TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Protein-*Engineering* eines Anticalins mit Bindungsspezifität für das Anthrazyklin-Zytostatikum Doxorubicin

Dipl.-Biol. Univ. Christian Oliver Kirchner

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.

Vorsitzende:	Univ.-Prof. Dr. Iris Antes
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra
	2. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 08.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.05.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Krebs 1

1.2 Das Zytostatikum Doxorubicin 1

1.3 Anticaline: Künstliche Bindungsproteine auf Grundlage der Lipocalin-Faltung 4

1.3.1 Antikörper – Paradigma eines Bindungsproteins 4

1.3.2 Vom Antikörper zum Anticalin 6

1.4 Anwendungsgebiete für Anticaline 7

1.4.1 Pharmazeutisches Potential eines gegen Doxorubicin gerichteten Anticalins 7

1.4.2 Diagnostisches und analytisches Potential 7

1.5 Phagemid-Präsentation der BBP-Zufallsbibliothek und Kolonie-Filterstapeltest 8

1.5.1 Der Phasmidvektor pBBP38 8

1.5.2 Kolonie-Filterstapeltest zur Identifizierung *target*-affiner BBP-Varianten 12

1.6 Zielsetzung der Arbeit 13

2 Material & Methoden 15

2.1 Materialien 15

2.1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen 15

2.1.2 Oligodesoxynukleotide 16

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine 17

2.1.4 Chemikalien 18

2.1.5 Standards und Kits 22

2.1.6 Geräte 23

2.1.7 Sonstige Materialien 27

2.1.8 Medien, Antibiotika, Puffer- und allgemeine Lösungen 29

2.2 Mikro- und molekularbiologische Methoden 34

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen 34

2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen 34

2.2.2.1 Herstellung $CaCl_2$-kompetenter Zellen 34

2.2.2.2 Herstellung ultra-kompetenter Zellen nach Inoue 35

2.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter Zellen 35

2.2.2.4 Herstellung elektro-kompetenter Zellen und Elektroporation 35

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Zelllyse 37

2.2.3.1 Plasmid-Minipräparation 37

2.2.3.2 Plasmid-Midipräparation 37

2.2.4 *In vitro* Modifizierung von DNA 37

2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) 37

2.2.4.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen 40
2.2.4.3 Ligierung von DNA-Fragmenten 40
2.2.5 Gelelektrophorese von DNA 41
2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese 41
2.2.5.2 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese 42
2.2.6 Reinigung *in vitro* modifizierter und/oder gelektrophoretisch getrennter DNA 43
2.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung 43
2.2.6.2 Fällung des Ligierungsansatzes der BBP-Zufallsbibliothek 44
2.2.6.3 Reinigung von DNA mittels des JETSORB *Gel Extraction Kit* 44
2.2.6.4 Reinigung von PCR-Produkten mittels des E.Z.N.A.®*Cycle-Pure Kit* 44
2.2.6.5 Präparative DNA-Reinigung aus der *LMP*-Agarose 44
2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA 45
2.3 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken und *Phage Display*-Anreicherung 46
2.3.1 Propagation von Helferphagen 46
2.3.2 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken 47
2.3.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide 49
2.3.3.1 Festphasen-Anreicherung 49
2.3.3.2 Anreicherung in Lösung 51
2.3.3.3 Übersicht verwendeter Elutionsmethoden 51
2.3.4 Amplifizierung selektierter Phagemide 53
2.3.5 Titerbestimmung von Phagemidlösungen 53
2.4 Kolonie-Filterstapeltest 54
2.5 Rekombinante Herstellung von BBP-Varianten in *E. coli* 56
2.5.1 2 L-Maßstab 56
2.5.2 Laborfermenter 57
2.6 Proteinchemische Methoden 59
2.6.1 Chromatographische Verfahren 59
2.6.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie 59
2.6.1.2 Größenausschluss-Chromatographie 59
2.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) 61
2.6.3 Western-Blotting 62
2.6.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 63
2.6.5 Konzentrierung von Proteinen 63
2.7 Physikochemische / biophysikalische Methoden 64
2.7.1 Gleichgewichtsdialyse 64
2.7.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) 65
2.7.3 UV/Vis-Spektroskopie 68
2.7.4 Fluoreszenzspektroskopie 70

2.7.4.1 Dreidimensionale Fluoreszenzabtastung 70
2.7.4.2 Protein-Fluoreszenztitration 70
2.7.4.3 Liganden-Fluoreszenztitration 75
2.7.4.4 Kompetitive Fluoreszenztitration 77
2.7.4.5 Fluoreszenzanisotropie 79
2.7.5 CD-Spektroskopie 81
2.8 Chemische Synthese und Affinitätskopplung von Zielmolekül-Konjugaten 82
2.8.1 Herstellung von Doxo-Biotin, Doxo-SS-Biotin sowie Doxo-Digoxigenin 82
2.8.2 Nachweis der Doxo-Marker-Konjugate mittels Dünnschichtchromatographie 83
2.8.3 Kovalente Kopplung von Doxorubicin an Trägerproteine 84
2.8.4 Indirekte Kopplung von Doxorubicin an Streptavidin mittels Doxo-Biotin 85
2.9 Computerprogramme und Datenbanken 86
3 Ergebnisse 89
3.1 Der Ligand Doxorubicin 89
3.1.1 Die Fluoreszenz des Doxorubicins 89
3.1.2 Die Selbstassoziation des Doxorubicins 90
3.1.2.1 Selbstassoziation von Doxorubicin – Absorptionsspektroskopie 90
3.1.2.2 Selbstassoziation von Doxorubicin – Fluoreszenzspektroskopie 92
3.1.2.3 Selbstassoziation von Doxorubicin – isotherme Titrationskalorimetrie 93
3.2 Lipocaline – Ein Faltungsmuster für künstliche Bindeproteine zur Komplexierung des Liganden Doxorubicin 96
3.2.1 Nachweis des AGP/Doxorubicin-Komplexes: Fluoreszenzanisotropie 97
3.2.2 Nachweis des AGP/Doxorubicin-Komplexes: Gleichgewichtsdialyse 98
3.3 Herstellung einer nativen BBP-Zufallsbiblothek 100
3.3.1 Optimierung der Komplexität der BBP-Zufallsbibliothek 100
3.3.1.1 Optimierung der Transformation des *E. coli*-Wirtsstamms XL1-*Blue* 100
3.3.1.2 Maßnahmen zur Optimierung der Ligierungseffizienz 101
3.3.2 Verbesserung der Integrität der BBP-Zufallsbibliothek 102
3.4 Herstellung immobilisierbarer Konjugate des Liganden Doxorubicin 105
3.4.1 Synthese von Doxorubicin-Biotin und -Digoxigenin 105
3.4.2 Reinigung und Charakterisierung des Wt-Streptavidin/Biotin-Doxo-Komplexes 109
3.5 Selektion von Anticalinen mit Bindungsaktivität für Doxorubicin aus der BBP-Zufallsbibliothek 111
3.5.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für die Affinitätsanreicherung 111
3.5.1.1 Verbesserung der Immobilisierung von Doxorubicin 112
3.5.1.2 Wahl der Elutionsmethode für spezifisch gebundene Phagemide 115

3.5.1.3 Auswahl eines geeigneten Blockierungsreagens 117
3.5.2 Affinitätsanreicherung an immobilisierten Doxorubicingruppen 120
3.5.3 Kolonie-Filterstapeltest zur Identifizierung von BBP-Varianten mit Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin 121
3.6 Charakterisierung aus der nativen BBP-Zufallsbibliothek selektierter Varianten 124
3.6.1 DNA-Sequenzanalyse 124
3.6.2 Bakterielle Produktion der BBP-Varianten F1K18 und F1K27 in löslicher Form 127
3.6.3 Reinigung der rekombinanten BBP-Varianten 128
3.6.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Doxorubicinkomplexierung durch Fluoreszenztitration 131
3.6.4.1 Vergleich der Varianten F1K18 und F1K27 mit dem Wt-BBP sowie den Anticalinen FluA und DigA16 mittels Proteinfluoreszenzmessung 131
3.6.4.2 Vergleich der Variante F1K27 mit dem Wt-BBP sowie dem Anticalin FluA mittels kompetitiver Fluoreszenzmessung 132
3.7 Affinitätsmaturierung der Variante F1K27 135
3.7.1 Einführung von Punktmutationen in die DNA-Sequenz des Strukturgens der BBP-Variante F1K27 und Herstellung der Phagemid-Bibliothek 135
3.7.2 Affinitätsanreicherung an immobilisierten Doxorubicingruppen 136
3.8 Versuche zur Proteinkristallisation 138
3.8.1 Fermentation der Variante F1K27 139
4 Diskussion 143
4.1 Der hydrophobe chromophore Haptenligand Doxorubicin 143
4.1.1 Die Fluoreszenz des Doxorubicins 143
4.1.2 Das Selbstassoziationsverhalten des Doxorubicins 145
4.2 Isolierung von Doxorubicin-bindenden Anticalinen 148
4.2.1 Die Anticalin-Bibliothek 148
4.2.2 Der Selektionsprozess 149
4.2.3 Weiteres Verbesserungspotential zur Erzeugung hoch-affiner Anticalin-Varianten für Doxorubicin mittels *Phage Display* 151
4.2.3.1 Optimierung der eingesetzten Zufallsbibliothek 151
4.2.3.2 Optimierung der Anreicherungsstrategie 152
4.3 Das α1-*Acid Glycoprotein* (AGP) – ein interessantes Scaffold-Protein 153
5 Zusammenfassung 157
6 Abkürzungsverzeichnis 159
7 Literaturverzeichnis 163

1 Einleitung

1.1 Krebs

Laut des *World Cancer Report* 2008 gehörte Krebs mit rund 7,6 Millionen Opfern zu den zehn häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen weltweit. Die Zahl neu diagnostizierter Erkrankungen betrug etwa 12,4 Millionen pro Jahr bei insgesamt geschätzten 25 Millionen Erkrankten (Boyle & Levin, 2008). Vor dem Hintergrund der wachsenden Weltbevölkerung und zunehmender Lebenserwartung ist der Trend weiter steigend. Brustkrebs ist mit einer Morbiditätsrate von 23 % die häufigste Krebserkrankung bei Frauen (Stewart *et al.*, 2003) und führt jährlich zu etwa 400 000 Todesopfern.

Neben der immensen Bedeutung flächendeckender Vorsorge, die die Diagnose einer Vielzahl der Neuerkrankungen bereits im Frühstadium erlaubt und damit erhöhte Chancen auf Heilung bei konventioneller Behandlung bietet (Hortobagyi, 1998), zeigt die Kombination klassischer Chemotherapie – z.B. mit dem aus der Klasse der antibiotisch wirkenden Anthrazykline stammenden Doxorubicin (Arcamone, 1985) – mit neuen, innovativen Therapieansätzen – z.B. dem gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 gerichteten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Gianni, 2002) – viel versprechende klinische Erfolge (Slamon *et al.*, 2001).

Um in strukturschwachen Gebieten der Bevölkerung von Seiten der Gesundheitssysteme eine wirksame Tumorbekämpfung zur Verfügung stellen zu können, müssen die Therapeutika einfach herzustellen oder kostengünstig zu beziehen sein und unkompliziert verabreicht werden können. Diese Kriterien erfüllen vor allem konventionelle Zytostatika, wie das Doxorubicin (Sikora *et al.*, 1999), wohingegen Biopharmazeutika häufig noch zu teuer oder zu instabil sind.

1.2 Das Zytostatikum Doxorubicin

Doxorubicin wurde erstmals im Jahre 1969 aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius subsp. caesius* ATCC 27952, dem bis heute einzig bekannten Produzenten isoliert (Arcamone *et al.*, 2000). Es entsteht durch Hydroxylierung des Ausgangsmoleküls Daunorubicin am Kohlenstoffatom C-14 (Abbildung 1).

Aus klinischer Sicht gehört Doxorubicin zu den effektivsten Therapeutika gegen HER2-positiven Brustkrebs. Eine Überexpression des Proto-Onkogens HER2/*neu*, einer transmembranen Rezeptor-Tyrosin-Kinase aus der ErbB-Familie, kann in 25–30 % aller Brustkrebsfälle nachgewiesen werden (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989). Das breite Wirkspektrum ermöglicht aber auch die Behandlung anderer solider Tumore, wie z.B. Sarkomen der Weichteile und von *non*-Hodgkin-Lymphomen, weshalb pro Jahr etwa 225 Kilogramm des Wirkstoffs pharmazeutisch hergestellt werden (Arcamone *et al.*, 1997; Weiss, 1992).

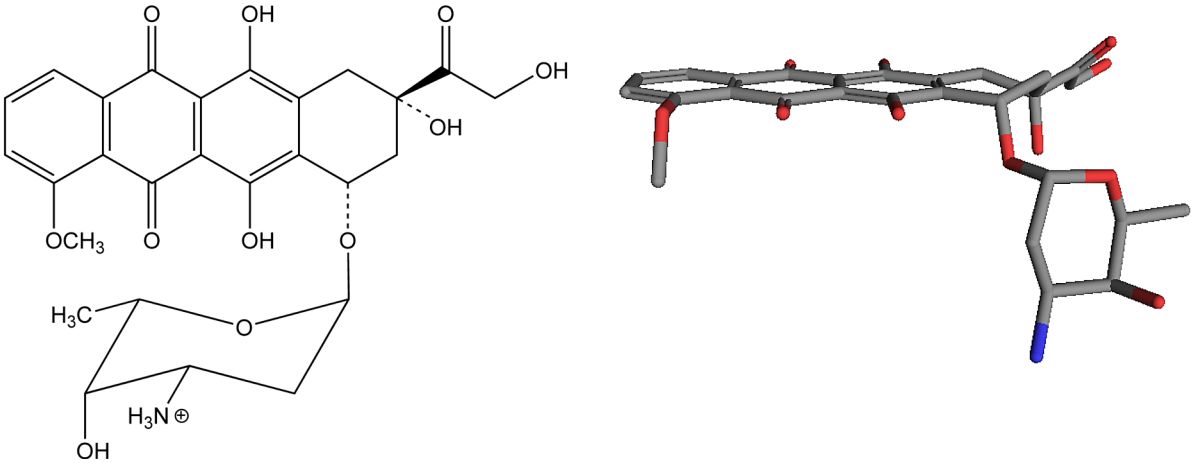

Abbildung 1: Chemische Struktur des Doxorubicins – Links: 2D-Ansicht; Rechts: 3D-Ansicht in Richtung der Ebene des planaren, chromophoren Tetrazyklus

Im Zeitalter zielgerichteter Behandlungsstrategien, sogenannter *Targeted Therapies* zeigt sich, dass das Anthrazyklin ein hervorragender Partner für andere Wirkstoffe wie Taxane und Trastuzumab darstellt und den antitumoralen Effekt mehr als additiv verstärkt (Cortes-Funes & Coronado, 2007; Esteva *et al.*, 2001; Gianni *et al.*, 1995). Es ist deshalb ein bevorzugtes Adjuvans bei der Bekämpfung HER2-positiver Tumore (Pritchard *et al.*, 2006). Als Komplikation der Kombination mit Trastuzumab (Markenname Herceptin®; Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen) sind jedoch hohe Kardiotoxizitätsraten beschrieben (Slamon *et al.*, 2001), weshalb z.B die amerikanische Zulassungsbehörde FDA dieser sehr effizienten Behandlungsmethode für die klinischen Routine erst in 2006 die Erlaubnis erteilt hat (Slamon *et al.*, 2011).

Die dem Antikörper Trastuzumab eigene, vom ErbB/Neuregulin-System vermittelte Kardiotoxizität verschlechtert gleichzeitig den Schutzmechanismus des Myokards gegenüber der noch stärker ausgeprägten Kardiotoxizität des Doxorubicins (Rayson *et al.*, 2008). Diese äußert sich in dilativer Kardiomyopathie und kongestiver Herzinsuffizienz. Die Wirkmechanismen, die sowohl für das Absterben der Tumorzellen als auch die Schädigung der kardialen Myozyten verantwortlich sind, konnten bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Aufgrund experimenteller Daten gibt es hauptsächlich vier Hypothesen, die meist den programmierten Zelltod, die Apoptose zum Gegenstand haben (Minotti *et al.*, 2004; Thorburn & Frankel, 2006): (I.) Doxorubicin stabilisiert ein Reaktionszwischenprodukt zwischen Topoisomerase II und DNA, resultierend in DNA-Strangbrüchen und p53-vermittelter Apoptose (Fornari *et al.*, 1996; Fornari *et al.*, 1994; Gewirtz, 1999; Jensen *et al.*, 1993; Siu *et al.*, 2004); (II.) Doxorubicin bindet an allosterische Stellen des 20S Proteasoms, was zu einer Anhäufung nicht abgebauten Proteins und somit dem programmierten Zelltod führt (Kiyomiya *et al.*, 2002a; Kiyomiya *et al.*, 2001; Kiyomiya *et al.*, 2002b); (III.) Doxorubicin erzeugt in Redox-Zyklen freie Radikale, die direkt Lipid- und DNA-Schäden hervorrufen oder darauf folgend durch Modifikation anderer Biomoleküle, z.B. apoptotischer Regulationsproteine (Fas, Fax, BclXL) zum Zelltod führen (Griffin-Green *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2002; Sinha *et al.*, 1989);

(IV.) Alkoholderivate des Doxorubicins können zur Freisetzung von Eisen aus dem Enzym Aconitase und dadurch zur Erzeugung freier Radikale und nachfolgend zur Apoptose führen (Minotti *et al.*, 1998; Minotti *et al.*, 2001).

Allerdings konnten bis dato keine pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen Doxorubicin und Herceptin® nachgewiesen werden, so dass eine Kombination beider Wirkstoffe bei Verwendung eines Doxorubicin-Derivats, eines -Konjugats oder einer -Formulierung mit verringerter Toxizität interessant bleibt (Gianni *et al.*, 2001). Ein vielversprechender Ansatz zur Reduktion der Kardiotoxizität des Doxorubicins, der bereits zu marktreifen Produkten geführt hat, ist die Einbettung des Wirkstoffes in liposomale Trägerformulierungen (Sparano & Winer, 2001; Verma *et al.*, 2008). Entsprechende Präparate sind das Myocet® (Zeneus Pharma Ltd.; Oxford, UK und Sopherion Therapeutics LLC; Princeton, NJ, USA) wie auch die PEGylierten Vertreter Caelyx® (Schering-Plough AG; Kenilworth, NJ, USA) und Doxil® (Ortho Biotech Products L.P., Horsham, PA, USA) (Ewer *et al.*, 2004; Rayson *et al.*, 2008), die über PEGylierung der Außenseite der liposomalen Lipid-Doppelmembran zusätzlich eine verlängerte Plasmahalbwertszeit aufweisen. Solche Trägersysteme besitzen großes Potential, da sie einen passiven *Targeting*-Effekt aufweisen, der am Ort des Tumors, der Infektion oder Entzündung eine lokale Erhöhung der Wirkstoffkonzentration hervorrufen kann. Außerdem vermeiden sie die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Wirkstoffe mit noch unbekanntem therapeutischen Profil und Nebenwirkungen zugunsten der Beibehaltung des eigentlich gut erforschten Wirkstoffs Doxorubicin (Allen & Cullis, 2004).

Der schlechte Einbau in die liposomale Matrix und die schnelle Freisetzung des Wirkstoffs in Gegenwart von Plasmaproteinen und Zellmembranbestandteilen ist ein Problem (Chowdhary *et al.*, 2003), welches durch chemische oder pH-Gradienten bei der Beladung der Liposomen gelöst wurde (Abraham *et al.*, 2004; Cullis *et al.*, 1997). Die Adressierung und Anreicherung liposomaler Trägermoleküle in mononukleären Zellen des phagozytotischen Systems der Leber, der Milz, der Nieren und des Knochenmarks stellt in diesen Geweben ein erhebliches Risiko ungewünschter toxischer Nebeneffekte dar (Allen & Cullis, 2004). Des Weiteren sind derart gekoppelte Arzneimittel nicht zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) geeignet, da die liposomalen Träger normalerweise die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können (Kreuter, 2001).

Ähnlich dem Doxorubicin (Back *et al.*, 1995; Curran, 1991) besitzt das bei Herzinsuffizienz verabreichte Arzneimittel Digitalis – ein Pflanzensteroid – eine geringe therapeutische Breite. Eine Überdosierung führt zu Vergiftungserscheinungen, die sich als schwere bis hin zu letalen Herzrhythmusstörungen manifestieren. Deshalb wurden Fab-Fragmente wie Digibind® (Glaxo Smith Kline; Brentford, London, England, UK) und DigiFab™ (BTG; London, UK), die aus Digitalis spezifischen polyklonalen Schafsantikörpern durch enzymatische Spaltung gewonnen werden, als Gegenmittel – sogenannte Antidote – entwickelt, welche einen Überschuss des Wirkstoffs stabil komplexieren und renal aus dem Körper abführen (Assez *et al.*, 2009;

Flanagan & Jones, 2001). In klinischen Studien wurde ihre therapeutische Eignung in Bezug auf die pharmakokinetischen Eigenschaften und Ligandenaffinität bereits nachgewiesen (Ward *et al.*, 2000).

Ein ähnlicher Komplexpartner für das Doxorubicin könnte sowohl als Gegenmittel bei klinischer Überdosierung des Chemotherapeutikums fungieren wie auch die bestehenden Probleme der bereits genannten liposomalen Trägersysteme umgehen und somit als effizienter alternativer Wirkstoff dienen. Im ersten Fall müsste das Biomakromolekül mit Doxorubicin vorbeladen und für das zweite Szenario unbeladen verabreicht werden. Dies wurde bereits am Beispiel eines gegen Doxorubicin gerichteten monoklonalen Antikörpers im Tiermodell gezeigt (Balsari *et al.*, 1991; Balsari *et al.*, 1994; Sardini *et al.*, 1992), wobei auch die nicht letalen Nebeneffekte des Zytostatikums, wie ausgeprägte Mukositis, Myelotoxizität, gastrointestinale Toxizität und Alopezie gemildert wurden (Balsari *et al.*, 2001; Balsari *et al.*, 1994; Morelli *et al.*, 1997; Morelli *et al.*, 1996).

Funktionelle Gruppen innerhalb der eben skizzierten, das Doxorubicin bindenden Biomakromoleküle, wie z.B. die reaktiven, modifizierbaren Aminosäureseitenketten entsprechender Antikörper, erlauben zudem durch gezielte chemische Konjugation mit anderen Biomakromolekülen eine Funktionserweiterung. Interessant erscheint hier vor allem eine kovalente Kopplung an Trastuzumab und damit einhergehend die Möglichkeit der gezielten Tumorzelladressierung und -internalisierung des Doxorubicins (Morelli *et al.*, 1994a; Morelli *et al.*, 1994b). Gezeigt wurde die klinische Wirksamkeit eines solchen Adressierungseffekt bereits am Beispiel des Antikörper-Wirkstoff-Konjugats (*Antibody-Drug Conjugate; ADC*) T-DM1 (Boyraz *et al.*, 2013), welches den Handelsnamen Kadcyla® (Roche Pharma AG; Grenzach, Deutschland) trägt. Es setzt sich aus dem bereits erwähnten monoklonalen Antikörper Trastuzumab und einem kovalent daran gebundenen Mikrotubuli-Hemmer, nämlich dem Maytansin-Derivat DM1, zusammen (Junttila *et al.*, 2011).

1.3 Anticaline: Künstliche Bindungsproteine auf Grundlage der Lipocalin-Faltung

1.3.1 Antikörper – Paradigma eines Bindungsproteins

Antikörper (Abbildung 2) sind aufgrund ihrer hohen strukturellen Plastizität basierend auf ihrer hypervariablen *Loop*-Region, die die Antigenbindungsstelle bildet, und in Verbindung mit einem stabilen Grundgerüst der Proteinfaltung Prototypen von Bindungsproteinen hoher Ligandenaffinität und -spezifität. Diese besonderen Eigenschaften der Antikörper sind evolutiv durch deren natürliche Aufgabe als adaptiver Bestandteil der Immunabwehr höherer Lebewesen erklärbar. Diese humorale Immunität dient vor allem der Erkennung in den Körper eingedrungener Mikroorganismen, wie Bakterien, Viren und Parasiten. Dabei wird nahezu jedes Protein-, aber auch Polysaccharid- oder Nukleinsäureantigen durch Bindung unschädlich gemacht und zusätzlich werden diverse Zelltypen des Immunsystems nebst dem Komplementsystem aktiviert (Janeway, 2001). Deshalb finden die Immunglobuline wie auch

ihre Fragmente in der biochemischen und biophysikalischen Forschung und Analytik, der medizinischen Diagnostik und der humanen Therapie breite Anwendung (Meulenberg, 2012).

Es gibt jedoch auch zahlreiche Nachteile bei der Verwendung von Antikörpern sowie ihren Fragmenten für genannte Anwendungen. So setzen sich Antikörper aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten komplexer Architektur zusammen, die gerade bei den kleinen Fv-Fragmenten zu instabiler Domänenassoziation führt. Bei der biotechnologischen Herstellung sind komplizierte Klonierungsschritte notwendig, da zwei Strukturgene gleichzeitig exprimiert werden müssen; außerdem lassen sich intakte Antikörper nur kostspielig in Zellkultur produzieren (Skerra, 1993). Die Antigen-Bindungsstelle, die durch die sechs hypervariablen *Loop*-Regionen bestimmt wird, verlangt eine komplizierte, konzertierte Manipulation im Fall der Erzeugung synthetischer Molekülbibliotheken, wie bei der HuCAL®(*Human Combinatorial Antibody Library*)-Technologie (Morphosys; Martinsried, Deutschland) erfolgreich umgesetzt (Rothe *et al.*, 2008). Zudem sind Antikörper ausgesprochen große Moleküle mit eingeschränkter Gewebepenetration und nicht in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Christiansen & Rajasekaran, 2004). Dies sind jedoch für viele therapeutische Zwecke unerlässliche Eigenschaften. Daraus ergibt sich ein Interesse an alternativen Proteinstrukturen mit ähnlicher Topologie, die als künstliche Rezeptormoleküle dienen können. Als Alternativen kommen Proteine mit exponierten Strukturbereichen in Frage, die Aminosäureaustausche ohne signifikante Veränderung der Faltungseigenschaften zulassen (Nygren & Skerra, 2004).

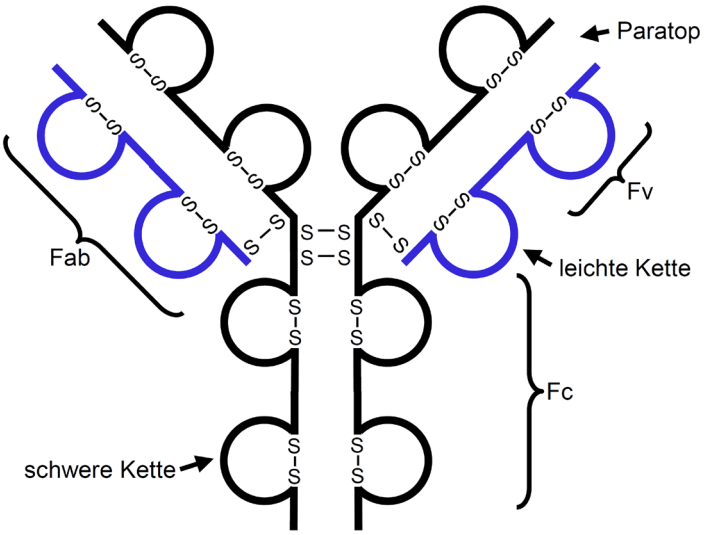

Abbildung 2: Typischer Aufbau eines humanen IgG1-Antikörpers – aus (Holla, 2012); der Antikörper besteht aus zwei schweren Ketten (schwarz) und zwei leichten Ketten (blau). Insgesamt 16 Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiär- und Quartärstruktur des Immunglobulins. Die konstante Fc-Region reguliert die Effektorfunktionen. Das Paratop ist die Antigenbindungsstelle, die aus den sechs *Complementary Determining Regions (CDRs)* gebildet wird und innerhalb der Fv- und Fab-Fragmente liegt. Diese können gentechnisch in *E. coli* hergestellt werden.

1.3.2 Vom Antikörper zum Anticalin

Ein Vergleich der Antigen-Bindungsdömanen von Antikörpern mit der Bindungstasche der Lipocaline offenbart, dass bei letztgenannter Proteinfamilie ein einfacheres aber analoges Strukturprinzip realisiert ist (Skerra, 2000; Skerra, 2003). Das starre Proteingerüst in Form des konservierten, achtsträngig parallelen β-*Barrel*, das den Lipocalinen hohe thermische Stabilität verleiht (Schlehuber & Skerra, 2002), trägt vier exponierte Peptidschleifen hoher Plastizität, die den Eingang zur Bindungstasche bilden und sich in Länge, Zusammensetzung und Konformation zwischen den einzelnen Lipocalinen erheblich unterscheiden (Skerra, 2000). Die Lipocaline bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und sind mit einer Molmasse von etwa 20 kDa kleiner als das kleinste Antigen-komplexierende Antikörperfragment Fv (25−30 kDa). Da die meisten Lipocaline natürlicherweise unglykosyliert sind, lassen sie sich effizient auf sekretorischem Weg – zur Ausbildung vorhandener Disulfidbrücken – auch in mikrobiellen Systemen wie *E. coli* produzieren (Breustedt *et al.*, 2006; Müller & Skerra, 1993; Skerra, 2008).

