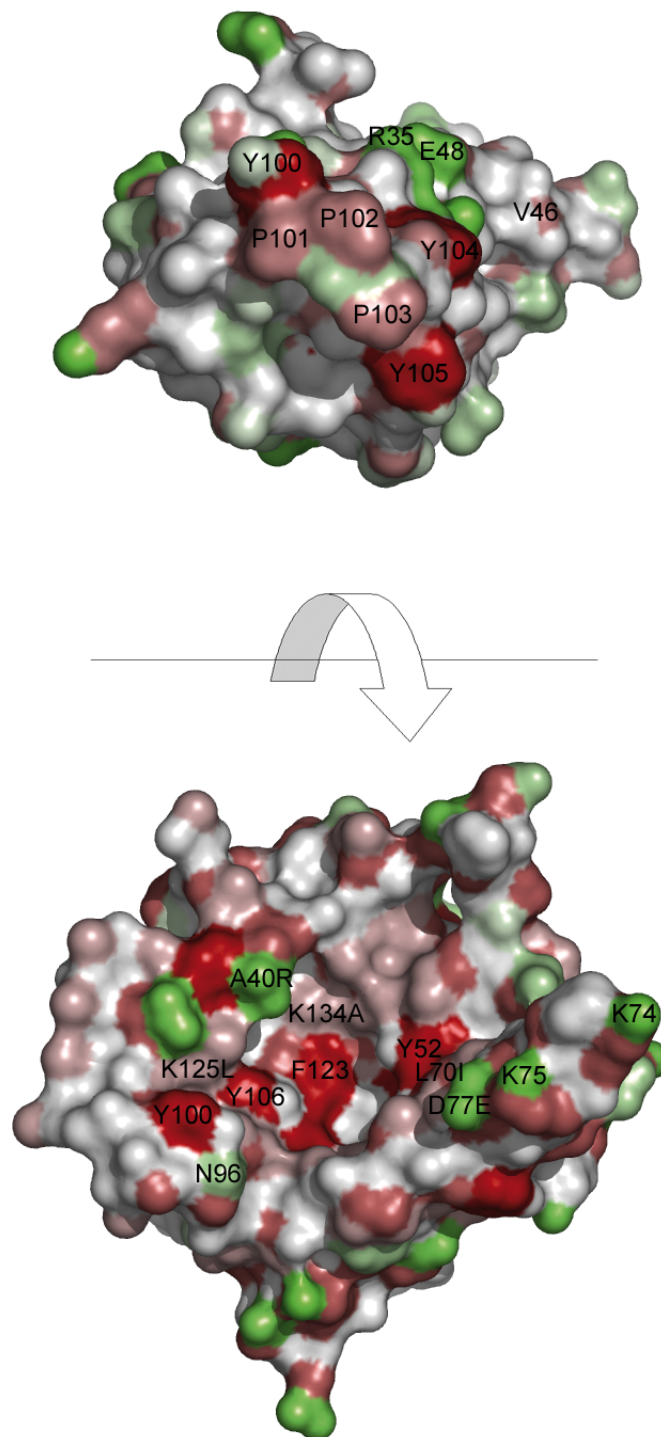


Abbildung 32: Spezifische Kontakte ermöglichen die korrekte Orientierung des Rezeptormoleküls. Färbung der Oberfläche nach Hydrophobizität (Eichinger *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 1999) von grün (hydrophil) über grau (neutral, inklusive Polypeptid-Rückgrat) bis braun (hydrophob). Wichtige Kontaktseitenketten sind beschriftet. Durch eine 180° Drehung des CTLA4-Moleküls (oben) in der Papierebene ist der Proteinkomplex mit dem Anticalin O10 (unten) zu bilden.

3.6.5 Struktureller Vergleich des Anticalins O10 in unkomplexierter und komplexierter Form

Durch die Komplexbildung des Anticalins O10 mit CTLA4 ergeben sich einige signifikante Unterschiede in der Struktur des veränderten Lipocalins, insbesondere in den vier Schleifenregionen. Eine Überlagerung der Apostruktur des Anticalins mit der im Komplex vorliegenden Konformation zeigt interessante Abweichungen (Abbildung 33). Bemerkenswert ist, dass die Schleife #3 durch Erkennung der neuen Zielstruktur komplett geordnet wird. In der Apostruktur konnte für diese Schleife keine Elektronendichte ermittelt werden. Dieses Verhalten kann als sogenannter „*Induced Fit*“ verstanden werden, welcher bisher für die Epitoperkennung von Antikörpern beschrieben worden ist (Rini *et al.*, 1992). Folgende Interaktionen tragen zur Fixierung der Schleife #3 bei: Tyr100 (O10) mit der BC-Schleife (Ala31, CTLA4); Asn96 (O10) mit der FG-Schleife (Tyr100, CTLA4) (Abbildung 31A). Zusätzlich wird der β -Strang F von O10 durch die Interaktion zwischen Tyr106 (O10) mit Pro102 (CTLA4) fixiert.

Die Komplexierung mit CTLA4 führt zudem zu einer leichten Öffnung des β -Fasses. Insbesondere die Stränge G und H zusammen mit der verbindenden Schleife #4 werden nach außen gedrückt. Diese Strukturänderung im Anticalin scheint mit der Verdrängung der BC-Schleife von CTLA4 (Abschnitt 3.6.3) einherzugehen. Die Flexibilität des Stranges H und eine Reorientierung von Phe123 (Rückdrehung der Seitenkette nach außen wie im nativen NGAL, Vergleich Abschnitt 3.6.1) schafft den nötigen Raum für die BC-Schleife in der Bindungsstelle des Anticalins. Die Reorientierung der Phe123-Seitenkette wird durch eine Änderung der Konformation von Arg40 in Schleife #1 möglich (Abbildung 33), indem dieser Rest eine doppelte Wasserstoffbrücke zur BC-Schleife des CTLA4 ausbildet.

Die längere Schleife #1 mit ihren sieben mutierten Aminosäurepositionen zeigt interessanterweise keine auffälligen Konformationsänderungen. Dagegen sind in Schleife #2 insbesondere für die $C\alpha$ -Positionen 72-75 kleinere Verschiebungen um bis zu 2,0 Å zu beobachten. Dies ermöglicht die Ausbildung der beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem C und C' Strang von CTLA4.

Ein Vergleich des komplexierten Anticalins mit der nativen Struktur des humanen NGAL verdeutlicht die strukturelle Rigidität der β -Fass-Struktur. Signifikante Unterschiede sind nur für die Schleifenregionen zu erkennen. Dabei weisen die Schleifen #1 und #2 im NGAL eher marginale Änderungen auf. Schleife #3 und #4 verengen dagegen den Eingang des Fasses im Vergleich mit dem veränderten Lipocalin. Dies ist nachvollziehbar, da gegenüber den wesentlich kleineren natürlichen Liganden Enterobactin bzw. Carboxymycobactin zur

Bindung des größeren Proteinliganden CTLA4 durch das Anticalin eine Aufweitung der Kelchstruktur erforderlich ist.

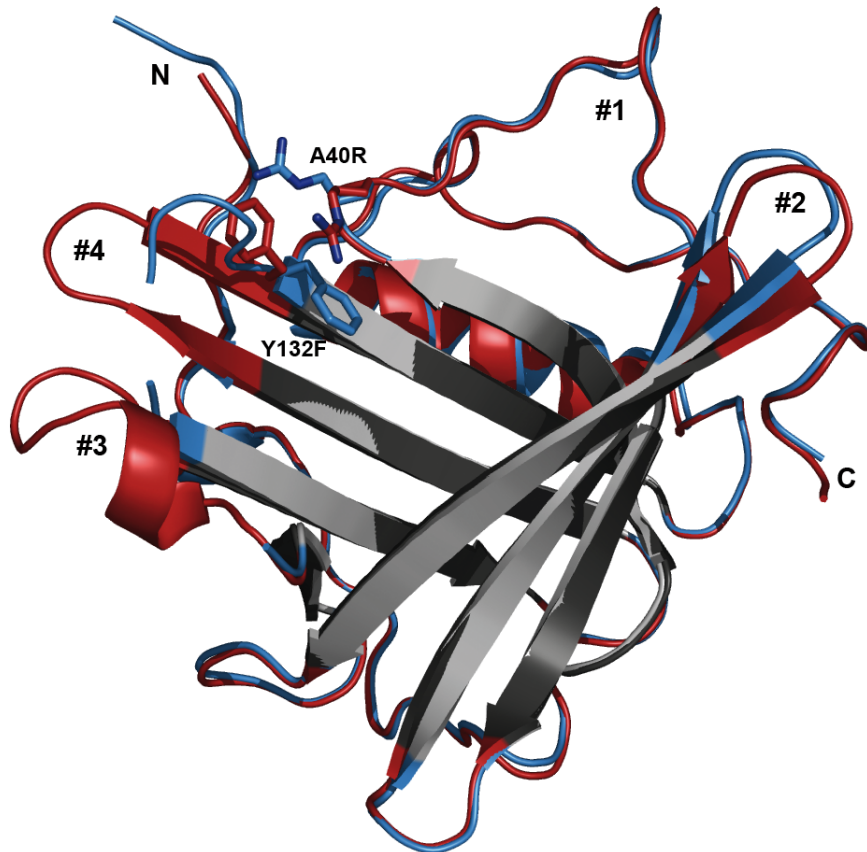


Abbildung 33: Das Anticalin O10 in Apoform und komplexierter Form. Die α -Positionen der β -Fass-Strukturen (grau) wurden überlagert. Dabei ist die Apoform in blau, die komplexierte Form in rot eingefärbt. Die veränderte Seitenketten A40R und Y132F sind dargestellt. Durch die Änderung der Konformation von Arg40 im Komplex unter Ausbildung einer doppelten Wasserstoffbrücke zur BC-Schleife des CTLA4 (siehe Text) wird eine Reorientierung der Phe123-Seitenkette ermöglicht.

4 Diskussion

4.1 Strukturbiologische Analyse des humanen AGP

4.1.1 Kristallisation und Strukturlösung

Der Einsatz des periplasmatischen *E. coli*-Expressionssystems ermöglichte die Produktion und Reinigung von AGP in ausreichender Menge zu dessen Kristallisation. Damit konnte durch die bakterielle Biosynthese die ausgeprägte Heterogenität der natürlichen Proteinpräparationen aufgrund der Glykosylierung umgangen werden. Die Analyse der rekombinanten Proteinpräparation mittels Massenspektrometrie, CD-Spektroskopie sowie nicht reduzierender SDS-PAGE konnte die richtige Molekülmasse, die korrekte Faltung und die Bildung der beiden Disulfidbrücken bestätigen. Nach der Optimierung der initial gefundenen Kristallisationsbedingungen mit Phosphat als Fällungsmittel ließen sich Kristalle mit einer Streufähigkeit von bis zu 1,8 Å erzeugen. Im Durchschnitt streuten die AGP-Kristalle nur bis 2,3 Å. Interessanterweise wurde bei Versuchen mit sogenannten „Quick Soaks“ (Behandlung der Kristalle mit Bromid- oder Jodid-Lösungen vor dem Einfrieren und der Exposition mit Röntgenstrahlung zur Phasierung) eine Zunahme der Streufähigkeit um bis zu 0,5 Å beobachtet, jedoch ohne Schrumpfung des Kristalls. Dieser Effekt konnte auch schon in der Vergangenheit bei Behandlung von Proteinkristallen vor dem Einfrieren mit erhöhter Ammoniumsulfatkonzentration beobachtet werden (Fu *et al.*, 1999). Auch von Fu *et al.*, 1999 wurde dabei keine Schrumpfung des Kristalls festgestellt. Höchstwahrscheinlich führt die Erhöhung der Salzkonzentration vor dem Einfrieren zu einer verstärkten Ordnung von flexiblen Teilen im Kristallgitter und damit zu erhöhter Diffraktionsfähigkeit (Abergel, 2004). Der Einsatz der „Quick Soaks“ lieferte keine Phasen, da kein ausreichendes anomales Signal detektiert werden konnte. Zur Verbesserung der Streufähigkeit wurde aber bei folgenden Experimenten stets erfolgreich 0,5 M NaCl in der Frierbedingung verwendet.

Phasierungsversuche durch molekularen Ersatz mit strukturell homologen Lipocalinstrukturen schlugen ebenfalls fehl. Zur Erhöhung der Chancen wurden die Suchmodelle schrittweise vereinfacht. Alle flexiblen Schleifen-Regionen wurden nacheinander entfernt und Polyalanin-Versionen aller Suchmodelle mit und ohne Schleifen-Regionen erzeugt. Alle Versuche mit den variierten Suchmodellen blieben erfolglos. Die mithilfe der alternativen Phasierungsmethode UV-RIP aufgeklärte Kristallstruktur des AGP kann dafür folgende Antwort geben: Grundsätzlich zeigt die AGP-Struktur die konservierte Faltung eines Lipocalins mit dem typischen β -Fass. Neben den generell variablen Konformationen aller Schleifenregionen besitzt allerdings insbesondere die lange Schleife #1 eine völlig andere

Gestalt mit zwei kompletten Windungen einer α -Helix. Bemerkenswert sind auch die verschiedenen Formen der N- und C-terminalen Bereiche des Proteins (Abbildung 10 und Abschnitt 3.1.7.6). Diese signifikanten Unterschiede in der Tertiärstruktur zu anderen Lipocalinen reichen trotz konservierter β -Fass-Struktur anscheinend aus, um einen erfolgreichen molekularen Ersatz zur Lösung des Phasenproblems zu verhindern.

Zwar gelang die Einführung eines Selenatoms in die Aminosäure Methionin (Met111) zwecks Phasierung mittels MAD, allerdings ließen sich mit dieser Proteinpräparation unter den gegebenen Kristallisationsbedingungen keine Proteinkristalle erzeugen. Wegen der sehr geringen Ausbeute (785 μ g gereinigtes Protein aus insgesamt 12 L Schüttelkultur) war die Suche nach gänzlich neuen Kristallisationsbedingungen nicht möglich. Eine Erklärung für das Ausbleiben von Kristallen mit SeMet-Substitution kann ein Blick in die aufgeklärte AGP-Kristallstruktur liefern. Das einzige Methionin des AGP (Met111) befindet sich an der Außenseite des β -Fasses und vermittelt einen Kontakt zur angelagerten α -Helix an dessen Rückseite. Der Atomradius des Selens ist nur unwesentlich größer als der des Schwefels (0,119 nm zu 0,104 nm); dies scheint aber trotzdem einen entscheidenden Effekt auf die Kristallisation des Moleküls zu besitzen. Seltsamerweise ist bei Betrachtung der Kristallpackung ein direkter Kontakt der α -Helix mit Nachbarmolekülen nicht festzustellen. Es ist daher anzunehmen, dass die Einführung des Selenomethionins höchstwahrscheinlich zu anderen kleinen strukturellen Veränderungen im AGP führt, welche eine Ausbildung des vom Wildtyp bekannten Kristallgitters verhindern. Zudem ist zu befürchten, dass die Proteinpräparation aufgrund der viel niedrigeren Ausbeute verhältnismäßig stärker mit Wirtszellkomponenten verunreinigt war, was ebenfalls die Kristallisation behindert haben könnte.

Eine ausgiebige Suche nach geeigneten Schwermetallverbindungen zur Einführung von anomalen Signalen in die vorhandenen nativen Kristalle lieferte keine positiven Resultate. Auch die Tränkung der Proteinkristalle mit dem AGP-Liganden Bromazepam zwecks Nutzung des Brom-Streusignals zur Phasierung schlug fehl. Schließlich konnte die Struktur des AGP erfolgreich mithilfe UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP) unter Nutzung der beiden Disulfidbrücken gelöst werden. Trotz der Verwendung einer recht großen, nicht optimalen Nylon-Schleife (Mutterlauge in der Schleife bewirkt teilweise UV-Absorption) konnten mittels des UV-Lasers spezifische Änderungen in der Konformation der beiden Schwefelbrücken induziert werden. Diese ließen sich erfolgreich zur Phasierung der Beugungsdaten verwenden. Für eine Lösung der Gesamtstruktur waren die räumlichen Änderungen der vier Schwefelpositionen alleine allerdings nicht ausreichend. Zusätzlich

fürte die Bestrahlung des Kristalls zu strukturellen Änderungen in acht weiteren Seitenketten des Proteins, welche sich in die Phasenbestimmung einbeziehen ließen. Damit ließ sich eine initiale Elektronendichte berechnen, und mit dem Programm ARP/wARP gelang es, 166 der 192 Aminosäurereste einzupassen. Das finale Strukturmodell konnte mit einer Auflösung von 1,8 Å verfeinert werden und zeigte exzellente Stereochemie (vgl. Tabelle 6).

Die Methode der Phasierung von Proteinstrukturen durch UV-induzierte Strahlenschäden (UV-RIP) war zuvor nur mit einigen Modellproteinen wie Elastase, Insulin, Lysozym, *Photoactive Yellow Protein*, Ribonuclease A, Thaumatin und Trypsin gezeigt worden (Nanao & Ravelli, 2006). Bloß in einem Fall konnte UV-RIP in Zusammenhang mit S-SAD erfolgreich für eine neue Strukturaufklärung verwendet werden (Rudino-Pinera *et al.*, 2007). Damit stellt die Phasierung des humanen α_1 -Acid Glycoproteins *ausschließlich* durch UV-RIP das erste funktionierende Beispiel für eine *de novo* Strukturlösung mit dieser neuartigen Methode dar.

4.1.2 Kristallstruktur des humanen AGP

Die AGP-Kristallstruktur (Abbildung 10) liefert ein neues Beispiel für das konservierte β -Faltungsmuster der Lipocalinfamilie. Auch in diesem Fall zeigt sich ein antiparalleles β -Fass mit angelagerter α -Helix als Grundstruktur. Damit können vorangegangene strukturelle Daten für AGP aus spektroskopischen Messungen (Kodicek *et al.*, 1995 ; Kopecky *et al.*, 2003) bestätigt werden. Anscheinend beeinträchtigt die fehlende Glykosylierung des rekombinanten Proteins nicht die strukturelle Integrität der Proteinfaltung. Bemerkenswerte Unterschiede zu anderen Lipocalinstrukturen sind in den flexiblen Schleifenregionen und an den beiden Termini des Proteins zu beobachten. Die Fixierung beider Enden an die Fass-Struktur durch jeweils eine Disulfidbrücke scheint die Gesamtstruktur zu stabilisieren. Herauszustellen ist die ausgeprägte Sekundärstruktur der langen α -helikalen Schleife #1. Deren mögliche Funktion wird im folgenden Abschnitt 4.1.3 diskutiert. Betrachtet man alle bis heute verfügbaren Lipocalinkristallstrukturen, so stellt die aufgeklärte AGP-Struktur die einzige Lipocalinstruktur mit diesem Merkmal dar.

Die Elektronendichte für das N-terminale Pyroglutamat war in der Kristallstruktur sehr gut definiert. Diese Modifikation der Aminosäure im AGP war bereits beschrieben worden (Schmid *et al.*, 1973). Der öfters beobachteten Zyklisierung eines Glutaminrestes am N-Terminus von Proteinen werden verschiedene Funktionen zugeschrieben (Cummins & O'Connor, 1998). So wird das modifizierte Ende gegen N-terminale Proteolyse durch Aminopeptididasen geschützt und kann unter anderem direkt mit Rezeptoren interagieren.

Darüber hinaus tragen einige physiologisch aktive Peptide (z.B. das Thyreotropin Releasing Hormon, TRH und das β -Amyloid) ein N-terminal modifiziertes Glutamin. Dabei wird die Lactambildung des terminalen Aminosäurerestes von Glutaminyl-Cyclasen katalysiert (Schilling *et al.*, 2008). Die Abspaltung eines Pyroglutamates (z.B. für die Edmann-Sequenzierung) erfolgt durch sogenannte Pyroglutamyl-Peptidasen. Für AGP ist zu vermuten, dass der N-Terminus aufgrund seiner Länge (siehe Abbildung 10) vor Proteolyse im Blutplasma geschützt werden muss. Auch könnte man sich eine Interaktion des frei zugänglichen Endes mit einem Rezeptor vorstellen, wobei ein spezifischer Kontakt mit der modifizierten Aminosäure ausgebildet werden könnte. Hier muss die Entdeckung eines Rezeptors für AGP abgewartet werden.

Überraschenderweise stellte sich die Bindungstasche des Proteins in der Kristallstruktur als blockiert heraus. Ein gebundenes Glycerinacetat-Molekül sowie der N-Terminus des Nachbarmoleküls in der Kristallpackung versperren den Zugang für eventuelle Liganden. Dies erklärt auch das Scheitern von „Tränkungsversuchen“ der Proteinkristalle mit unterschiedlichen Liganden. Um AGP/Ligand-Komplexstrukturen zu analysieren, müssen also neue Kristallisationsbedingungen mit anderer Kristallpackung gefunden werden.

Der gebundene Ligand Glycerinacetat resultierte höchstwahrscheinlich aus der Präparation des Proteins und muss aus den zur Produktion verwendeten *E. coli*-Wirtszellen stammen. Der Ester zwischen Glycerin und Essigsäure kann chemisch gesehen zu den Monoacylglycerinen gezählt werden, er gehört allerdings aufgrund des kurzen Acetylrestes nicht zur Gruppe der Lipide. Es kann aber vermutet werden, dass durchaus ein Monoacylglycerid aus *E. coli* von AGP gebunden worden ist. Der lange Fettsäurerest kann durch seine Flexibilität in der Kristallstruktur ungeordnet vorliegen und daher ist keine entsprechende Elektronendichte vorhanden. Die Bindungsaktivität von AGP zu Lipiden und Phospholipiden ist bereits intensiv beschrieben worden (Israili & Dayton, 2001; Ojala *et al.*, 2006; Ceciliani & Pocacqua, 2007). Wie berichtet (Abschnitt 3.1.7.3), befindet sich der gebundene Ligand am Eingang zur tieferen unpolaren Tasche I des Proteins. Durch die kleinere Tasche III ergibt sich Raum für den postulierten (nicht sichtbaren) Fettsäure-Schwanz mit einer Öffnung zum Lösungsmittel hin. Somit könnte dieser aus der Bindungstasche herausragen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten Kokristallisationsversuche von AGP mit einem Monoacylglycerid durchgeführt werden mit der Hoffnung, dass der Fettsäure-Schwanz unter neuen Kristallisationsbedingungen im Kristallgitter fixiert und damit sichtbar wird. Zusätzlich ist zu bemerken, dass die stark erhöhten Temperaturfaktoren für das Glycerinacetat (B-Faktoren um 56 für den Ligand gegenüber 31 für das Protein) eher auf einen artifiziellen Charakter der

Bindungsaktivität für diese Verbindung schließen lassen. Allerdings scheint die Bindung stark genug zu sein, alle Schritte während des Aufschlusses der Zellen und der Reinigung des Proteins zu überstehen. Es stellt sich die Frage, wie eine Mitreinigung des Glycerinacetats in Zukunft vermieden werden könnte, um Kokristallstrukturen mit anderen Liganden zu ermöglichen. Zunächst müsste getestet werden, ob das gebundene Molekül durch andere Verbindungen verdrängt werden kann. Dies ist nur für Moleküle mit besseren Dissoziationskonstanten und im Überschuss möglich. Auch könnte eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln versucht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die komplette Entfaltung des Proteins mit anschließender Dialyse, um den Liganden komplett zu entfernen. Danach müsste das AGP dann rückgefaltet werden.

Die vorliegende Kristallstruktur kann aber trotz der Blockade der Bindungstasche detaillierte Einblicke in deren Gestalt geben. Sie zeigt eine klare Aufteilung in drei kleinere Taschen I, II und III mit unterschiedlichen Größen und Eigenschaften (Abbildung 12). Die vorliegende Geometrie ermöglicht die Bindung von sehr unterschiedlichen Molekülen in verschiedenen Orientierungen. Es ist zu vermuten, dass Ringsysteme in der größeren unpolaren Tasche I gebunden werden. Je nach Orientierung des Liganden können dann die beiden flexiblen Argininreste (Arg68, Arg90) zur Kompensation von gegebenenfalls vorhandenen negativen Ladungen dienen. Sollten positive Ladungen im Liganden vorhanden sein, können diese dagegen in der negativ geladenen Tasche II untergebracht werden. Außerdem ist anzunehmen, dass die Gestalt der Bindungstasche durch Konformationsänderungen der Schleifenregionen sowie der allgemeinen Flexibilität der Aminosäureseitenketten innerhalb der Fassstruktur in gewissen Grenzen anpassbar ist.

Die beiden Versuche der Modellierung von zwei pharmazeutisch interessanten Liganden (Abschnitt 3.1.7.4. und 3.1.7.5) konnten die breite Spezifität der vorliegenden Bindungstasche untermauern. Dabei wurden zwei strukturell unterschiedliche Moleküle (Diazepam und Progesteron) gewählt. Beide Strukturen ließen sich gut in die Bindungstasche einpassen und zeigten individuell verschiedene Interaktionen (Abbildung 13). Dies kann eine erste Erklärung für die beobachtete breite Bindungsaktivität für unterschiedliche Liganden (Israili & Dayton, 2001) liefern. Sehr interessant wäre in diesem Zusammenhang die Analyse weiterer relevanter pharmazeutischer Liganden in neuen Kokristallisationsversuchen mit dem Protein. Durch das etablierte Expressionssystem für AGP sind die Ausgangsbedingungen dafür gegeben.

4.1.3 Funktionelle Betrachtungen des humanen AGP

Die genaue physiologische Funktion des humanen AGP, eines wichtigen Plasma-Proteins neben dem humanen Serum Albumin (HSA), ist bis heute noch überwiegend unbekannt. Auf Basis der vorliegenden Kristallstruktur soll hier vor allem seine Funktion als Plasma-bindende Protein diskutiert werden.

Neben der starken Änderung seiner Konzentration im Plasma weist das Akutphase-Protein AGP interessanterweise hohe Variabilität in Bezug auf seine Glykosylierung auf. Durch das verwendete bakterielle Expressionssystem weist die hier gelöste Kristallstruktur leider keine assoziierten Zuckerreste auf. Allerdings lässt die Lage der fünf Glykosylierungsstellen (Asn-Reste in Abbildung 10 und Abbildung 11) einige Rückschlüsse auf deren Lage und funktionellen Einfluss zu. Dabei wird ersichtlich, dass die unterschiedliche Gestalt der Zuckerreste den Zugang zur Bindungstasche strukturell beeinflussen kann. Hier ist vor allen Dingen die Glykosylierung der Schleife #1 (Asn38) zu nennen, welche sich direkt über dem Eingang der Bindungstasche befindet. Bei spektroskopischen Bindungsstudien des AGP mit Progesteron wurde eine Transformation der α -helikalen Schleife #1 zu einem β -Strang während der Ligandenbindung beobachtet (Kopecky *et al.*, 2003). Dies deutet auch auf eine Rolle der Glykosylierung in dieser Region für die Ligandenbindungsaktivität hin. Interessanterweise konnte in den hier durchgeführten Modellierungsstudien das Progesteron auch ohne nennenswerte Strukturänderung der Schleife #1, die hier allerdings keine Glykosylierung trug, in die Bindungstasche eingepasst werden. Der Vergleich mit der verwandten Struktur des Lipocalins c8 γ kann weitere Hinweise auf eine Funktionalität der Schleife #1 geben. In c8 γ befindet sich ein freier Cysteinrest (Cys40) in Schleife #1, welcher die direkte Verbindung zu c8 α vermittelt (Lovelace *et al.*, 2008). Daher kann vermutet werden, dass wahrscheinlich auch die längere Schleife #1 des AGP eine entsprechende, aber bis heute unbekannt Funktion besitzen sollte.