Der Lipocalinfamilie fehlen die physiologischen Mechanismen der somatischen Genrekombination und Hypermutation zur Variation ihrer Funktionalität, die für das immense Spektrum der Ligandenspezifitäten von Antikörpern verantwortlich sind (Schlehuber & Skerra, 2005). Um sie deshalb als künstliche Rezeptorproteine, sogenannte "Anticaline" (Beste *et al.*, 1999) nutzen zu können, sind Methoden des Protein-*Engineering* und der kombinatorischen Biochemie notwendig (Skerra, 2008). Wie anhand des Bilin-Bindungsproteins (BBP) aus *Pieris brassicae* (Schmidt & Skerra, 1994a) mit den Hapten-*Targets* Digoxigenin (Schlehuber, 2001; Schlehuber *et al.*, 2000) und Fluorescein (Beste, 1998; Beste *et al.*, 1999) gezeigt werden konnte, ist es möglich die Bindungstasche des natürlichen Lipocalins so zu verändern, dass neue Liganden komplexiert werden können.

Bindungsaffinität für einen ausgewählten Liganden kann grundsätzlich auf zwei Wegen erzeugt werden. Das rationale Design verwendet theoretische Vorhersagen und Berechnungen mittels *Molecular Modelling* (Essen & Skerra, 1994). Das evolutive Design hingegen, welches das Immunsystem imitiert (Skerra, 2003), basiert auf einer Bibliothek von Proteinvarianten, die durch gerichtete, konzertierte Zufallsmutagenese innerhalb der für die Bindungstasche kodierenden Bereiche hergestellt wird (Weiss & Lowman, 2000). In einem kombinierten Ansatz werden zunächst mittels *Molecular Modelling* die für die Komplexierung des Liganden essentiellen Aminosäureseitenketten bestimmt, um so die Wahrscheinlichkeit der Selektion von Proteinvarianten mit gewünschter Ligandenaktivität zu erhöhen. Dabei können die für die korrekte Faltung verantwortlichen Aminosäurereste anhand einer vorhandenen Kristallstruktur in der Regel zuverlässig vorhergesagt und von der Mutagenese ausgenommen werden. Um Varianten mit gewünschter Bindungsspezifität zu isolieren, muss die Molekülbibliothek schließlich einem geeigneten Selektionsprozess, wie z.B. dem *Phage*

Display unterzogen werden (Hoess, 2001; Persson *et al.*, 2008; Sheedy *et al.*, 2007; Skerra, 2008).

1.4 Anwendungsgebiete für Anticaline

Die natürlichen humanen Lipocaline liegen in löslicher Form in hohen Konzentrationen – bis zu 1,0 mg/ml – im Plasma und anderen Gewebsflüssigkeiten vor (Skerra, 2008). Sie üben zudem keine zusätzlichen immunologischen Effektorfunktionen aus, wie sie z.B. durch die konstante Fc-Region der Antikörper vermittelt werden. Bei therapeutischen Antikörpern kann diese natürliche Funktion Nebenwirkungen bis hin zu anaphylaktischen Schockreaktionen erzeugen (Schlehuber & Skerra, 2005). Auch das Problem der Immunogenität kann bei Anticalinen durch Verwendung humaner Lipocalin-Grundgerüste, von denen bis dato zwölf identifiziert sind (Breustedt *et al.*, 2006), minimiert werden. Die durch die geringe Größe bedingte kurze Halbwertszeit *in vivo* lässt sich durch Fusion z.B. mit humanem Serumalbumin oder der entsprechenden Albuminbindungsdomäne, Peptiden – wie das Beispiel der PASylierung® (XL-protein GmbH; Freising, Deutschland) zeigt (Schlapschy *et al.*, 2013) – oder durch PEGylierung verlängern (Skerra, 2008).

Diese Faktoren machen die Anticaline, zusammen mit der nachgewiesenen funktionellen Modifizierbarkeit des den Antikörpern analogen Strukturprinzips, interessant als Trägermoleküle für pharmazeutische Agentien und targetspezifische, therapeutische Biomoleküle *per se*. Ihr manipulierbares Ligandenrepertoire umfasst gegenüber anderen künstlichen Rezeptorproteinen neben den üblichen Proteinen sogar Haptenzielmoleküle, die in der kelchförmigen Bindungstasche gut aufgenommen werden können (Nygren & Uhlen, 1997; Skerra, 2007).

1.4.1 Pharmazeutisches Potential eines gegen Doxorubicin gerichteten Anticalins

Die Wirksamkeit des auch "Digical" genannten Anticalins DigA16 als Gegengift konnte bei einer Digoxin-Überdosierung im Meerschweinchen-Modell, unter Verwendung eines moderaten stöchiometrischen Überschusses des Anticalins, nachgewiesen werden (Schlehuber & Skerra, 2005). Ein "Doxocal" könnte entsprechend bei einer akuten Doxorubicin-Vergiftung von Nutzen sein. Bei Konjugation mit einem gegen einen gewebsspezifischen Zelloberflächenrezeptor gerichteten Antikörper – oder einem entsprechenden Anticalin, wodurch ein Duocalin entsteht (Schlehuber & Skerra, 2001) – erscheint sogar eine zielgerichtete Tumoradressierung des Wirkstoffs möglich.

1.4.2 Diagnostisches und analytisches Potential

Das Anticalin FluA vermag die intrinsische Fluoreszenz von Fluorescein bei Komplexierung dieses Liganden nahezu vollständig zu löschen (Beste *et al.*, 1999). Der dem Phänomen zugrunde liegende ultraschnelle Elektronentransfer zwischen Anticalin und Ligand eröffnet besonders in der Zellfluoreszenzmikroskopie interessante biophysikalische Anwendungen (Skerra, 2008). So könnte auch ein Doxocal dazu verwendet werden das Hintergrundsignal

beim Nachweis der Aufnahme des fluoreszierenden Doxorubicins in Tumorzellen zu senken (Bontenbal *et al.*, 1998).

Außerdem hängen die Fluoreszenzeigenschaften des Doxorubicins – sowie von verwandten Anthrazyklinen – erheblich von der Polarität der molekularen Umgebung ab, was zum Studium seiner Wechselwirkungen mit Lipid-Doppelschichten, Liposomen, Nukleinsäuren sowie Proteinen ausgenutzt werden kann, wobei mitunter starke Fluoreszenz-Quenchingeffekte zu erwarten sind (Pietrzak *et al.*, 2003).

1.5 Phagemid-Präsentation der BBP-Zufallsbibliothek und Kolonie-Filterstapeltest

Ein System zur Selektion von Lipocalinproteinen mit neuen Bindungseigenschaften, den sogenannten Anticalinen, setzte eine Kopplung von Genotyp und Phänotyp voraus. Ein dafür geeigneter Vektor musste sowohl die Erzeugung einer Zufallsbibliothek von BBP-Varianten als auch das Durchmustern dieser Bibliothek nach Varianten mit neuen Bindungseigenschaften unter Anwendung des *Phage Display* ermöglichen. Ein entsprechend etabliertes System lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor und war bei der Selektion gegenüber den Haptenliganden Fluorescein (Beste *et al.*, 1999) und Digoxigenin (Schlehuber *et al.*, 2000) erfolgreich eingesetzt worden.

1.5.1 Der Phasmidvektor pBBP38

Der in dieser Arbeit verwendete Phasmidvektor pBBP38 (Abbildung 3) trägt die für das lösliche Monomer der Isoform II des Bilin-Bindungsproteins kodierende cDNA. Dabei ist das N-terminale Kodon der Aminosäure Asparagin (AAC) der Isoform I gegen ein Aspartat-Kodon (GAC) ausgetauscht (Schmidt & Skerra, 1994a). Innerhalb der Bindungstasche des Proteins wurden 16 für die Interaktion mit dem natürlichen Liganden verantwortliche Aminosäuren (Beste *et al.*, 1999) zur Herstellung einer Proteinbibliothek randomisiert (Abbildung 4, Tabelle 1 und Abschnit 2.3.2). Dies geschah in einer zweistufigen Polymerasekettenreaktion (siehe Abschnitt 2.2.4.1), bei deren erstem Schritt degenerierte Oligodesoxynukleotide der zielgerichteten Einführung der gewünschten Zufallsmutationen dienten (Abbildung 4).

Zur anschließenden effizienten und gerichteten Ligierung wurden im Vorfeld am 5'- bzw. 3'-Ende des zu mutierenden cDNA-Bereiches zwei nicht-kompatible *Bst*XI-Schnittstellen eingeführt. Dazu geeignet waren die Aminosäuresubstitutionen Asn21→Gln und Lys135→Met, die innerhalb des β-*Barrels* liegen, da sie keinen erkennbaren Einfluss auf die Faltung und die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken im BBP haben. Zudem erlauben diese Schnittstellen die spätere Subklonierung selektierter BBP-Varianten in geeignete Vektoren für den Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) sowie für die präparative Produktion in *E. coli*. Ein zusätzlicher Lys→Ser Aminosäureaustausch an Position 87 eliminiert zudem eine

vermutete Proteaseerkennungssequenz. Die Sequenz mit diesen insgesamt vier Aminosäure-Substitutionen entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten "Wildtyp"-BBP.

Zur Verankerung der zu präsentierenden BBP-Varianten in der Phagenhülle des filamentösen Phagen M13 wurde das BBP-Strukturgen mit einer verkürzten Version des für das Hüllprotein pIII kodierenden Gens fusioniert, das die C-terminale Domäne der Aminosäuren 217 – 406 umfasst. Im Vergleich zur häufig eingesetzten Deletionsvariante (AS 198 – 406) (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991) zeigt diese nochmalig verkürzte Version eine verbesserte Biosynthese des Fusionsproteins (Skerra, 2001). Dieser beobachtete Effekt ist vermutlich durch die Deletion des ungepaarten Cysteinrestes an Position 201 bedingt. Die auf dem Plasmid enthaltene intergenische Region des Phagen f1 (f1-IG) sorgt durch Verpackung der einzelsträngigen DNA – in Gegenwart eines Helferphagen – in das Phagemidpartikel für die Kopplung mit dem Genotyp (Skerra, 2001).

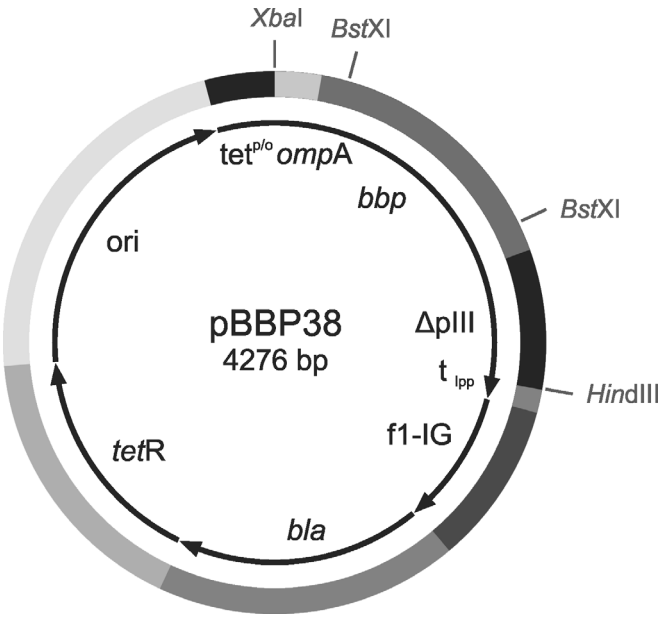

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Phasmidvektors pBBP38; der Vektor wurde zur Herstellung der Phagemidbibliothek verwendet und kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem BBP und einem C-terminalen Fragment des Phagenhüllproteins pIII (ΔpIII, Aminosäuren 217 – 406). Die Abkürzungen t_{lpp}, f1-IG, *bla*, *tet*R und ori bezeichnen den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Phagen f1, das β-Lactamasegen, das Strukturgen des Tetrazyklin-Repressors sowie den Replikationsursprung. *Xba*I, *Bst*XI und *Hin*dIII bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Der Austausch der mutierten Genkassette des BBP erfolgte über die beiden *Bst*XI-Schnittstellen.

Der *E. coli*-Stamm XL1-*Blue* wurde für die Herstellung der Phagemide verwendet, da er die entscheidenden Kriterien hoher Transformationskompetenz, Produktion hoher Phagemidtiter bei relativ kurzen Generationszeiten sowie eine effiziente Synthese des BBP-ΔΔpIII-Fusionsproteins gewährleistete (Schmidt, 1995). Um eine hohe Überlebensfähigkeit des Bakterienstamms und damit effiziente Expression des Fusionsgens zu ermöglichen, reguliert der stringente *tet*-Promotor die Transkription (Skerra, 1994). Ein innerhalb des Fusionsgens zwischen der für das BBP und der für das trunkierte pIII-Hüllprotein kodierenden Region befindliches

Amber-Stoppkodon sollte ursprünglich der alternativen Produktion sowohl der löslichen BBP-Varianten als auch des Fusionsproteins – unter Verwendung eines *Amber*-Suppressorstamms wie *E. coli* XL1-*Blue* – dienen (Schmidt, 1995). In einem *sup*E-*Amber*-Suppressorstamm wird nämlich die Translationstermination am Stoppkodon zu etwa 10–20 % durch den Einbau eines Glutamin-Restes in die wachsende Polypeptidkette umgangen (Miller, 1992).

Da selbst das dichte Tetrazyklin-Promotor/Operator-System keine absolute Repression in Abwesenheit des Induktors aufweist, führt eine Substitution dieses Stoppkodons durch Glutamin für die infizierten Zellen zu toxischen Niveaus an Fusionsprotein. Das heißt, dass durch die Anwesenheit des *Amber*-Stoppkodons die Bildung einer für die Wirtszelle tolerablen Konzentration des BBP-ΔΔpIII-Fusionsproteins nicht überschritten wird. Durch die Einführung zweier weiterer Stoppkodons (*Ochre* und *Opal*) an den Positionen 42 und 43 innerhalb des BBP-Strukturgens wird verhindert, dass der BBP-Wildtyp durch Religierung von unvollständig mit Restriktionsenzym geschnittenem Vektor die resultierende Bibliothek verunreinigt (Beste, 1998).

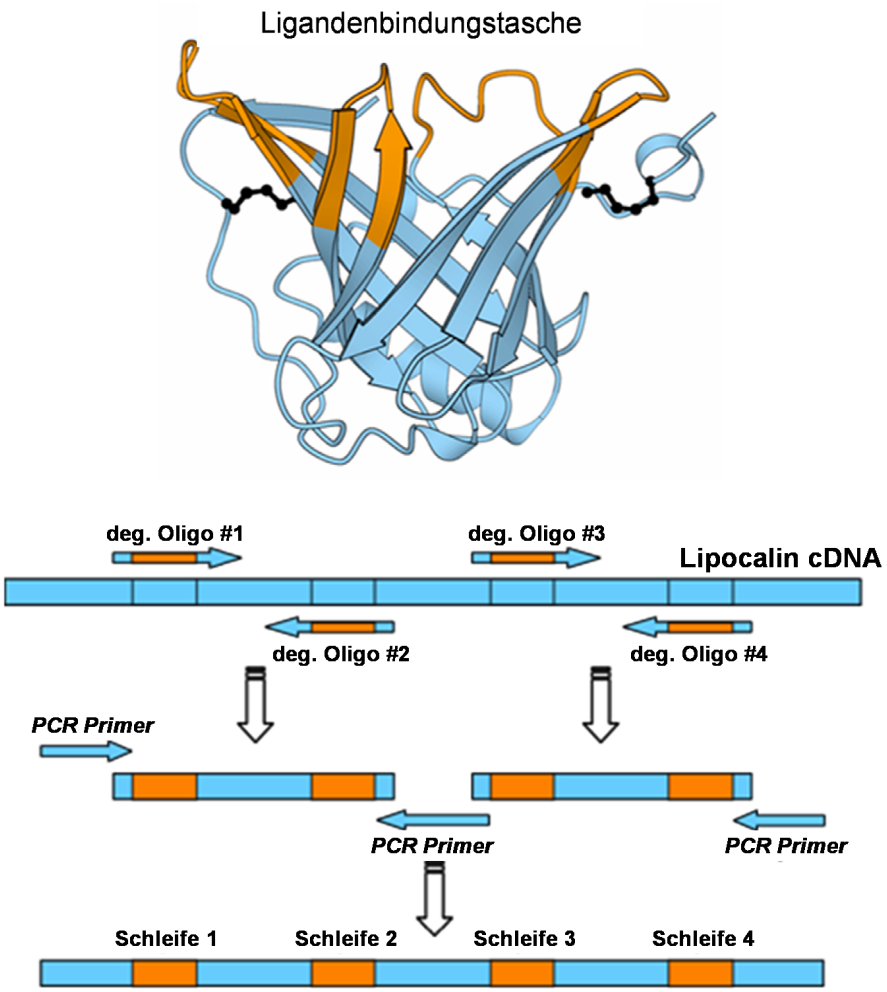

Abbildung 4: BBP-Faltungsmuster und Bibliotheksentwurf – Oben: Röntgenstruktur des kelchförmigen Wt-BBP; Unten: Schema der Assemblierungs-*PCR* zur Herstellung der *bbp*-Bibliothek (in orange sind die vier randomisierten Schleifen hervorgehoben, die den Zugang zur Bindungstasche des Lipocalins definieren; mit freundlicher Genehmigung von A. Skerra)

Werden die mit den Phasmiden transformierten *E. coli* Zellen anschließend zusätzlich mit einem M13-Helferphagen infiziert, führt dies zur Verpackung der Phasmid-DNA in einzelsträngiger Form zusammen mit dem kodierten Fusionsprotein in Form sogenannter Phagemide. Das BBP-ΔΔpIII-Fusionsprotein trägt N-terminal eine bakterielle OmpA-Signalsequenz, welche die Translokation des N-terminalen Segmentes des Fusionsproteins in das bakterielle Periplasma vermittelt (Movva *et al.*, 1980). Zusammen mit den nativen Phagenproteinen gelangt das C-terminale Fragment des Phagenhüllproteins, das die innere *E. coli*-Membran durchspannt, danach zur Assemblierungsstelle der naszierenden Phagemidpartikel und wird in das Phagemid eingebaut (Kay, 1996).

Da bei Koinfektion mit dem Helferphagen VCS-M13 dessen native Hüllproteine im Überschuss produziert werden, wird bei optimierter Genregulation lediglich bei etwa 10% der Phagemide eine der fünf Kopien des Hüllproteins pIII durch ein rekombinantes Fusionsprotein ersetzt. Zudem tragen nur circa 1% der Phagemide zwei oder mehr Kopien des Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche (Bradbury *et al.*, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1995; Lowman *et al.*, 1991), weshalb man in diesem Fall von monovalenter Oberflächenpräsentation spricht.

Tabelle 1: Die innerhalb der Wt-*bbp*-Sequenz randomisierten Aminosäure-Positionen zur Erzeugung der BBP-Molekülbibliothek (Beste, 1998)

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

[a]Die Nomenklatur der Zufallskodons folgt der NC-IUB (1986), wobei Xaa für alle 20 Aminosäuren steht.

1.5.2 Kolonie-Filterstapeltest zur Identifizierung *target*-affiner BBP-Varianten

Theoretisch erhöht jeder zusätzliche Selektionszyklus beim *Phage Display* den Gehalt bindungsaktiver BBP-Varianten ausgehend von der nativen Zufallsbibliothek. Ein gegenläufiger Effekt dabei ist jedoch die parallele Tendenz zur Anreicherung von Phagemiden, die während der Vervielfältigung in *E. coli* aufgrund hoher Infektiosität oder schneller Assemblierung einen biologischen Selektionsvorteil bieten (Levitan, 1998). Deshalb wurde der Kolonie-Filterstapeltest (Skerra *et al.*, 1991) eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4), um bereits nach wenigen Runden eine größere Anzahl der angereicherten BBP-Varianten effizient zu durchmustern. Der dafür verwendete Vektor pBBP22 (Abbildung 5) kodiert für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem rekombinanten BBP (bzw. einer seiner Varianten), dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel (Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000), einem Pro-Ser-Ala-Peptid-*Linker* und der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD) (König & Skerra, 1998). Die ABD des Protein G von *Streptococcus* G148 weist eine hohe Affinität $K_D = 1 - 100$ nM (Nilsson *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1994) für humanes Serumalbumin (HSA) auf und umfasst 46 Aminosäurereste (Åkerström *et al.*, 1987; Guss *et al.*, 1986; Olsson *et al.*, 1987).

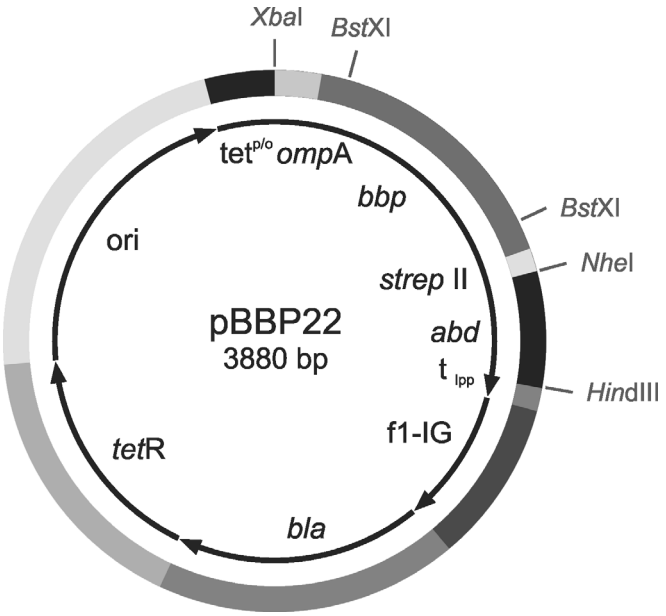

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Plasmids pBBP22 für den Kolonie-Filterstapeltest; der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators (tet$^{p/o}$) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem rekombinanten Wt-BBP, dem *Strep*-tag II, einem Pro-Ser-Ala-Peptid-*Linker* und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD). *Xba*I, *Bst*XI, *Nhe*I und *Hin*dIII bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Für alle anderen Sequenzabschnitte siehe die Legende zu Abbildung 3.

Der *Amber*-Suppressorstamm *E. coli* TG1-F$^-$ dient dabei vorzugsweise zur Herstellung funktioneller Fusionsproteine auch derjenigen Varianten, die aufgrund der Mutagenesestrategie interne *Amber*-Stoppkodons aufweisen. Sein F$^-$-Phänotyp verhindert gleichzeitig eine Phagenkontamination. Die Suspension der transformierten Zellen wird auf einer hydrophilen

Membran ausplattiert und bis zur Bildung kleiner Kolonien inkubiert. Danach wird diese Membran auf eine frische Agarplatte mit einer hydrophoben Membran umgesetzt, welche zuvor mit HSA beschichtet worden war. Die Zugabe von Anhydrotetrazyklin zum Agarmedium regt die Proteinbiosynthese des Fusionsproteins und den Export des rekombinanten Proteins in das Periplasma an (Ghrayeb *et al.*, 1984; Skerra & Plückthun, 1988). Dies führt zu einer partiellen Permeabilisierung der äußeren Membran (Plückthun & Skerra, 1989) und ermöglicht, verbunden mit der Diffusion durch die Poren der hydrophilen Filtermembran, die Freisetzung des kompakten Fusionsproteins aus den Kolonien der Bakterien. Mittels der ABD wird es auf der darunter liegenden zweiten Membran durch Komplexbildung mit dem HSA verankert und in gerichteter Weise präsentiert. Dadurch entsteht ein Abbild der Kolonien in Form der funktionell adsorbierten BBP-Varianten. Nach der Induktionsperiode werden die beiden Membranfilter voneinander getrennt, und die Bindungsaktivität der einzelnen BBP-Varianten kann durch Zugabe des markierten *Targets* in Verbindung mit einem geeigneten Nachweisreagens detektiert werden.

Mittels des monovalenten *Phage Displays* in Verbindung mit dem Kolonie-Filterstapeltest kann aus einer Proteinbibliothek einfach und effizient auf die Bindungsaktivität einzelner Varianten für einen vorgegebenen Liganden selektiert werden (Schlehuber *et al.*, 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mittels des rational basierten evolutiven Protein-Designs ein Anticalin mit Bindungsaffinität für das Anthrazyklin Doxorubicin hergestellt werden. Dazu musste zunächst ein geeignetes Lipocalin-*Scaffold* identifiziert und die korrespondierende Proteinbibiliothek mit einem Phagemid/Helferphagen-System erzeugt werden. Mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie sollten anschließend solche Anticaline selektiert werden, die den Liganden spezifisch und mit hoher Affinität komplexieren. Außerdem sollten die entsprechenden in *E. coli* produzierten Proteinvarianten hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die praktische Eignung eines solchen Anticalins als Reagens in der biophysikalischen Analytik sowie der Diagnostik geprüft werden.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen

***E. coli* K12-Stämme**

<u>*Phage Display*</u>:

XL1-*Blue* — *end*A1, *hsd*R17(r_k^-, m_k^+), *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169 [F': *pro*AB, *lac*I^qZΔ15, Tn10(Tet^R)] *(Bullock et al., 1987)*
von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

<u>Kolonie-Filterstapeltest:</u>

TG1-F^- — *sup*E, *hsd*D5, *thi*, D(*lac-pro*AB)
von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

<u>Expression:</u>

JM83 — F^-, *ara*, Δ(*lac-pro*AB), *rps*L (= *str*A), ϕ80, *lac*ZΔM15 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)
von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

JM83proABΔ*skp* — JM83 *pro*AB^+
von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

MC4100Δ*skp* — F^-, *ara*D139, Δ (*arg*F-*lac*)U169, *prs*L150, *rel*A1, *deo*C1, *rbs*R, *fth*D5301, *fru*A25, λ^-(Peters *et al.*, 2003)
von Professor Dr. M. Müller, Universität Freiburg

W3110 — F^-, *mcr*A *mcr*B *IN(rrn*D-*rrn*E*)l,* λ^- (Hayashi *et al.*, 2006)
von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

Plasmide

<u>*Phage Display:*</u>

pBBP38 — *ori*, $tet^{p/o}$ (*Xba*I), OmpA, *bbp*-K87S, K41N; C42*ochre*, G43*opal* (*Bst*XI)-ΔΔpIII (217−406), *bla*
von Pieris AG, Freising

<u>Kolonie-Filterstapeltest:</u>

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

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

Expression:

pBBP21	*ori*, $tet^{p/o}$, OmpA, *bbp*-K87S (*Bst*XI)-*strep*II, *dsb*C, *bla* (Beste, 1998) von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising
pBBP21-F1K18	wie bbp21 jedoch mit Substitution der *bbp*-Genkassette durch *Bst*XI Verdau und Klonierung der in dieser Arbeit auf Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin selektierten Variante F1K18 (Abbildung 27)
pBBP21-F1K27	wie bbp21 jedoch mit Substitution der *bbp*-Genkassette durch *Bst*XI Verdau und Klonierung der in dieser Arbeit auf Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin selektierten Variante F1K27 (Abbildung 27)
pBBP21-FluA	*ori*, $tet^{p/o}$, OmpA, *fluA*-K87S (*Bst*XI)-*strep*II, *dsb*C, *bla* (Beste, 1998) von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising
pBBP21DigA16	*ori*, $tet^{p/o}$, OmpA, *digA16*-K87S (*Bst*XI)-*strep*II, *dsb*C, *bla* (Schlehuber, 2001) von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising
pTUM4	*ori*, p^{fkpA} *fkp*A *sur*A, p^{dsbA} *dsb*A *dsb*C, p^{cat} *cat* (Schlapschy *et al.*, 2006) von Professor Dr. A. Skerra, TU München, Freising

Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphage; Stratagene GmbH, Heidelberg

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden in HPLC-gereinigter Qualität von der Firma IBA GmbH (Göttingen) bezogen. Die Nomenklatur der Kodons folgt der NC-IUB (1986).

Oligodesoxynukleotide für die Mutagenese:

Die Oligodesoxynukleotide FS-15, GB-3, GB-4 und GB-11 wurden vor Verwendung zusätzlich mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.2 und 3.3.2) gereinigt.

FS-15: 5'- GGG TAG GCG GTA CCT TCS NNA AAG TAT TCC TTG CCG TGG ATT ACM NNG TAS NNC GAA ACT TTG ACA CTC TT -3'

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

GB-4: 5'- TCT GGA GAG CAC CCA GAC MNN GTC SNN GTG TCC CTT CTT GTC CTC GTC GTA SNN GCA MNN GTA TCC GAT GAT GTA GTT -3'

GB-11: 5'- CCA AGA TTG GAA AGA TCT ACC ACA GCN NSA CTN NKG GAG GTN NSA CCV VSG AGN NKG TAT TCA ACG TAC TCT CC -3'

Oligodesoxynukleotide der Assemblierungs- und Amplifizierungs-*PCR*:

Das Oligodesoxynukleotid FS-18 wurde vor der Verwendung zusätzlich mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.2 und 3.3.2) gereinigt.