Die zweite interessante Glykosylierungsstelle befindet sich in Strang D. Die Seitenkette des Asn75 zeigt hier direkt in die Bindungstasche (Abbildung 10). Die Anwesenheit von Zuckermolekülen unterschiedlicher Größe sollte also einen direkten Einfluß auf die Gestalt der Bindungstasche haben. Auch ließe sich damit der Zugang blockieren oder die Bindungstasche komplett ausfüllen. In diesem Zusammenhang ist eine direkte Interaktion der Glykosylierung von Asn75 mit dem α -helikalen C-terminalen Bereich des AGP zu diskutieren. In früheren Studien wurde ein direkter Einfluss der Glykosylierung wie auch der Disulfidbrücken auf den Gehalt an α -Helices in AGP beobachtet (Nishi *et al.*, 2006). Dabei wurde die Bindungsaffinität zu den beiden fluoreszierenden Modell-Liganden Bis-ANS und

Quinaldin-Rot erheblich geschwächt. Es kann also vermutet werden, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen den Zuckerresten und der C-terminalen Helix besteht. Dies kann aber auch im Zusammenhang mit den postulierten strukturellen Veränderungen in AGP bei Interaktion mit biologischen Membranen stehen (Nishi *et al.*, 2006). Ein spezifischer Rezeptor für AGP wurde bis heute allerdings noch nicht gefunden.

Für die biologische Rolle als allgemeines *Drug Binding Protein* (Israili & Dayton, 2001) könnte eine direkte Kontrolle der Bindungsaktivität immens wichtig sein. Insbesondere in Bezug auf die extreme Erhöhung der AGP-Plasmakonzentration während einer Entzündungsreaktion muss die Affinität des Proteins zu physiologischen Liganden strikt reguliert sein. Daher wäre eine Ligandenbindungsstudie mit unterschiedlichen Glykosylierungsformen des AGP von großem Interesse. Allerdings lässt sich dieses durch die beobachtete Heterogenität der natürlichen Proteinpräparationen nur schwer bewerkstelligen. Zukünftige kokristallisierte AGP/Ligand-Strukturen könnten vielleicht Rückschlüsse auf eventuelle Kontrollmechanismen liefern. Die vorliegende Kristallstruktur bietet einen guten Startpunkt für weitere Computer-Modellierungen von potentiellen AGP-Liganden und könnte somit die Prüfung von Pharmazeutika im Hinblick auf ihre Bindung an humanes AGP und der damit verbundenen veränderten Pharmakokinetik unterstützen. So ließen sich in Zukunft die bis heute durchgeführten empirischen AGP-Bindungs-Tests ersetzen.

4.2 Ligandenbindung der humanen Lipocaline

Wegen ihrer kelchartigen Proteinstruktur und aufgrund von biochemischen Befunden sind die Lipocaline schon früh den Transportproteinen zugeordnet worden (Flower, 1996). Für einige Vertreter konnten zahlreiche endogene wie auch exogene Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten ermittelt werden (siehe Tabelle 1). Dabei fällt auf, dass überwiegend kleine hydrophobe Moleküle gebunden werden. Allerdings war ein direkter Vergleich der beschriebenen Bindungsaktivitäten bislang schwierig, da die durchgeführten Studien jeweils mit sehr verschiedenen Proteinpräparationen durchgeführt wurden. Neben variierenden Reinheitsgraden wirkt sich insbesondere die Nutzung unterschiedlicher Ausgangsmaterialien negativ auf die Vergleichbarkeit aus. In einigen Studien wurde das Protein aus Körperflüssigkeiten oder Geweben gewonnen, andere nutzten rekombinante Proteine aus unterschiedlichen Organismen (Bakterien, Hefen, menschliche Zelllinien). Reinheit, Faltung und Glykosylierungsstatus der Lipocaline wichen damit stark von einander ab. Außerdem wurden in den verschiedenen Bindungsstudien unterschiedliche Messmethoden (meist

spektroskopischer Art) zur Bestimmung der Bindungskonstanten verwendet, was einen direkten Vergleich zusätzlich erschwert.

Um diese Probleme zu umgehen, wurde ein einheitliches Expressionssystem zur Produktion von zehn humanen Vertretern der Lipocalinfamilie in *E. coli* verwendet: α_1 -Acid Glycoprotein (AGP), Apolipoprotein D (ApoD), Complement Component Factor 8γ (C8g), Glycodelin (GLY), Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), α_1 -Microglobulin (α_1m), Odorant-Binding Protein (OBP), Retinol-Binding-Protein (RBP), Tear Lipocalin (Tlc) und β -Trace Protein (PGDS). Dieses Expressionssystem gewährleistete die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken der sekretorischen Proteine im oxidierenden Milieu des bakteriellen Periplasma (Skerra, 1994). Der Einsatz des „Helferplasmides“ pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) mit vier konstitutiv überexprimierten periplasmatischen Chaperonen führte für einige Vertreter zudem zu einer erhöhten Proteinausbeute. Damit konnten alle Vertreter in ausreichender Menge hergestellt werden und unter einheitlichen Bedingungen mit hoher Reinheit präpariert werden (Abbildung 16). Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken wurde durch SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen kontrolliert. Trotz fehlender Glykosylierung (Verwendung von *E. coli* als Produktionsorganismus) deuteten die CD-Spektren auf korrekte Faltung und intakte Sekundärstruktur mit überwiegendem β -Faltblatt-Charakter hin. Alle Spektren ließen sich mit bereits publizierten Daten gut vergleichen. Somit stand erstmals genügend vergleichbares Ausgangsmaterial für Ligandenmessungen unter standardisierten Bedingungen zur Verfügung.

Zur Messung der Affinitäten für die unterschiedlichen Liganden wurde die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gewählt, welche für Lipocaline zur Bestimmung von Bindungskonstanten schon vorher erfolgreich verwendet worden ist (Briand *et al.*, 2002; Cogan *et al.*, 1976; Collini *et al.*, 2003; Gasymov *et al.*, 1999).

Als exemplarische Verbindungen für eine vergleichende Bindungsstudie wurden vier kleine hydrophobe Moleküle ausgewählt. Darunter waren die beiden natürlichen Liganden des RBP Retinol und Retinsäure (Cogan *et al.*, 1976). Affinitäten für Retinoide sind auch schon für andere Vertreter der Lipocaline beschrieben worden. Das relativ unpolare Molekül 8-Anilino-1-naphthyl-sulfonsäure (ANS) bindet generell an hydrophobe Proteinoberflächen und in Taschen, wobei eine charakteristische Fluoreszenz auftritt. Die Modellverbindung 11-(5-(Dimethylamino)-1-naphthyl-sulfonylamino)-undecansäure (DAUDA) ist ein fluoreszierendes Fettsäureanalog. Für alle ausgewählten Modellliganden lag wenigstens eine publizierte Bindungsaktivität eines Lipocalins vor, so dass ein direkter Vergleich der gemessenen Ergebnisse mit Literaturwerten möglich war.

Für neun der humanen Lipocaline (mit Ausnahme des NGAL) konnte eine Affinität zu Retinol festgestellt werden (Tabelle 8). Dabei wurde der Literaturwert für das Plasma RBP (190 nM, Cogan *et al.*, 1976) bestätigt, was die Funktionalität des rekombinanten Proteins unterstreicht. Überraschenderweise wurde die höchste Affinität für das ApoD bestimmt. Diese Eigenschaft war bislang nicht beschrieben. Der gemessene Wert ist aufgrund des hohen Messfehlers, resultierend aus der mathematischen Messwertanpassung allerdings vorsichtig zu bewerten. Die Kristallstruktur des ApoD (Eichinger *et al.*, 2007) zeigt eine passende Bindungstasche für die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure, für welche ein direkter Kontakt der Carboxylgruppe über eine Wasserstoffbrücke zu Asn68 postuliert wird. Eine ähnliche Bindung könnte daher auch für das Retinolmolekül erwartet werden. Für die PGDS wurde ebenfalls eine relativ hohe Affinität bestimmt. Dies ist insofern nicht überraschend, da neben dessen Funktion in der Prostaglandin-D-Synthese auch schon der homologen PGDS aus der Ratte eine Rolle im Transport von Retinoiden zugeschrieben wurde (Tanaka *et al.*, 1997). Zum ersten Mal konnte auch für Glycodelin eine Affinität zu Retinol beschrieben werden. Eine solche Aktivität wurde in einer vorangegangenen Arbeit für glykosyliertes Glycodelin-A (aus dem Endometrium) ausgeschlossen (Koistinen *et al.*, 1999). Möglicherweise führt die Glykosylierung des Proteins zu einem Verschluss der Bindungstasche für Retinoide. Die beiden Lipocaline AGP und OBP binden Retinol mit deutlich schwächeren Dissoziationskonstanten. Ein Blick auf die Kristallstruktur des AGP (Abschnitt 3.1.7) mit seiner weitgehend hydrophoben Bindungstasche und dem durch einen Argininrest vermittelten polaren Eingang (Abbildung 11) legt eine Affinität für Retinol nahe. Dabei sollte die terminale Alkoholgruppe des Liganden mit dem Arginin in direkte Wechselwirkung treten können. Bemerkenswerterweise zeigen bis auf NGAL alle untersuchten Lipocaline eine Affinität zu Retinol. Daher stellt sich die Frage, ob neben dem speziellen Transport des Vitamin-A durch das RBP im menschlichen Plasma noch andere, bis heute unbekannt Transportwege oder Funktionen des Retinols existieren.

Ein sehr ähnliches Ergebnis wurde für die Bindung von Retinsäure ermittelt. Alle zehn untersuchten Vertreter zeigten Affinität zu dem entsprechenden Carbonsäurederivat des Retinols. Dabei diente wiederum das RBP als Referenz, dessen Literaturwert (210 nM, Cogan *et al.*, 1976) mit den durchgeführten Messungen bestätigt werden konnte. Nach dem RBP zeigte PGDS die höchste Affinität, der gemessene Wert wich allerdings, höchstwahrscheinlich aufgrund von strukturellen Divergenzen, vom beschriebenen Wert für das homologe Protein der Ratte (80 nM, Tanaka *et al.*, 1997) ab. Während der Titrationen von RBP und PGDS wurde eine langsame Komplexbildung beobachtet, die zu einer wesentlich

längeren Einstellzeit des jeweiligen Fluoreszenzendwertes (ca. 15 Min) führte. Für die anderen Vertreter war die Gleichgewichtseinstellung bereits nach etwa einer Minute vollzogen. Die Kristallstrukturen des RBP (Newcomer *et al.*, 1984) und der PGDS (Kumasaka *et al.*, 2009) offenbaren eine enge Bindungstasche für beide Proteine. Zusätzlich wird im RBP der Ligand sehr tief in der β -Fass-Struktur gebunden. Dies könnte eine Erklärung für die verlangsamte Kinetik der Ligandenbindung liefern.

Die anderen Lipocaline ließen sich in zwei unterschiedliche Gruppen mit je vergleichbaren Affinitäten einteilen. Dabei zeigten in der ersten Gruppe α 1m, OBP und Tlc Dissoziationskonstanten um die 1,8 μ M. Die Kristallstruktur des humanen Tlc offenbart eine ungewöhnliche zweiteilige Form der Bindungstasche (Breustedt *et al.*, 2005) und sollte damit die Bindung von Molekülen mit variabler Größe und Form zulassen, allerdings mit eher moderaten Bindungskonstanten. Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung anderer lipophiler Liganden wurden in vorangegangenen Studien im mikromolaren Bereich beschrieben (Glasgow *et al.*, 1995). Die in Verdrängungsexperimenten mit gebundenen fluoreszierenden Stoffen ermittelten Affinitäten des OBP für verschiedene kleine Moleküle (Briand *et al.*, 2002) liegen ebenfalls im niedrigen mikromolaren Bereich. Nebenbei zeigt OBP eine für diese Proteinfamilie relativ hohe Sequenzidentität von 45,2 % zu Tlc. Dies könnte die Ähnlichkeit der gemessenen Dissoziationskonstanten erklären.

Die zweite Gruppe enthält AGP, ApoD, C8g, GLY und NGAL mit Affinitäten im höheren mikromolaren Bereich. NGAL besitzt eine weit zum Lösungsmittel hin geöffnete, trichterförmige Kavität, die zur Aufnahme des natürlichen Liganden Enterobactin geeignet ist (Goetz *et al.*, 2002). Aufgrund der positiven Ladung und der Polarität dieser Bindungstasche scheint eine Komplexbildung von Retinoiden jedoch erschwert zu sein. C8 γ zeigt deutliche strukturelle Ähnlichkeit mit NGAL und besitzt auch eine trichterförmige Liganden-Bindungstasche (Dissertation Breustedt, 2008). Auch diese scheint keine feste Bindung von Retinoiden zu erlauben. Die Tasche in der gelösten Kristallstruktur des AGP offenbart genug Raum für den Ring der Retinsäure. Eine Affinität im höheren mikromolaren Bereich ist insofern nicht überraschend als AGP generell über 300 verschiedene, oft pharmazeutisch relevante Liganden (Israili & Dayton, 2001) mit nanomolaren bis millimolaren Dissoziationskonstanten bindet.

Einige der Lipocaline zeigen deutliche Unterschiede in den Affinitäten für Retinol und Retinsäure (siehe Tabelle 8). Diese Eigenschaft ist schon für die PGDS der Ratte beschrieben worden (Tanaka *et al.*, 1997). Offenbar führt die Ladung der Carboxylgruppe der Retinsäure

mitunter zu zusätzlichen Wechselwirkungen und führt zu einer Diskriminierung der Liganden.