FS-18: 5'- AGA TCT TTC CAA TCT TGG AGT CAC CAA CTG GGT AGG CGG TAC CTT C -3'

GB-1: 5'- CTT CGA CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GGA -3'

GB-2: 5'- CAC CAG TAA GGA CCA TGC TTC TGG AGA GCA CCC AGA C -3'

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung:

GB-7: 5'- GAC GGT GCC TGT CCC GA -3'

GB-8: 5'- GAC TAC TGG GGA GCC GA -3'

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Aprotinin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Benzonase®, Reinheitsgrad I (25 U/µl)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA), Frak. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ExtrAvidin®-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA), Frak. V	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A (~90 U/mg und ~70 U/mg) aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	IBA GmbH, Göttingen

Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Transferrin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase (6 Weiss U/µl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.1.4 Chemikalien

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
N-Acetyl-L-Tryptophanamid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (*Sequagel Concentrate & Diluent*)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30% mit 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na_2-Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose (*Electrophoresis Grade*)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose (*Low Melting Point*)	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
4-Aminofluorescein, Reinheit ≥ 97% 4-(Fluoresceinamin, Isomer I)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumacetat	Merck KGaA, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natriumsalz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure (ANS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Antifoam A-Stammlösung	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Bacto Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
D-Biotinoyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Blue Dextran	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
ChemiBLOCKER™	Chemicon Inter. Inc., Temecula, CA, USA
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
dNTP-Satz (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
2'-Deoxy-P-nukleosid-5'-triphosphat (dPTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Digoxigenin (Dig)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxy-succinimidester (NHS) (Dig-NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure, technisch	AppliChem, Darmstadt
Ethanol *p.a.*, 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Ethanol, technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylacetat	Merck KGaA, Darmstadt
N-Ethyldiisopropylamin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure-Na_2-Dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Ethylenglykol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
D(+)-Glucose, Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glutarsäureanhydrid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kobaltchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupferchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid, Tetrahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol *p.a.*, 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (*Heavy White Oil*) für die *PCR*	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (*SDS*)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro *Blue* Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (*p*NPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
8-Oxo-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat (8-oxo-dGTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
P-20 *Surfactant*	BIACORE, Uppsala, Schweden
Phenol, Reinheit ≥ 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Ponceau S	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure konz. (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetrazyklin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

(TEMED)	
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
tRNA (*S. cerevisiae*)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Xylencyanol FF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.5 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

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

Protein Größenstandards:

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

Kits zur DNA-Isolierung:

E.Z.N.A.®*Cycle-Pure Kit*	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
JETSORB *Gel Extraction Kit*	GENOMED GmbH, Bad Oeynhausen
JETQUICK *Plasmid Miniprep Spin Kit*	GENOMED GmbH, Bad Oeynhausen
QIA*prep Spin Plasmid Miniprep Kit*	Qiagen GmbH, Hilden
QIA*prep Plasmid Midiprep Kit*	Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

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

2.1.6 Geräte

ABI-Prism™ 310 *Genetic Analyzer*	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
BIACORE-X System	BIACORE, Uppsala, Schweden
Bio-Mag 10 Magnetrührer	BCC Spezialgeräte, Göttingen
Brutschränke:	
BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Friocell	Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg
Drehtisch zum Ausplattieren	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Durchflussdetektoren:	
2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Elektroblotapparatur	Eigenbau; Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammern:	Eigenbau
G42	Biometra, Göttingen
Hoefer HE33	Amersham Biosciences, San Francisco, USA
Elektroporator *MicroPulser*™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fermenter:	
5 und 10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluss-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO_2 Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
O_2-Sensor (12/320 A-Typ)	Mettler-Toledo, Steinbach
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Messtechnik, Steinbach
Fraktionssammler:	
Gradi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe

	GmbH, Freiburg
Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
17000 Minirac	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geldokumentationssystem	LTF-Labortechnik, Wasserburg
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
ÄKTA™ Purifier System	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA™ Explorer System	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Millipore Synergy 185 Reinstwasser-Anlage	Millipore GmbH, Eschborn
Netzgeräte:	
Power Pack P25 und P30	Biometra, Göttingen
500/500	Renner GmbH, Dannstadt
PCR-Cycler:	
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Mastercycler Gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
CG810	Schott-Geräte GmbH, Hofheim
pH526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin
Pipettierhilfen:	
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet®	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten:	
Gilson P10, P20, P100, P200 und P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Multipette 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroid-Kamera MP4	Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen
Signalschreiber:	
REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Österreich
BD 40	Kipp & Zonen, Delft, Niederlande
Schüttelapparate Typ 3012 und 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Schüttelinkubatoren:	
Modell TR-125/ITE-K	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Multitron II	Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Thermoshake THO 5	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn
CM5-Sensorchips	BIACORE, Uppsala, Schweden
2003 *Slab Gel Dryer*	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Spektrophotometer:	
ELISA-Photometer SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Fluoreszenzphotometer LS 50B	Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA
Ultrospec 2000-UV/Vis-Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultrospec 3000-UV/Vis-Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Speed-Vac-Konzentrator Univapo UVC 150H	UniEquip, Martinsried
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
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
Wasserbäder:	
Haake F6 / C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Haake DC30 / K20	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo UC / 5B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen:	
Sigma 4K10 und 4K15	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A / HBB-6	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor	Kendro Laboratory Products GmbH, München

Sorvall RC 5B, RC 5C Plus und Evolution RC mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.7 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche:	
Spectra/Por®, *MWCO*: 6 – 8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, *MWCO*: 12 – 16 kDa	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dynabeads M-280 Streptavidin	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20 und 60 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen; Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml (*safelock*)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Größenausschlusschromatographie-Säulen:	
Superdex 75 HR 10/30 Superdex 200 HR 10/30 Superdex 75 HiLoad 16/60 *Prep Grade* Superdex 200 HiLoad 16/60 *Prep Grade*	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Amicon®Ultra 4, *MWCO*: 5 kDa Amicon®Ultra 4, *MWCO*: 10 kDa Amicon®Ultra 4, *MWCO*: 30 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Mikrosep™10 K	Pall GmbH, Dreieich
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar®PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	

Immobilon™-P (0,45 µm) GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrodialysiereinheiten (10 kDa *MWCO*)	Perbio Science GmbH, Bonn
Falcon Micro Test III *Flexible Assay-Plates*	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Nunc-Immuno™-Flügelstifte	Nunc GmbH, Wiesbaden
PD-10-Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen:	
blau (200 – 1000 µl) gelb (5 – 200 µl) kristallklar (0,5 – 10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Quarzküvetten:	
Typ 101-QS (Fluoreszenz) Typ 108-QS (Absorption) Typ 108.002B-QS (Anisotropie) Typ 110 QS (CD)	Hellma, Müllheim, Baden
Schwan-Stabilo®-Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main
Sterilfilter:	
Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex® HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Spin-X Sterilfiltrationseinheit (0,45 µm)	Costar, Corning, NY, USA
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Zellschaber 3010	Costar, Corning, NY, USA
Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren JA-10 und JA-20 sowie für Sorvall-Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Nalgene Company, New York, USA
Zubehör *SDS-PAGE* Glasplatten, *Spacer*, Dichtungen und Kämme	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Biometra, Göttingen

2.1.8 Medien, Antibiotika, Puffer- und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklav sterilisiert oder über 0,45 µm-Filter sterilfiltriert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden alle Lösungen unter Verwendung von Millipore®-Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

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

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H_2O (1/1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % (*v/v*) Ethanol (1/1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan)	35 mg/ml in Wasser (1/500 zum Medium)
Tetrazyklin (Tet)	10 mg/ml in 70 % (*v/v*) Ethanol (1/1000 zum Medium)

Lagerung bei – 20 °C

Induktor-Stammlösungen:

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

Lagerung bei –20 °C

LB-Medium:

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

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

SOB- bzw. SOC-Medium:

Bacto Trypton	10 g/L
Bacto Hefe-Extrakt	5 g/L
NaCl	584 mg/L
KCl	149 mg/L

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

Jeweils 1 ml 1 M $MgCl_2$ und 1 M $MgSO_4$ und im Fall des SOC-Mediums zusätzlich noch 2ml Glucose zu 98 ml bzw. 96 ml Medium geben.

2YT-Medium:

Bacto Trypton	16 g/L
Bacto Hefe-Extrakt	10 g/L
NaCl	5 g/L

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

Lösungen für die Fermentation oder für Nährmedien:

Mineralsalzlösung:

31 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O	5,51 g/L
19 mM KH_2PO_4	2,58 g/L
25 mM NH_4Cl	1,33 g/L
5 mM Na_3-Citrat x 2 H_2O	0,47 g/L

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

Glukoselösungen:

20 % (*w/v*) Glukose (separat autoklavieren)
50 % (*w/v*) Glukose (separat autoklavieren)

$MgSO_4$-Stammlösung:

1 M $MgSO_4$ (separat autoklavieren)

$MgCl_2$-Stammlösung:

1 M $MgCl_2$ (separat autoklavieren)

Thiamin-Stammlösung:

10,0 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)

$FeCl_3$-Stammlösung:

35,0 g/L $FeCl_3$ x 6 H_2O (mit konzentierter HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert und sterilfiltriert)

Zn-Acetat-Stammlösung:

8,0 g/L Zn-Acetat x 2 H_2O (sterilfiltriert)

Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

$MnCl_2$ x 4 H_2O	3,0 g/L
$CuCl_2$ x 6 H_2O	0,3 g/L
H_3BO_3	0,6 g/L
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,5 g/L

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x 4 H2O	1,2 g/L
EDTA	4 mM

Weitere Lösungen für die Fermentation:

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

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

TAE-Puffer:

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10-fach Auftragspuffer für Agarosegele:

Bromphenolblau	1,0 mg/ml
Xylencyanol	1,0 mg/ml
Glycerin	50 % (*v/v*)

Puffer für die *SDS-PAGE*:

1-fach *SDS*-Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986):

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1,0 g/L

pH 8,8 stellt sich ein.

4-fach *Lower*-Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4,0 g/L

4-fach *Upper*-Tris:

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

5-fach 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*) (in reduzierendem Puffer)

Färbelösung:

Essigsäure	10 % (*v/v*)
Methanol	40 % (*v/v*)
Coomassie Brillantblau R-250	0,25 % (*w/v*)

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brillantblau R-250

Aufbewahrungslösung:

Essigsäure	7 % (*v/v*)
Glycerin	3 % (*v/v*)
Wasser	90 % (*v/v*)

<u>Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:</u>

Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24/1

Phenol:

Kristallines Phenol (Reinheit ≥ 99 %; unter Schutzgas destilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit 0,5 Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

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

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4,8:

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

LMP-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM

pH 7,5 mit Essigsäure einstellen.

<u>Sonstige Puffer:</u>

AP-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	100 mM

$MgCl_2$	5 mM

pH 8,8 mit HCl einstellen.

2 x BBS/E:

Na-Borat pH 8,0	400 mM
NaCl	320 mM
EDTA	8 mM

Benzonase-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
$MgCl_2$	5 mM

10-fach Formamid-Auftragungspuffer:

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

PBS:

KH_2PO_4	4 mM
Na_2HPO_4	16 mM
NaCl	115 mM

pH 7,4 stellt sich ein.

PBS/E:

PBS mit 1 mM EDTA

PBS/T:

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

PBS/T 0,5:

PBS mit 0,5 % (*v/v*) Tween 20

Periplasma-Aufschlusspuffer:

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

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

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

TE-Puffer:

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

2.2 Mikro- und molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen
(nach Schlehuber, 2001)

Zur Vereinzelung der Bakterienkolonien eines *E. coli*-Stamms wurde ein "Drei-Ösen"-Ausstrich der entsprechenden Glycerinkultur auf LB-Agar-Kulturplatten durchgeführt und die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Selektion auf genomische Marker, Episome oder Plasmide erfolgte durch den Zusatz entsprechender Antibiotika zum Nährmedium. Die Platten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu vier Wochen zum Animpfen neuer Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Für 4 ml Kulturen wurden dabei 13 ml-Kulturröhrchen verwendet. Kulturen größeren Maßstabs wurden in Erlenmeyer-Kolben mit dem 2,5-fachen Gefäßvolumen kultiviert. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen, sofern nicht anders angegeben, direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 L wurden im Verhältnis 1/50 mit einer stationären Übernachtkultur inokuliert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 180 *rpm* im Schüttelinkubator. Die Zelldichte wurde optisch bei 550 nm (OD_{550}) mittels des Ultrospec 2000- oder Ultrospec 3000-UV/Vis-Spektralphotometers im linearen Messbereich bestimmt. Die Messung wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur Aufbewahrung wurden stationäre Flüssigkulturen in 1/80-Volumen des ursprünglichen Kulturmediums in Selektivmedium einschließlich 20 % (*v/v*) Glycerin eingefroren; bei –20 °C für eine mittelfristige Lagerung, und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C für die langfristige Lagerung.

2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, mussten die *E. coli*-Zellen zuvor in eine transformations-kompetente Form überführt werden. Dazu wurde neben der klassischen $CaCl_2$-Methode (Cohen *et al.*, 1972), der Methode nach Inoue (1990) auch die Methode der Elektroporation (Dower *et al.*, 1988) eingesetzt. Die chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wiesen eine Transformationseffizienz zwischen 10^5 bis 10^9 *cfu* pro µg Plasmid-DNA auf. Zur Herstellung einer Zufallsbibliothek möglichst großer Diversität waren dagegen höhere Transformationsausbeuten erforderlich, die durch das leistungsfähigere Verfahren der Elektroporation erreicht wurden. Diese Methode besaß eine Transformationseffizienz von bis zu 10^{10} *cfu* pro µg Plasmid-DNA.

2.2.2.1 Herstellung $CaCl_2$-kompetenter Zellen
(nach Schlehuber, 2001)

50 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtkultur des zu transformierenden *E. coli*-Stamms angeimpft und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von

OD_{550} = 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugieren (Sigma 4K10, 4400 x 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 und das erhaltene Sediment in 20 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml 50 mM $CaCl_2$ inklusive 15 % (*v/v*) Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µl entweder direkt für die Transformation verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung ultra-kompetenter Zellen nach Inoue
(nach Inoue, 1990)

100 ml SOB-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtkultur des zu transformierenden *E. coli*-Stamms angeimpft und bei 22 °C bis zu einer optischen Dichte von OD_{600} = 0,6 inkubiert. Danach wurde der Kolben für 10 min unter gelegentlichem Schwenken auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 2500 x g, 4 °C in 50 ml-Falcon-Röhrchen zentrifugiert (Sigma 4K10) und der Überstand vollständig dekantiert. Die Zellen wurden in insgesamt 30 ml TB-Puffer (TBE-Puffer ohne EDTA) resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren (10 min, 2500 x g, 4 °C) wurden die Zellen in insgesamt 8 ml sterilem TB-Puffer mit 7 % (*v/v*) DMSO resuspendiert und nach vorsichtigem Durchmischen für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei –80 °C.

2.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter Zellen
(nach Schlehuber, 2001)

Zur Transformation wurden 200 µl der Zellsuspension mit 5 µl der DNA-Lösung versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 45 s auf 42 °C erwärmt. Die $CaCl_2$-kompetenten Zellen wurden daraufhin in 2 ml LB-Medium, die ultra-kompetenten Zellen in 2 ml SOC-Medium überführt und für 45 min bei 37 °C und 200 *rpm* geschüttelt. Abhängig von der erwarteten Zahl an Transformanden wurden 50 – 200 µl der Zellsuspension auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.4 Herstellung elektro-kompetenter Zellen und Elektroporation
(nach Schlehuber, 2001)

Die Präparation elektro-kompetenter Zellen des *E. coli* Stamms XL1-*Blue* für die Herstellung von Phagemid-Bibliotheken wurde in Anlehnung an die Vorschriften von Tung & Chow (1995) bzw. Hengen (1996) durchgeführt.

Von einer am Vortag frisch ausgestrichenen XL1-*Blue*-LB/Tet-Agarplatte wurde eine 5 ml Vorkultur in LB-Flüssigmedium inokuliert. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C, 200 *rpm* wurde

eine 50 ml LB-Kultur im Verhältnis 1/1000 mit der stationären Vorkultur angeimpft und für weitere 12 h bei 30 °C und 200 *rpm* inkubiert. Anschließend wurden 1,5 L LB-Medium mit dieser 50 ml-Kultur angeimpft und bei 26 °C und 160 *rpm* bis zu einer OD_{600} = 0,6 inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten im Kühlraum unter Verwendung gekühlter Reagenzien und Materialien durchgeführt. Der Kulturkolben wurde zunächst für 30 min auf Eiswasser gekühlt und anschließend für 15 min bei 2700 x g, 4 °C zentrifugiert (SLA 3000). Das nach Dekantieren des Überstandes erhaltene Zellsediment wurde vorsichtig in insgesamt 800 ml bidestilliertem Wasser inklusive 10 % (*v/v*) Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert (SLA 3000; 15 min, 4000 x g, 4 °C). Das resultierende Zellsediment wurde anschließend nochmals wie beschrieben resuspendiert und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert, die Flüssigkeitsreste vorsichtig mit der Pipette abgezogen und die Zellen in insgesamt 600 µl bidestilliertem Wasser inklusive 10 % (*v/v*) Glycerin (autoklaviert) resuspendiert und letztendlich das Volumen mit obiger Wasser/Glycerin-Lösung auf 2 ml aufgefüllt. Für die anschließende Elektroporation wurden die erhaltenen Zellen zu jeweils 100 µl auf Eis aliquotiert und sofort eingesetzt.

Die Elektroporation wurde mit einem *MicroPulser*™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) unter Verwendung bei –20 °C gekühlter Bio-Rad-Küvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm im Kühlraum durchgeführt. Für die Transformation wurden je 100 µl der elektro-kompetenten XL1-*Blue*-Zellen und je 10,0 µl entsprechend 2,0 µg entweder der ligierten und durch Fällung entsalzten (zur Herstellung der Phagemid-Bibliothek; siehe Abschnitt 2.2.6.2) oder lediglich ligierter (siehe Abschnitt 2.2.4.3) bzw. *in vivo* amplifizierter Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.3) eingesetzt. Die Zellen und die Plasmid-DNA wurden zunächst auf Eis gemischt und für eine Minute inkubiert, bevor die Transformation durch Anlegen eines Pulses von 12,5 $kV cm^{-1}$ für 6 ms (*MicroPulser*™-Programm Ec2 für Bakterienzellen) erfolgte. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Elektroden frei von Kondenswasser waren, um eine mit Thermoemission verbundene Lichtbogenbildung und einen daraus resultierenden Zelltod zu vermeiden. Um die Zellvitalität nach der Transformation zu erhalten, wurde der Elektroporationsansatz umgehend mit 2 x 1 ml SOC-Medium gespült und das gesamte Volumen in einen bei 37 °C im Wasserbad vorinkubierten Schüttelkolben überführt. Nach Beendigung aller Transformationen wurde der gesamte Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C bei 180 *rpm* inkubiert.

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

Die Elektroporationsküvetten wurden für den Einsatz in Testransformationen oder die für den Kolonie-Filterstapeltest bestimmten Elektroporationsansätze regeneriert. Dazu wurden sie für 10 – 15 min in 10 mM HCl pH 2,0 unter Rühren gewaschen und mindestens sechsmal einzeln

mit H_2O gespült. Nach dem Spülen mit 70 % Isopropanol wurden die Küvetten 2 – 3 Tage im Trockenschrank bei 80 °C vollständig getrocknet.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Zelllyse

2.2.3.1 Plasmid-Minipräparation
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Zur Analyse einzelner Transformanden, die aus der Infektion mit den Phagemiden der Affinitätsanreicherung resultierten oder nach Umklonierungen bzw. Mutagenesen erhalten wurden, wurde zunächst die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab isoliert. Die DNA wurde dazu aus stationären 4 ml-Übernachtkulturen unter Verwendung der Plasmid-Isolierungs-Kits JET-QUICK *Plasmid Miniprep Spin Kit* (GENOMED GmbH, Löhne) oder Wizard®Plus SV *Miniprep Kits* (Promega Corp., Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben präpariert und für Transformationen bzw. Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt. Bei der Präparation wurden typischerweise 10 bis 20 µg DNA in 50 µl TE/10-Puffer erhalten. Die Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.2.3.2 Plasmid-Midipräparation
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Um DNA-Mengen für präparative Restriktionsansätze sowie zur Konservierung der BBP-Zufallsbibliotheken (siehe Abschnitt 2.3.2) zu gewinnen, wurde die Plasmid-DNA ausgehend von stationären *E. coli*-Kulturen im 50 ml-Maßstab isoliert. Dazu wurde die DNA mittels des *Plasmid Midiprep Kits* (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß Herstellerangaben präpariert. Die DNA-Ausbeute betrug in der Regel etwa 100 µg in 100 µl TE-Puffer. Zur vollständigen Entfernung von Exonukleasen und anderer inhibitorischer Biomakromoleküle wurde im Anschluss eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-Fällung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6.1). Bis zur Verwendung wurde die DNA bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.4 *In vitro* Modifizierung von DNA

2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*)

Für die konzertierte Mutagenese aller sechzehn Aminosäurepositionen wurde eine zweistufige *PCR*-Strategie verwendet (Beste, 1998) (Abbildung 4). Diese beruht auf dem Einsatz von vier degenerierten Oligodesoxynukleotiden von denen ein jedes jeweils eine der vier zu mutierenden Peptidschleifen überspannt. Je ein *Primer*-Paar diente in der ersten Stufe der *PCR* zur Erzeugung zweier Fragmente A und B mit den mutierten *Loop*-Regionen 1 und 2 sowie 3 und 4. Im zweiten *PCR*-Schritt wurde das Strukturgen der BBP-Varianten voller Länge mittels eines *Primer*-Paares, das die Fragmente A und B flankiert, und eines vermittelnden Oligodesoxynukleotides assembliert.

Standard-*PCR* (nach Schlehuber, 2001):

Zur Herstellung der Fragmente A und B (siehe oben) wurden jeweils 10 ng Plasmid-Matrizen-DNA des BBP-Strukturgens in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie jeweils 50 pmol der beiden zusätzlich gereinigten (siehe Abschnitte 2.2.5.2 und 3.3.2) degenerierten Oligodesoxynukleotide-Paare versetzt. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem 10 µl 10-fach *Taq*-Puffer (Fermentas; 0,75 M Tris/HCl pH 8,8, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 % (*v/v*) Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) und 2 µl (5 U/µl) *Taq*-Polymerase (Fermentas). Die *PCR* wurde in aufeinanderfolgenden Thermozyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung doppelsträngiger DNA für 1 min bei 94 °C; 2. Hybridisierung der *Primer* an die komplementären DNA-Sequenzen für 1 min bei 60 °C; 3. "*Hot Start*"-Synthese der DNA für 1,5 min bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 19-mal wiederholt bevor der Ansatz zur Vervollständigung der Polymerisationsprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert wurde. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde ein Kontrollansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt.

PCR-Ansatz zur Herstellung einer nativen BBP-Zufallsbibliothek (nach Beste, 1998) :

Für die nachfolgende Ligierung der Zufallsbibliothek im 30 pmol-Maßstab wurde die Assemblierungs-*PCR* (siehe oben) in einem 2 ml-Maßstab durchgeführt. Dieser bestand aus 200 µl 10-fach Reaktionspuffer (Promega; 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 9,0, 15 mM $MgCl_2$, 1 % (*v/v*) Triton X), 40 µl dNTP-Mischung (10 mM-Stammlösung), je 100 µl der flankierenden Oligodesoxynukleotide (10 µM), je 1 pmol der gereinigten (siehe Abschnitt 2.2.6.4) *PCR*-Fragmente A und B, 20 pmol des zusätzlich gereinigten (siehe Abschnitt 2.2.5.2 und 3.3.2) vermittelnden *Primers*, 20 µl (5 U/µl) *Taq*-Polymerase (Promega) und wurde mit dem entsprechenden Volumen an bidestilliertem Wasser auf 2,0 ml aufgefüllt. Die Synthese wurde mit den gleichen Parametern wie die Standard-*PCR* (siehe oben) mit Ausnahme der auf 55 °C gesenkten Hybridisierungstemperatur durchgeführt.

Die *PCR*-Produkte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese getrennt, die gewünschten Reaktionsprodukte isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1) und anschließend gereinigt (siehe Abschnitte 2.2.6.1 und 2.2.6.5).

Error Prone-PCR (nach Lazar, 2007) :

Um statistisch verteilt Mutationen in die Gensequenz verschiedener BBP-Varianten einzuführen, wurde eine fehlererzeugende *PCR* nach dem Protokoll von Zaccolo *et al.* (1996) durchgeführt. Dazu wurden die Nukleotidanaloga 2'-Desoxy-P-nukleosid-5'-triphosphat (dPTP) und 8-Oxo-2'-desoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP) (Abbildung 6) zusätzlich zu den natürlichen Desoxynukleotiden eingesetzt. Das dPTP erzeugt, aufgrund seiner ausgeprägten Imino/Amino-Tautomerie (Zaccolo *et al.*, 1996) in Verbindung mit der Stabilität des *anti*-Isomers des bizyklischen Ringsystems (Lin & Brown, 1989), Transitionen durch

Basenpaarung mit A und G. Der empirische Wert der vier erzeugten Transitionen liegt bei jeweils 40 % für A→G und T→C bzw. jeweils 10 % für G→A und C→T. Eines der wenigen bekannten Nukleotidanaloga, das Transversionen verursacht, ist 8-oxo-dGTP (Pavlov *et al.*, 1994; Purmal *et al.*, 1994). Gepaart mit C liegt das Analogon als *anti*-Isomer vor (Oda *et al.*, 1991). Bei Paarung mit Adenin liegt das 8-oxo-dGTP als *syn*-Isomer vor (Kouchakdjian *et al.*, 1991), und bewirkt so A→C und T→G Transversionen bei einem empirischen Verhältnis von 1:1,5.

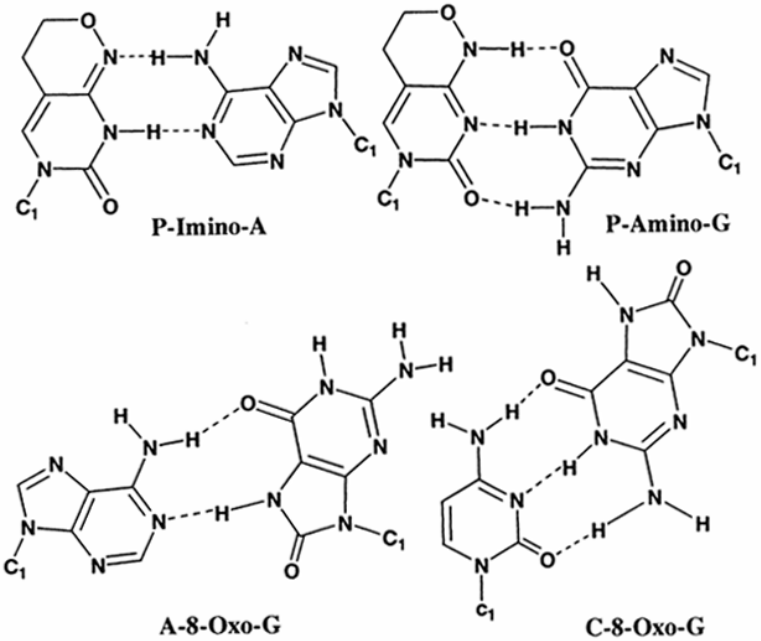

Abbildung 6: Die Strukturformeln der bei der *Error Prone-PCR* verwendeten Nukleotidanaloga dPTP (2'-Deoxy-P-nukleosid-5'-triphosphat) und 8-oxo-dGTP (8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat) sowie ihren Möglichkeiten zur Basenpaarung – aus (Zaccolo *et al.*, 1996).

In einem Ansatzvolumen von insgesamt 20 µl wurden 5 – 10 fmol Plasmid-DNA als Matrize sowie je 10 pmol der beiden Oligodesoxynukleotide GB-1 und GB-2 mit 2 µl 10-fach *Taq*-Puffer (Promega; 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 9,0, 15 mM $MgCl_2$, 1 % (*v/v*) Triton X), 1,6 µl 25 mM $MgCl_2$, 4 µl dNTP-Mischung (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und den Nukleotidanaloga mit einer Endkonzentration von 60 µM eingesetzt. Nach initialer Denaturierung der Matrizen-DNA für 1 min bei 94 °C wurde die Amplifizierung der DNA in 20 Zyklen, bestehend aus 1. Denaturierung doppelsträngiger DNA für 1 min bei 94 °C; 2. Hybridisierung der *Primer* an die komplementären DNA-Sequenzen für 1,5 min bei 60 °C; 3. Synthese der DNA für 1,5 min bei 72 °C durch einmaligen "*Hot-Start*" mit 1,0 µl (5 U/µl) *Taq*-Polymerase (Promega) durchgeführt. Die nachfolgende Vervielfältigung der Syntheseprodukte wurde mit 5 µl des *Error Prone-PCR*-Ansatzes als Matrize in Abwesenheit der Nukleotidanaloga durchgeführt, um noch vorhandene Basenfehlpaarungen zu reparieren und die eingebauten synthetischen Basen zu entfernen. Sonstige Reaktionsbedingungen waren identisch.