Die Bindungsstudien mit dem Fettsäureanalogon DAUDA ergaben ein sehr differenziertes Bild. Interessanterweise ließ sich für die Lipocaline GLY, NGAL und RBP keine Affinität für DAUDA feststellen. Anscheinend sind diese Vertreter aufgrund der Gestaltung ihrer Bindungstasche nicht in der Lage, Fettsäuren zu binden. Insgesamt lagen die gemessenen Dissoziationskonstanten für die anderen Lipocaline um den Wert von 1 μM , was eine wesentlich schwächere Bindung im Vergleich zu den Retinoiden darstellt. Allerdings ist zu bemerken, dass DAUDA eine große fluoreszierende Naphthyl-sulfongruppe trägt, welche die Bindung der Fettsäureeinheit auch bei richtiger Orientierung des aliphatischen Restes sterisch behindern könnte. Dissoziationskonstanten deutlich unter 1 μM waren nur bei PGDS und ApoD zu beobachten, welche beide bekanntermaßen Fettsäurestrukturen binden können (z. B. Arachidonsäure durch ApoD (Vogt & Skerra, 2001) und Vorstufen des Prostaglandins durch PGDS (Urade & Hayaishi, 2000)). Andere Vertreter der Lipocaline wie $\alpha 1\text{m}$, AGP und Tlc binden DAUDA schwächer mit Affinitäten um 1 μM . Für das Tlc konnte mit den durchgeführten Messungen der Literaturwert von 2,8 μM (Gasymov *et al.*, 1999) bestätigt werden.

OBP und C8 γ zeigen die schwächsten Werte. Wie schon beschrieben, sind mit OBP Verdrängungsexperimente mit fluoreszierenden Liganden durchgeführt worden (Briand *et al.*, 2002). Darunter befand sich auch DAUDA, welches aufgrund seiner niedrigen Affinität durch verschiedene Duftstoff-Liganden verdrängt werden konnte und damit als spektroskopische Sonde diente. Die von Briand *et al.*, 2002 mit $1,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ bestimmte Dissoziationskonstante für DAUDA selbst ist allerdings aufgrund des großen Fehlers als fragwürdig einzustufen.

Für die Lipocaline ApoM, GLY, NGAL und RBP ließ sich keine Bindungsaffinität für DAUDA ermitteln. Höchstwahrscheinlich ist die Bindungstasche des Glycodelins sehr klein oder nicht komplett zugänglich für das voluminöse DAUDA-Molekül, da dieses Lipocalin auch schon für die beiden zuvor untersuchten Liganden nur schwache Affinitäten zeigte. Gleiches gilt für die beiden Lipocaline NGAL und RBP mit ihren eher schmalen Liganden-Bindungstaschen.

Der hydrophobe Ligand ANS wurde von allen untersuchten Lipocalinen außer RBP gebunden. Dies lässt sich durch die schon erwähnte enge Form der Bindungstasche des RBP erklären. Insgesamt zeigen die humanen Lipocaline eher schwache Affinität zu ANS mit Dissoziationskonstanten von 5,8 bis 10,9 μM . Ein etwas höherer Wert ließ sich nur für GLY

bestimmen. Da allerdings das Molekül ANS nicht nur in „Taschen“, sondern auch an hydrophoben Oberflächenregionen von Proteinen binden kann, könnte die höhere Affinität für GLY durchaus durch die fehlende Glykosylierung des bakteriell produzierten Proteins erklärt werden.

Das einzige Lipocalin mit stärkerer Bindungsaktivität war AGP. Hier kann die aufgeklärte Kristallstruktur (Abschnitt 3.1.7) einen genaueren Einblick liefern. Das berichtete weitreichende Ligandenspektrum des AGP (Israili & Dayton, 2001) bezieht sich überwiegend auf größere Verbindungen mit mehrzyklischen Ringsystemen. Daher ist eine Affinität zu ANS mit seinem Naphthalin-Ring durchaus zu erwarten. Die Kristallstruktur des AGP offenbart eine durchaus passende Bindungstasche für dieses Molekül. Sie unterteilt sich, wie beschrieben, in drei Taschen. Die Bindung des hydrophoben Anilinrings von ANS erfolgt höchstwahrscheinlich in der größeren hydrophoben Tasche I (siehe Modell in Abbildung 34). Dieser würde tief in der Bindungstasche liegen mit einer Platzierung des Naphthalin-Ringes in den beiden oberen kleineren Taschen. Die polare Sulfonsäure-Gruppe am Doppelring würde somit in das Lösungsmittel zeigen bzw. in Wechselwirkung mit Arg90 oder Arg68 am Bindungstascheneingang treten. Die hydrophobe Natur der gesamten Tasche führt insgesamt zur starken Erhöhung der Fluoreszenz des Liganden. In der Studie von Essassi *et al.*, 1990 wurden zwei Bindungsstellen für ANS mit unterschiedlichen Dissoziationskonstanten ermittelt; eine höher affine Stelle (0,74 μM) und eine schwächer affine Stelle (10,8 μM). Die Lokalisation der postulierten zweiten ANS-Bindestelle auf AGP (Essassi *et al.*, 1990) ist aus der vorliegenden Kristallstruktur leider nur schwer zu beantworten. Der kleinere hydrophobe Eingang zur Bindungstasche an der Seite des β -Fasses (Pfeil in Abbildung 11) könnte Teile des ANS mit schwächerer Affinität aufnehmen. Allerdings könnte sich eine zweite Bindungsstelle auch außerhalb der Bindungstasche befinden, zum Beispiel zwischen α -Helix und β -Fass. Die gemessenen Affinitäten der anderen humanen Lipocaline für ANS unterstützen allerdings die These einer zweiten niederaffinen Bindestelle für den unpolaren Liganden in allen humanen Vertretern der Proteinfamilie.

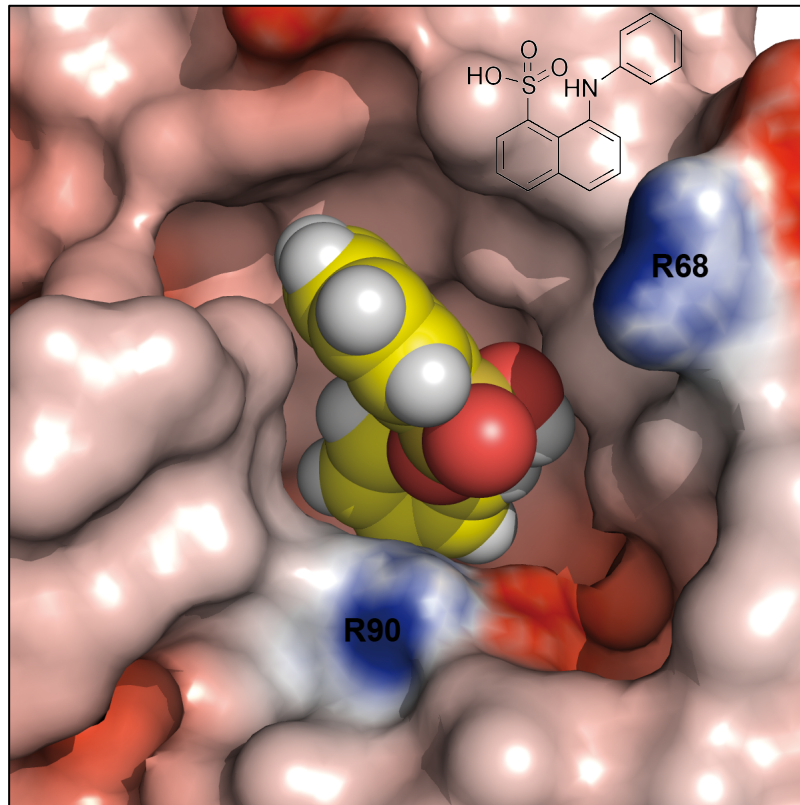


Abbildung 34: Modell für die Bindung von ANS in der AGP-Bindungstasche. Blick von oben in die β -Fass-Struktur mit Färbung der Moleküloberfläche nach Ladung (von -10 kBT/e in rot, bis +10 kBT/e in blau). Das ANS-Molekül ist im Kalottenmodell dargestellt und wurde visuell in die Bindungstasche eingepasst. Der Anilinring der Verbindung zeigt dabei nach unten in die unpolare Tasche III.

Zusammenfassend konnten mit den durchgeführten Experimenten unter standardisierten Bedingungen zum ersten Mal vergleichbare Bindungsdaten für zehn Vertreter der humanen Lipocaline mit vier ausgewählten Liganden gesammelt werden. Die Ergebnisse erlauben eine direkte Gegenüberstellung der Dissoziationskonstanten. Somit sollten sich durch die Verwendung des periplasmatischen Expressionssystems für sekretorische Proteine auch Lipocaline aus anderen Spezies in Hinblick auf ihre Ligandenbindung untersuchen lassen. Dies ist insbesondere interessant, da die meisten Funktionen der Lipocaline, insbesondere die physiologischen Liganden, bis heute unbekannt sind.

4.3 Strukturbiologische Analyse des O10/CTLA4-Proteinkomplexes

Das Faltungsmuster der Lipocaline konnte, wie eingangs beschrieben, erfolgreich als Gerüststruktur zur Generierung von artifiziellen Bindeproteinen, sogenannten Anticalinen, eingesetzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die erste Kristallstruktur eines Komplexes zwischen einem Anticalin und seinem Protein-Zielmolekül (dem humanen Immunrezeptor CTLA4) aufgeklärt werden.

4.3.1 Bakterielle Produktion des humanen CTLA4

Um die extrazelluläre Domäne des humanen CTLA4 im Komplex mit einem Anticalin O10 zu kristallisieren, musste der humane Rezeptor zuerst in ausreichenden Mengen produziert werden. Dazu wurde ein bakterielles Expressionssystem verwendet, da dieses höhere Ausbeuten an rekombinantem Protein liefern kann als eukaryotische Systeme (z. B. Hefen, Insektenzellen oder menschliche Zelllinien). Zur Vermeidung von flexiblen Bereichen des Proteins sollte CTLA4 zunächst in monomerer Form überexprimiert werden, das heißt ohne den Cysteinrest am Beginn der Stalk-Region, der die Dimerisierung durch Ausbildung einer Disulfidbindung bewirkt. Allerdings verwies die Analyse der Literatur über CTLA4 auf zahlreiche Probleme bei der Produktion des Rezeptorfragmentes in monomerer Form. Das Monomer zeigte bei bakterieller Expression verstärkt Löslichkeitsprobleme und konnte nur erfolgreich durch den Ersatz eines Loops durch ein Somatostatin-Peptid produziert werden (Nuttall *et al.*, 1999). Die Expression in transfizierten COS-Zellen konnte nur sehr geringe Proteinausbeuten liefern. Hier wurden zahlreiche Probleme mit der korrekten Faltung des disulfid-verbrückten Proteins und eine reduzierte Bindungsaktivität beschrieben (Linsley *et al.*, 1995). In allen bis dahin veröffentlichten Kristallstrukturen (Schwartz *et al.*, 2001; Stamper *et al.*, 2001) wurde stets die dimere Form verwendet. Für therapeutische Zwecke ist eine stabile Fusion des monomeren CTLA4 mit dem Fc-Teil eines humanen Antikörpers (CTLA4-Ig) entwickelt worden (Lane *et al.*, 1993). Diese wurde unter anderem auch zur Selektion des Anticalins benutzt. Aus proteinchemischer Sicht stellte die gentechnische Produktion des freien, monomeren CTLA4 für die Kristallisation daher eine gewisse Herausforderung dar.

Zur Erhöhung der Erfolgchancen wurde der periplasmatische Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994) verwendet. Das oxidierende Milieu des Periplasmas von *E. coli* sollte dabei die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken im CTLA4 ermöglichen. Durch die Entfernung der C-terminalen Linkerregion inklusive des Cys122 ließen sich erfolgreich kleine

Mengen an monomerem Protein gewinnen. Allerdings musste erst das N-terminale Ende um eine Glutaminsäure erweitert werden, um die Aktivität der Signalpeptidase zu erhöhen (Geller *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde durch die Verwendung des Helferplasmides pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) die Faltungseffizienz im Periplasma und damit die Ausbeute an CTLA4 erhöht. Eine Optimierung der Salzkonzentration konnte die berichtete Aggregations-tendenz des monomeren Proteins verringern, so dass Kristallisationsversuche möglich waren. Das Anticalin O10 zeigte hohe Affinität zum gentechnisch erzeugten monomeren CTLA4, und der resultierende Proteinkomplex aus beiden Komponenten konnte mittels Größenaus-schlusschromatographie präpariert werden.

Die durch Rückfaltung aus Einschlusskörpern gewonnene dimere Form des Rezeptormoleküls (dCTLA4) lieferte gute Protein-Ausbeuten, war bemerkenswert stabil und besser lagerfähig als die monomere Version. Die intermolekulare Disulfidbrücke (über Cys122) wurde dabei durch Oxidation mithilfe des Luftsauerstoffs während der Rückfaltung ausgebildet. Versuche mit verschiedenen Oxidationsmitteln hatten zuvor zu vermehrt falschen Verknüpfungen geführt (Cox *et al.*, 1999).

4.3.2 Kristallisation und Strukturlösung

Initiale nadelförmige Proteinkristalle für die Apo-Version des Anticalins O10 mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel ließen sich in ihrer Streufähigkeit durch die Variation von Fällungsmittelkonzentration und des pH-Wertes nicht entscheidend verbessern und waren damit für Beugungsexperimente unbrauchbar. Erst die Zugabe des Detergenz Anapoe X405 trug zur Ausbildung von größeren, streufähigen Kristallen mit anderer Morphologie (Abbildung 26) bei. Additive wie Salze, Detergenzien und bivalente Ionen zeigen in der Proteinkristallographie große Effekte auf die Löslichkeit von biologischen Makromolekülen. Dabei können jene kleinen Moleküle die Interaktionen zwischen den Proteinketten sowie auch mit dem Lösungsmittel beeinflussen. Effekte auf die Struktur des Wassers manipulieren direkt die Wechselwirkungen der Makromoleküle mit dem Lösungsmittel im Kristallisations-tropfen. Darüber hinaus können Additive gewisse Konformationen von Regionen im Protein stabilisieren (Cudney *et al.*, 1994). Somit lassen sich mit passenden Additiven wie im Falle des Anticalin O10 andere Kristallformen mit verbesserter Streufähigkeit erzeugen. Für diese optimierten Kristalle wurde zunächst die Raumgruppe C2 mit vier O10-Molekülen in der asymmetrischen Einheit ermittelt. Bei Verfeinerung der Struktur ergab sich jedoch eine wesentlich schlechtere Qualität der Elektronendichte für zwei der enthaltenen Ketten. Durch Reprozessierung der Daten in der niedrigeren Raumgruppe P1 (Auflösung der zweizähligen

Symmetrie) wurde dieses Problem gelöst. Schwierigkeiten beim Frieren der Kristalle hatten bereits auf Spannungen im Kristallgitter hingedeutet.