Die *PCR*-Produkte wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese getrennt, die gewünschten Reaktionsprodukte isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1) und anschließend gereinigt (siehe Abschnitte 2.2.6.1 und 2.2.6.5).

2.2.4.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

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

Bei analytischen Spaltungen wurden typischerweise etwa 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl für 1 h inkubiert. Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 – 100 µl für 1 h durchgeführt. Präparativ wurden dabei 2 – 10 µg DNA und 10 – 60 U des Restriktionsenzyms eingesetzt. Isolierte und gereinigte *PCR*-Fragmente wurden mit 60 U pro µg-DNA gespalten. Für die Ligierung der mutierten BBP-Strukturgene mit dem Rückgrat des *Phage Display*-Vektors pBBP38 wurden das assemblierte Fragment (siehe Abschnitt 2.2.4.1) und pBBP38 im präparativen Maßstab mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI (10 U/µl) (Promega) geschnitten. Das Volumen des Ansatzes betrug 10 µl pro µg-DNA bei einer enzymatischen Aktivität von 5 U pro µg-DNA. Ferner wurde darauf geachtet eine konstante Temperatur von 50 °C bei exakter Inkubationszeit von 60 min einzuhalten, um eine effiziente Restriktion zu gewährleisten und unspezifisches Restriktionsverhalten zu vermeiden (siehe Abschnitt 3.3.1.2).

Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente zunächst durch präparative Agarose-Gelelektrophorese getrennt und isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1) sowie gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.6.1 und 2.2.6.5).

2.2.4.3 Ligierung von DNA-Fragmenten
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent verknüpft. In einem Standardansatz, z.B. bei Umklonierungen, wurden dazu 50 – 200 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 20 µl in Gegenwart von 1/10 Volumen 10-fach T4-DNA-Ligase Puffer (Fermentas; 40 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP) und 1,5 Weiss *Units* (1 U/µl) T4-DNA-Ligase (Fermentas) eingesetzt. Der Ansatz wurde für 2 – 20 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Für den Kolonie-Filterstapeltest war eine höhere Ligierungseffizienz notwendig, weshalb das Enzymsystem der Firma

Promega verwendet wurde (siehe Abschnitte 2.3.2 und 3.5.3). Nach Inaktivierung der Ligase bei 65 °C (Fermentas) respektive 70 °C (Promega) für 10 min wurden jeweils 5 µl des Ligierungsansatzes für die Transformation eines chemisch-kompetenten *E. coli*-Stamms (siehe Abschnitt 2.2.2) verwendet.

Für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek wurden die beiden DNA-Fragmente, d.h. das Vektor-Fragment und das *PCR*-Fragment, welches den der Zufallsmutagenese unterworfenen Teil der BBP-Genssequenz enthielt, in äquimolarem Verhältnis eingesetzt. Die Ligierung erfolgte bei einer DNA-Konzentration von 10 ng/µl und einer Konzentration der T4-DNA-Ligase (3 U/µl) (Promega) von 0,1 U/µl unter Zusatz von 1/10 Volumen 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer (Promega; 300 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP). Der Ansatz wurde für 72 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert, durch Ethanol-Fällung (siehe Abschnitt 2.2.6.1) entsalzt und zur Transformation des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* mittels Elektroporation (siehe Abschnitt 2.2.2.4) verwendet.

2.2.5 Gelelektrophorese von DNA

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese
(nach Schlapschy, 2004)

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

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 1 % oder 1,5 % (*w/v*) Agarose-Suspension in TBE- oder TAE-Puffer in der Siedehitze homogenisiert, mit 1/10 000 Volumen einer 1 % (*w/v*) Ethidiumbromidlösung versetzt, und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde anschließend in eine mit demselben Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Probentasche mit 10 µl DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10-fach Auftragungspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 60 min bei einer Spannung von 90 V. Durch Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm wurden die DNA-Fragmente mittels der interkalierten Ethidiumbromidmoleküle sichtbar gemacht und konnten unter Verwendung eines Rotfilters photographisch dokumentiert werden. Die DNA-Konzentration wurde unter Verwendung eines DNA-Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt.

Die Herstellung von Agarosegelen zur präparativen Auftrennung und anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von *Low Melting Point* (*LMP*)-Agarose und TAE-Puffer. Hierbei wurden entsprechende Probentaschen mit einer Kapazität von maximal 50 µg DNA verwendet und die Elektrophorese für 90 min bei 70 V betrieben. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht reduzierter Intensität bei 365 nm sichtbar gemacht

und aus dem Gel ausgeschnitten sowie anschließend die DNA gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.6.5). Die DNA-Konzentration wurde anschließend durch eine analytische Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines DNA-Größenstandards bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.2.5.2 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese
(nach Skerra, 1989 und Schlapschy, 2004)

Die Reinigung der für die Herstellung der Phagemidbibliothek notwendigen Oligodesoxynukleotide (siehe Abschnitt 2.1.2 und 3.3.2) wurde mittels vertikaler, denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 1,5 mm starken Gelen durchgeführt. Dazu wurde zunächst aus zwei Glasplatten (20 × 40 cm) mit Abstandhaltern eine mittels Klammern fixierte Kammer zusammengesetzt. Ausgehend von einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff, 25 % (*w/v*) Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19/1 (*Sequagel Concentrate*), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (*Sequagel Diluent*) sowie 10-fach TBE-Puffer wurden 12 % (*w/v*) Acrylamid, 7,5 M Harnstoff und 40 µl TEMED pro 100 ml der vorher genannten Reagenzien in TBE-Puffer gemischt. Durch Zugabe von 1,0 ml 10 % (*w/v*) APS pro 100 ml dieser Lösung wurde die Polymerisation gestartet. Anschließend wurde die oben genannte Gelkammer mit der polymerisierenden Gellösung zügig befüllt und ein Geltaschenformer eingebracht.

Die Reinigung erfolgte ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes gemäß dem von Skerra (1989) ausgearbeiteten Protokoll. Die Hälfte des lyophilisierten Rohproduktes wurde in 20 µl H_2O gelöst, mit 20 µl Formamid-Auftragungspuffer (98 % (*v/v*) Formamid (entionisiert), 10 mM EDTA pH 8,0, 0,2 % (*w/v*) Bromphenolblau) versetzt, für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Zwei Taschen des fertig polymerisierten Polyacrylamid-Harnstoffgels wurden dann mit jeweils 20 µl der Probe in Form einer möglichst dichten Zone beladen und die Elektrophorese gestartet. Diese wurde bei konstanter Leistung von 40 W für etwa 4 h mit TBE als Laufpuffer durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker das Gelende erreicht hatte.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F_{254}) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor fluoreszierendem Hintergrund sichtbar gemacht (UV-*Shadowing*). Die Hauptproduktbande wurde möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung des Gelstücks wurde es in eine 1 ml-Einwegspritze überführt, deren Spitze vorher über einer Flamme zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer dünnen Kanüle durchbohrt worden war (Atrazhev & Elliott, 1996). Unter Zugabe von insgesamt 1,0 ml TE-Puffer wurde das Gelstück durch die Bohrung gepresst und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die Gelmasse wurde mit Hilfe einer *Spin*-X Filtrationseinheit (Porendurchmesser 0,45 µM) abgetrennt (Sorvall RMC 14, 18500 x g, RT, 5 min) und das Filtrat (circa 0,9 ml) dreimal mit je 1,0 ml 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf etwa 400 µl eingeengt wurde. Nach Zugabe von 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8, 4,0 µl 1 M $MgCl_2$ und 1,0 ml Ethanol wurde die DNA für mindestens 1 h bei –20 °C gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 18500 x g, 4 °C, 30 min), das Präzipitat mit 500 µl 70 % (*v/v*) Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum für 2 min getrocknet bevor es in 50 µl sterilem H_2O bidest. gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration wurden 2,0 µl der Lösung mit 398 µl TE-Puffer verdünnt (1/200) und die Absorption bei 260 nm gegen TE-Puffer gemessen. Der Extinktionskoeffizient ergab sich näherungsweise aus der Summe der Absorptionsbeiträge der Basen wie vom Hersteller der Oligodesoxynukleotide angegeben (A = 15,0 $mM^{-1}cm^{-1}$; C = 7,4 mM^{-1} cm^{-1}; G = 11,8 $mM^{-1}cm^{-1}$; T = 8,8 $mM^{-1}cm^{-1}$).

2.2.6 Reinigung *in vitro* modifizierter und/oder gelektrophoretisch getrennter DNA

2.2.6.1 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung
(nach Schlehuber, 2001)

Um die nach einer Plasmid-Präparation noch verbliebenen Exonukleasen wirksam zu entfernen oder DNA, die nachfolgend enzymatisch verändert werden sollte (siehe Abschnitt 2.2.4), von inhibitorischen Biomakromolekülen zu befreien, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit abschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl 3 M NaOAc pH 4,8 versetzt und das Volumen mit sterilem H_2O bidest. auf 400 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und bis zur Phasentrennung zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 16000 x g, RT, 4 min). Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und durch erneutes Zentrifugieren abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit 1,0 ml eiskaltem Ethanol *p.a.* gemischt und für mindestens 1 h bei –20 °C inkubiert. Das nach Zentrifugieren (18500 x g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % (*v/v*) Ethanol *p.a.* gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgezogen und verworfen. Das Präzipitat wurde für ~10 min bei 50 °C im Thermoblock bei offenem Deckel des Reaktionsgefäßes inkubiert. Das auf diese Weise schonend getrocknete Präzipitat wurde im Anschluss in 10–500 µl TE/10 resuspendiert und die DNA entweder langfristig bei –20 °C oder wie im Falle der für die Herstellung der Phagemidbibliothek bestimmten DNA (siehe Abschnitt 2.3.2) kurzzeitig bei 4 °C gelagert.

2.2.6.2 Fällung des Ligierungsansatzes der BBP-Zufallsbibliothek
(nach Beste, 1998)

Zur Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.2) wurde der Ligierungsansatz von Vektorrückgrat und *PCR*-Insert vor der Elektroporation entsalzt. Dazu wurden jeweils 14,25 µg DNA entsprechend 1425 µl des Ligierungsansatzes auf 15 ml-Polycarbonat-Röhrchen verteilt und mit 1 Vol 5 M NH_4OAc, 1/40 Volumen tRNA aus *S. cerevisiae* (Stammlösung 10 mg/ml in TE-Puffer) sowie 4 Volumen Ethanol *p.a.* versetzt. Die Fällung erfolgte bei RT für 1 h. Die Ansätze wurden zentrifugiert (Sorvall SS-34 mit Hartgummiadaptern für die Polycarbonat-Röhrchen, 23400 x g, 4 °C, 30 min) und das Präzipitat mit jeweils 2,0 ml 70 % (*v/v*) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgezogen und verworfen. Das Präzipitat wurde bei 50 °C im Wasserbad bei geöffnetem Deckel getrocknet. Das auf diese Weise schonend getrocknete Präzipitat wurde im Anschluss auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/µl in sterilem H_20 bidest. resuspendiert und kurzzeitig bei 4 °C gelagert.

2.2.6.3 Reinigung von DNA mittels des JETSORB *Gel Extraction Kit*

Die bei Standardklonierungen enzymatisch verdauten und elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente, die Syntheseprodukte des ersten *PCR*-Schrittes der Herstellung nativer BBP-Zufallsbibliotheken und die im Zusammenhang mit der Affinitätsmaturierung durch den Einsatz der Nukleotidanaloga zufällig mutierten BBP-DNA-Sequenzen (siehe Abschnitt 2.2.4.1 und 2.2.4.2), wurden mittels des JETSORB *Gel Extraction Kit* gereinigt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente zur Vermeidung von Strahlenschäden mit UV-Licht geringer Intensität bei 365 nm sichtbar gemacht, und die gewünschten Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Rückgewinnung aus dem Gelstück erfolgte mit dem JETSORB *Gel Extraction Kit* nach Vorschrift des Herstellers. Die DNA wurde letztlich in 10–20 µl TE/10-Puffer aufgenommen.

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

Um die Syntheseprodukte von *PCR*-Reaktionen (siehe Abschnitt 2.2.4.1) nachfolgenden enzymkatalysierten Prozessen, wie Sequenzierungen und der Restriktion durch Endonukleasen, direkt zuführen zu können, mussten inhibitorisch wirkende Biomakromoleküle wirksam entfernt werden. Dies geschah auch im Falle des für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliothek bestimmten, *PCR*-assemblierten BBP-Strukturgens mittels des E.Z.N.A.®*Cycle-Pure Kits* nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der reinen DNA erfolgte mit 30–50 µl TE/10-Puffer.

2.2.6.5 Präparative DNA-Reinigung aus der *LMP*-Agarose
(nach Skerra, 1998 und Mayer, 2013)

Die nach der Elektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.1) ausgeschnittene DNA wurde zunächst in Portionen von je 200 mg pro Gelstück auf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit 200 µl

LMP-Puffer (0,1 M Tris-Acetat pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0) versetzt. Das Gemisch wurde unter gelegentlichem Schütteln für 10 min bei 65 °C bis zum Zustand der Schmelze inkubiert. Auf RT abgekühlt, wurde 400 µl Phenol zugegeben und gründlich geschüttelt. Nach Zentrifugieren (Eppendorf 5415 C, 16000 x g, 4 °C, 5 min) wurde die klare obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktionsprozedur wurde mit 400 µl Phenol/Chloroform und anschließend 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt. Dann wurde die abgenommene wässrige Phase mit 1,0 ml Ethanol p.a. versetzt und mindestens 30 min auf –80 °C abgekühlt. Das nach Zentrifugieren (16000 x g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % (*v/v*) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Fragment wurde in 20 µl TE/10 gelöst.

Die Konzentration der DNA wurde in einer analytischen Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.5.1) durch Abgleich mit einem internen Größenstandard bekannter Konzentration ermittelt.

2.2.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA
(nach Schlehuber, 2001 und Schlapschy, 2004)

Die Analyse der Sequenzintegrität *PCR*-amplifizierter oder mutagenisierter DNA erfolgte mit dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977). Ausgehend von doppelsträngiger zirkulärer Plasmid-DNA wurde bei diesem Verfahren mittels des ABI PRISM® *BigDye*™ *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* und eines für die Sequenzierungs-*PCR* geeigneten Oligodesoxynukleotides (siehe Abschnitt 2.1.2) die DNA-Matrize einzelsträngig neu synthetisiert. Das Substrat der im Kit enthaltenen, modifizierten *Taq*-DNA-Polymerase (Ampli*Taq*®) (Tabor & Richardson, 1995) bestand neben den natürlichen dNTPs aus, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten, Didesoxynukleosidtriphosphaten, den sogenannten Terminatornukleotiden (*BigDye*™ *Terminators*), die statistisch zu einem Abbruch der Polymerisation bei gleichzeitiger 3'-terminaler Fluoreszenzmarkierung des Syntheseprodukts führten (Rosenblum *et al.*, 1997). Die so entstandenen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden anschließend mit dem ABI PRISM® 310 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City; CA, USA) untersucht. Dazu wurden die Syntheseprodukte im Sequenzierautomaten durch Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimizied Polymer* 6, POP-6™, Applied Biosystems) aufgetrennt, und die fluoreszenten Gruppen am Ende der Laufstrecke durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer *CCD* (*Charge-Coupled Device*)-Kamera bei vier verschiedenen Wellenlängen detektiert und als digitales Signal an einen Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mittels einer geeigneten Software (DNA-*Sequencing Analysis* 3.3, Applied Biosystems) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. in Form einer Textdatei ausgegeben.

Die *PCR*-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10,0 µl durchgeführt, wobei 4,0 µl des *BigDye*™ *Ready Reaction Mix* mit je 1,0 – 2,0 µl Plasmid-DNA (~200 ng), 2,0 µl

Sequenzier-*Primer* (1,6 µM) und 2,0 – 3,0 µl H_2O gemischt wurden. Der *BigDye*™ *Ready Reaction Mix* enthielt den Puffer, die DNA-Polymerase, die Desoxynukleotide sowie die fluoreszenzmarkierten mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelten Didesoxynukleotide (Rosenblum *et al.*, 1997) geeigneter Konzentration. Nach Überschichtung mit Mineralöl und erfolgter initialer Denaturierung bei 95 °C für 5 min wurde folgender *PCR*-Zyklus 25-mal durchlaufen: 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 60 °C, 4 min. Nicht umgesetzte Komponenten wurden danach entfernt. Dazu wurden die Syntheseprodukte durch Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA und 30 µl Ethanol *p.a.* für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugieren (Eppendorf 5415 C, 16000 x g, RT, 30 min) wurde das Präzipitat mit 125 µl 70 % (*v/v*) Ethanol *p.a.* vorsichtig gewaschen und bei RT getrocknet. Das Präzipitat wurde in 14 µl *Template Suppressor Reagent* (TSR)-Puffer resuspendiert. Die Sequenzanalyse wurde dann mittels des Programms (ABI PRISM®310 *Data Collection*) gestartet.

2.3 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken und *Phage Display*-Anreicherung

Zellen des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* wurden durch Elektroporation mit der Bibliothek der Phasmidvektoren, die für die Varianten des BBP-Fusionsproteins kodierten, transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen wurden Phagemide erzeugt, die die Varianten des BBP-Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche präsentierten.

2.3.1 Propagation von Helferphagen
(nach Schlehuber, 2001)

50 ml 2YT/Tet-Medium wurden im Verhältnis 1/100 mit einer stationären Übernachtkultur von *E. coli* XL1-*Blue* in 2YT/Tet angeimpft und bei 37 °C und 200 *rpm* bis zu einer Zelldichte von OD_{550} = 0,3 inkubiert. 10 ml dieser Kultur wurden in einen auf 37 °C temperierten, sterilen 50 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt und die Zellen mit 2 x 10^{10} *pfu* VCS-M13 Helferphagen (Stratagene, 10^{11} *pfu*/ml), entsprechend einer *moi* (*Multiplicity of Infection*) von 10, infiziert. Nach 30 min bei 37 °C und 200 *rpm* wurde die Kultur auf eine Kanamycinendkonzentration von 25 µg/ml eingestellt und für weitere 8 h bei 37 °C und 200 *rpm* inkubiert. Um die Bakterienzellen abzutöten, wurde die Kultur anschließend im Wasserbad für 10 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in einen hitzesterilisierten Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SS-34, 12000 x g, 4 °C, 15 min). Der Überstand mit den Phagen wurde nach der Filtration (Porendurchmesser 45 µm) bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Für die Titerbestimmung der hergestellten Helferphagen wurden 50 ml 2YT/Tet-Medium im Verhältnis 1/100 mit einer stationären XL1-*Blue E. coli*-Kultur in 2YT/Tet angeimpft und bei 37 °C und 200 *rpm* bis zu einer OD_{550} = 0,5 inkubiert. Dann wurde 2YT-Weichagar durch Erhitzen verflüssigt und zu je 3 ml in 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen abgefüllt und im Wasserbad auf 48 °C temperiert. Jeweils 100 µl der exponentiell wachsenden XL1-*Blue*-Kultur sowie 100 µl der Helferphagenlösung zweier unabhängiger Verdünnungsreihen in

2YT-Medium in den Verdünnungsstufen 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} und 10^{-10} wurden zu dem Weichagar gegeben, vorsichtig gemischt und zügig auf 37 °C temperierte 2YT/Tet-Agarplatten gegossen. Durch Schwenken der Platte in Form einer 8 wurde die Zellsuspension gleichmäßig verteilt, um einen einheitlichen Zellrasen zu erhalten. Nach Erstarren des Weichagars bei RT, wurden die Platten für 8 h bei 37 °C und vor dem Auszählen noch bis zu weiteren 12 h bei RT inkubiert. Der Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lag zwischen 10^{11} und 10^{12} *pfu*/ml.

2.3.2 Herstellung von Phagemid-Bibliotheken
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von dem Phasmidvektor pBBP38 (siehe Abschnitt 1.5.1) hergestellt. Der Vektor besitzt die für die Replikation und Verpackung einzelsträngiger Phasmid-DNA erforderliche intergenische Region des filamentösen Phagen f1 und kodiert unter Kontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein der jeweiligen BBP-Variante und einer verkürzten Form des Phagenhüllproteins pIII (AS 217 – 406; ΔΔpIII).

Phagemid-Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38:

Der XL1-*Blue*-Elektroporationsansatz (siehe Abschnitt 2.2.2.4) – transformiert mit dem das mutierte BBP-Strukturgen tragenden Plasmid pBBP38 – mit einem Gesamtvolumen von etwa 50 ml (bei 23 Transformationsansätzen) wurde zunächst für 45 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde diese Zellsuspension in 4 L 2YT/Amp-Medium bis zu einer OD_{550} = 0,1 – 0,2 verdünnt.

Zur Ermittlung der Diversität der Zufallsbibliothek wurde ein Aliquot (100 µl) der Zellsuspension vor Verdünnung und nach Verdünnung (siehe oben) abgenommen und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-4} – 10^{-6} zweier unabhängiger Verdünnungsreihen in LB-Medium auf LB/Amp-Agarplatten, die auf 37 °C temperiert waren, ausplattiert. Die Platten wurden für etwa 12 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die erhaltenen Bakterienkolonien ausgezählt.

Währendessen wurde die verdünnte Bibliothek von 2 x 2 L in 5 L Erlenmeyer-Kolben bei 37 °C bis zu einer OD_{550} = 0,5 (Dauer etwa 6 – 8 h) weiter inkubiert. Anschließend wurden die 4 L vereinigt und auf 2 x 1 L in zwei 5 L Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt (die restliche Kultur wurde verworfen). Jeweils 1 L der Kultur wurde entweder zur Herstellung einer Glycerin-Stammlösung einschließlich einer Plasmid-Midipräparation der Bibliothek oder zur Herstellung von Phagemiden der Bibliothek verwendet (siehe unten).

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

1 L der Kultur (siehe oben) wurde bei 37 °C und 180 *rpm* bis zu einer OD_{550} = 2,0 weiter geschüttelt. Dann wurden 20 ml entnommen und in einem 500 ml Schüttelkolben mit 180 ml

LB/Amp-Medium für 12 h bei 37 °C bei 180 *rpm* inkubiert. Nach Abzentrifugieren (SLA-3000, 5000 x g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen bei –20 °C gelagert oder die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.3.2).

Die restliche Kultur von 980 ml (siehe oben) wurde zentrifugiert (SLA-3000, 5000 x g, 4 °C, 15 min) und das Zellsediment in 12 ml 2YT inklusive 20 % (*v/v*) Glycerin resuspendiert. Die im Anschluß auf 12 sterile Kryo-Röhrchen aliquotierte Bibliothek wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Aufarbeiten der Phagemide:

1 L der Kultur (siehe oben) wurde mit insgesamt 3,0 x 10^{12} VCS-M13-Helferphagen (siehe Abschnitt 2.3.1) infiziert (*moi* = 10) und bei 37 °C für 45 min und 180 *rpm* inkubiert. Danach wurden 2,0 ml Kanamycin (Stammlösung 35 mg/ml) zugegeben und für weitere 10 min bei 26 °C und 160 *rpm* inkubiert. Die Proteinbiosynthese der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 12,5 µl aTc (Stammlösung 2 mg/ml in DMF) pro 1 L-Kultur induziert und für 7 – 14 h bei 26 °C und 160 *rpm* durchgeführt. Dann wurde die Kultur in drei sterile 500 ml-Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SLA-3000, 18 000 x g, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde filtriert und auf drei 500 ml-Zentrifugenbecher verteilt. Es wurde 1/4 Volumen 20 % (*w/v*) PEG 8000 mit 15 % (*w/v*) NaCl (sterile, eisgekühlte Lösung) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Fällung der Phagemide erfolgte auf Eiswasser über Nacht mindestens jedoch für 2 h. Nach neuerlichem Zentrifugieren (SLA-3000, 18 000 x g, 4 °C, 30 min) wurde das Präzipitat in insgesamt 30 ml BBS/E-Puffer mit Benzamidin (Endkonzentration 50 mM = 7,83 mg/ml) gelöst und in sterile SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt. Die resuspendierten Phagemide wurden 1 h auf Eiswasser inkubiert und kurz durchmischt, bevor dann zentrifugiert wurde (SS-34-Rotor, 40 000 x g, 4 °C, 10 min). Vom Überstand wurden 100 µl für die Titerbestimmung der Phagemide (siehe Abschnitt 2.3.5) entnommen und der Rest in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Überstand mit den Phagen wurde nach der Keimarmfiltration (Porendurchmesser 45 µm) erneut mit 1/4 Volumen 20 % (*w/v*) PEG 8000 mit 15 % (*w/v*) NaCl (sterile, eisgekühlte Lösung) versetzt und 1 h auf Eiswasser gefällt. 1,8 ml wurden auf Eis belassen und für die anschließende Affinitätsanreicherung (siehe Abschnitt 2.3.3) aufbereitet. Das restliche Volumen wurde als 2,0 ml Aliquots in Kryo-Röhrchen schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

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

Reamplifizierung der BBP-Bibliothek auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP38:

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

Um dabei die ursprüngliche Komplexität der Zufallsbibliothek zu erhalten, wurde für die Reinfektion ein 20-facher Überschuss an Phagemiden verglichen mit der Diversität der Bibliothek eingesetzt. Gleichzeitig war ein 10-facher Überschuss an XL1-*Blue*-Zellen verglichen mit der Phagemidanzahl notwendig, um eine nahezu hundertprozentige Infektionseffizienz zu gewährleisten Das Kulturvolumen in 2YT-Medium wurde so gewählt, dass die benötigte Zellzahl bei einer OD_{550} = 0,5 – entsprechend einer exponentiell wachsenden Kultur – erreicht wurde.

Die XL1-*Blue*-Zellen wurden in 2YT-Medium bei einer OD_{550} = 0,5 mit den Phagemiden reinfiziert und bei 37 °C und 180 *rpm* für weitere 30 min inkubiert. Dann wurde Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 100 mg/L zugegeben und erneut bei 37 °C und 180 *rpm* für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 10-fachem Überschuss des Helferphagen VCS-M13 infiziert und für 30 min bei 37 °C und 180 *rpm* geschüttelt. Daraufhin wurde die Kultur auf eine Kanamycinendkonzentration (Stammlösung 35 mg/ml) von 70 mg/L eingestellt, für 10 min bei 26 °C und 160 *rpm* inkubiert und schließlich die Biosynthese der BBP-Fusionsproteine durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (Stammlösung 2 mg/ml in DMF) mit einer Endkonzentration von 25 µg/L induziert und für 7 – 14 h bei 26 °C und 160 *rpm* weiter inkubiert. Die restlichen Schritte der Aufarbeitung der Phagemide entsprachen denjenigen in diesem Kapitel bereits beschriebenen.

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

2.3.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

2.3.3.1 Festphasen-Anreicherung
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Adsorption von Doxorubicin an funktionalisierte Polystyrolflügelstifte für die initialen *Panning*-Runden mit der nativen Zufallsbibliothek des BBP:

Die Adsorption des Zielmoleküls Doxorubicin erfolgte dabei in Form eines Biotin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1) durch Ausbildung eines Streptavidin/Biotin-Komplexes. Der Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplex wurde zunächst durch lichtgeschützte Inkubation von 800 µl Streptavidin (100 µg/ml) mit 6,0 µl Doxo-Biotin (1,5 mM Stammlösung in DMF,

bezogen auf die Biotingruppe; siehe Abschnitt 2.8.1) unter Rühren für 1 h bei RT ausgebildet. Anschließend wurden die Nunc-Immuno™-Flügelstifte für 2 h lichtgeschützt und unter Rühren bei RT mit dem Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplex beschichtet. Unbelegte Bindungsstellen wurden mit 1,2 ml Blockierungspuffer entsprechend 2% (*w/v*) RNase A (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) in PBS/T für 1 h bei RT abgesättigt und dreimal für 2 min mit jeweils 1,2 ml PBS/T gewaschen. Die beschichteten Polystyrolstifte wurden anschließend mit einer Mischung aus 250 µl Phagemidlösung (zwischen 5,0 x 10^{11} und 5,0 x 10^{12} *cfu*/ml) und 500 µl Blockierungspuffer für 1 h lichtgeschützt und unter Rühren bei RT inkubiert. Dabei bildete sich der Komplex bindungsaktiver Phagemide mit dem präsentierten Liganden Doxorubicin aus. Dann wurde achtmal mit jeweils 950 µl PBS/T für 2 min lichtgeschützt und unter Rühren bei RT gewaschen. Die Elution der mit dem Zielmolekül Doxorubicin komplexierten Phagemide erfolgte in diesem Fall durch Kompetition mit dem löslichen Streptavidin/ Biotin-Doxorubicin-Komplex (siehe Abschnitte 2.3.3.3 und 2.8.4).