Wegen der starken Aggregationstendenz des monomeren CTLA4 kam es in den Kristallisationsexperimenten mit dem Proteinkomplex initial zur verstärkten Ausfällung des Proteins und einer damit resultierenden Trennung des Komplexes. Einige Ansätze zeigten neben Präzipitat zwar auch Kristalle, welche gemäß Analyse durch SDS-PAGE aber nur das Anticalin enthielten. Anscheinend wurde das Apoprotein nach Trennung des Komplexes durch seine bessere Löslichkeit nicht ausgefällt und konnte somit in einigen der Bedingungen kristallisieren.

Der Einsatz der stabilen dimeren Version des CTLA4 lieferte Komplexkristalle mit dem Anticalin O10, mit welchen sich die Kristallstruktur durch molekularen Ersatz aufklären ließ. Zunächst wurde angenommen, dass sich in der asymmetrischen Einheit ein Molekül dimeres CTLA4 mit zwei Molekülen O10 befinden (66,9 kDa, Matthews-Koeffizient 2,6 bei 52,5 % Lösungsmittelgehalt; Matthews, 1968). Das Programm Phaser hatte allerdings erhebliche Schwierigkeiten bei der Platzierung des zweiten Monomers des CTLA4 und des zweiten Anticalinmoleküls. Die Annahme von einem Monomer des CTLA4 mit einem gebundenen Anticalin (33,5 kDa) resultierte in einem ungewöhnlich hohen Matthews-Koeffizienten von 5,2 mit einem Lösungsmittelgehalt von 76,2 % für den Kristall. Die Komplexstruktur mit nur je einem CTLA4- und O10-Molekül ließ sich aber problemlos verfeinern. Eine spätere Analyse der Kristallpackung des finalen Strukturmodells offenbarte große Lösungsmittelkanäle im Kristall und lieferte damit die Erklärung für den hohen Matthews-Koeffizienten.

Die dimere Struktur des Proteinkomplexmodells (Abbildung 29) lässt sich durch Zuhilfenahme der durch zweizählige Symmetrie verwandten kristallographischen Nachbar Ketten erzeugen. Interessanterweise verläuft die Symmetrieachse genau durch die interchenare Disulfidbrücke des dimeren CTLA4-Fragments.

4.3.3 Strukturanalyse

Beide Kristallstrukturen (Apo- und Komplexstruktur) enthüllen annähernd die komplette Proteinkette für alle Moleküle. Sämtliche Disulfidbindungen sind geschlossen und mit entsprechender Elektronendichte sichtbar. Eine Ausnahme stellt die Schleife #3 in der Apostruktur des Anticalins dar, welche ohne Bindungspartner komplett ungeordnet vorliegt und erst durch die Komplexbildung fixiert wird. Die hohe Auflösung beider Datensätze (~ 2 Å) ermöglicht eine eingehende Analyse der spezifischen Erkennung von CTLA4 durch das

artifizielle Lipocalin sowie den strukturellen Vergleich des Anticalins in gebundener und ungebundener Form.

Die Apostruktur des Anticalins O10 behält auch nach Austausch von 30 Aminosäurepositionen gegenüber dem nativen Lipocalin NGAL sein robustes Faltungsmuster mit dem antiparallelen β -Fass und der α -Helix. In der Bindungstasche lässt sich ein Fragment des zur Kristallisation benutzten Detergenzes Anapoe X-405 ausmachen. Trotz der Entfernung der Seitenketten für die Interaktion mit dem nativen Liganden Enterobactin (R81A, K125L, K134A) weist also das veränderte Lipocalin O10 nachwievor eine gewisse Tendenz auf, kleinere Liganden zu binden. Der Austausch der hydrophilen Aminosäuren R81, K125 und K134 zur eher kleinen hydrophoben Alanin-Seitenkette kommt der Erkennung des neuen Proteinliganden CTLA4 zugute, da dessen Hauptepitop (FG-Schleife) mit dem typischen $^{99}\text{MYPPPPYY}^{105}$ Motiv aus überwiegend hydrophoben Aminosäureseitenketten besteht, welche sich exzellent in die hydrophobe Umgebung der Anticalin-Bindungstasche einpassen. Die natürliche Verdrillung der beiden Stränge C und D im Anticalin O10 steht in Einklang mit der Windung des kompletten β -Sandwichs im CTLA4, was zu zahlreichen spezifischen Kontakten führt und insbesondere die Interaktion mit der mutierten Schleife #2 begünstigt (Abschnitt 3.6.3).

Der Vergleich der natürlichen NGAL-Struktur mit der Apostruktur des Anticalins O10 offenbarte eine Verschiebung der eingeführten Tyrosinseitenkette (Y132F) von mehr als 8 Å. Diese wird vermutlich durch die eingeführte Argininseitenkette (A40R) in Schleife #1 ausgelöst, welche im veränderten Lipocalin den entsprechenden Platz von Phe132 einnimmt (Abbildung 33). Durch die Bildung des Komplexes mit CTLA4 wird diese Verschiebung rückgängig gemacht, da der Proteinligand mehr Raum in der Bindungstasche benötigt. Somit zeigt die Seitenkette von Phe132 in der komplexierten Version wieder zur offenen Seite des β -Fasses hin.

Das durch eine intermolekulare Disulfidbrücke verbundene dimere CTLA4 in der Komplexstruktur zeigt die gleiche strukturelle Integrität, wie sie auf der Oberfläche der T-Zelle vorliegen sollte (Stamper *et al.*, 2001; Abbildung 30 und Abbildung 29). Die Orientierung der beiden Rezeptordomänen ermöglicht die Anlagerung von zwei Anticalinmolekülen ohne sterische Behinderung. Beide Epitope werden durch je ein verändertes Lipocalin besetzt. Durch die hohe Affinität des Anticalins O10 sollte somit unter physiologischen Bedingungen die Interaktion des CTLA4 mit B7.1 komplett blockiert werden und die Unterdrückung des entsprechenden Signaltransduktionswegs gewährleistet sein (Allison, 2005). Dies erklärt die ausgeprägte antagonistische Eigenschaft des neu generierten

Bindemoleküls (Schönfeld *et al.*, 2009). Dabei ist die annähernde Verdopplung der Kontaktfläche mit dem Anticalin, verglichen mit der nativen CTLA4/B7.1-Interaktionsfläche, herauszustellen.

4.3.4 Kontaktfläche im Proteinkomplex

Durch die Bindung des Anticalins O10 an der extrazellulären Domäne des CTLA4 kommt es zu einem Verlust an Gesamtproteinoberfläche von 2378 \AA^2 (1155 \AA^2 auf der Seite von O10, 1223 \AA^2 auf der Seite von CTLA4). Dies stellt im Vergleich zur natürlichen Interaktionsfläche von CTLA4 mit seinem natürlichen Wechselwirkungspartner B7.1 (1255 \AA^2 ; Stamper *et al.*, 2001) eine Verdopplung dar. Damit lässt sich die über 50fach höhere Affinität des generierten Anticalins O10 ($K_D = 9.0 \text{ nM}$) gegenüber B7.1 ($K_D = 0,4 \text{ \mu M}$; van der Merwe *et al.*, 1997) erklären. Eine große Anzahl der mutierten Aminosäureseitenketten (10 von 20 veränderten Schleifen-Positionen) des O10 tritt in direkten Kontakt mit CTLA4 (je drei in den Schleifen #1 und #4; vier in Schleife #2; keine in Schleife #3). Bei direktem Vergleich der beiden Kontaktflächen von O10 und B7.1 mit CTLA4 zeigt sich, dass 85,5 % der natürlichen Interaktionsfläche des B7.1 auch vom Anticalin bedeckt werden (Abbildung 35). Damit ist das humane Epitop komplett durch das Anticalin blockiert, was sich durch die starke antagonistische Eigenschaft des neu generierten Bindemoleküls (Daten von der Pieris AG, Feising) unterstreichen lässt.

Das Anticalin O10 erkennt außerdem das gleiche Epitop auf dem CTLA4-Rezeptor der Maus. Beim Vergleich der humanen mit der murinen CTLA4-Struktur können nur wenige der ausgetauschten Aminosäuren (41 Mutationen insgesamt zwischen den beiden Spezies) in der besagten Epitopregion gefunden werden. Hier ist vor allen Dingen die Position Tyr105 in der zentralen FG-Schleife (Abschnitt 3.6.3) zu nennen, welche im Mausrezeptor konservativ durch Phenylalanin ersetzt ist. Weitere relevante Mutationen befinden sich in der BC-Schleife (S27P, K30N, A31T) und nur am Rande der Bindestelle des Anticalins. Damit sind die Epitope des Menschen und der Maus in Bezug auf die Erkennungsstelle des Anticalins annähernd gleich, was in Einklang mit Biocore-Bindestudien und in Zellkulturexperimenten steht (Daten von der Pieris AG, Feising). Im Rahmen präklinischer Studien kann das Anticalin also vorteilhafterweise zunächst im Mausmodell getestet werden.

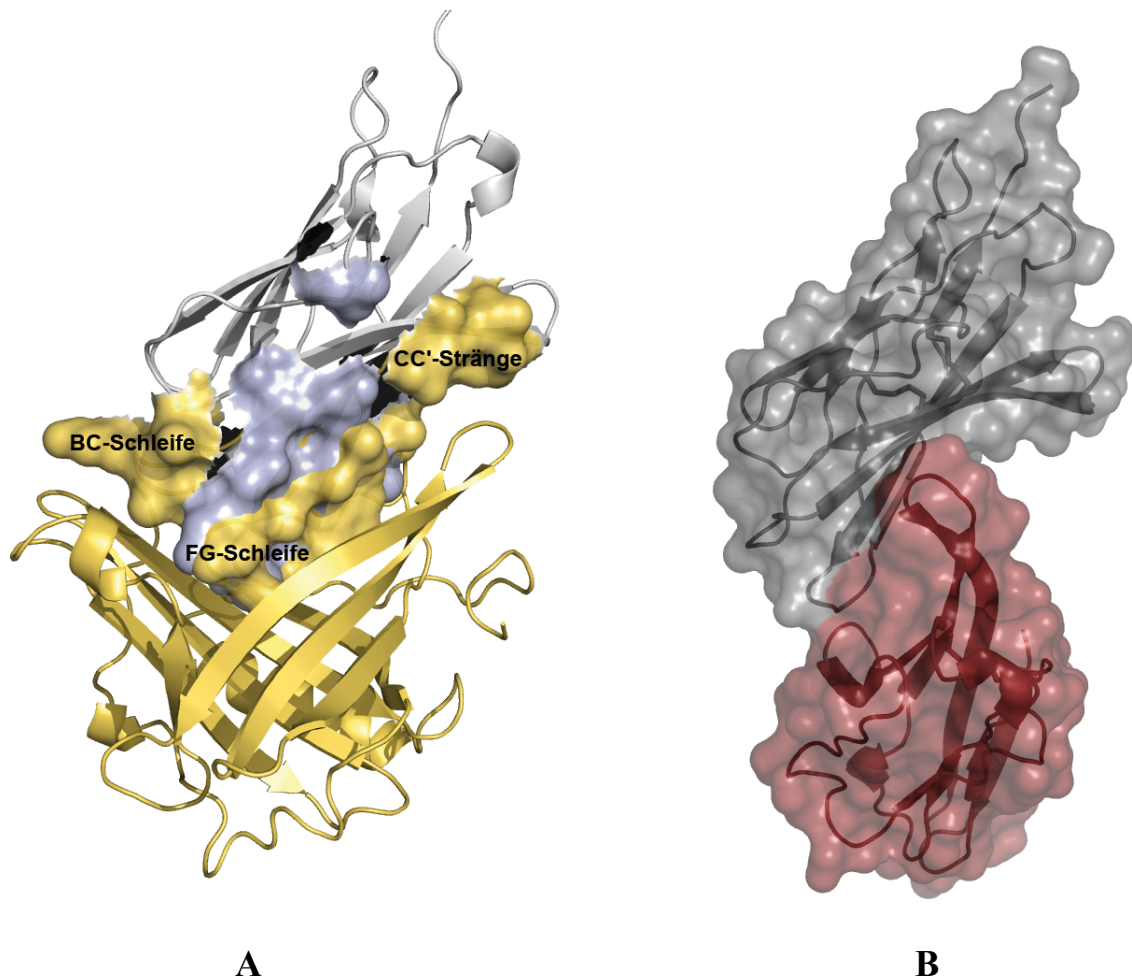


Abbildung 35: Vergleich der Kontaktflächen von CTLA4 mit B7.1 und dem Anticalin O10. [A] Die spezifischen Interaktionsflächen auf der CTLA4-Oberfläche mit dem entsprechenden Bindungspartner (B7.1 in grau, Anticalin O10 in gelb) sind hervorgehoben. Eine genaue Berechnung ergibt, dass 85,5 % der Kontaktfläche mit B7.1 (graue Fläche) auch vom Anticalin bedeckt werden (gelbe Fläche). Insgesamt ist die Kontaktfläche des Anticalins mit CTLA4 (2378 Å², gelbe Fläche) annähernd doppelt so groß wie die mit B7.1 (1255 Å², graue Fläche). Die verschiedenen Bereiche des Epitops auf CTLA4 sind bezeichnet. [B] Zum Vergleich ist die Kristallstruktur von Stamper *et al.*, 2001 mit gleicher Orientierung von CTLA4 in grau und B7.1 in rot dargestellt.