<u>Adsorption von Doxorubicin an gegen Digoxigenin gerichtete paramagnetische Partikel – Anreicherungszyklen 1 und 2 der Affinitätsmaturierung bzw. bei der Affinitätsmaturierung mit basischer und denaturierender Elution</u>

Die Adsorption des Zielmoleküls Doxorubicin erfolgte dabei in Form eines Digoxigenin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1). Zunächst wurden 50 µl der MagaCell™-Anti-Dig-Partikelsuspension (Europa Bioproducts Ltd., Cambridge, England) entsprechend 100 pmol zugänglicher Digoxigenin-Bindungsstellen dreimal für 2 min unter Rotation bei RT mit je 400 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Partikel mit 400 µl PBS/T inklusive 2% (*w/v*) RNase A (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) für 1 h unter Rotation bei RT blockiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit jeweils 400 µl PBS/T wurden die Partikel in den ersten beiden Zyklen der Affinitätsmaturierung (siehe Abschnitt 3.7.2) mit einer Endkonzentration von 600 nM Doxorubicin in Form der Doxo-Dig-Konjugate (siehe Abschnitt 2.8.1) in 400 µl PBS inkubiert. Im Falle der Affinitätsmaturierung mit basischer respektive denaturierender Elution (siehe Abschnitt 3.7.2) wurde die Doxorubicinendkonzentration derselben Konjugate von Zyklus 1 mit 150 nM bis Zyklus 4 mit 1,2 nM um jeweils den Faktor 5 gesenkt. Die Immobilisierung des Zielmoleküls erfolgte jeweils für 30 min lichtgeschützt und unter Rühren bei RT. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit jeweils 400 µl PBS/T wurden die Partikel in Gegenwart von 300 µl der Phagemidlösung (zwischen 5,0 x 10^{11} und 5,0 x 10^{12} *cfu*/ml) mit 100 µl PBS/T 0,4 inklusive 8% (*w/v*) RNase A (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; ~70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) für 30 min lichtgeschützt bei RT rotiert. Dabei wurde der Komplex zwischen bindungsaktiven Phagemiden und dem Zielmolekül Doxorubicin ausgebildet. Nicht-gebundene respektive niedrigaffine oder unspezifisch gebundene Phagemide wurden in acht Waschschritten zu je 2 min mit jeweils

1 ml PBS/T abgetrennt. Bevor die Elution der mit dem Doxorubicin komplexierten Phagemide mittels saurer, basischer oder denaturierender Elution erfolgte (siehe Abschnitt 2.3.3.3), wurden die paramagnetischen Partikel im Zuge des achten Waschschrittes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, um etwaige unspezifische, gegenüber der Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes bindungsaktive Phagemide abzutrennen.

2.3.3.2 Anreicherung in Lösung
(nach Schlehuber, 2001)

Adsorption von Doxorubicin an gegen Digoxigenin gerichtete paramagnetische Partikel – Anreicherungszyklen 3 und 4 der Affinitätsmaturierung (vgl. Abschnitt 2.3.3.1):

Die Adsorption des Zielmoleküls Doxorubicin erfolgte dabei in Form eines Digoxigenin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1). 50 µl der MagaCell™-Anti-Dig-Partikelsuspension (Europa Bioproducts Ltd., Cambridge, England) wurden zunächst – wie in Abschnitt 2.3.3.1 beschrieben – äquilibriert, gewaschen, blockiert und nochmals gewaschen. Währenddessen wurden 260 µl der Phagemidsuspension in PBS (zwischen 5,0 x 10^{11} und 5,0 x 10^{12} *cfu*/ml) mit 40 µl entsprechender Verdünnungen der 1,5 – 2,5 mM Stammlösung der Dig-Doxo-Konjugate (Doxorubicinkonzentration in Anreicherungszyklus 3 = 120 nM und in 4 = 12 nM) in PBS für 1 h bei RT (lichtgeschützt unter Rotation) inkubiert. Diese Mischung wurde im Anschluss mit 100 µl PBS/T 0,4 inklusive 8 % (*w/v*) RNase A (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; ~ 70 U/mg nach Kunitz; Proteasen nicht nachweisbar) versetzt und zur Resuspension der gewaschenen, gesammelten Partikel verwendet. Dann wurden die Phagemid/Doxo-Komplexe über den Digoxigeninrest durch 15 min lichtgeschützte Inkubation unter Rotation bei RT an den Partikeln immobilisiert. Nicht-gebundene respektive niedrigaffine oder unspezifisch gebundene Phagemide wurden in acht Waschschritten zu je 2 min mit jeweils 1 ml PBS/T abgetrennt, bevor dann die Elution an den Liganden Doxorubicin komplexierter Phagemide mittels saurer Elution erfolgte (siehe Abschnitt 2.3.3.3), wurden die paramagnetischen Partikel im Zuge des achten Waschschritts in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, um etwaige unspezifische, gegenüber der Plastikoberfläche des Reaktionsgefäßes bindungsaktive Phagemide abzutrennen.

2.3.3.3 Übersicht verwendeter Elutionsmethoden
(nach Kay *et al.*, 1996 und Schlehuber, 2001)

Saure Elution:

Inkubation für 15 min mit 900 µl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 unter Rotation bei RT; anschliessend wurde das Eluat umgehend mit 210 µl 0,5 M Tris neutralisiert, wobei sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Die Reinfektion des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Basische Elution:

Inkubation für 30 min mit 900 µl 0,1 M Triethylamin pH 12,0 unter Rotation bei RT; anschließend wurde das Eluat umgehend mit 250 µl 1 M Tris neutralisiert, wobei sich ein pH-Wert von 8,0 einstellte. Bei Verwendung paramagnetischer Partikel während der Affinitätsmaturierung wurden diese nach der basischen Elution mit 1,0 ml der Reinfektionskultur von XL1-*Blue* in 2YT-Medium bei einer Zelldichte von OD_{550} = 0,5 resuspendiert und für 30 min bei 37 °C und 200 *rpm* geschüttelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit den 3,0 ml XL1-*Blue*-Zellen, die mit der korrespondierenden Elutionsfraktion reinfiziert worden war, vor Ausplattierung auf den großen LB-Amp-Platten (siehe Abschnitt 2.3.4) vereinigt, so dass eine quantitative Rückgewinnung der Phagemide gewährleistet war.

Denaturierende Elution:

Inkubation für 30 min mit 1,0 ml 4 M Harnstoff in PBS unter Rotation bei RT; die Reinfektion von 3,0 ml XL1-*Blue*-Zellen mit der Elutionsfraktion erfolgte in 2YT-Medium bei einer Zelldichte von OD_{550} = 0,5 und wurde bei 37 °C, 200 *rpm* für 30 min vollzogen. Die Harnstoffendkonzentration betrug während dieses Reinfektionsschrittes 1,0 M, wodurch weder die Infektiosität noch die Überlebensfähigkeit der Zellen beeinträchtigt wurde. Bei Verwendung paramagnetischer Partikel während der Affinitätsmaturierung wurden diese nach der denaturierenden Elution mit 1,0 ml der Reinfektionskultur von XL1-*Blue* in 2YT-Medium bei einer Zelldichte von OD_{550} = 0,5 resuspendiert und für 30 min bei 37 °C und 200 *rpm* geschüttelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit den 3,0 ml XL1-*Blue*-Zellen, die mit der korrespondierenden Elutionsfraktion reinfiziert worden war, vor Ausplattierung auf den großen LB-Amp-Platten (siehe Abschnitt 2.3.4) vereinigt, so dass eine quantitative Rückgewinnung der Phagemide gewährleistet war.

Kompetitive Elution:

Die Verdrängung spezifisch mit dem Zielmolekül Doxorubicin komplexierter Phagemide wurde mittels Inkubation mit 900 µl einer 120 µM Lösung bezogen auf das Streptavidintetramer im Komplex mit Doxo-Biotin (siehe Abschnitt 2.8.4) für 30 min bei RT unter Rotation durchgeführt. Diese Elutionsmethode wurde zur Vermeidung des toxischen Effekts des freien niedermolekularen Doxorubicins auf *E. coli* (siehe Abschnitt 3.5.1.2) gewählt. Die Reinfektion des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

Reduktive Elution:

Bei Vorliegen eines Doxorubicin-SS-Biotin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1) wurde die Disulfidbrücke durch 15 min Inkubation mit 1,0 ml PBS/T inklusive 50 mM DTT unter Rotation bei RT gespalten. Die Reinfektion des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* erfolgte wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben.

2.3.4 Amplifizierung selektierter Phagemide
(nach Schlehuber, 2001)

Das Repertoire derjenigen Phagemide, die bei der Elution während der Affinitätsanreicherung erhalten wurden (siehe Abschnitt 2.3.3) – typischerweise 10^5 bis 10^9 *cfu* – wurde vor dem darauf folgenden Anreicherungszyklus amplifiziert, wobei in der Regel Phagemidlösungen mit einem Titer von etwa 5,0 x 10^{11} bis 5,0 x 10^{12} *cfu*/ml in 0,3 – 1,0 ml PBS erhalten wurden.

Aus einer stationären Übernachtkultur von *E. coli* XL1-*Blue* in 5 ml LB-Medium, die bei 30 °C und 180 *rpm* inkubiert worden war, wurden 50 ml 2YT-Medium zu einer resultierenden OD_{550} zwischen 0,03 und 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 180 *rpm* geschüttelt. Bei OD_{550} = 0,5 wurden 3 ml der exponentiell wachsenden Kultur mit der Elutionsfraktion infiziert und bei 37 °C und 180 *rpm* für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Sigma 4K10, 4420 g, 4 °C, 2 min), in 600 µl 2YT/Amp-Medium resuspendiert und in Aliquots zu je 200 µl auf Agarplatten (Ø = 14 cm) mit LB/Amp-Medium ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C für 12 – 14 h. Die Kultivierung auf Platten hatte im Vergleich zu Flüssigkulturen den Vorteil eines geringeren durch Wachstumsvorzüge bedingten Selektionsdrucks (Willats, 2002). Die Zellen der drei großen Elutionsplatten wurden anschließend resuspendiert. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber mit jeweils 10 ml 2YT von der Platte gelöst und in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Die Platten wurden anschließend mit 10 ml 2YT gespült, wobei die 10 ml der Suspension von einer Platte auf die nächste überführt wurden. Die resultierenden 40 ml der Zellsuspension wurden gründlich homogenisiert und für das Animpfen von 50 ml 2YT/Amp-Medium zu einer OD_{550} = 0,08 verwendet. Diese Kultur wurde bei 37 °C, 180 *rpm* bis zu einer OD_{550} = 0,5 inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und die weiteren Schritte der Herstellung, Reinigung und Konservierung der Phagemide erfolgten wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

2.3.5 Titerbestimmung von Phagemidlösungen
(nach Schlehuber, 2001)

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

Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10^{-8}, das heißt mit einem typischen Phagemidgehalt von 10^3 bis 10^4 *cfu*/ml hergestellt. 90 µl der exponentiell wachsenden Zellkultur, die auch zur Amplifizierung eluierter Phagemide benutzt wurde (Abschnitt 2.3.4), wurden mit 10 µl der kurz zuvor auf 37 °C temperierten Phagemidverdünnung gemischt und für 30 min bei 37 °C und 180 *rpm* inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur auf Kontaminationen wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit PBS hergestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und die gesamte Suspension von 100 µl auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtiter durch Auszählen der Klone als *cfu*/ml bestimmt und um den Verdünnungsfaktor korrigiert. Nach Normalisi-

erung der erhaltenen Phagentiter gegen den Ausgangstiter der eingesetzten Phagemide, dessen Wert auf 1 gesetzt wurde, wurde der Verlauf der Selektion mittels des Computerprogramms KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) graphisch dargestellt.

2.4 Kolonie-Filterstapeltest
(nach Schlehuber, 2001)

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

Das Fusionsgen wurde ausgehend von der gereinigten Plasmid-DNA der angereicherten BBP-Varianten (siehe Abschnitt 2.2.3.1) durch Restriktion der *Bst*XI-Genkassette (siehe Abschnitt 2.2.4.2) und anschließender Subklonierung (siehe Abschnitte 2.2.4.3, 2.2.5.1 und 2.2.6.3) auf das analog verdaute Rückgrat der Vektoren pBBP22 oder pBBP61 (siehe Abschnitt 2.1.1 bzw. Abbildung 5) hergestellt. Der Vektor pBBP61 trägt zur Verbesserung der Löslichkeit des Fusionsproteins zwischen dem Strukturgen des BBP und der AB-Domäne den natürlichen *Linker* des Protein G. Der Ligierungsansatz wurde entweder zur Transformation ultra-kompetenter und chemisch-kompetenter (siehe Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.3) oder elektrokompetenter (siehe Abschnitt 2.2.2.4) *E. coli* TG1-F^- Zellen verwendet.

Die Transformanden wurden anschließend auf die Produktion von BBP-Varianten mit Bindungsaktivität für das Zielmolekül Doxorubicin durchmustert. Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP oder GVPP, Porendurchmesser 0,22 µm) aufgelegt. Zur Herstellung von Primärmembranen wurden 100 – 200 µl der Zellsuspension des Transformationsansatzes gleichmäßig ausplattiert. Auf die Sekundärmembran wurden die positiven Kolonien des Primärfilters als Doppelproben aufgetragen. Die Primärplatten wurden für 7,5 h und die Sekundärplatten für 5 – 6 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien auf einen Durchmesser von etwa 0,5 – 1,0 mm angewachsen waren.

In der Zwischenzeit wurde eine hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon™-P, Porendurchmesser 0,45 µm) nach Angaben des Herstellers mit PBS angefeuchtet, das heißt nacheinander für je 5 min in 20 ml Methanol, Wasser und PBS geschwenkt. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in 12,5 ml einer Lösung von 10 mg/ml HSA in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit dem gleichen Volumen 3 % (*w/v*) BSA, 0,5 % (*v/v*) Tween 20 in PBS für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/L Anhydrotetrazyklin (Stammlösung 2 mg/ml in DMF)

zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie auf eine LB/Amp-Agarplatte, die zusätzlich 200 µg/L Anhydrotetrazyklin enthielt, gelegt.

Die vorbereitete, mit den Kolonien bewachsene, hydrophile Membran wurde deckungsgleich auf die hydrophobe Membran aufgelegt. Die Kulturplatten mit den beiden Primärmembranen wurden bei 22 °C für 12 h inkubiert. Demgegenüber lag die Inkubationszeit der sekundären Membranen bei 9 – 10 h. Während dieser Phase wurden die jeweiligen BBP-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und durch die Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert.

Danach wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS/T gewaschen und anschließend lichtgeschützt für 1 h mit 10 ml einer Doxorubicin-Konjugat-Lösung inkubiert. Die Primärfilter wurden mit dem identischen monovalenten Konjugat des Doxorubicins entsprechend der Konjugateverwendung während der *Phage Display*-Anreicherung der BBP-Varianten inkubiert. Das bedeutet, dass für die Primärfilter der Anreicherung aus der nativen BBP-Zufallsbibliothek (siehe Abschnitt 3.5.2) ein Doxo-Biotin-Konjugat (siehe Abschnitt 2.8.1) mit einer Endkonzentration von 1,0 µM verwendet wurde. Zugehörige sekundäre Positivfilter wurden in Gegenwart von 0,1 – 1,0 µM Doxo-Biotin geschüttelt. Als Negativkontrolle diente in diesen Fällen ein identisch hergestellter Filter, der nicht mit dem Konjugat des Zielmoleküls inkubiert jedoch derselben chromogenen Nachweisreaktion (siehe unten) unterzogen wurde. Um die spezifische Komplexierung des Zielmoleküls in der Bindungstasche der Varianten zu überprüfen, wurden identische sekundäre Filter mit 0,1 µM Doxo-Biotin und zusätzlich einem tausendfachen Überschuss entsprechend 0,1 mM ANS als kompetitivem Liganden inkubiert (siehe Abschnitt 3.5.3).

Die Komplexbildung zwischen immobilisierter BBP-Variante und Zielmolekül-Konjugat wurde mittels einer chromogenen Nachweisreaktion (Stuyver *et al.*, 2003) geführt. Dazu wurden die Membran nach zweimaligem Waschen für 5 min in 20 ml PBS/T zunächst 1 h mit 10 ml ExtrAvidin®-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1/10 000 in PBS/T verdünnt) oder Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1/2 000 in PBS/T verdünnt) inkubiert. Anschließend wurde für jeweils 5 min mit 20 ml PBS/T und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und schließlich kurz in AP-Puffer geschwenkt. Die Anfärbung erfolgte durch Inkubation der Membran mit 10 ml AP-Puffer inklusive 30 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, *p*-Toluidin-Salz (BCIP; 50 mg/ml in DMF) und 5 µl Nitro *Blue* Tetrazolium (NBT; 75 mg/ml in 70 % (*v/v*) DMF) bis an den Positionen bindungsaktiver Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität, der von diesen Kolonien produzierten BBP-Varianten für das Zielmolekül nachgewiesen.

Kolonien der Primärfilter, die starke Farbsignale zeigten, wurden ausgewählt und von der Primärmembran doppelt auf eine Elternplatte übertragen. Diese wurde zunächst 12 h bei

37 °C inkubiert und dann bei 4 °C gelagert wurde. Die Elternplatte diente als Ausgangspunkt für die Erstellung der Sekundärfilter.

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

2.5.1 2 L-Maßstab
(nach Schlehuber, 2001)

Zur Produktion rekombinanter BBP-Varianten in *E. coli* wurde das Expressionsplasmid pBBP21 (Abbildung 28) verwendet. 50 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie der *E. coli*-Stämme JM83 oder TG1-F^- (siehe Abschnitt 2.1.1), die zur Herstellung löslicher BBP-Varianten mit internen *Amber*-Stoppkodons geeignet waren, angeimpft und bei 30 °C und 200 *rpm* über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 L LB/Amp-Medium im Verhältnis 1/50 mit der stationären Übernachtkultur angeimpft. Nach Erreichen einer Zelldichte von OD_{550} = 0,5 durch Inkubation der Kultur bei 22 °C und 180 *rpm* wurde die Biosynthese der rekombinanten Proteine durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (Stammlösung 2 mg/ml in DMF) mit einer Endkonzentration von 200 µg/L induziert und in Abhängigkeit des herzustellenden Proteins für weitere 2,5 – 3 h inkubiert.

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

Zur späteren *SDS-PAGE*-Analyse (siehe Abschnitt 2.6.2) der Proteinpräparation wurden Proben des Gesamtzellaufschlusses bereitgestellt. Dazu wurde 1 ml der Kultur vor Beginn der Proteinbiosynthese der rekombinanten Proteine und am Ende der Synthese entnommen, zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 16000 x g, 4 °C, 2 min) und der Überstand abgezogen. Das erhaltene Zellsediment wurden in 80 µl Benzonase-Lösung (12,5 U/ml in Benzonase-Puffer) resuspendiert und mit 20 µl 5-fach Auftragungspuffer (reduzierend) für die *SDS-PAGE* gemischt. Nach Inkubation für 1 h auf Eis und nachfolgender Hitzebehandlung im Thermoblock (5 min, 95 °C) wurde das Gesamtzellprotein bei –20 °C eingefroren oder direkt für die *SDS-PAGE* verwendet.

2.5.2 Laborfermenter
(nach Schlapschy, 2004 und Breustedt, 2008)

Für die physikochemische/biophysikalische Charakterisierung der BBP-Varianten (siehe Abschnitt 2.7) wurden teilweise größere Mengen der rekombinanten Proteine benötigt und nach einem von Schiweck & Skerra (1995) etablierten diskontinuierlichen Fermentationsverfahren in *E. coli* produziert.

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

Für die Expression wurden die *E coli*-K12-Stämme JM83proΔ*skp*, MC4100Δ*skp* und W3110 (siehe Abschnitt 2.1.1) mit dem Expressionsplasmid pBBP21 bzw. dessen BBP-Varianten kodierenden Plasmidderivaten transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2). In einigen Fällen wurden die Zellen zusätzlich mit einem zweiten Plasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) kotransformiert. Dieses Plasmid kodierte für die Faltungshelferproteine DsbA, DsbC, FkpA und SurA und verbesserte durch erhöhte, zelluläre Löslichkeit der rekombinanten Proteine die Überlebensfähigkeit der Wirtszellen während der Proteinbiosynthese der Fremdproteine. Da die Selektion auf das Plasmid pTUM4 durch Chloramphenicol-Resistenz vermittelt war, wurde in diesem Fall das entsprechende Kulturmedium zusätzlich mit 30 mg/L dieses Antibiotikums versetzt.

Als Initialkultur wurden 2 ml LB-Selektivmedium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 10 – 12 h bei 37 °C und 220 *rpm* inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 360 ml Mineralsalzlösung, der 40 ml 20 % (*w/v*) Glukose, 4,0 ml 1 M $MgSO_4$, jeweils 400 µl Antibiotika-Stammlösung (Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml; Chloramphenicol-Stammlösung 30 mg/ml in 70 % EtOH) und 400 µl Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1/1000 mit der Initialkultur angeimpft und für etwa 26 h bei 30 °C und 200 *rpm* inkubiert.

Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD_{550} = 1,5 – 2,0. Die optische Dichte wurde mittels einer entnommenen Probe bestimmt, die entsprechend mit der Mineralsalzlösung verdünnt wurde. Der 10 L Fermenter wurde mit 7 L Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf der Magnetrühreinheit fixiert. Vor dem Animpfen wurde auf 30 °C temperiert und über einen Trichter folgende sterile Lösungen zugegeben: 800 ml 20 % (*w/v*) Glukose, 80 ml 1 M $MgSO_4$, je 8,0 ml entsprechende Antibiotika- und Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung, je 4,0 ml $FeCl_3$- und $Zn(OAc)_2$-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung und 200 µl 30 %-ige Antifoam A-Fertiglösung. Die Belüftung fand zu Beginn mit Druckluft statt, woraufhin dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugewiesen wurde. Während der Fermentation wurde der Sauerstoff-

partialdruck auf einem Wert ≥ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. später reinem Sauerstoff gehalten. Gleichzeitig wurde der pH-Wert durch Titration mit 12,5 % (*w/v*) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 *rpm* (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Gerätes). Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und erneut 600 µl Antifoam A-Fertiglösung zugegeben. Die Bakterienkultur konnte nun bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{550} \approx 5{,}0$ am nächsten Morgen, maximal jedoch für acht Stunden unbeaufsichtigt gelassen werden. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 % (*w/v*) Glukose nach folgendem Protokoll zudosiert:

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

Des Weiteren wurden der Kultur bei OD_{550} = 13 nochmals je 4,0 ml $FeCl_3$- und $Zn(OAc)_2$-Stammlösung sowie 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD_{550} = 20 durch Zugabe von 0,5 mg aTc/L Kultur (Stammlösung 5 mg/ml in DMF) induziert, die Kultivierung für weitere 1,75 – 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugieren (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A-Rotor, 7300 x g, 4 °C, 20 min) in 4 °C kühlen Zentrifugenbechern geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden mittels eines Spatels vorsichtig abgeschabt und in ein eiskaltes 1000 ml-Becherglas überführt und in gekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer (siehe Abschnitt 2.5.1) für 10 min auf einem Magnetrührer (300 *rpm*) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2,0 ml L^{-1} OD^{-1} der Kultur. Um einen quantitativen Periplasma-Aufschluss zu gewährleisten wurde die Zellsuspension anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg/ml Lysozym (Stammlösung 20 mg/ml in Aufschlusspuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (SLA-1500 Rotor, 20000 x g, 4 °C, 20 min) von den Sphäroplasten grob getrennt und in einem nachfolgenden zweiten (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) von Zellresten geklärt. Anschließend wurde der periplasmatische Proteinextrakt gegen SA-Puffer dialysiert (dreimal gegen 10 L). Ausgefallene Komponenten wurden durch Zentrifugieren (SLA-1500-Rotor, 20000 x g, 4 °C, 30 min) und anschließendes Filtrieren (Porendurchmesser 0,45 µm) abgetrennt. Die erhaltene Proteinlösung wurde entweder sofort affinitätschromatographisch (siehe Abschnitt 2.6.1.1) gereinigt oder portioniert bei –20 °C gelagert.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Chromatographische Verfahren

2.6.1.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie
(nach Schlehuber, 2001)

Die in dieser Arbeit beschriebenen, eigenständig produzierten Proteine lagen allesamt als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Skerra & Schmidt, 2000) vor und wurden daher mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* (siehe Abschnitt 2.5) gereinigt. Dazu wurde die extrahierte Periplasmafraktion einer 2 L-Schüttelkultur über Nacht bei 4 °C gegen das hundertfache Volumen SA-Puffer dialysiert; demgegenüber wurde bei den Fermentationen dreimal gegen das zehnfache Volumen an SA-Puffer umgepuffert. Danach wurden die Proteinlösungen zur Entfernung von Proteinaggregaten filtriert (Porendurchmesser 0,45 µM). Es wurden abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein Streptavidin-Sepharose-Säulen mit kovalent immobilisierter Streptavidin-Mutante Nr. 1, dem so genanten Strep-Tactin (Voss & Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/ml mit Bettvolumina von 2 ml, 4 ml, 8 ml oder 16 ml bei Flussraten von 10 SV/h betrieben. Zunächst wurden die Säulen mit SA-Puffer bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie, die anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt wurde, äquilibriert. Nach dem Auftragen der Periplasmafraktion auf die Säule wurde diese mit SA-Puffer gespült, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurde anschließend mit einer 2,5 mM Lösung von *D*-Desthiobiotin in SA-Puffer kompetitiv eluiert. Zur Regenerierung wurde das *D*-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung aufwies. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Waschen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule und Einstellung der Basislinie entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch *SDS-PAGE* ermittelt, vereinigt und bei 4 °C gelagert.

2.6.1.2 Größenausschluss-Chromatographie
(nach Schlehuber, 2001)

Die Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) ermöglicht die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen molaren Masse und Form. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren im analytischen Maßstab zur Untersuchung der Integrität und des monomeren Charakters des rekombinant hergestellten Wt-BBP und seiner Varianten verwendet (siehe Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3). Ferner wurde das Verfahren präparativ als "*Polishing*"-Schritt zur Abtrennung von Aggregatanteilen und zur Feinreinigung des Wt-Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplexes (siehe Abschnitt 3.4.2), des AGP und des Wt-BBP sowie der im Zuge dieser Arbeit selektierten BBP-Varianten genutzt.

Alle verwendeten Chromatographie-Puffer wurden vor Verwendung sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45 µM) und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast. Für die analytischen Läufe wurde eine Superdex™75 HR 10/30-Säule mit einem Bettvolumen von 24 ml und einen Auflösungsbereich von 3 – 75 kDa verwendet. Die Säule wurde an einem Äkta™Purifier-HPLC-System mit einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min bei einem maximalen Druck von 1,8 MPa betrieben. Zunächst wurde die Säule mit 2 SV des Chromatographiepuffers (in der Regel PBS/E) äquilibriert, bevor die Probe durch Injektion mittels einer Probenschleife von 200 µl oder 500 µl auf die Säule aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte mit 1 SV des Chromatographiepuffers, wobei die gewünschten, das Protein enthaltenden Eluatfraktionen mittels eines Fraktionskollektors zu je 0,1 – 1,0 ml gesammelt wurden.

Die präparative Reinigung des Wt-BBP und seiner Varianten wurde – sofern nicht wie bei kleineren Ansätzen im analytischen Maßstab wie oben beschrieben vorgegangen wurde – an einer Superdex™75 HiLoad 16/60 *Prep Grade*-Säule durchgeführt. Diese besitzt ein Bettvolumen von 120 ml bei einem Auflösungsbereich von 3 – 75 kDa. Vor der Trennung der Proteine wurde die Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min bei einem maximalen Druck von 0,3 MPa mit 2 SV des Chromatographiepuffers (in der Regel PBS/E) an einer Äkta™Explorer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels einer 2 ml Probenschleife auf die Säule appliziert und mit 1 Säulenvolumen des Chromatographiepuffers eluiert, wobei mit einem Kollektor Fraktionen von jeweils 1,0 – 2,0 ml aufgefangen wurden.

Die Reinigung des Wt-Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplexes zum Zweck der kompetitiven Elution während des *Phage Display* (siehe Abschnitt 3.4.2) wurde mit einer präparativen *HiPrep*™16/60 Sephacryl S-300 HR-Säule an einem Äkta™Explorer-HPLC-System durchgeführt. Die Säule besitzt ein Bettvolumen von 120 ml bei einem Trennungsbereich von 10 – 150 kDa. Vor der Trennung der Proteine wurde die Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min bei einem maximalen Druck von 0,3 MPa mit 2 SV PBS pH 7,4 äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mittels einer 5 ml Probenschleife auf die Säule aufgetragen und der Komplex anschließend mit 1,5 SV des Chromatographiepuffers eluiert, wobei mit einem Kollektor Fraktionen von jeweils 2,0 ml aufgefangen wurden. Die Säule wurde in diesem Fall mit Alufolie umwickelt, um eine mögliche lichtinduzierte Degradation des Doxorubicins durch die lange Expositionszeit zu verhindern!