4.3.5 Vergleich des Erkennungsmodus des Anticalins mit Antikörpern

Der in dieser Arbeit strukturell aufgeklärte Bindungsmodus des künstlichen Lipocalins lässt sich gut mit der Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und seinem Antigen vergleichen. Die strukturelle Flexibilität aller vier Schleifenregionen und der spezifische Austausch von Aminosäurepositionen (insbesondere in den Schleifen) im Anticalin ermöglichen die Erkennung des Epitops. Dabei illustriert insbesondere die induzierte Ordnung der Schleife #3 („*Induced Fit*“) bei der Komplexbildung zusammen mit den kleineren konformellen Änderungen der Schleifen #2 und #4 die erstaunliche Flexibilität der Binderegion. Für das natürliche Lipocalin NGAL konnte dieser Mechanismus bei Bindung des Liganden Enterobactin nicht beobachtet werden (Goetz *et al.*, 2002).

Die vier flexiblen Schleifen des Anticalins lassen sich mit den sechs hypervariablen Regionen (CDRs) der Bindestelle eines Antikörpers, welche die Interaktion mit dem Antigen vermitteln, vergleichen. CDRs zeigen hohe Sequenzvariabilität in Verbindung mit struktureller Diversität, welche zur Erkennung verschiedenster Antigene notwendig ist. Aus bekannten Antikörperstrukturen wurde als strukturelle Basis für die Antigenerkennung eine Gruppe definierter Konformationen der CDRs ermittelt (Al-Lazikani *et al.*, 1997). Eine Analyse dieser CDRs in Bezug auf Länge und Aminosäurekomposition ermöglichte deren Zuordnung zu bestimmten Antigenklassen (Collis *et al.*, 2003). Die Diversität der CDRs resultiert aus der Rekombination eines speziellen Gensegmentes, gefolgt von dessen Hypermutation mit anschließender Selektion durch das Immunsystem (Skerra, 2003). Im veränderten Lipocalin wird eine ähnliche Diversität durch die Komplexität der Schleifenregionen in der entsprechenden Molekülbibliothek (konzertierte Mutagenese durch eine zweistufige PCR-Strategie unter Einsatz von vier Oligodesoxynukleotiden mit degenerierten Basentriplets) mit anschließender Selektion mittels *Phage Display* gewährleistet. Somit lassen sich neuartige Bindemoleküle mit vergleichbaren Affinitäten zu Antikörpern generieren (Skerra, 2007b).

Der strukturelle Vergleich des O10/CTLA4-Komplexes mit einem Antikörper/Antigen Komplex unterstreicht die Ähnlichkeit des Bindungsmodus. In der Kristallstruktur des murinen Antikörperfragmentes 8-18C5 zusammen mit dem *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (MOG) der Ratte (PDB: 1PKQ; Breithaupt *et al.*, 2003) zeigt das Rezeptormolekül (MOG) eine sehr ähnliche Faltung wie die extrazelluläre Domäne von CTLA4. Analog zu CTLA4 werden die Schleifen FG, BC und C'C" des MOG durch die CDRs der schweren und leichten Kette des Fab-Fragmentes erkannt (Abbildung 36). Ähnlich wie im O10/CTLA4-Komplex ist die FG Schleife tief zwischen den Schleifen des

Antikörpers verborgen. Die Kontaktfläche dieses Komplexes ist mit 1664 \AA^2 entschieden kleiner als die des O10/CTLA4-Komplexes mit 2380 \AA^2 . Dies resultiert aus der verminderten Länge der CDRs des Fab-Fragmentes im Vergleich zu den Schleifen des veränderten Lipocalins. Allgemein hat der Anticalin/Antigen-Komplex eine wesentlich größere Kontaktfläche als durchschnittlich für Antikörper/Antigen Komplexe beobachtet. (1550 \AA^2 ; Jones & Thornton, 1996).

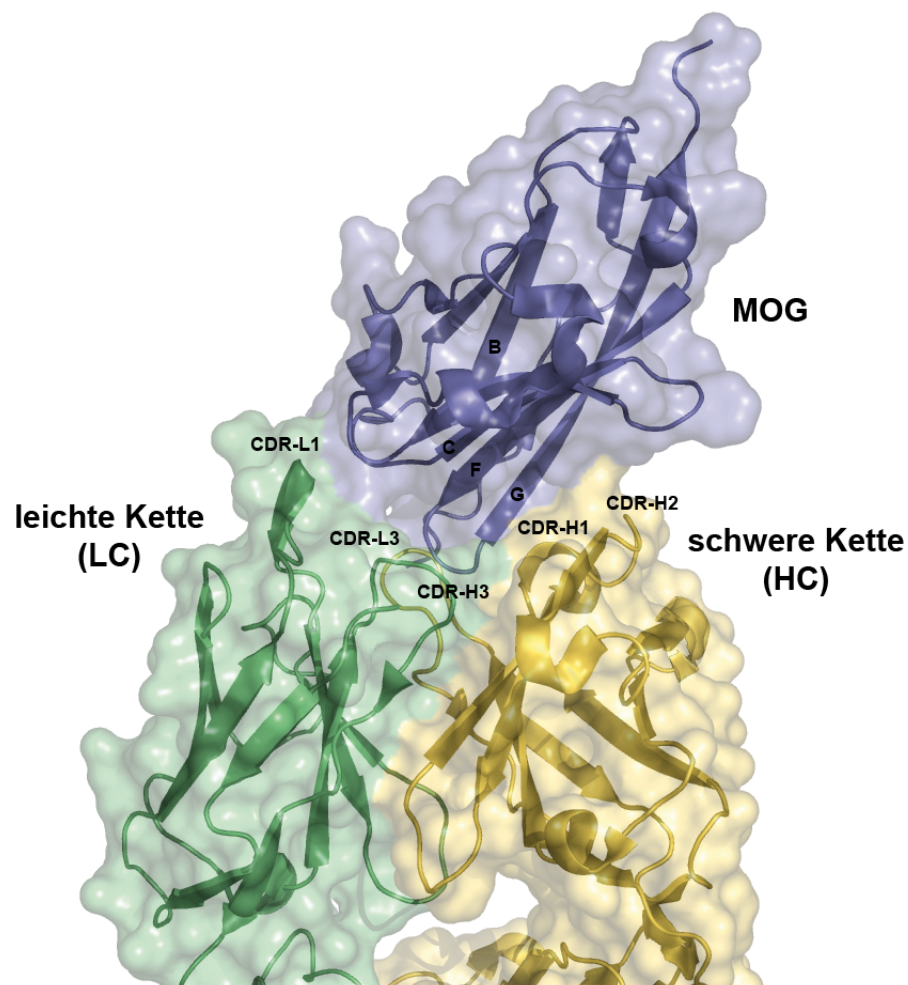


Abbildung 36: Erkennung der extrazellulären Domäne des Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) durch ein Fab-Fragment (PDB: 1PKQ). Die Domäne des MOG ist in ähnlicher Weise orientiert wie die des CTLA4 (Vergleich mit Abbildung 35). Schwere und leichte Kette des Fab-Fragmentes (gelb und grün) sind an der Bindung beteiligt. CDRs sind beschriftet.

Bemerkenswerterweise scheinen die beiden antagonistischen Antikörper zu humanem CTLA4, welche sich momentan in klinischen Tests befinden (Sanderson *et al.*, 2005; Tarhini & Kirkwood, 2007), eine leicht abgewandelte Epitopspezifität im Gegensatz zum Anticalin aufzuweisen, da diese keine Kreuzreaktivität zu Maus oder Affe besitzen. Das Anticalin O10 ist hingegen in der Lage, auch das Epitop der Maus – mit vierfach schwächerer Affinität – gegenüber humanem CTLA4 zu binden. Dabei ist zu bemerken, dass auch beide (humane und murine) B7.1-Rezeptoren humanes und murines CTLA4 erkennen können (Blazar *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1994). Diese analoge Eigenschaft des veränderten Lipocalins ermöglicht die Durchführung präklinischer Studien im Mausmodell und vereinfacht damit dessen pharmakologische Entwicklung als Wirkstoff für die Tumor-Therapie.

Als Alternative zur Entwicklung von antagonistischen Antikörpern (Reichert & Valge-Archer, 2007) bietet das kombinatorische Design von Lipocalinen zahlreiche Vorteile für die Therapie in Bezug auf bessere Eindringung in das Gewebe, geringe Immunogenität und kontrollierbare Pharmakokinetik (Skerra, 2007b). Nach der erfolgreichen Ausdehnung der Anticalintechnologie auf Proteintargets und der im Rahmen dieser Arbeit bereitgestellten strukturellen Analyse des neuartigen Erkennungsmodus durch das Lipocalin, sollte die Grundlage für die zukünftige Entwicklung neuer proteinbindender Wirkstoffe gelegt sein.

5 Zusammenfassung

Die Proteinfamilie der Lipocaline stellt eine in vielen Organismen verbreitete Gruppe kleiner extrazellulärer Proteine mit vielfältigen Funktionen dar, wobei in der Regel kleine hydrophobe Moleküle in der konservierten kelchartigen β -Fass-Struktur gebunden werden. Allerdings sind die meisten physiologischen Liganden für die humanen Vertreter dieser Proteinfamilie bislang unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zehn humane Lipocaline in einem bakteriellen Expressionssystem in rekombinanter Form produziert. Dabei ermöglichte die Sekretion der Proteine in das Periplasma von *E. coli* die korrekte Ausbildung der typischerweise ein bis zwei Disulfidbrücken. Obwohl die Glykosylierung fehlte, ließen sich alle Lipocaline in monomerer Form mithilfe des *Strep*-tag-Affinitätsanhängsels reinigen, wie durch Gelfiltration bestätigt wurde. Für vier unterschiedliche physiologische (Retinol und Retinsäure) wie auch synthetische (DAUDA und ANS) Liganden wurden Dissoziationskonstanten unter vergleichbaren Bedingungen mittels Fluoreszenztitration bestimmt. Die ermittelten Daten lassen zum ersten Mal einen direkten Vergleich der Bindungsaktivitäten der humanen Lipocaline zu.

Insbesondere wurde festgestellt, dass RBP und PGDS ausgeprägte Bindungsaktivitäten für Retinoide besitzen, während ApoD hohe Affinität für Retinol ($K_D = 84$ nM), aber nur geringe Affinität für Retinsäure zeigt. Für das unglykosylierte Glycodelin konnte erstmals Affinität zu Retinol beschrieben werden ($K_D = 2,22$ μ M). AGP offenbarte mit Abstand die höchste Bindungsaktivität für ANS ($K_D = 1,07$ μ M). Anhand der später aufgeklärten Kristallstruktur erscheint eine Platzierung des hydrophoben Anilinrings in der größeren hydrophoben Tasche I plausibel, wobei die polare Sulfonsäure-Gruppe am Doppelring in das Lösungsmittel zeigt bzw. in Wechselwirkung mit der Seitenkette von Arg90 am Bindungstascheneingang tritt. Die hydrophobe Sonde DAUDA wurde von der Mehrzahl der untersuchten Proteine mit Dissoziationskonstanten um 1 μ M gebunden. Das am besten charakterisierte Lipocalin RBP band im untersuchten Konzentrationsbereich weder DAUDA noch ANS, was vermutlich auf seine optimale Bindungstasche für den physiologischen Liganden Retinol zurückzuführen ist.

Das Lipocalin α_1 -Acid Glycoprotein (AGP) ist neben HSA eines der wichtigsten Plasmaproteine im humanen Serum. Es besitzt unter anderem die Eigenschaft, eine große Anzahl an pharmakologisch aktiven Substanzen zu binden. Das zuvor etablierte Expressionssystem wurde genutzt, um unglykosyliertes AGP in größerer Menge zu produzieren, zu kristallisieren und seine Röntgenkristallstruktur aufzuklären. Dabei wurden

Kristalle der Raumgruppe $P4_12_12$ in Gegenwart von 1,9 - 2,2 M Na/K- P_i , pH 6,4 - 6,9 erhalten, welche Beugung am Synchrotron bis $1,8 \text{ \AA}$ zeigten. Das Phasenproblem wurde anschließend mittels UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP) gelöst. Der photolytische Bruch der beiden Disulfidbrücken und die daraus resultierenden Verschiebungen der Schwefelatompositionen konnten erfolgreich zur Phasenbestimmung verwendet werden.

Die Kristallstruktur des AGP mit antiparallelem β -Fass und C-terminaler α -Helix zeigt die typische Faltung eines Lipocalins und bestätigt damit dessen Zugehörigkeit zu dieser Proteinfamilie. Im Gegensatz zu den bereits bekannten Lipocalinstrukturen besitzt die lange Schleife #1 am Eingang der β -Fass-Struktur, die die β -Stränge A und B verbindet, α -helikalen Charakter. Die überwiegend unpolare Bindungstasche des AGP lässt sich in drei kleinere Taschen unterteilen, was die breite Ligandenbindungsaktivität dieses Lipocalins erklärt. Die tiefe Haupttasche I und die kleinere Tasche III sind komplett unpolar und bieten genügend Platz für hydrophobe Ringsysteme. Die Tasche II ist wesentlich kleiner und partiell negativ geladen und kann damit positiv geladene Gruppen eines Liganden beherbergen. Zwei pharmakologisch relevante Verbindungen (Diazepam & Progesteron) wurden in der Bindungstasche mit guter Passform modelliert. Interessanterweise erforderte das Docking von Progesteron nicht die zuvor postulierte Transformation der α -helikalen Schleife #1 zu einem β -Faltblatt. Eine Analyse der Lage der Glykosylierungsstellen ließ Rückschlüsse auf die potentielle Lage der angelagerten Zuckerreste und deren Einfluss auf die Struktur der Bindungstasche zu.