Alle Säulen wurden mit Proteinen bekannter Molekularmasse kalibriert, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Der Verlauf der Chromatographie und die Retentionszeiten bzw. Retentionsvolumina wurden anhand der Absorption des Eluats bei 280 nm beobachtet. Anschließend wurde die Reinheit bzw. der Proteingehalt ausgewählter, gesammelter Fraktionen mittels *SDS-PAGE* (siehe Abschnitt 2.6.2) bzw. Absorptionsmessung (siehe Abschnitt 2.6.3) analysiert.

Die Säulen wurden durch Spülen mit 1 SV 0,5 M NaOH regeneriert und anschließend mit mindestens 2 SV bidestilliertem Wasser bis zum Erreichen eines neutralen pH-Werts gespült.

Daraufhin wurde die Säule entweder für einen neuerlichen Lauf äquilibriert oder in 1 SV 20% Ethanol überführt und bei RT gelagert.

2.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) (nach Schlehuber, 2001)

Die Untersuchung der Homogenität und Integrität gereinigter Proteinlösungen (siehe Abschnitt 2.6.1) wurde unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese *SDS-PAGE* (Laemmli, 1970) mit dem Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) durchgeführt. Durch Anlagerung der aliphatischen *SDS*-Moleküle an das Peptidrückgrat des Proteins erhält das Biomakromolekül eine negative Nettoladung. Bedingt durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels verhält sich die elektrophoretische Mobilität des Proteins annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus seiner Molmasse. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die getrennten Proteine durch Anfärben mit Coomassie-Brillantblau R250 sichtbar gemacht.

Die Gele wurden in ein sorgfältig gesäubertes, über einen Abstandshalter getrenntes Paar Glasplatten (10 x 8 cm) gegossen. Dazu wurden die Platten übereinander gelegt, mit einer Silikondichtung versehen und mit Metallklammern befestigt. Die so entstandene Gelkammer wurde anschließend mit 4,5 ml des Trenngelgemisches mit einem Polyacrylamidgehalt von 15 % zügig befüllt. Diese Gelmischung bestand aus 5,0 ml 30 % (*w/v*) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 2,5 ml 4-fach *Lower* Tris, 2,5 ml Wasser und 2,5 µl TEMED. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl einer 10 % (*w/v*) Lösung des Radikalstarters APS initiiert. Anschließend wurde das Gel mit 1,0 – 2,0 ml Isopropanol überschichtet. Diese Schutzschicht wurde nach etwa 45 min vom entstandenen Polymer abgegossen. Das Sammelgel setzte sich aus 1,0 ml 30 % (*w/v*) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung, 1,5 ml 4-fach *Upper* Tris, 3,5 ml Wasser und 3,0 µl TEMED zusammen. Durch Zugabe von 36 µl 10 % (*w/v*) APS-Lösung wurde die Polymerisation gestartet und die Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert. Dann wurde der Taschenformer luftblasenfrei eingesetzt. Nach Erstarren wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoreseapparatur, deren Pufferreservoirs mit Laufpuffer gefüllt wurden, eingespannt. Die Proteinproben wurden in einem Volumen von 20 µl angesetzt, mit 5 µl 5-fach Auftragungspuffer (reduzierend oder nicht-reduzierend) versetzt und für 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Die Proben wurden nach Herausziehen des Taschenformers und Spülen der Taschen mit Puffer zu jeweils 20 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA für eine Dauer von 160 min oder bis zum Austreten des Bromphenolblau-Markers aus dem Trenngel vollzogen. Das Gel wurde anschließend aus den Glasplatten gelöst und nach Abtrennung des Sammelgels angefärbt. Dafür wurde das Gel komplett mit Coomassie-Brillantblau R250-Färbelösung bedeckt und für 20 min geschwenkt. Dann wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum Verblassen des Hintergrunds inkubiert. Die Entfärbelösung wurde dabei einige Male erneuert. Die Lagerung des Gels erfolgte in Aufbewahrungs-

lösung bei 4 °C. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Proteingele auf Whatman-Papier 3MM im Geltrockner bei 80 °C für 1 h unter Vakuum getrocknet. Um sie zu dokumentieren, wurden die Gele entweder fotografiert oder gescannt.

2.6.3 Western-Blotting
(nach Schlehuber, 2001)

Für den immunochemischen Nachweis eines bestimmten Proteins in einem Proteingemisch wurde die Methode des *Western-Blotting* angewandt. Das mittels *SDS-PAGE* (siehe Abschnitt 2.6.2) getrennte Proteingemisch wurde durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran übertragen und das gesuchte Protein in einem nachfolgenden immunochemischen Nachweisverfahren selektiv angefärbt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das erhaltene Trenngel für 20 min in Transferpuffer (20 % (*v/v*) Methanol in 1-fach *SDS*-Laufpuffer) eingelegt. Der Elektrotransfer erfolgte auf eine Nitrozellulose- oder Immobilon™-P-Membran. Für den Elektrotransfer wurden 8 Blatt Whatman-Filterpapier 3MM und die zu verwendende Membran entsprechend der Größe des Trenngels passend zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die Immobilon™-P-Membran wurde dafür nach Herstellerangaben (Millipore, Eschborn) vorbereitet. Anschließend wurden 4 dieser Filterpapiere luftblasenfrei übereinander auf die Edelstahl-Kathode der Elektroblotapparatur gelegt. Darauf wurde das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 4 Blatt Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (~ 1 mA/cm^2) vollzogen. Die Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 15 min in 20 ml PBS/T geschwenkt.

Der immunochemische Nachweis des Wt-BBP bzw. seiner angereicherten Varianten erfolgte über das C-terminale *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel der rekombinant hergestellten Proteine mit einem Alkalische Phosphatase-Konjugat der Streptavidinmutante Strep-Tactin (Voss & Skerra, 1997). Dazu wurde die Membran 1 h mit 10 ml Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1/1000 in PBS/T verdünnt) inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für jeweils 5 min mit 20 ml PBS/T und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Stuyver *et al.*, 2003) wurde die Membran in 20 ml AP-Puffer, mit 60 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, *p*-Toluidin-Salz (BCIP, 50 mg/ml in DMF) und 10 µl Nitro *Blue* Tetrazolium (NBT, 75 mg/ml in 70 % (*v/v*) DMF) inkubiert (siehe Abschnitt 2.4), bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.6.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen
(nach Schlehuber, 2001 und Schlapschy, 2004)

Die Konzentration c von Proteinlösungen wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}) in einer Quarzküvette der Schichtdicke d (1 cm) und unter Korrektur der Eigenabsorption des verwendeten Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet:

$$A_{280} = \varepsilon \times c \times d \qquad (1)$$

Der Extinktionskoeffizient ε des jeweiligen Proteins wurde – sofern nicht direkt aus Literaturquellen entnommen – nach der Methode von Edelhoch (1967) mittels des auf dem *ExPASy-Server* (siehe Abschnitt 2.9) frei zugänglichen Computerprogramms *ProtParam* (Wilkins *et al.*, 1999) ermittelt (Tabelle 2). Dabei werden die Absorptionsbeiträge der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette (Gill & von Hippel, 1989) addiert. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, ob es sich um freie oder verbrückte Cysteinreste handelte. Ferner wurden für die Trp- und Tyr-Aminosäuren die von Pace (1995) ermittelten Extinktionskoeffizienten zugrunde gelegt.

Tabelle 2: Molare Extinktionskoeffizienten (280 nm) der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine

Protein	ε_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]
Wt-BBP-*Strep*-tag II	54150
F1K18-*Strep*-tag II	53860
F1K27-*Strep*-tag II	55350
FluA-*Strep*-tag II	59755
DigA16-*Strep*-tag II	53580
AGP-*Strep*-tag II	36960
NGAL-*Strep*-tag II	29930
RBP-*Strep*-tag II	38870
Tlc-*Strep*-tag II	17960
Core Streptavidin (pro UE)	35600

2.6.5 Konzentrierung von Proteinen
(nach Schlapschy, 2004)

Die verschiedenen physikochemischen/biophysikalischen Experimente (siehe Abschnitt 2.7) benötigten zum Teil konzentrierte Proteinlösungen. Dazu wurde die gereinigte Proteinlösung (siehe Abschnitt 2.6.1) zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert. Anschliessend wurde das Volumen der Proteinlösung unter Verwendung einer Amicon®-Konzentriereinheit mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa durch Zentrifugieren (Sigma 4K10, 4 °C, 3000 g) entsprechend eingeengt. Etwaige Proteinaggregate wurde durch Zentrifugieren (Eppendorf 5415 C, 16000 x g, 4 °C, 1 min) der Proteinlösung durch eine *Spin*-X Filtrationseinheit (Porendurchmesser 0,45 µM) entfernt. Die Konzentration einer genügend verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt,

und die Proteinlösung bei 4 °C gelagert. Das Permeat wurde in der Regel mittels Absorptionsmessung und Anwendung von Gleichung (1) auf Proteindurchbruch kontrolliert.

2.7 Physikochemische / biophysikalische Methoden

2.7.1 Gleichgewichtsdialyse

Diese Methode beruht auf der Einstellung des Konzentrationsgleichgewichts des untersuchten Analyten – in diesem Fall des Haptenliganden Doxorubicin – zwischen zwei voneinander durch eine semipermeable Membran getrennten Kompartimenten. In der sogenannten Proteinkammer befand sich das den Liganden komplexierende Biomakromolekül, dessen Größe oberhalb der gewählten molekularen Ausschlussgröße der Dialysemembran war und somit nicht auf die Pufferkammerseite diffundieren konnte. Um während der Einstellung des Gleichgewichts eine Änderung des Volumens bedingt durch Osmose zu verhindern (Lima *et al.*, 1983), wurden beide Kammern mit der analogen Konzentration der Ligandenlösung befüllt. Nach Komplexierung des Liganden durch das Protein und Einstellung des Gleichgewichts war die Konzentration des ungebundenen Haptens auf beiden Kammerseiten identisch. Die Konzentration des spektroskopisch aktiven Liganden wurde anschließend auf der Seite der Proteinkammer (gebundener und ungebundener Ligand) und der zugehörigen Pufferkammer (unkomplexiertes Hapten) durch Absorptionsmessung bestimmt. Aus der Differenz der gemessenen Konzentrationen der beiden Kammerseiten einer Mikrodialyseeinheit wurde die Konzentration des komplexierten Liganden errechnet. Mittels der erhaltenen Wertepaare unterschiedlicher Ligandenausgangskonzentration wurde die Bindungskonstante des Proteins für Doxorubicin durch nicht-lineare Regression ermittelt. Die lineare Auftragung nach Scatchard (1949a) legte überdies die Anzahl der Bindungsstellen des Proteins für den Liganden offen. Die Gleichgewichtsdialyse wurde angewandt, um die Affinität des in *E. coli* exprimierten und über SA-Chromatographie gereinigten AGP (siehe Abschnitt 2.5.1 und 2.6.1.1) für Doxorubicin zu bestimmen (siehe Abschnitt 3.2.2).

Die *DispoEquilibrium Dialyzer*™-Einheiten (Harvard Apparatus GmbH; March-Hugstetten) mit einem Füllvolumen von 25 – 75 µl pro Kammer und einer molekularen Ausschlussgröße der Zellulosemembran von 10 kDa wurden auf Seite der Proteinkammer zunächst mit jeweils 100 µM an löslichem, monomeren AGP in PBS/E pH 7,4 (sterilfiltriert; Porendurchmesser 0,45 µm) und variierenden Doxorubicinkonzentrationen (Stammlösung 2 mg/ml in H_2O) im Bereich von 5 – 200 µM in einem Gesamtvolumen von 75 µl versehen. Die korrespondierenden Pufferkammern wurden jeweils mit der analogen Konzentration der Ligandenlösung in demselben Gesamtvolumen befüllt. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte lichtgeschützt bei 25 °C im Wasserbad für 24 h. Danach wurden die Proben durch Zentrifugieren (Eppendorf 5415 C, 20 x g, RT, 5 s) in ein 500 µl Reaktionsgefäß überführt und jeweils die Konzentration des Doxorubicins auf der Proteinseite und der korrespondieren Pufferkammerseite durch Absorptionsmessung bestimmt. Dazu wurden jeweils 50 µl Probenlösung mit

100 µl PBS/E versetzt und mittels eines Ultrospec 2000-UV/Vis-Spektralphotometers die Absorption im Bereich von 200 – 600 nm bei einer Geschwindigkeit von 250 nm/min unter Abzug des PBS/E Leerwerts abgegriffen. Die jeweilige Konzentration des spektroskopisch aktiven Liganden Doxorubicin wurde über den Absorptionswert bei 472 nm unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten, der vereinfacht als ε_{intern} des indefiniten Polymerisationsmodells (siehe Abschnitt 3.1.2.1) mit 7920 $M^{-1}cm^{-1}$ angesehen wurde, und der Verdünnung bestimmt.

Die Dissoziationskonstante (K_D) wurde durch graphische Auftragung der erhaltenen Wertepaare der Konzentration $[L]_{gebunden} = [P \bullet L]$ des im Komplex mit dem Biomakromolekül befindlichen Liganden gegen die jeweilige Konzentration [L] des unkomplexierten Liganden gemäß des Massenwirkungsgesetzes wie folgt ermittelt:

$$K_D = \frac{[P] \times [L]}{[P \bullet L]} \tag{2}$$

bzw. nach Umformung:

$$[P \bullet L] = \frac{[P]_T \times [L]}{K_D + [L]} \tag{3}$$

Hierbei bezeichnet [P] die Konzentration des unbeladenen Proteins, $[P]_T$ die Proteingesamtkonzentration und $[P \bullet L]$ die Konzentration des Protein/Liganden-Komplexes. Setzt man – anhand der Bilanzgleichungen für die bimolekulare Komplexbildung – die Konzentrationen $[P] = [P]_T - [P \bullet L]$ in Gleichung (2) ein, so ergibt sich Gleichung (3). Die nicht-lineare Regressionsanalyse wurde mit dem Programm KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) durch Varianz von $[P]_T$ unter Minimierung der Fehlerquadrate durchgeführt.

Bei Auswertung der Wertepaare durch lineare Regression nach Scatchard (1949a) wurde r/c gegen r (r entspricht dem Bruchteil des komplexierten Proteins; c ist die Konzentration des freien Haptens) aufgetragen, woraus sich nach

$$r/c = K_A \times r_{max} - K_A \times r \tag{4}$$

die Bindungskonstante (K_A) als negative Steigung und die Anzahl der Ligandenbindungsstellen des Proteins als Wert des Abzissenschnittpunkts ergibt.

2.7.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist ein effizientes Messverfahren die entstehende Wärmeänderung (ΔQ) molekularer Wechselwirkungen direkt in Lösung zu bestimmen. Solche Interaktionen erzeugen oder absorbieren Wärme aus deren Änderung in der Regel ein komplettes thermodynamisches Profil der vorliegenden Reaktion, bestehend aus Assoziationskonstante (K_A), Bindungsstöchiometrie (n), Enthalpieänderung (ΔH), freier Enthalpie- (ΔG) und Entropieänderung (ΔS) abgeleitet werden kann. Das hier verwendete Kalorimeter

VP™-ITC (MicroCal™ Inc., Northampton, MA, USA) besitzt zwei identische Messzellen, die aufgrund ihrer Nickel-Molybdän-Chrom-Legierung (Hastelloy®Alloy C-276) eine hohe thermische Leitfähigkeit aufweisen. Die Messzellen sind von einer temperierbaren, adiabatischen Kammer umschlossen. Ausgangspunkt der kalorimetrischen Messung ist eine vom Gerät erzeugte Temperaturdifferenz (ΔT) zwischen der Referenzzelle, die mit Wasser oder dem verwendeten Probenpuffer befüllt ist, und der Probenzelle. ΔT wird mit einer maximalen Abweichung von 10^{-4} K laufend aufgezeichnet. Zur Aufrechterhaltung dieser Temperaturdifferenz wird der Referenzzelle permanent ein konstanter Strom zugeführt. Zur Mikrokalorimetereinheit gehört weiterhin die automatische, in die Probenzelle einführbare Titrationsspritze zur Injektion und Durchmischung des Liganden. Das regelbare Gesamtinjektionsvolumen beträgt 250 µl. Nach Einspritzung eines Liganden oder Rezeptors bzw. Bindeproteins in die Messzelle erfolgt dort die intermolekulare Wechselwirkung mit dem Bindungspartner, die sich in der angesprochenen Wärmeänderung manifestiert. Um die thermische Differenz zwischen den beiden Zellen wieder herzustellen und das System somit isotherm zu halten, wird der Probenzelle ein zu ΔT proportionaler Regelstrom (*differential power*, ΔP) zugeführt (endotherme Reaktion) oder dieser Regelstrom ausgesetzt (exotherme Reaktion). Befindet sich das Gerät im thermischen Gleichgewicht so ist ΔP konstant, gleichbedeutend mit der Basislinie einer Messung. Die Regelleistung wird zeitabhängig gemessen und als ΔP in µcal/s angegeben. Integriert man das erhaltene Signal einer Einspritzung in die Probenzelle erhält man den Gesamtbetrag der durch die Injektion verursachten Wärmeänderung in kcal/mol des eingespritzten Liganden unter gleichzeitiger Kenntnis der Temperatur sowie der vorliegenden Konzentrationen bzw. Stöchiometrie der beteiligten Komplexierungspartner (MicroCal, 2003; Tellgmann, 1998).

Im Falle des Doxorubicins wurde mittels ITC die Verdünnungswärme bei Titration einer hochkonzentrierten, polymerisierten Lösung des Haptens in die Puffer enthaltende Probenzelle aufgezeichnet und dadurch die Dissoziationskonstante (K_D) der Selbstassoziation des Haptenliganden Doxorubicin ermittelt (siehe Abschnitt 3.1.2.3). Dazu wurde die Probenzelle vor dem Experiment nach Herstellerangaben (MicroCal, 2003) gespült und die Messzelle mit 1,41 ml 50 mM Hepes/NaOH pH 7,4 luftblasenfrei befüllt. Auch die korrespondierende Referenzzelle wurde vor der Messung analog mit 1,41 ml H_2O (Millipore) frisch befüllt. Sämtliche Puffer und die Referenz- bzw. Probenlösungen waren entgast und mit Ausnahme der Doxorubicinlösung sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,45 µm). Im Fall des Doxorubicins waren in eigenen Versuchen hohe Ausbeuteverluste durch Wechselwirkung des hydrophoben Analyten mit der Filtermembran beobachtet worden. Die automatisierte Titrationsspritze wurde ebenfalls nach Herstellerangaben mit 300 µl 3,75 mM Doxorubicin in H_2O (Millipore) aufgezogen und in die Probenzelle eingeführt. Die Zellen wurden anschließend auf 25°C äquilibriert und die Parameter der kalorimetrischen Titration über die elektronische, an einen Computer angeschlossene Steuereinheit des Geräts festgelegt. Das System befand sich im

Ausgangsgleichgewicht sobald das ΔP-Signal einen stabilen, positiven Wert erreicht hatte, der maximal ± 1 µcal/s vom eingestellten Regelstrom der Referenzzelle abwich. Gleichzeitig musste die Temperaturdifferenz zwischen adiabatischer Kammer und den Zellen stabil 0,0 ± 0,05 °C betragen. Über die ITC-Äquilibrierungsoption "Auto" wurde die Einstellung des thermischen Gleichgewichts zwischen den Zellen (Basislinie) – unter Durchmischung der Messzelle bei 310 *rpm* – automatisch vorgenommen. Die Antwortzeit des ΔP auf die Einspritzung des Liganden wurde abhängig von der zu erwartenden Signalstärke durch die Auswahl eines der *Modi* "hoch", "niedrig" oder "passiv" festgelegt (MicroCal, 2003). Standardmäßig wurde die vom Hersteller empfohlene Einstellung "hoch" verwendet, wohingegen eine Verwendung der beiden anderen *Modi* lediglich im Falle langsam ablaufender thermischer Prozesse angezeigt ist. Anschließend wurde die Titration des Liganden in die Probenzelle gestartet, wobei die erste Injektion 60 s nach Beginn der Aufzeichnung erfolgte. In der Regel wurde der erste Titrationsschritt mit dem Minimalvolumen von 0,5 µl durchgeführt, gefolgt von 25 Titrationsschritten von je 7 µl. Die Dauer der Einspritzung in Sekunden betrug standardmäßig das Doppelte des Wertes des zugegebenen Volumens des Liganden in Mikroliter. Im vorliegenden Fall 14 s. Die Zeit zwischen zwei aufeinander folgenden Injektionen wurde mit 300 s angesetzt, um die Einstellung des thermischen Gleichgewichts zu gewährleisten.

Die erhaltenen Verdünnungswärmen der Titration des Doxorubicins in Puffer wurden zunächst um die Werte einer analog durchgeführten Referenzmessung durch Titration mit Wasser bereinigt. Anschließend wurden die Dissoziationskonstante K_D und $\Delta H_{Dissoz} = -(\Delta H_{Dim})$ mittels des im Datenanalyseprogramm Origin™ enthaltenen Moduls VP™-ITC Version 7.0 (siehe Abschnitt 2.9) graphisch durch nicht-lineare Regression bestimmt (MicroCal, 2004). Hierfür wurde das integrierte Dimer-Dissoziationsmodell des Programms mit den Gleichungen (7)–(10) zugrunde gelegt. Abgesehen von einem Faktor 2 ist es mit dem der indefiniten isodesmischen Polymerisierung identisch (siehe Gleichung (40) und Abschnitt 3.1.2.3). Das Modell basiert auf der reversiblen Dimerisierung eines Liganden der Monomerkonzentration [L] und der Dimerkonzentration $[L_2]$; K_D bezeichnet dabei die Dissoziationskonstante und ΔH_{Dissoz} die Enthalpieänderung der Dissoziation:

$$L + L \underset{\Delta H_{Dissoz}}{\overset{\Delta H_{Dim}}{\rightleftharpoons}} L_2 \tag{5}$$

$$K_D = \frac{[L]^2}{[L_2]} \tag{6}$$

Die äquivalente Monomerkonzentration [L] im Gleichgewicht ist demnach gegeben durch (McPhail & Cooper, 1997; Remeta *et al.*, 1991):

$$[L] = \frac{\sqrt{1 + 8 \times [C]_T / K_D} - 1}{4 / K_D} \tag{7}$$

mit $[C]_T$ = totale Konzentration des Liganden zum jeweiligen Zeitpunkt der Titration:

$$[C]_T = [L] + 2 \times [L_2] \tag{8}$$

Während eines ITC-Verdünnungsexperimentes wird die Wärmeänderung (ΔQ) bei Injektion eines kleinen Volumens (ΔV) der konzentrierten Ligandenlösung mit der Konzentration $[C]_0$ in die Zelle des Kalorimeters (Volumen V_0) gemessen. Für die i-te Einspritzung der Titrationsreihe ist die beobachtete Wärmeänderung gegeben durch:

$$\Delta Q = \Delta H_{Dim} \times \{V_0 \times ([L_2]_i - [L_2]_{i-1}) - \Delta V \times ([L_2]_0 - [L_2]_{i-1})\} \tag{9}$$

mit $[L_2]_0$,$[L_2]_i$ und $[L_2]_{i-1}$ als Dimerkonzentration in der ursprünglichen Lösung (Titrationsspritze) und in der Zelle des Kalorimeters nach der i-ten bzw. (i-1)-ten Injektion. Die korrespondierenden totalen Konzentrationen des Liganden (ausgedrückt als Monomer) sind entsprechend $[C]_0$, $[C]_i$ und $[C]_{i-1}$. Der letzte Term der Gleichung (9) stellt einen Korrekturfaktor dar, der die Volumenänderung während der Titration bzw. die daraus resultierende Konzentrationsänderung berücksichtigt.

Aus Gründen der einheitlichen graphischen Darstellung in dieser Arbeit, wurden die Messwerte in das Datenanalyseprogramm KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) überführt, wobei die freie Wärmeänderung in den SI-Einheiten kJ/mol angegeben wurde.

Die Änderung der freien Enthalpie ΔG und der Entropie ΔS des Selbstassoziationsprozesses wurde unter Berücksichtigung der Gaskonstante (R) und der Temperatur (T) aus folgender Beziehung – Gibbs-Helmholtz-Gleichung – abgeleitet (Cooper *et al.*, 2001):

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \tag{10}$$

2.7.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die Methode der UV/Vis-Spektroskopie wurde angewandt, um das konzentrationsabhängige Selbstassoziationsverhalten des chromophoren Liganden Doxorubicin in Lösung zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Der Nachweis der Absorption erfolgte bei der durch dreidimensionale Fluoreszenzabtastung bestimmten maximalen Anregungswellenlänge des Doxorubicins von 472 nm (siehe Abschnitt 3.1.1). Ausgehend von einer 2,0 mM Stammlösung des Chromophors in DMF wurde die Absorption des Doxorubicins durch Verdünnung in PBS/E pH 7,4 (filtriert; Porendurchmesser 0,45 µm) in einem Konzentrationsbereich von 1,0–300 µM bestimmt. Dazu wurde eine Quarzküvette der Schichtdicke 1,0 cm mit 500 µl der jeweiligen Doxorubicinverdünnung befüllt und nach Abzug des Pufferwerts die spezifische Absorption des Chromophors bei einer konstanten Temperatur von 25 °C ermittelt. Die Absorption der monomeren Spezies des Chromophors im Gleichgewicht mit der dimeren Form ist beschrieben durch die Gleichung (Chaires *et al.*, 1982; Menozzi *et al.*, 1984):

$$A = \varepsilon_M \times [C]_M + 2 \times \varepsilon_D \times [C]_D \tag{11}$$

wobei A der experimentell bestimmten Absorption bei 472 nm geteilt durch die Schichtdicke d [cm] der Küvette entspricht; ε_M und ε_D sind die molaren Extinktionskoeffizienten der monomeren respektive dimeren Form des Doxorubicins (berechnet mittels der molaren Masse des Monomers) und $[C]_M$ bzw. $[C]_D$ stellen die korrespondierenden molaren Konzentrationen dar.

Aus der Bilanzerhaltung der Masse ergibt sich die totale molare Konzentration des Doxorubicins $[C]_T$ als Ausdruck monomerer Einheiten wie folgt:

$$[C]_T = [C]_M + 2 \times [C]_D \tag{12}$$

Löst man die Gleichungen (6), (7), (11) und (12) unter Einsetzen von $[C]_T$ nach $A/[C]_T = \varepsilon_{kalk}$ auf, erhält man mit $\Delta\varepsilon = \varepsilon_M - \varepsilon_D$:

$$\varepsilon_{kalk} = \varepsilon_D + \Delta\varepsilon \times \frac{(\sqrt{1 + 8 \times [C]_T / K_D} - 1)}{4 \times [C]_T / K_D} \tag{13}$$

Die unbekannten Parameter K_D, ε_M und ε_D der Gleichung (13) wurden parallel durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels des Computerprogramms KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) unter Minimierung der Fehlerquadrate bestimmt.

Die Erweiterung des Modells der Selbstassoziation des Doxorubicins hin zur indefiniten isodesmischen Polymerisation wurde bei Untersuchung mittels Absorptionsspektroskopie nach Rodriguez (1995) vollzogen (siehe Abschnitt 3.1.2.2). ε_{kalk} entsprach in diesem Fall:

$$\varepsilon_{kalk} = \alpha_M \times \varepsilon_M + \alpha_{ext} \times \varepsilon_{ext} + \alpha_{int} \times \varepsilon_{int} \tag{14}$$

mit α als molarem Anteil der einzelnen Spezies des Chromophors an der Gesamtkonzentration ausgedrückt in der monomeren Form; Dabei entsprach <u>M</u> dem Monomer, <u>ext</u> der äußeren Form aufeinander gestapelter Moleküle und <u>int</u> der in dem Stapel befindlichen Form des Doxorubicins. Die jeweilige molare Fraktion ist definiert durch:

$$\alpha_M = \frac{1}{[C]_T / K_D} + \frac{1 - \sqrt{4 \times [C]_T / K_D + 1}}{2 \times [C]_T^2 / K_D^2} \tag{15}$$

$$\alpha_{ext} = 2 \times (1 - \alpha_M - \alpha_M \times [C]_T / K_D) \tag{16}$$

$$\alpha_{int} = 1 - \alpha_M - \alpha_{ext} = \alpha_M \times (1 + 2 \times [C]_T / K_D) - 1 \tag{17}$$

Durch Einsetzen von α_M aus (15) in die Gleichungen (16) und (17) wurde α_{ext} und α_{int} als Ausdruck der monomeren Fraktion erhalten. Anschließend wurden die unbekannten Parameter K_D, ε_M, ε_{ext} und ε_{int} wiederum durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels des Computerprogramms KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) durch iterative Minimierung der Fehlerquadrate bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Als Näherung wurde dafür zunächst der mittels des Monomer-Dimer-Modells für ε_M ermittelte Wert angenommen (siehe Abschnitt weiter oben).