Die einfach aufgebaute Bindungstasche der Lipocaline mit ihren vier strukturell variablen Schleifen eröffnet die Möglichkeit, durch Protein-Engineering künstliche Bindungsaktivitäten zu erzeugen, was zu den sogenannten Anticalinen führt. In dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur eines Proteinkomplexes zwischen einem Anticalin und seinem Protein-Zielmolekül, dem humanen Immunrezeptor CTLA4 aufgeklärt. Der Vergleich mit der ebenfalls gelösten Kristallstruktur der Apoforn dieses Anticalins gestattete Einblicke in die Konformationsänderungen der Schleifenregionen während der Erkennung der neuen Zielstruktur. Die induzierte strukturelle Ordnung der Schleife #3 („*Induced Fit*“) bei der Komplexbildung, zusammen mit kleineren konformationellen Änderungen der Schleifen #2 und #4, illustriert die erstaunliche Flexibilität der Binderegion des Anticalins, was diese hinsichtlich des Bindungsmodus mit Antikörpern vergleichbar macht. Das Haupt-Epitop von CTLA4, die sogenannte FG-Schleife, liegt zentral im β -Fass des veränderten Lipocalins verborgen. Aufgrund der annähernden Verdopplung der Kontaktfläche von CTLA4 mit dem Anticalin verglichen mit der Interaktionsfläche zwischen dem physiologischen Komplex aus

CTLA4 und seinem immunologischen Gegenrezeptor B7.1 (2378 \AA^2 gegenüber 1255 \AA^2) ließ sich die ausgeprägte antagonistische Eigenschaft des neu generierten Bindemoleküls erklären. Die hier gewonnenen Erkenntnisse dürften die pharmazeutische Entwicklung dieses Anticalins als potentiellen Wirkstoff für die Immuntherapie von Tumoren unterstützen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström (1×10^{-10} m)
α_1 m	α_1 -Microglobulin
AGP	α_1 -Acid glycoprotein
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-naphthyl-sulfonsäure
ApoM	Apolipoprotein M
ApoD	Apolipoprotein D
aTc	Anhydro-Tetracyclin
BBP	Bilin Binding Protein
bp	Basenpaar
C8g	Complement Component Factor 8 γ
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CDR	Complementarity Determining Region
CHO	Chinese Hamster Ovary
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4
DAUDA	11-(5-(Dimethylamino)-1-Naphthyl-Sulfonylamino) Undecansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc	konstante Region des Antikörpers
GLY,Gd	Glycodelin
HABA	Hydroxyl-Azophenyl-Benzoic Acid
HSA	Human Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
Kan	Kanamycin
(k)Da	(kilo-)Dalton
K _D	Dissoziationskonstante

MAD	<i>Multiple Wavelength Anomalous Dispersion</i>
MHC	<i>Histocompatibility Complex</i>
MOG	<i>Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
NPN	N-phenyl-1-naphthylamin
OBP	<i>Odorant-Binding Protein</i>
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i>
ORM	<i>Orosomuroid</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PGDS	<i>Prostaglandine D Synthase, β-Trace Protein</i>
RBP	<i>Retinol-Binding Protein</i>
Rmsd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAD	<i>Single Wavelength Anomalous Dispersion</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SKP	<i>Seventeen Kilodalton Protein</i>
Tlc	<i>Tear Lipocalin</i>
U	<i>Unit (Enzymaktivitätseinheit)</i>
UV-RIP	<i>UV-Radiation Induced Phasing</i>
v/v	<i>Volume per Volume</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literatur

- Abergel, C.** (2004) Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1413-1416.
- Åkerstrom, B., Logdberg, L., Berggard, T., Osmark, P. & Lindqvist, A.** (2000) α 1-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 172-184.
- Albani, J. R.** (2006) Progesterone binding to the tryptophan residues of human α_1 -acid glycoprotein. *Carbohydr Res* **341**, 2557-2564.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C.** (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927-948.
- Allison, J. P.** (2005) Blockade of T cell inhibitory signals: a new paradigm in tumor immunotherapy? *Cancer Immun* **5**, 9.
- Athamna, A., Kramer, M. R. & Kahane, I.** (1996) Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**, 135-141.
- Bachmann, B. J.** (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**, 525-557.
- Bailey, S.** (1994) The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 760-763.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. & Skerra, A.** (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1898-1903.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russelljones, G. J. & Gotschlich, E. C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline-phosphatase conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**, 175-179.
- Blazar, B. R., Taylor, P. A., Linsley, P. S. & Vallera, D. A.** (1994) In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood* **83**, 3815-3825.
- Bocskei, Z., Groom, C. R., Flower, D. R., Wright, C. E., Phillips, S. E., Cavaggioni, A., Findlay, J. B. & North, A. C.** (1992) Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* **360**, 186-188.
- Breithaupt, C., Schubart, A., Zander, H., Skerra, A., Huber, R., Linington, C. & Jacob, U.** (2003) Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9446-9451.

- Breustedt, D. A., Korndorfer, I. P., Redl, B. & Skerra, A.** (2005) The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem* **280**, 484-493.
- Breustedt, D. A., Schönfeld, D. L. & Skerra, A.** (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 161-173.
- Breustedt, D. A.** (2008) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie. Dissertation. Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der TU München.
- Briand, L., Eloit, C., Nespoulous, C., Bezirard, V., Huet, J. C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D. & Pernollet, J. C.** (2002) Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* **41**, 7241-7252.
- Brünger, A.T.** (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L.** (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **54**, 905-921.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. & Huber, R.** (1995) High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 788-796.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) X11-Blue - a High-Efficiency Plasmid Transforming *Escherichia-Coli* Strain with Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* **5**, 376-&.
- Carter, P. J.** (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* **6**, 343-357.
- Ceciliani, F. & Pocacqua, V.** (2007) The acute phase protein α_1 -acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci* **8**, 91-108.
- Chen, C., Gault, A., Shen, L. & Nabavi, N.** (1994) Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule. *J Immunol* **152**, 4929-4936.
- Chen, E. Y. & Seeburg, P. H.** (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.

- Chuang, V. T., Hijioka, M., Katsuki, M., Nishi, K., Hara, T., Kaneko, K., Ueno, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H. & Otagiri, M.** (2005) Characterization of benzodiazepine binding site on human α_1 -acid glycoprotein using flunitrazepam as a photolabeling agent. *Biochim Biophys Acta* **1725**, 385-393.
- 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. & Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Collini, M., D'Alfonso, L., Molinari, H., Ragona, L., Catalano, M. & Baldini, G.** (2003) Competitive binding of fatty acids and the fluorescent probe 1-8-anilinonaphthalene sulfonate to bovine beta-lactoglobulin. *Protein Sci* **12**, 1596-1603.
- Collis, A. V., Brouwer, A. P. & Martin, A. C.** (2003) Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen. *J Mol Biol* **325**, 337-354.
- Cox, G. N., Pratt, D., Smith, D., McDermott, M. J. & Vanderslice, R. W.** (1999) Refolding and characterization of recombinant human soluble CTLA-4 expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **17**, 26-32.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., McPherson, A.** (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 414-23
- Cummins, P.M. & O'Connor, B.** (1998) Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 1-17.
- DeLano, W. L.** (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*.
- Dente, L., Ruther, U., Tripodi, M., Wagner, E. F. & Cortese, R.** (1988) Expression of human α_1 -acid glycoprotein genes in cultured cells and in transgenic mice. *Genes Dev* **2**, 259-266.
- Devereux, J., Haerberli, P. & Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**, 387-395.
- Dilley, W. G., Haagensen, D. E., Cox, C. E. & Wells, S. A., Jr.** (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.

- Dutta, B., Mukhopadhyay, D., Roy, N., Das, G. & Karande, A. A.** (1998) Cloning, expression, purification, and immunocharacterization of placental protein-14. *Protein Expr Purif* **14**, 327-334.
- Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H. J. & Skerra, A.** (2007) Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem* **282**, 31068-31075.
- Emsley, P. & Cowtan, K.** (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- Engh, R. A. & Huber, R.** (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement. *Acta Crystallogr A* **47**, 392-400.
- Essassi, D., Zini, R. & Tillement, J. P.** (1990) Use of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a fluorescent probe in the investigation of drug interactions with human alpha-1-acid glycoprotein and serum albumin. *J Pharm Sci* **79**, 9-13.
- Fiedler, M. & Skerra, A.** (1999) Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. *Protein Exp Purif* **17**, 421-427.
- Fitos, I., Visy, J., Zsila, F., Mady, G. & Simonyi, M.** (2007) Conformation selectivity in the binding of diazepam and analogues to α_1 -acid glycoprotein. *Bioorg Med Chem* **15**, 4857-4862.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Flower, D. R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* **318**, 1-14.
- Fournier, T., Medjoubi, N. N. & Porquet, D.** (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 157-171.
- Frantz, M., Jung, M. L., Ribereau-Gayon, G. & Anton, R.** (2000) Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* **50**, 471-478.
- Fu, Z. Q., Du Bois, G. C., Song, S. P., Harrison, R. W. & Weber, I. T.** (1999) Improving the diffraction quality of MTCP-1 crystals by post-crystallization soaking. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 5-7.

- Gasymov, O. K., Abduragimov, A. R., Yusifov, T. N. & Glasgow, B. J.** (1999) Binding studies of tear lipocalin: the role of the conserved tryptophan in maintaining structure, stability and ligand affinity. *Biochim Biophys Acta* **1433**, 307-320.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P.** (1987) Efficient Site-Directed Invitro Mutagenesis. *Biotechniques* **5**, 786-791.
- Geller, B., Zhu, H. Y., Cheng, S., Kuhn, A. & Dalbey, R. E.** (1993) Charged residues render pro-OmpA potential dependent for initiation of membrane translocation. *J Biol Chem* **268**, 9442-9447.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319-326.
- Glasgow, B. J., Abduragimov, A. R., Farahbakhsh, Z. T., Faull, K. F. & Hubbell, W. L.** (1995) Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr Eye Res* **14**, 363-372.
- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. & Strong, R. K.** (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-1043.
- Goetz, D. H., Willie, S. T., Armen, R. S., Bratt, T., Borregaard, N. & Strong, R. K.** (2000) Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* **39**, 1935-1941.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H.** (2005) The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* **23**, 515-548.
- Grzyb, J., Latowski, D. & Strzalka, K.** (2006) Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol* **163**, 895-915.
- Halttunen, M., Kamarainen, M. & Koistinen, H.** (2000) Glycodelin: a reproduction-related lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 149-156.
- Hamil, K. G., Liu, Q., Sivashanmugam, P., Anbalagan, M., Yenugu, S., Soundararajan, R., Grossman, G., Rao, A. J., Birse, C. E., Ruben, S. M., Richardson, R. T., Zhang, Y. L., O'Rand, M. G., Petrusz, P., French, F. S. & Hall, S. H.** (2003) LCN6, a novel human epididymal lipocalin. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 112.
- Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P. & Merritt, E. A.** (1988) Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* **4**, 77-88.

- Herve, F., Caron, G., Duche, J. C., Gaillard, P., Abd. Rahman, N., Tsantili-Kakoulidou, A., Carrupt, P. A., d'Athis, P., Tillement, J. P. & Testa, B. (1998) Ligand Specificity of the Genetic Variants of Human α_1 -Acid Glycoprotein: Generation of a Three- Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Drug Binding to the A Variant. *Mol Pharmacol* **54**, 129-138.
- Hochepped, T., Berger, F. G., Baumann, H. & Libert, C. (2003) Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 25-34.
- Hochepped, T., Van Molle, W., Berger, F. G., Baumann, H. & Libert, C. (2000) Involvement of the acute phase protein α_1 -acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J Biol Chem* **275**, 14903-14909.
- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**, 293-302.
- Holm, L. & Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* **233**, 123-138.
- Holmes, M. A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C. & Strong, R. K. (2005) Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* **13**, 29-41.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Crystallogr A* **19**, 353-356.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Israili, Z. H. & Dayton, P. G. (2001) Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev* **33**, 161-235.
- Jancarik, J. & Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* **24**, 409-411.
- Jarchow, S., Lück, C., Görg, A. & Skerra, A. (2008) Identification of potential substrate proteins for the periplasmic Escherichia coli chaperone Skp. *Proteomics* **8**, 4987-4994.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13-20.
- Jones, T. A. (1992) A set of averaging programs. *Molecular Replacement*, 91-105.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991) Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119.

- Kabsch, W.** (1988) Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. *J Appl Crystallogr* **21**, 916-924.
- Kabsch, W.** (1993) Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J Appl Crystallogr* **26**, 795-800.
- Kabsch, W. & Sander, C.** (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K. & Fogel, D. B.** (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallographica Section D* **55**, 484-491.
- 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.
- Kodicek, M., Infanzon, A. & Karpenko, V.** (1995) Heat denaturation of human orosomucoid in water/methanol mixtures. *Biochim Biophys Acta* **1246**, 10-16.
- Koistinen, H., Koistinen, R., Seppala, M., Burova, T. V., Choiset, Y. & Haertle, T.** (1999) Glycodelin and beta-lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Lett* **450**, 158-162.
- Kopecky, V., Jr., Ettrich, R., Hofbauerova, K. & Baumruk, V.** (2003) Structure of human α_1 -acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 41-46.
- Kumasaka, T., Aritake, K., Ago, H., Irikura, D., Tsurumura, T., Yamamoto, M., Miyano, M., Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2009) Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem* **284**, 22344-22352.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* **154**, 367-382.
- Kute, T. & Westphal, U.** (1976) Steroid-protein interactions. XXXIV. Chemical modification of α_1 -acid glycoprotein for characterization of the progesterone binding site. *Biochim Biophys Acta* **420**, 195-213.
- Lacazette, E., Gachon, A. M. & Pitiot, G.** (2000) A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet* **9**, 289-301.