2.7.4 Fluoreszenzspektroskopie

2.7.4.1 Dreidimensionale Fluoreszenzabtastung

Die dreidimensionale Fluoreszenzabtastung des spekroskopisch aktiven Liganden diente verschiedenen Zwecken. Einerseits wurde dadurch die strukturelle Integrität des Haptens überprüft. Andererseits wurde die maximale Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge des Fluorophors bestimmt, um den nachfolgenden biophysikalischen Nachweis der Komplexbildung des Doxorubicins mit natürlichen Lipocalinen wie dem Wt-BBP, den angereicherten BBP-Varianten, dem AGP sowie die Identifizierung geeigneter Blockierungsreagenzien für den Einsatz im *Phage Display* unter optimalen Versuchsbedingungen mittels Liganden-Fluoreszenztitration (siehe Abschnitt 2.7.4.3) oder Fluoreszenzanisotropie (siehe Abschnitt 2.7.4.5) zu führen. Auch für die Untersuchung des Selbstassoziationsverhaltens des Doxorubicins mittels UV/Vis-Spektroskopie (siehe Abschnitt 2.7.3) oder Fluoreszenzspektroskopie (siehe Abschnitt 2.7.4.3) wurden die aus den Fluoreszenzspektren erhaltenen Informationen benötigt.

Eine frisch hergestellte 1,0 mM Stammlösung von Doxorubicin in wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) wurde in PBS/E pH 7,4 auf 5,0 µM verdünnt. 2,0 ml der Lösung des Fluorophors wurden in einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 1 cm) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Fluoreszenzphotometers des Typs LS-50B (Perkin-Elmer) lichtgeschützt für 10 min auf 25 °C temperiert. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzemission wurde die Temperatur mit 25 °C konstant gehalten (Demchenko & Ladokhin, 1988). Die dreidimensionale Abtastung der Fluoreszenzemission erfolgte durch schrittweise Erhöhung der Anregungswellenlänge um 1,0 nm in einem Bereich von 400 – 490 nm. Dabei wurde für jede Anregungswellenlänge die korrespondierende Emission in einem Bereich von 510 – 710 nm alle 0,5 nm abgetastet und aufgezeichnet. Die Geschwindigkeit der Abtastung der Fluoreszenzemission betrug 500 nm/min. Die Schlitzweite der Anregung und Emission entsprach jeweils 10 nm. Die gesammelten Spektren wurden mittels des *FL WinLab 4.0*™ Computerprogramms (siehe Abschnitt 2.9) graphisch zu einem dreidimensionalen Spektrum zusammengeführt (siehe Abschnitt 3.1.1).

2.7.4.2 Protein-Fluoreszenztitration
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Die Komplexbildung zwischen Protein und Ligand wurde in Lösung durch Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften eines der Komplexpartner verfolgt. Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen ist vor allem auf die Anregung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zurückzuführen. Phenylalanin trägt nur in geringem Maße zur Fluoreszenz bei. Eine Abnahme der messbaren Fluoreszenzintensität (*Quenching*) geschieht durch direkte Wechselwirkungen des Liganden mit Tryptophanseitenketten in der Bindungstasche oder durch bindungsinduzierte Konformationsänderungen innerhalb des Proteins, die zu veränderter Pola-

rität der Umgebung nicht direkt mit dem Liganden wechselwirkender Trp- oder Tyr-Reste führt. Abhängig von den Fluoreszenzeigenschaften des Liganden wird dessen Fluoreszenz ebenso beinflusst. Die Dissoziationskonstanten wurden durch Messung der Fluoreszenz des einen Bindungspartners bei Titration mit dem anderen ermittelt.

Die Bindungseigenschaften der natürlichen Lipocaline, der BBP-Varianten sowie potentieller Blockierungsreagenzien gegenüber Doxorubicin (siehe Abschnitt 3.2, 3.6.4.1 und 3.5.1.3) und anderer niedermolekularer Liganden wurden mittels Titration der jeweiligen Proteinlösung mit dem Liganden untersucht. Im Falle des Haptens Doxorubicin wurde im Wesentlichen die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden nachgewiesen. Die Dissoziationskonstante des jeweiligen Protein/Liganden-Komplexes wurde aus der erhaltenen Titrationskurve durch nicht-lineare Regression ermittelt.

Die Konzentration der eingesetzten, filtrierten (Porendurchmesser 0,45 µm) Proteinlösungen in PBS/E pH 7,4 betrug in der Regel 1,0 µM in einem Volumen von 2,0 ml. Die Proteinlösung wurde in einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 1 cm) mit Rührfisch vorgelegt und im thermostatisierbaren Probenhalter des Fluoreszenzphotometers (LS-50B; Perkin-Elmer) für 10 min auf 25 °C inkubiert. Die anschließende Titration mit dem Liganden Doxorubicin erfolgte ausgehend von einer 0,5 – 1,0 mM Stammlösung des Haptens in wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) oder einer frisch hergestellten Doxorubicinlösung identischer Konzentration in H_2O (Millipore; sterilfiltriert). Die intrinsische Fluoreszenz der Tryptophan-Seitenketten der Proteine wurde bei 295 nm und einer Schlitzweite von 4 oder 5 nm – in Abhängigkeit von der gemessenen Ausgangsintensität der Fluoreszenz – angeregt. Der Nachweis der Fluoreszenzemission erfolgte bei 345 nm und Schlitzweiten von 5 oder 6 nm. Die Titration erfolgte durch portionsweise Zugabe der Ligandenlösung in Volumina von 1,0 – 8,0 µl zur Proteinlösung. Die Endkonzentration betrug dabei 5,0 – 30,0 µM. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde die Lösung nach jeder Zugabe unter Rühren 1 min im Dunkeln inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde dann über 10 s integriert gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (bis zu 60 µl entsprechend 3 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Die nach Einstellung des Gleichgewichts der Komplexbildung gemessenen apparenten Fluoreszenzintensitäten der Proteine wurden bei der Titration um den Pufferwert und den Einfluss des Lösungsmittels korrigiert. Die berechneten relativen Intensitäten der Proteinfluoreszenz I/I_0 wurden auf einen Anfangswert von 100 % skaliert, und um den inneren Filtereffekt (siehe unten), entsprechend der Eigenabsorption des Doxorubicins bei der Anregungswellenlänge der Proteinfluoreszenz von 295 nm, korrigiert.

<u>Korrektur des inneren Filtereffekts mit N-Acetyl-L-Tryptophanamid:</u>

Aufgrund der nicht vernachlässigbaren Eigenabsorption des Doxorubicins bei der Anregungswellenlänge der Proteinfluoreszenz von 295 nm wurden die Messwerte um diesen inneren Filtereffekt berichtigt (Samworth *et al.*, 1988). Die Korrektur der Eigenabsorption bei der

Emissionswellenlänge von 345 nm wurde nicht berücksichtigt, da der Effekt hier gering war. Die von der Doxorubicinkonzentration abhängige Verringerung der messbaren Fluoreszenzintensität wurde mittels Titration einer 1,0 µM N-Acetyl-L-Tryptophanamid-Lösung mit Doxorubicin in der oben beschriebenen Weise ermittelt. Da der Ligand nicht mit dem N-Acetyl-L-Tryptophanamid durch Komplexbildung wechselwirkte, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei der Titration vornehmlich auf die Eigenabsorption des Doxorubicins zurückzuführen.

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

$$F = f_P \times [P] \times I^0_{Anregung} \tag{18}$$

mit f_P = molarer Fluoreszenzkoeffizient des Proteins, [P] = Proteinkonzentration und $I^0_{Anregung}$ = Ausgangsintensität des nicht abgeschwächten Anregungslichts.

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

$$F_{app} = f_P \times [P] \times I_{Anregung} \tag{19}$$

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

$$\log \frac{I^0_{Anregung}}{I_{Anregung}} = \varepsilon_L \times c_L \times d \tag{20}$$

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

Durch Umformen von Gleichung (20) erhält man:

$$I_{Anregung} = I^0_{Anregung} \times 10^{-\varepsilon_L \times c_L \times d} \tag{21}$$

Damit ergibt sich aus Gleichung (19):

$$F_{app} = f_P \times [P] \times I^0_{Anregung} \times 10^{-\varepsilon_L \times c_L \times d} \tag{22}$$

bzw. unter Verwendung von Gleichung (18):

$$F_{app} = F \times 10^{-\varepsilon_L \times c_L \times d} \tag{23}$$

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

$$\log F_{app} = \log F - \varepsilon_{app} \times c_L \tag{24}$$

Die Korrektur der bei der Titration der Proteinlösungen gemessenen Fluoreszenzintensitäten erfolgt dann gemäß Gleichung (25):

$$F = F_{app} \times 10^{\varepsilon_{app} \times c_L} \tag{25}$$

<u>Bestimmung der Dissoziationskonstante:</u>

Bei jedem Schritt der Fluoreszenztitration stehen die Bindungspartner miteinander im Assoziations/Dissoziations-Gleichgewicht. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist das Gleichgewicht durch die Dissoziationskonstante K_D in Gleichung (2) beschrieben. Die dabei nicht direkt erfassbaren Konzentrationen der nicht komplexierten Bindungspartner sind durch folgende Bilanzgleichungen definierbar $[P] = [P]_T - [P \bullet L]$ und $[L] = [L]_T - [P \bullet L]$ (mit $[P]_T$ = Proteingesamtkonzentration; $[L]_T$ = Ligandengesamtkonzentration). Durch Substitution von [P] und [L] in Gleichung (2) erhält man:

$$K_D = \frac{([P]_T - [P \bullet L]) \times ([L]_T - [P \bullet L])}{[P \bullet L]} \tag{26}$$

Auflösen dieser Gleichung nach $[P \bullet L]$ ergibt folgende gemischt quadratische Gleichung, die die einzig physikalisch sinnvolle von zwei mathematisch möglichen Lösungen darstellt:

$$[P \bullet L] = \frac{[P]_T + [L]_T + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \tag{27}$$

unter Berücksichtigung genannter Bilanzgleichungen ergibt sich analog:

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

$$[L] = \frac{[L]_T - [P]_T - K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \tag{29}$$

Die gemessene Fluoreszenz ist die Summe der Fluoreszenzbeiträge der im Gleichgewicht vorliegenden Molekülspezies. Für ein durch Gleichung (2) charakterisiertes System mit drei Komponenten läßt sich die gemessene Fluoreszenz F mit dem molaren Fluoreszenzkoeffizienten f und der jeweiligen Konzentration des Moleküls wie folgt beschreiben:

$$F = f_P \times [P] + f_L \times [L] + f_{P \bullet L} \times [P \bullet L] \tag{30}$$

Nach Substitution von $[P \bullet L]$, [P] und [L] gemäß Gleichung (27), (28) und (29) ergibt sich schließlich:

$$\begin{aligned} F = {} & ([P]_T - [L]_T - K_D) \times \frac{f_P}{2} + ([P]_T + [L]_T + K_D) \times \frac{f_{P \bullet L}}{2} + ([L]_T - [P]_T - K_D) \times \frac{f_L}{2} \\ & + (f_P + f_L - f_{P \bullet L}) \times \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \end{aligned} \tag{31}$$

Als anzupassende Parameter verbleiben die molaren Fluoreszenzkoeffizienten f_P, f_L und $f_{P \bullet L}$ sowie die gesuchte Dissoziationskonstante K_D. Die Anpassung der Titrationskurven an die gemessene Fluoreszenz in Anbhängigkeit von $[L]_T$ erfolgte durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels des Computerprogramms *KaleidaGraph® V 3.6* (siehe Abschnitt 2.9) durch iterative Minimierung der Fehlerquadrate. Unter den gegebenen Bedingungen der Protein-Fluoreszenztitration zeigten die Liganden selbst vernachlässigbare Eigenfluoreszenz ($f_L = 0$), wodurch sich Gleichung (31) vereinfachte.

Um bei der Abnahme der intrinsischen Proteinfluoreszenz zwischen den Phänomenen der dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschung bzw. ihrer Mischform zu unterscheiden, wurden die erhaltenen Werte falls erforderlich mittels eines modifizierten Stern-Volmer-Diagrammes ausgewertet (Samworth *et al.*, 1988). Von statischer Fluoreszenzlöschung spricht man, wenn der beobachtete Effekt ausschließlich auf eine Komplexbildung des Proteins mit dem Liganden zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wird die dynamische Löschung durch Kollisionsereignisse der in Lösung befindlichen Moleküle verursacht (siehe Abschnitt 3.5.1.3). Der allgemeine Ausdruck der Stern-Volmer-Gleichung lautet:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \times [L]_T \qquad (32)$$

mit F_0 und F als Ausdruck der Fluoreszenzintensität der Tryptophanreste in Abwesenheit bzw. Gegenwart des *Quenchers*, dessen Konzentration jeweils der Gesamtkonzentration $[L]_T$ des Liganden beim jeweiligen Titrationsschritt entspricht; K ist eine Konstante, die in Abhängigkeit des zugrunde liegenden Löschungsmechanismus verschieden interpretiert werden kann. Aus Gleichung (32) ergibt sich für den Fall der Anregung der Tryptophanseitenketten eines gefalteten Proteins eine heterogene Fluorophorpopulation unterschiedlicher Zugänglichkeit. Die Fluoreszenzemission der gesamten Fluorophorpopulation ist wie folgt definiert:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_A \times K_A \times [L]_T} + \frac{1}{f_A} \qquad (33)$$

mit $\Delta F = F_0 - F$, f_A als Anteil der zugänglichen Fluorophore und K_A als Assoziationskonstante.

Resultiert die beobachtete Fluoreszenzlöschung ausschließlich aus einer Komplexbildung zwischen dem Protein und dem Liganden erhält man bei graphischer Darstellung von $F_0/\Delta F$ gegen $1/[L]_T$ unabhängig von der Population unzugänglicher Fluorophorreste einen linearen Zusammenhang, wobei sich der Anteil zugänglicher Fluorophore durch den Kehrwert des Schnittpunkts der Ordinate und der Wert der Dissoziationskonstante K_D aus dem Quotienten der Steigung durch den Ordinatenschnittpunkt ergibt. Die Auswertung der Titrationskurven wurde durch lineare Regression mittels des Computerprogramms *KaleidaGraph® V 3.6* (siehe Abschnitt 2.9) durchgeführt.

2.7.4.3 Liganden-Fluoreszenztitration
(nach Breustedt, 2008)

Klassische Liganden-Fluoreszenztitration:

Die Bindungsaktivitäten von Blockierungsreagenzien gegenüber Doxorubicin (siehe Abschnitt 3.5.1.3) wurden durch Titration der Ligandenlösung mit diesen Reagenzien untersucht. Dabei wurde in allen Fällen die Abnahme der Fluoreszenzintensität des Liganden bei Komplexbildung mit den Proteinen nachgewiesen.

Die Messungen wurden mit einem thermostatisierbaren Küvettenhalter ausgestatteten LS-50B Fluoreszenzphotometer (Perkin-Elmer) durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten, Doxorubicinlösung in PBS/E pH 7,4 betrug 10,0 µM und war ausgehend von einer 1 mM Stammlösung des Liganden in wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) hergestellt worden. Das eingesetzte Volumen der verdünnten Doxorubicinlösung entsprach 2,0 ml. Diese Ligandenlösung wurde zunächst in einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 1 cm) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Fluoreszenzphotometers für 10 min auf 25 °C temperiert. Die anschließende Titration mit den Proteinlösungen erfolgte ausgehend von frisch hergestellten, filtrierten (Porendurchmesser 0,45 µm) 2,0 mM Stammlösungen der entsprechenden Reagenzien in PBS/E pH 7,4. Die Fluoreszenz des Doxorubicins wurde selektiv bei 470 nm und 5 nm Schlitzweite angeregt. Der Nachweis der Fluoreszenzemission erfolgte bei 585 nm mit einer Schlitzweite von 10 nm. Die Titration erfolgte durch portionsweise Zugabe der Reagenzienlösung in Volumina von 1,0 – 10,0 µl zur Doxorubicinlösung. Die Endkonzentration betrug dabei 100 µM. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde die Lösung nach jeder Zugabe unter Rühren 1 min im Dunkeln inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde dann über 10 s integriert gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (bis zu 100 µl entsprechend 5 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Nach Abzug des Fluoreszenzbeitrages des Puffers wurden die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten auf einen Anfangswert von 100 % skaliert. Die Anpassung der Titrationskurven an die Wertepaare $F/[P]_T$ erfolgte durch nicht-lineare Regression mittels Gleichung (31) mit dem Computerprogramm KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) durch iterative Minimierung der Fehlerquadrate. Unter den gegebenen Bedingungen der Liganden-Fluoreszenztitration (siehe oben) zeigten die Blockierungsreagenzien selbst keine Fluoreszenz. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante sowie der molaren Fluoreszenzkoeffizienten f_L und $f_{P\bullet L}$ erfolgte daher unter Verwendung von Gleichung (31) mit $f_P = 0$.

Untersuchung der Selbstassoziation des Doxorubicins mittels Fluoreszenzspektroskopie:

Die Fluoreszenzemission des Doxorubicins zeigte bei Titration des Fluorophors in den Puffer PBS/E pH 7,4 (Versuchsdurchführung wie vorheriger Absatz in Abwesenheit von Protein) mit zunehmender Konzentration ein nicht-lineares Verhalten, das als Selbstassoziation des Haptens (siehe Abschnitt 3.1.2.2) interpretiert wurde. Unabhängig vom zugrunde gelegten

Modell der Selbstassoziation sind die entstehenden Polymere als nicht fluoreszent beschrieben (Rizzo *et al.*, 1989), weshalb das Produkt aus der molaren Fluoreszenz f_L des monomeren Fluorophors und seiner jeweils in Lösung befindlichen Monomerkonzentration [L] die apparente Fluoreszenz F einfach beschreibt:

$$F = f_L \times [L] \tag{34}$$

Mit $[L] = [L]_1$ aus Gleichung (7) als Ausdruck der Monomerkonzentration des Monomer-Dimer-Modells der Selbstassoziation des Liganden läßt sich die graphische Darstellung der Fluoreszenz F gegen die eingesetzte absolute Doxorubicinkonzentration $[L]_T$ wie folgt durch nicht-lineare Regression auswerten:

$$F = f_L \times \frac{\sqrt{1 + 8 \times [L]_T / K_D} - 1}{4 / K_D} \tag{35}$$

wobei als anzupassende Parameter die Dissoziationskonstante K_D und die molare Fluoreszenz f_L verbleiben.

Demgegenüber ist das klassische Modell der indefiniten isodesmischen (isos = gleich; desmos = Bindung) Selbstassoziation (Chaires *et al.*, 1982; Ishida *et al.*, 1988; Martin, 1996; Rodriguez *et al.*, 1995) definiert als:

$$L + L \Leftrightarrow L_2 \qquad K_{D2} = [L]^2 / [L_2] \tag{36}$$

$$L_2 + L \Leftrightarrow L_3 \qquad K_{D3} = [L_2] \times [L] / [L_3] = K_{D2} \times [L]^3 / [L_3] \tag{37}$$

$$L_3 + L \Leftrightarrow L_4 \qquad K_{D4} = [L_3] \times [L] / [L_4] = K_{D2} \times K_{D3} \times [L]^4 / [L_4] \tag{38}$$

$$\downarrow \qquad\qquad\qquad\qquad \downarrow$$

$$L_{i-1} + L \Leftrightarrow L_i \qquad K_{Di} = [A_{i-1}] \times [L] / [A_i] = (K_{D2} \times \cdots \times K_{Di-1}) \times [L]^i / [L_i] \tag{39}$$

wobei $K_{DIso} = K_{D2} = K_{D3} = K_{D4} = \cdots = K_{Di}$; Im Gleichgewicht ergibt sich deshalb nach dem Massenwirkungsgesetz analog zu Gleichung (7) folgender Term für $[L] = [L]_1$ als Ausdruck der Monomerkonzentration des Modells der indefiniten isodesmischen Selbstassoziation des Liganden (Evstigneev *et al.*, 2012; Ishida *et al.*, 1988):

$$[L_1] = \frac{2 \times [L]_T / K_{DIso} + 1 - \sqrt{4 \times [L]_T / K_{DIso} + 1}}{2 \times [L]_T / K_{DIso}^2} \tag{40}$$

Durch Kombination von Gleichung (34) und (40) wurde die Auftragung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die eingesetzte absolute Doxorubicinkonzentration $[L]_T$ mittels des Computerprogramms KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) durch nicht-lineare Regression unter Anpassung der Dissoziationskonstante K_{Diso} und des relativen molaren Fluoreszenzkoeffizienten f_L graphisch ausgewertet.

2.7.4.4 Kompetitive Fluoreszenztitration
(nach Breustedt, 2008)

Der spektroskopisch aktive Ligand 8-Anilino-1-Naphthalin-Sulfonsäure (ANS) wurde als Komplexierungspartner für das Wt-BBP, FluA und die angereicherten BBP-Varianten verwendet, um mittels Verdrängung aus der Bindungstasche dieser Proteine durch das Doxorubicin die Affinität für den letztgenannten Liganden zu ermitteln (siehe Abschnitt 3.6.4.2). Dazu wurde zunächst die Affinität der Proteine für das ANS mittels Liganden-Fluoreszenzmessung bei Titration der Proteinlösung (siehe Abschnitt 2.7.4.3 und 3.6.4.2) bestimmt. Im Fall des ANS zeigte die Titrationskurve in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden eine Zunahme der Fluoreszenz. Für die Messung wurden 2,0 ml der 1,0 µM Proteinlösung in einer Quarzküvette vorgelegt und für 10 min auf 25 °C temperiert bevor die Fluoreszenzemission bei 370 nm (Schlitzweite jeweils 10 – 15 nm) angeregt und bei 475 nm (Schlitzweite jeweils 10 – 15 nm) detektiert wurde. Die Ligandenlösung (1,0 mM ANS in wasserfreiem DMF; über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) wurde der Proteinlösung in Portionen von 1,0 – 10,0 µl bis zu einer Endkonzentration von 20,0 µM zugesetzt und nachfolgend bis zur Einstellung des Gleichgewichts jeweils für 1 min unter Rühren im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde anschließend über 10 s integriert gemessen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (40 µl, entsprechend 2 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Nach Abzug des Fluoreszenzbeitrages des nicht komplexierten Liganden (durch Titration der ANS-Lösung in den verwendeten Puffer) wurden die erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die zutitrierte Ligandenkonzentration aufgetragen. Gleichung (31) vereinfachte sich wegen der molaren Fluoreszenzkoeffizienten $f_P = 0$ und $f_L = 0$, so dass die erhaltenen Daten unter Anpassung der Dissoziationskonstante K_D und des relativen molaren Fluoreszenzkoeffizienten $f_{P \bullet L}$ mittels des Computerprogramms *KaleidaGraph® V 3.6* (siehe Abschnitt 2.9) durch nicht-lineare Regression untersucht wurden.

Das anschließende Verdrängungsexperiment wurde ausgehend von jeweils 2,0 ml der 1,0 µM Proteinlösung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.4.2). Zur Ausbildung des Protein/ANS-Komplexes enthielt die Proteinlösung zusätzlich jeweils 9,0 µM ANS (aus der 1,0 mM Stammlösung des ANS in wasserfreiem DMF; über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert), entsprechend der Konzentration halbmaximaler Sättigung der Ligandenbindungsstellen der Proteine, wie durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten (siehe oben) bestimmt. Diese Lösung wurde zunächst in einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 1 cm) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Fluoreszenzphotometers für 10 min auf 25 °C temperiert und so die Gleichgewichtseinstellung des Komplexes vollzogen. Die Titration erfolgte durch portionsweise Zugabe einer 1,0 mM Doxorubicinlösung (in wasserfreiem DMF) in Volumina von 1,0 – 20,0 µl zur Lösung des Protein/ANS-Komplexes. Die Endkonzentration betrug dabei 40,0 µM. Zur Einstellung des Gleichgewichts wurde jeweils für

1 min unter Rühren im Dunkeln bei 25 °C inkubiert. Durch die kompetitive Verdrängung des ANS mit Doxorubicin aus der Bindungstasche der Proteine wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei spezifischem Nachweis des komplexierten ANS beobachtet. Dazu wurde die Fluoreszenz bei 370 nm (Schlitzweite 15 nm) angeregt und die Emission bei 475 nm (Schlitzweite 15 nm) beobachtet. Das Fluoreszenzsignal wurde über 10 s integriert nachgewiesen. Die geringe Volumenzunahme im Verlauf der Titration (80 µl, entsprechend 4 %) wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Aufgrund der nicht vernachlässigbaren Eigenabsorption des Doxorubicins bei der Anregungswellenlänge von 370 nm wurden die Messwerte hinsichtlich dieses inneren Filtereffektes durch Titration einer 9,0 µM ANS-Lösung mit Doxorubicin in Abwesenheit des Proteins korrigiert (siehe Abschnitt 2.7.4.2 und 2.7.4.3). Da das Doxorubicin nicht mit dem ANS wechselwirkte, war die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei der Titration vornehmlich auf die Eigenabsorption des Doxorubicins zurückzuführen. Des Weiteren wurden die Rohdaten noch um den Fluoreszenzbeitrag des Puffers bereinigt. Die Auftragung der Titrationskurve erfolgte in Form der apparenten Fluoreszenz des ANS in Prozent der Ausgangsintensität gegen die zugegebene Kompetitorkonzentration $[D]_T$ des Doxorubicins.

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

In einem kompetitiven Experiment ist das Protein prinzipiell in der Lage einen Komplex mit beiden in Lösung befindlichen Liganden A und B einzugehen (Kuzmič *et al.*, 1992; Lindahl *et al.*, 1991; Wang, 1995):

$$P + A \Leftrightarrow P \bullet A \qquad K_{DA} = \frac{[P] \times [A]}{[P \bullet A]} \tag{41}$$

$$P + B \Leftrightarrow P \bullet B \qquad K_{DB} = \frac{[P] \times [B]}{[P \bullet B]} \tag{42}$$

Unter Erhaltung der Massenbilanz folgt daraus:

$$[A]_T = [A] + [P \bullet A] \tag{43}$$

$$[B]_T = [B] + [P \bullet B] \tag{44}$$

$$[P]_T = [P] + [P \bullet A] + [P \bullet B] \tag{45}$$

mit K_{DA} und K_{DB} als Dissoziationskonstanten des Proteins P für die Liganden A und B; [P] = Konzentration des Proteins; [A] und [B] = Konzentration des Liganden A und B; [P•A] und [P•B] = Konzentration des jeweiligen Protein/Liganden-Komplexes; T kennzeichnet dabei die jeweilige Gesamtkonzentration. Aus den Gleichungen (41)–(44) folgt für die Konzentration der Komplexe [P•A] und [P•B]:

$$[P \bullet A] = \frac{[P] \times [A]_T}{K_{DA} + [P]} \tag{46}$$

$$[P \bullet B] = \frac{[P] \times [B]_T}{K_{DB} + [P]} \tag{47}$$

setzt man Gleichung (46) und (47) in (45) ein ergibt sich ein kubischer Ausdruck der Form:

$$[P]^3 + a \times [P]^2 + b \times [P] + c = 0 \tag{48}$$

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

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

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

Unter der Annahme einer 1:1-Bindung sowohl zwischen ANS als auch Doxorubicin mit dem Wt-BBP, FluA und den BBP-Varianten und unter Berücksichtigung der im vorliegenden Versuch gegebenen Konzentrationsverhältnisse $[ANS]_T >> [P]_T$ und $[Doxo]_T >> [P]_T$, konnte statt dieses kubischen Ausdrucks der Cheng-Prusoff-Formalismus (Cheng & Prusoff, 1973) aus Gleichung (49) und (50) angewendet werden (Horovitz & Levitzki, 1987). Dabei ist die erhaltene Titrationskurve der apparanten Fluoreszenz in Prozent der Ausgangsintensität gegen die zugegebene Doxorubicinkonzentration $[D]_T$ durch folgende Gleichung beschrieben:

$$F_{app} = F_{min} + \frac{F_{max} - F_{min}}{1 + {[D]_T}/{IC_{50}}} \tag{49}$$

mit F_{max} = oberer Plateauwert, der dem Ausganswert (100 %) der Fluoreszintensität des jeweiligen Protein/ANS-Komplexes entspricht; F_{min} = unterer Plateauwert, der der maximalen durch den Liganden Doxorubicin hervorgerufenen Verdrängung des ANS aus dem Komplex mit dem jeweiligen Protein entspricht; IC_{50} = halbmaximale inhibitorische Konzentration des Liganden Doxorubicin. F_{min} und IC_{50} wurden als frei anzupassende Parameter mittels des Computerprogramms *KaleidaGraph® V 3.6* (siehe Abschnitt 2.9) durch nicht-lineare Regression ermittelt. Aus dem IC_{50}-Wert und der Kenntnis sowohl der eingesetzten ANS-Konzentration $[A]_T$ wie auch der zuvor in einem eigenen Experiment selbst bestimmten K_{DA} = Dissoziationskonstante des ANS/Protein-Komplexes (siehe Abschnitt weiter oben bzw. 2.7.4.2) konnte dann die K_{DD} = Dissoziationskonstante des Doxorubicin/Protein-Komplexes über die Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet werden:

$$K_{DD} = \frac{IC_{50}}{1 + {[A]_T}/{K_{DA}}} \tag{50}$$

2.7.4.5 Fluoreszenzanisotropie
(nach Holla 2012)

Grundlage der Fluoreszenzanisotropie ist das bei Anregung mit linear polarisiertem Licht von fluoreszierenden Molekülen emittierte, polarisierte Licht. Im Fall kleiner Moleküle geht diese Polarisierung bedingt durch die schnelle ungerichtete Rotation vor der Fluoreszenzemission

weitgehend verloren. Die Komplexierung eines fluoreszierenden Liganden durch ein Makromolekül verringert diese Depolarisation durch Einschränkung der Rotationsfreiheit des Fluorophors und kann deshalb als erhöhter Anisotropiewert nachgewiesen werden (Burke *et al.*, 1989). In der Praxis wird zur Messung dieses Effekts eine Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und die resultierenden Emissionsintensitäten I_{vv} bzw. I_{vh} werden mit vertikal und horizontal ausgerichteten Polarisationsfiltern gemessen. Daraus wird die Fluoreszenzanisotropie r wie folgt berechnet:

$$r = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times I_{vh}} \tag{51}$$

Vor Beginn der Anisotropiemessung wird zunächst noch der gerätespezifische Korrekturfaktor G (*Granting Factor*) bestimmt, indem die Ausgangsprobe des Haptens mit horizontal polarisiertem Licht angeregt und die Intensitäten der horizontal und vertikal polarisierten Komponenten I_{hh} und I_{hv} des emittierten Lichts gemessen werden.