- Lane, P., Gerhard, W., Hubele, S., Lanzavecchia, A. & McConnell, F.** (1993) Expression and functional properties of mouse B7/BB1 using a fusion protein between mouse CTLA4 and human gamma 1. *Immunology* **80**, 56-61.
- Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M.** (1993) Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Linsley, P. S., Nadler, S. G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H. T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M., Leytze, G. & Brady, W.** (1995) Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* **270**, 15417-15424.
- Löbel D., Marchese S., Krieger J., Pelosi P. & Breer H.** (1998) Subtypes of odorant-binding proteins-heterologous expression and ligand binding. *Eur J Biochem.* **254**, 318-324.
- Logdberg, L. & Wester, L.** (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 284-297.
- Lovelace, L. L., Chiswell, B., Slade, D. J., Sodetz, J. M. & Lebioda, L.** (2008) Crystal structure of complement protein C8gamma in complex with a peptide containing the C8gamma binding site on C8alpha: implications for C8gamma ligand binding. *Mol Immunol* **45**, 750-756.
- Luo, G., Zhang, X., Nilsson-Ehle, P. & Xu, N.** (2004) Apolipoprotein M. *Lipids Health Dis* **3**, 21-25.
- Maruyama, T., Furuie, M. A., Hibino, S. & Otagiri, M.** (1992) Comparative study of interaction mode of diazepines with human serum albumin and α_1 -acid glycoprotein. *J Pharm Sci* **81**, 16-20.
- Maruyama, T., Otagiri, M. & Takadate, A.** (1990) Characterization of drug binding sites on α_1 -Acid glycoprotein. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **38**, 1688-1691.
- Mathias, U. & Jung, M.** (2007) Determination of drug-serum protein interactions via fluorescence polarization measurements. *Anal Bioanal Chem* **388**, 1147-1156.
- Matsumoto, K., Sukimoto, K., Nishi, K., Maruyama, T., Suenaga, A. & Otagiri, M.** (2002) Characterization of ligand binding sites on the α_1 -Acid glycoprotein in humans, bovines and dogs. *Drug Metab Pharmacokinet* **17**, 300-306.
- Matthews, B. W.** (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-497.
- McCoy, A.** (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallographica Section D* **63**, 32-41.

- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J.** (2005) Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 458-464.
- McPherson, A., Friedman, M. L. & Halsall, H. B.** (1984) Crystallization of α_1 -acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **124**, 619-624.
- Meerman, H. J. & Georgiou, G.** (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* **12**, 1107-1110.
- Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P. & Tsai, C. M.** (1997) Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* **21**, 69-82.
- Müller, H. N. & Skerra, A.** (1993) Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in Escherichia coli. Ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J Mol Biol* **230**, 725-732.
- Muhsin, M., Graham, J. & Kirkpatrick, P.** (2004) Bevacizumab. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 995-996
- Nakano, M., Kakehi, K., Tsai, M. H. & Lee, Y. C.** (2004) Detailed structural features of glycan chains derived from α_1 -acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* **14**, 431-441.
- Nanao, M. H. & Ravelli, R. B.** (2006) Phasing macromolecular structures with UV-induced structural changes. *Structure* **14**, 791-800.
- Newcomer, M. E.** (1993) Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution. *Structure* **1**, 7-18.
- Newcomer, M. E., Jones, T. A., Aqvist, J., Sundelin, J., Eriksson, U., Rask, L. & Peterson, P. A.** (1984) The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J* **3**, 1451-1454.
- Newcomer, M. E. & Ong, D. E.** (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 57-64.
- Nishi, K., Komine, Y., Fukunaga, N., Maruyama, T., Suenaga, A. & Otagiri, M.** (2006) Involvement of disulfide bonds and histidine 172 in a unique β -sheet to α -helix transition of α_1 -acid glycoprotein at the biomembrane interface. *Proteins* **63**, 611-620.

- Nobmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Shen, F., Yi, J. & Harding, S. E.** (2007) Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* **24**, 117-128.
- Nuttall, S. D., Rousch, M. J., Irving, R. A., Hufton, S. E., Hoogenboom, H. R. & Hudson, P. J.** (1999) Design and expression of soluble CTLA-4 variable domain as a scaffold for the display of functional polypeptides. *Proteins* **36**, 217-27.
- Oehninger, S., Coddington, C. C., Hodgen, G. D. & Seppala, M.** (1995) Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* **63**, 377-383.
- Ojala, P. J., Hermansson, M., Tolvanen, M., Polvinen, K., Hirvonen, T., Impola, U., Jauhiainen, M., Somerharju, P. & Parkkinen, J.** (2006) Identification of alpha-1 acid glycoprotein as a lysophospholipid binding protein: a complementary role to albumin in the scavenging of lysophosphatidylcholine. *Biochemistry* **45**, 14021-14031.
- Ortlund, E., Parker, C. L., Schreck, S. F., Ginell, S., Minor, W., Sodetz, J. M. & Lebioda, L.** (2002) Crystal structure of human complement protein C8gamma at 1.2 Å resolution reveals a lipocalin fold and a distinct ligand binding site. *Biochemistry* **41**, 7030-7037.
- Parikh, H. H., McElwain, K., Balasubramanian, V., Leung, W., Wong, D., Morris, M. E. & Ramanathan, M.** (2000) A rapid spectrofluorimetric technique for determining drug-serum protein binding suitable for high-throughput screening. *Pharm Res* **17**, 632-637.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Korman, A. J. & Allison, J. P.** (2006) Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **18**, 206-213.
- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K. S. & Lamzin, V. S.** (2001) ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr D* **57**, 1445-1450.
- 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.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M.** (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* **35**, 163-187.
- Ramagopal, U. A., Dauter, M. & Dauter, Z.** (2003) Phasing on anomalous signal of sulfurs: what is the limit? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1020-1027.

- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. & Milne, R.** (2000) Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 185-198.
- Ravelli, R. B., Leiros, H. K., Pan, B., Caffrey, M. & McSweeney, S.** (2003) Specific radiation damage can be used to solve macromolecular crystal structures. *Structure* **11**, 217-224.
- Redl, B.** (2000) Human tear lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 241-248.
- Reichert, J. M. & Valge-Archer, V. E.** (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* **6**, 349-356.
- Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U. & Wilson, I. A.** (1992) Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* **255**, 959-965.
- Rocchia, W., Alexov, E. & Honig, B.** (2001) Extending the applicability of the nonlinear Poisson-Boltzmann equation: Multiple dielectric constants and multivalent ions. *J Phys Chem B* **105**, 6507-6514.
- Rojo-Domiguez, A. & Hernandez-Arana, A.** (1993) Three-dimensional modeling of the protein moiety of human alpha1-acid glycoprotein, a lipocalin-family member. *Protein Seq Data Anal* **5**, 349-355.
- 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.
- Rudino-Pinera, E., Ravelli, R. B., Sheldrick, G. M., Nanao, M. H., Korostelev, V. V., Werner, J. M., Schwarz-Linek, U., Potts, J. R. & Garman, E. F.** (2007) The solution and crystal structures of a module pair from the *Staphylococcus aureus*-binding site of human fibronectin--a tale with a twist. *J Mol Biol* **368**, 833-844.
- Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., Yellin, M. & Weber, J.** (2005) Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* **23**, 741-750.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santulli-Marotto, S., Nair, S. K., Rusconi, C., Sullenger, B. & Gilboa, E.** (2003) Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res* **63**, 7483-7489.

- Sauer, O., Schmidt, A. & Kratky, C.** (1997) Freeze-Trapping Isomorphous Xenon Derivatives of Protein Crystals. *J Appl Crystallogr* **30**, 476-486.
- Schäfer, U., Beck, K. & Müller, M.** (1999) Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J Biol Chem* **274**, 24567-24574.
- Schilling, S., Wasternack, C. & Demuth, H. U.** (2008) Glutaminyl cyclases from animals and plants: a case of functionally convergent protein evolution. *Biol Chem* **389**, 983-991.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* **23**, 561-565.
- Schlapschy, M., Dommel, M. K., Hadian, K., Fogarasi, M., Korndörfer, I. P. & Skerra, A.** (2004) The periplasmic *E. coli* chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization. *Biol Chem* **385**, 137-143.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A.** (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* **19**, 385-390.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A.** (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J Mol Biol* **297**, 1105-1120.
- Schlehuber, S. & Skerra, A.** (2005) Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discov Today* **10**, 23-33.
- Schmid, K., Burgi, W., Collins, J. H. & Nanno, S.** (1974) The disulfide bonds of α_1 -acid glycoprotein. *Biochemistry* **13**, 2694-2697.
- Schmid, K., Kaufmann, H., Isemura, S., Bauer, F., Emura, J., Motoyama, T., Ishiguro, M. & Nanno, S.** (1973) Structure of α_1 -acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins. *Biochemistry* **12**, 2711-2724.
- Schmidt, F. S. & Skerra, A.** (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur J Biochem* **219**, 855-863.
- Schmidt, T. G. & Skerra, A.** (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A* **676**, 337-345.

- Schmidt, T. G. & Skerra, A.** (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.
- Schneider, T. R. & Sheldrick, G. M.** (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1772-1779.
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P. M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A. M. & Skerra, A.** (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 8198-81203.
- Schreck, S. F., Parker, C., Plumb, M. E. & Sodetz, J. M.** (2000) Human complement protein C8 gamma. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 199-208.
- Schwartz, J. C., Zhang, X., Fedorov, A. A., Nathenson, S. G. & Almo, S. C.** (2001) Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature* **410**, 604-608.
- Seppala, M., Jiang, S., Strick, N., Lin, K., Li, Y. Y., Koistinen, H., Koistinen, R. & Neurath, A. R.** (1997) Glycodelins GdA and GdS modified by 3-hydroxyphthalic anhydride inhibit gp120-CD4 binding and HIV-1 infection in vitro. *Lab Invest* **77**, 127-130.
- Seppala, M., Taylor, R. N., Koistinen, H., Koistinen, R. & Milgrom, E.** (2002) Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr Rev* **23**, 401-430.
- Sheldrick, G. M., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hope, H. & Sieker, L. C.** (1993) The application of direct methods and Patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**, 18-23.
- Sheldrick, G. M.** (2002) Macromolecular phasing with SHELXE. *Z Kristallogr* **217**, 644-650.
- Skerra, A.** (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* **20**, 3551-3554.
- Skerra, A.** (1994a) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A.** (1994b) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra, A.** (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 683-693.

- Skerra, A.** (2007a) Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 295-304.
- Skerra, A.** (2007b) Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use. *Curr Opin Mol Ther* **9**, 336-344.
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Stamper, C. C., Zhang, Y., Tobin, J. F., Erbe, D. V., Ikemizu, S., Davis, S. J., Stahl, M. L., Seehra, J., Somers, W. S. & Mosyak, L.** (2001) Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* **410**, 608-611.
- Strupat, K.** (2005) Molecular weight determination of peptides and proteins by ESI and MALDI. *Methods Enzymol* **405**, 1-36.
- Studier, F. W.** (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**, 37-44.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Tanaka, T., Urade, Y., Kimura, H., Eguchi, N., Nishikawa, A. & Hayaishi, O.** (1997) Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is a newly recognized type of retinoid transporter. *J Biol Chem* **272**, 15789-15795.
- Tao, P., Wang, R. & Lai, L.** (1999) Calculating Partition Coefficients of Peptides by the Addition Method. *J Mol Model* **5**, 189 - 195.
- Tarhini, A. A. & Kirkwood, J. M.** (2007) Tremelimumab, a fully human monoclonal IgG2 antibody against CTLA4 for the potential treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther* **9**, 505-514.
- Trainor, G. L.** (2007) The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **2**, 51-64.
- Treuheit, M. J., Costello, C. E. & Halsall, H. B.** (1992) Analysis of the five glycosylation sites of human α_1 -acid glycoprotein. *Biochem J* **283 (Pt 1)**, 105-112.
- Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 259-271.
- Vagin, A. & Teplyakov, A.** (1997) MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J Appl Crystallogr* **30**, 1022-1025.

- van der Merwe, P. A., Bodian, D. L., Daenke, S., Linsley, P. & Davis, S. J.** (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* **185**, 393-403.
- Vogt, M. & Skerra, A.** (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit* **14**, 79-86.
- Voss, 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.
- Waites, G. T. & Bell, S. C.** (1989) Immunohistological localization of human pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin (alpha 2-PEG), a glycosylated beta-lactoglobulin homologue, in the decidua and placenta during pregnancy. *J Reprod Fertil* **87**, 291-300.
- Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K. & Thornton, S. J.** (2008) Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 84-99.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. & Mak, T. W.** (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science* **270**, 985-988.
- 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.
- Zsila, F. & Iwao, Y.** (2007) The drug binding site of human α_1 -acid glycoprotein: insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 797-809.

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Breustedt, D. A., **Schönfeld, D. L.** & Skerra, A. (2006)

Comparative ligand binding analysis of ten human lipocalins.

Biochim Biophys Acta **1764**, 161-73.

Schönfeld, D. L., Ravelli, R. B., Mueller, U. & Skerra A (2008)

The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin.

J Mol Biol **384**, 393-405.

Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P. M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A. M. & Skerra, A. (2009)

An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies.

Proc Natl Acad Sci U S A. **106**, 8198-81203.

Lebenslauf

Name:	Dorian Leo Schönfeld
geboren:	02.11.1977 in Berlin
Familienstand:	verheiratet
1984 – 1990	Besuch der Grundschule am Königsgraben, Berlin
1990 – 1997	Besuch der Gustav-Heinemann-Gesamtschule, Berlin Abschluss: Abitur
09/1997 – 10/1998	Zivildienstleistender bei der Lebenshilfe e.V., Berlin
10/1998 – 07/2003	Studium der Biochemie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald Abschluss: Diplom Biochemiker (Note 1,1) Diplomarbeit: „Untersuchungen zur gerichteten Evolution einer Glutamat-Racemase“, Bereich Technische Chemie & Biotechnologie bei Prof. Dr. U. Bornscheuer
08/2001 – 10/2001	Industriepraktikum im Bereich Molecular Engineering, Degussa AG Texturant Systems GmbH, Freising/München
02/2002 – 03/2002	Industriepraktikum im Bereich Protein Screening, Firma Novozymes, Kopenhagen, Dänemark
10/2003 – 07/2007	Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie bei Prof. Dr. A. Skerra, TU München, Freising/Weihenstephan
12/2007 – 07/2009	Senior Scientist bei der Firma Evotec (UK) Ltd, Abingdon, Oxfordshire, UK

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Arne Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 6.4.2010

Dorian Leo Schönfeld