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \tag{52}$$

Im Idealfall sind die hier erhaltenen Messwerte nahezu identisch. In der Realität weichen die Intensitäten vor allem als Konsequenz der verschiedenen Transmissionseffizienzen von Monochromatoren für vertikal und horizontal polarisiertes Licht mehr oder minder stark voneinander ab. Entsprechend ergibt sich deshalb unter Berücksichtigung des G-Werts für die Anisotropie r:

$$r = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh}} \tag{53}$$

Die Messung der Anisotropie des niedermolekularen Fluorophors Doxorubicin bei Komplexierung mit dem Biomakromolekül AGP erfolgte mit 1,0 µM Doxorubicin in PBS/E pH 7,4 (1,0 mM Stammlösung des Haptens in wasserfreiem DMF; über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) mit unterschiedlichen Konzentrationen 0 – 50 µM des Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Die Proben wurden zur Gleichgewichtseinstellung des Komplexes für jeweils 15 min bei 25 °C lichtgeschützt inkubiert und anschließend in der Fluoreszenzquarzküvette (Typ Hellma 108.002B-QS, Mindestvolumen 150 µl) im Probenhalter des Fluoreszenzphotometers LS-50B (Perkin-Elmer) für weitere 5 min bei derselben Temperatur äquilibriert. Die Messung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm (Schlitzweite 15 nm) und einer Emissionswellenlänge von 585 nm (Schlitzweite 20 nm) durchgeführt. Die Anisotropie wurde über 10 s integriert gemessen.

Es wurden jeweils drei Messwerte derselben Probe aufgenommen und der Mittelwert gebildet. Zur Auswertung wurde die aus den Messwerten nach Gleichung (53) – unter Berück-

sichtigung des Korrekturfaktors G – berechnete Anisotropie r gegen die AGP-Konzentration aufgetragen.

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

Da die Komplexierung durch das AGP weder die Fluoreszenzlebensdauer des Doxorubicins verändert noch die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors dadurch wesentlich beeinflusst wird (Husain et al., 1993), lässt sich die Anisotropie r bei der Komplexbildung aus Protein und Ligand adäquat durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (siehe Abschnitt 2.7.4.2). Die Auflösung der gemischt quadratischen Gleichung (26) nach [P•L] ergibt dabei Gleichung (27). Bei Einsetzen von [P•L] aus Gleichung (27) folgt wegen $[L] = [L]_T - [P \bullet L]$ für [L]:

$$[L] = \frac{[L]_T - [P]_T - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \qquad (54)$$

Die gemessene Gesamtanisotropie ergibt (55) sich anteilig aus der Anisotropie des freien Liganden und der des Komplexes:

$$r = r_f \frac{[L]}{[L] + [P \bullet L]} + r_k \frac{[P \bullet L]}{[L] + [P \bullet L]} \qquad (55)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (27) und (54) in (55) ergibt sich für die gemessene Anisotropie folgender Zusammenhang:

$$r = \left(\frac{[L]_T - [P]_T - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \right) \times \frac{r_f}{[L]_T}$$
$$+ \left(\frac{[P]_T + [L]_T + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_T + [L]_T + K_D)^2}{4} - [P]_T \times [L]_T} \right) \times \frac{r_k}{[L]_T} \qquad (56)$$

mit r, r_f und r_k als Ausdruck der gemessenen Anisotropie und der Anisotropie des freien Liganden bzw. des vollständig mit dem AGP komplexierten Liganden; $[L]_T$ und $[P]_T$ ist die Gesamtkonzentration des Liganden bzw. des Proteins. Sowohl die Dissoziationskonstante K_D des Doxorubicin/Protein-Komplexes als auch r_f und r_k wurden als frei anzupassende Parameter mittels des Computerprogramms KaleidaGraph® V 3.6 (siehe Abschnitt 2.9) durch nicht-lineare Regression ermittelt.

2.7.5 CD-Spektroskopie
(nach Schlehuber, 2001)

Man spricht von Zirkulardichroismus (CD), wenn rechts- und linkshändig zirkular polarisiertes Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives, absorbierendes Medium unterschiedlich stark abgeschwächt wird. Die resultierenden molaren Extinktionskoeffizienten ε_R und ε_L der beiden Komponenten sind daher voneinander verschieden (Berova *et al.*, 2000). Bei

Proteinen sind einerseits die Peptidbindungen durch Absorption im fernen UV-Bereich (180 – 250 nm) oder die aromatischen Seitenketten im nahen UV-Bereich (250 – 350 nm) mittels Zirkulardichroismus nachweisbar. Die CD-Analyse im Absorptionsbereich der Peptidbindungen gibt Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins, wohingegen die Messung im Absorptionsbereich der aromatischen Seitenketten Aussagen über ihre molekulare Umgebung erlaubt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie eingesetzt, um die Integrität des β-*Barrel* als grundlegendes Faltungsmuster der aus der BBP-Zufallsbibliothek angereicherten BBP-Proteinvarianten zu verifizieren (siehe Abschnitt 3.5.1.1).

Die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigten Proteine (siehe Abschnitt 2.6.1) wurden zweimal gegen filtrierten (Porendurchmesser 0,45 µm) und entgasten CD-Puffer (20 mM Kaliumphosphat, 50 mM Kaliumsulfat, pH 7,4) dialysiert. Die Proteinlösung mit einer Konzentration von ~50 µM wurde in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1,0 mm gefüllt, und luftdicht verschlossen für 20 min bei 20 °C im Probenhalter des Spektropolarimeters (Jasco J-810) temperiert. Die CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 – 260 nm bei 22 °C aufgenommen (Geräteeinstellungen: *response* = 2 s; *band width* = 2 nm; *data pitch* = 0,2 nm; *scan speed* = 100 nm/min). Um valide Ergebnisse zu erzielen, wurden insgesamt bis zu 10 Spektren akkumuliert. Die beobachteten Elliptizitätswerte in Grad (Θ_{obs}) wurden für die BBP-Varianten auf die molare Elliptizität pro Aminosäure Θ_{MWR} (*MRW = mean residue weight*) mittels folgender Gleichung umgerechnet:

$$\Theta_{MWR} = \frac{\Theta_{obs} \times M_R}{c \times d \times N_A} \qquad (57)$$

M_R ist dabei die Molmasse des untersuchten Proteins, c dessen Konzentration [mg/ml], d die Schichtdicke [cm] sowie N_A die Anzahl der Aminosäuren.

2.8 Chemische Synthese und Affinitätskopplung von Zielmolekül-Konjugaten

2.8.1 Herstellung von Doxo-Biotin, Doxo-SS-Biotin sowie Doxo-Digoxigenin (nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

Die kovalente Kopplung von Doxorubicin an Biotin und Digoxigenin wurde mit reaktiven Karbonsäureesterderivaten der beiden Markermoleküle durchgeführt. Als solches wurden Biotin-X-NHS (D-Biotinoyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit einer Reinheit von > 97 %, EZ-Link®Sulfo-NHS-SS-Biotin (Sulfosuccinimidyl-2-Biotinamido-Ethyl-1,3-Dithiopropionat; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL, USA) und Dig-NHS (Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl-ε-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit > 90 % Reinheit verwendet (siehe Abschnitt 3.4.1).

Für die Kopplung wurden jeweils 2,0 ml der Doxorubicin-Stammlösung in wasserfreiem DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) entsprechend 2,0 µmol in mindestens äquivalenter Stöchiometrie bis zu einem 50-fachen Überschuss mit der Hünig-Base N-Ethyldiisopropylamin (Reinheit ≥ 98 %; Merck KGaA, Darmstadt) vorinkubiert. Dazu wurde die 5,8 M Stammlösung des N-Ethyldiisopropylamins zunächst im Verhältnis 1/10 in wasserfreiem DMF verdünnt und anschließend 3,4 µl dieser Verdünnung oder im Falle des 50-fachen Überschusses 17,0 µl der unverdünnten N-Ethyldiisopropylaminlösung der Doxorubicinlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min lichtgeschützt bei RT auf einem Rollenmischer. Die auf RT temperierten Markermolekülderivate wurden zu je einem Moläquivalent frisch eingewogen (0,91 mg Biotin-X-NHS, 1,21 mg Sulfo-NHS-SS-Biotin und 1,32 mg Dig-NHS). Die Zugabe der reaktiven Karbonsäureesterderivate zu der Doxorubicinlösung wurde portionsweise vorgenommen, um einen Überschuss der primären Aminogruppen des Doxorubicins zu simulieren und dadurch eine effiziente Umsetzung zu gewährleisten. Nach 2 – 3 h Inkubation bei RT und Dunkelheit auf einem Rollenmischer wurden die Syntheseprodukte mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.8.2). Im Falle nicht annähernd quantitativer Umsetzung des Doxorubicins wurden schrittweise weitere 0,5 – 2 Moläquivalente der reaktiven Markermolekülderivate zugegeben (siehe oben) und das Ergebnis nach der jeweiligen Inkubation dünnschichtchromatographisch überprüft (siehe Abschnitt 2.8.2).

Herstellung von Negativkontrollreagenzien:

Für den Einsatz z.B. im Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) wurden dem Doxo-Biotin bzw. Doxo-Dig entsprechende Negativkontrollen benötigt. Dazu wurden 0,91 mg Biotin-X-NHS, 1,21 mg Sulfo-NHS-SS-Biotin sowie 1,32 mg Dig-NHS in Gegenwart von 1 ml 50 mM Tris/HCl bei einem pH-Wert 8,0 – 9,0 für 12 h bei RT inkubiert. Wegen der drastischen Reaktionsbedingungen war hier kein chromatographischer Nachweis des Tris-Biotins, Tris-SS-Biotins sowie des Tris-Digs erforderlich.

2.8.2 Nachweis der Doxo-Marker-Konjugate mittels Dünnschichtchromatographie

Der Nachweis der Syntheseprodukte Doxo-Biotin, -SS-Biotin und -Dig (siehe Abschnitt 2.8.1) erfolgte durch analytische Dünnschichtchromatographie (DC). Die polare, stationäre Phase bestand aus DC Aluminiumoxid 60 F_{254}-Platten (20 × 20 cm; MerckKGaA, Darmstadt), die vor der Verwendung der Größe der Analysekammern entsprechend auf eine Länge von 10,0 cm und je nach Anzahl aufzutragender Proben auf eine maximale Breite von 10,0 cm passend zurechtgeschnitten wurden. Zur Analyse wurden jeweils 0,5 – 1,0 µl der Konjugate (siehe Abschnitt 2.8.1), des freien Liganden Doxorubicin sowie der reaktiven Karbonsäureesterderivate und des N-Ethyldiisopropylamin 1 – 1,5 cm oberhalb des unteren Randes der Dünnschichtfolie punktförmig aufgetragen. Anschließend wurden die Proben-

punkte durch Auflegen der Aluminiumplatte auf eine 50 °C temperierte Heizplatte für 10–20 s getrocknet, um restliches Lösungsmittel der Synthesereaktion zu verdampfen.

Als mobile, vergleichsweise apolare Lösungsmittelphase dienten 12 ml eines 3/1 (*v/v*) Chloroform/Methanol-Gemisches, mit dem die Analysekammer vor dem Lauf gesättigt wurde. Dazu wurde an den beiden schmalen Seiten der Kammer ein zurechtgeschnittenes Whatman-Filterpapier 3MM (Bender & Hobein AG, München) senkrecht eingepasst und nach Befüllen der Kammer mit dem Fließmittel die komplette Benetzung der Filter bei geschlossenem Deckel abgewartet. Dann wurde die Dünnschichtfolie in die mit dem Lösungsmittel gesättigte Kammer gestellt und die kapillarkraftbedingte Wanderung des Fließmittels entlang der DC-Platte bis etwa 1,5–2,0 cm unterhalb des oberen Plattenrandes abgewartet (circa 5 min). Anschließend wurde die Platte erneut getrocknet. Das Doxorubicin und seine biotinylierten bzw. digoxigenierten Konjugate konnten direkt durch die Rotfärbung im sichtbaren Bereich identifiziert werden. Auch die nicht farbigen Synthesekomponenten DMF, N-Ethyldiisopropylamin und Biotin-X-NHS, Sulfo-NHS-SS-Biotin sowie Dig-NHS und deren Laufstrecken konnten durch teilweise blockierte Fluoreszenzanregung – dem sogenannten UV-*Shadowing* – bei Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm nachgewiesen werden. Die Kopplungseffizienz der Umsetzung des freien Doxorubicins zum gewünschten Konjugat wurde anhand der Farbintensität der erhaltenen Probenpunkte im Vergleich zum unkonjugierten Doxorubicin abgeschätzt.

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

$$R_f = \frac{P}{L} \tag{58}$$

Der R_f-Wert einer chemischen Verbindung stellt unter identischen Versuchsbedingungen – Dünnschichtchromatographieplatten und Laufmittel – eine Stoffkonstante dar.

2.8.3 Kovalente Kopplung von Doxorubicin an Trägerproteine
(nach Beste, 1998 und Schlehuber, 2001)

<u>Doxorubicin-NHS-Synthese und -Kopplung an Trägerproteine:</u>

Für die Immobilisierung auf der Oberfläche der Polystyrol-Flügelstifte (siehe Abschnitt 2.3.3.1 und 3.5.1.1) wurde Doxorubicin mit BSA bzw. RNase A als Trägermolekül konjugiert. Dazu wurde zunächst 0,9 mg (1,6 µmol) Doxorubicin in 97,3 µl DMF (über Molekularsieb 0,4 nm Perlform dehydratisiert) gelöst und mit einem Moläquivalent der sterisch gehinderten Base N-Ethyldiisopropylamin (entsprechend 2,7 µl einer 1/10-Verdünnung der 5,8 M Stammlösung in wasserfreiem DMF) für 15 min lichtgeschützt bei RT auf einem Rollenmischer vorinkubiert. Die Synthese des Glutarylamido-Doxorubicin erfolgte durch portionsweise Zugabe von 0,175 mg (1,6 µmol) Glutarsäureanhydrid (MerckKGaA, Darmstadt) und

lichtgeschützte Inkubation bei RT auf einem Rollenmischer für insgesamt 3 h. Der Nachweis der Umsetzung erfolgte per Dünnschichtchromatographie (siehe Abschnitt 2.8.2) unter Verwendung eines 1/1 (*v/v*) $CHCl_3$/MeOH-Lösungsmittelgemisches. Bei nicht quantitativer Umsetzung mit dem Anhydrid wurden gegebenenfalls weitere Portionen des Reagens zugegeben; bis zur vollständigen Produktbildung nach erfolgter Inkubation (siehe oben). Die weitere Umsetzung wurde mittels Inkubation (siehe oben) mit zunächst 0,2 mg (1,6 µmol) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid (EDC) (MerckKGaA, Darmstadt) und anschließend 0,125 mg (1,6 µmol) N-Hydroxysuccinimid durchgeführt. Das erhaltene reaktive Doxorubicin-Derivat wurde dann direkt für die Kopplungsreaktion mit den Trägerproteinen eingesetzt. Dazu wurden ~10,0 mg (0,16 µmol) BSA (entsprechend einer 10/1-Stöchiometrie Doxo-NHS/BSA) und 5,0 mg (0,4 µmol) RNase A (entsprechend einer 4/1-Stöchiometrie Doxo-NHS/RNase A) in 1,0 ml 5% (*w/v*) $NaHCO_3$ pH 8,1 gelöst und die Lösung der reaktiven Doxorubicin-Konjugate langsam unter Rühren zupipettiert. Nach 3 h Inkubation bei RT lichtgeschützt auf dem Rollenmischer wurde der Reaktionsansatz zur Abtrennung überschüssiger Reaktanden auf eine mit PBS äquilibrierte PD-10-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 1,5 ml PBS gespült, das Konjugat mit 3 ml PBS eluiert und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Anhand der Absorption der Doxorubicingruppe bei 495 nm ($\varepsilon_{Doxo495}$ = 8030 $M^{-1}cm^{-1}$) wurde der Beladungsgrad B unter Berücksichtigung der Absorption A des Doxorubicins bei 280 nm ($\varepsilon_{Doxo280}$ = 5814 $M^{-1}cm^{-1}$) und des resultierenden Korrekturfaktors $Q = \varepsilon_{Doxo280}/\varepsilon_{Doxo495}$ = 0,724 bestimmt (siehe Abschnitt 3.4.2). Der Beladungsgrad B ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen des Doxorubicins [D] und des jeweiligen Trägerproteins [P]:

$$B = \frac{[D]}{[P]} \tag{59}$$

mit

$$[D] = \frac{A_{495}}{\varepsilon_{Doxo495} \times d} \tag{60}$$

und

$$[P] = \frac{[A_{280} - (A_{495} \times Q)]}{\varepsilon_{P280} \times d} \tag{61}$$

wobei ε_{P280} = Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$] des jeweiligen Trägerproteins und d = Schichtdicke [cm] der Küvette. Es wurde typischerweise ein Beladungsgrad von 4,0 Doxorubicingruppen pro BSA-Molekül (66,3 kDa; ε_{P280} = 43 824 $M^{-1}cm^{-1}$ (Putnam, 1975)) bzw. 1,2 Doxorubicingruppen pro RNase A-Molekül (13,7 kDa; ε_{P280} = 9 500 $M^{-1}cm^{-1}$ (Gill & von Hippel, 1989)) erhalten.

2.8.4 Indirekte Kopplung von Doxorubicin an Streptavidin mittels Doxo-Biotin

Für den Einsatz als immobilisierbare Doxorubicin-Konjugate auf der Oberfläche der Polystyrol-Flügelstifte (siehe Abschnitt 2.3.3.1 und 3.5.2) wurde alternativ ein Komplex aus Doxo-Biotin/Streptavidin verwendet.

Das benötigte Streptavidin lag für die vorliegende Arbeit bereits gereinigt als lösliches, tetrameres *Core*-Protein mit einer molaren Masse von 13,3 kDa pro Untereinheit in PBS Puffer vor (siehe Abschnitt 3.4.2; freundlicherweise von M. Gebauer zur Verfügung gestellt). Die Herstellung erfolgte cytoplasmatisch in *E. coli* durch Expression des natürlichen, die Aminosäuren Glu^{14} bis Ser^{139} kodierenden Strukturgens aus *S. avidinii* (Schmidt & Skerra, 1994b). Vorteile dieser verkürzten Version gegenüber dem natürlicherweise vorkommenden Protein waren erhöhte Löslichkeit, verringerte Oligomerisierungstendenz und verbesserte Proteolyseresistenz (Schmidt & Skerra, 1994b). Das tetramere Protein wurde durch Rückfaltung aus Einschlusskörpern mit Ausbeuten von bis zu 140 mg/L-Kultur gewonnen. Die Bindungskapazität für Biotin betrug dabei 0,88 Moleküle pro Untereinheit und zeigte damit die gute sterische Zugänglichkeit der Bindungstasche des rekombinanten *Core*-Proteins (Schmidt & Skerra, 1994b).

Das eingesetzte Streptavidin wurde vor Inkubation mit dem Biotin-Konjugat filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm), um Aggregate abzutrennen. Im Anschluss wurde die Konzentration des rekombinanten Streptavidins durch spektroskopische Messung der Absorption bei 280 nm (siehe Abschnitt 2.6.3) mittels des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 35600\ M^{-1}cm^{-1}$ bestimmt (Schmidt & Skerra, 1994b; Scopes, 1974). Die Bildung des Komplexes wurde durch lichtgeschützte Inkubation bei RT von 84,0 mg (6,3 µmol) Streptavidin (bezogen auf das Monomer des Proteins) mit einem Moläquivalent Doxo-Biotin (siehe Abschnitt 2.8.1) in einem Gesamtvolumen von 10,0 ml während eines Zeitraumes von 1 h auf dem Rollenmischer ausgebildet. Das Moläquivalent wurde in diesem Fall auf die Zahl in Lösung befindlicher, bindungsaktiver Biotingruppen gerechnet.

Die Abtrennung überschüssigen, nicht gebundenen Doxo-Biotins erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie über eine Sephacryl™-300 HR Säule (siehe Abschnitt 2.6.1.2 und 3.4.2). Anhand der Absorption wurde, wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben, der Beladungsgrad bestimmt. Vor dem Einsatz als Kompetitor gebundener Phagemide während der *Phage Display*-Selektion wurde der Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplex entsprechend der gewünschten Doxorubicinkonzentration konzentriert (siehe Abschnitt 2.6.5, 2.3.3.1 und 2.3.3.3).

2.9 Computerprogramme und Datenbanken

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

Die Auswertung von Messdaten physikochemisch/biophysikalischer Analysen erfolgte mit den Programmen KaleidaGraph® V 3.6 (Synergy Software, Reading, USA) oder Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) unter Verwendung des Zusatz-

moduls *Solver* (Brown, 2006). Die Daten der isothermen Titrationskalorimetrie wurden direkt mit dem im Datenanalyseprogramm Origin™ integrierten Modul VP™-ITC Version 7.0383 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) ausgewertet und anschließend graphisch mit KaleidaGraph® V 3.6 (siehe oben) aufbereitet. Die Daten der dreidimensionalen Fluoreszenzabtastung des Doxorubicins wurde mit dem Programm FL WinLab 4.0™ (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) durchgeführt.

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

Die Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden mit der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) und den über den *ExPASy-Molecular Biology Server* (Gasteiger *et al.*, 2005) frei zugänglichen Analyseprogrammen, wie z.B. *ProtParam* untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Der Ligand Doxorubicin

3.1.1 Die Fluoreszenz des Doxorubicins

Die Fluoreszenzeigenschaften des in dieser Arbeit als Ligand dienenden Anthrazyklin-Chemotherapeutikums Doxorubicin (Doxo) (λ_{Ex} = 470 nm, λ_{Em1} = ~ 560 nm and λ_{Em2} = 585 – 590 nm) hängen erheblich von der Polarität seiner molekularen Umgebung ab. Der Chromophor unterliegt einer inversen Solvatochromie, bei der mit abnehmender Dielektrizitätskonstante ε des Lösungsmittels bis zu einem Schwellenwert von 12, das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten λ_{Em1} und λ_{Em2} auf ein Minimum sinkt, bevor mit weiter abnehmender Dielektrizitätskonstante der gegenteilige Effekt eintritt (Karukstis *et al.*, 1998).

Deshalb wurden nachweisbare Auswirkungen auf die Fluoreszenzemission des Liganden bei einer Komplexierung innerhalb der hydrophoben Bindungstasche eines dafür künstlich geschaffenen Anticalins erwartet (Pietrzak *et al.*, 2003). In dem näherungsweise physiologischen Puffer PBS/E pH 7,4 bei konstanter Temperatur von 25 °C wurde aus dem Spektrum der Fluoreszenzemission bei variierender Anregungswellenlänge ein Optimum der Anregung bei 472 nm und der Emission bei etwa 590 nm beobachtet, wie schon von Andreoni (1992) in Phosphatpuffer mit pH 7,4 beschrieben (Abbildung 7).

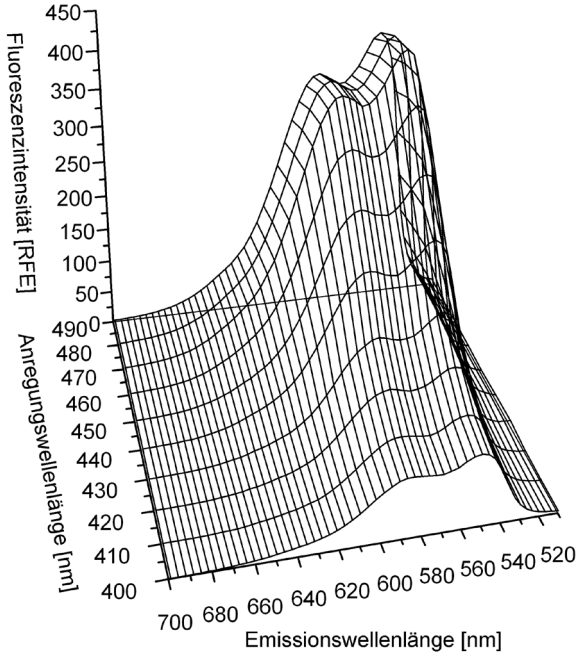

Abbildung 7: Dreidimensionales Fluoreszenzspektrum von Doxorubicin; das Anregungs-/Emissions-Fluoreszenzspektrum des Doxorubicins wurde bei einer Konzentration von 5,0 µM des Fluorophors in PBS/E pH 7,4 aufgenommen (siehe Abschnitt 2.7.4.1).

3.1.2 Die Selbstassoziation des Doxorubicins

Einen limitierenden Faktor für den direkten Einsatz als Fluoreszenzprobe stellt jedoch die Tendenz des Anthrazyklins zur Selbstassoziation in wässriger Lösung dar. Dieses Phänomen beruht auf der Stapelung der planaren, aromatischen Anthrachinonringe zweier Doxorubicinmoleküle und wird im Wesentlichen durch intermolekulare Wechselwirkungen der beteiligten π-Elektronensysteme vermittelt (Hayakawa et al., 1991). Das Selbstassoziationsverhalten des Doxorubicins wurde mittels Absorptions- und Fluoreszenzmessung sowie isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht.

3.1.2.1 Selbstassoziation von Doxorubicin – Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsmessung des Doxorubicins wurde im Konzentrationsbereich 1,0 – 300 µM nach Verdünnung einer frisch hergestellten 2,0 mM Stammlösung des Chromophors (in DMF) in PBS/E pH 7,4 durchgeführt. Bei höheren Konzentrationen wurde in diesem Puffer eine Präzipitation des Doxorubicins beobachtet. Zur Absorptionsmessung wurde sowohl die Wellenlänge mit 472 nm als auch die Temperatur bei 25 °C konstant gehalten. Die halblogarithmische Auftragung des, aus der apparenten Absorption bei der jeweiligen Doxorubicinkonzentration berechneten, molaren Extinktionskoeffizienten gegen die Doxorubicinkonzentration zeigte ausgehend von einem oberen Plateau-Wert bei niedriger Chromophorkonzentration mit zunehmender Konzentration eine Abnahme des Koeffizienten bis hin zu einem unteren Plateau-Wert (Abbildung 8). Dies deutete auf ein Assoziationsgleichgewicht hin.

Durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (13) wurde für ein Monomer-Dimer-Modell der Selbstassoziation im Gleichgewicht eine Dissoziationskonstante von 14,8 ± 0,3 µM erhalten. Der Extinktionskoeffizient des Monomers gleichbedeutend der Asymptote bei unendlicher Verdünnung entsprach $\varepsilon_M = 13{,}10 \pm 0{,}09 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$. Der Wert des Dimers entsprechend der Asymptote bei hohen Doxorubicinkonzentrationen hatte einen Wert von $7{,}91 \pm 0{,}02 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$. Von Menozzi (1984) wurde durch Absorptionsmessung eine Dissoziationskonstante von 43,9 ± 4,6 µM für das Dimer mit Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_M = 13{,}08 \pm 0{,}08 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ und $\varepsilon_D = 8{,}15 \pm 0{,}15 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$ für die monomere bzw. dimere Spezies beobachtet. Die in dieser Arbeit bestimmten Extinktionskoeffizienten waren mit dem Literaturwert also nahezu identisch, wohingegen die hier erhaltene Dissoziationskonstante um den Faktor 3 niedriger lag.

^{1}H-NMR-Experimente (Evstigneev *et al.*, 2006) und Gleichgewichts-Sedimentationsmessungen (Eksborg, 1978) legen für Anthrazykline höhere Aggregationsgrade als Dimere nahe. Tatsächlich sollte die Selbstassoziation der Doxorubicinmoleküle sterisch nicht limitiert sein, da für die Daunosaminzuckerreste eine helikale Anordnung in der Peripherie der übereinander liegenden Ringsysteme angenommen werden kann (Bouma *et al.*, 1986; Chaires *et al.*, 1982; Li *et al.*, 1998). Die Wechselwirkung der ungeladenen aromatischen Ringe zweier

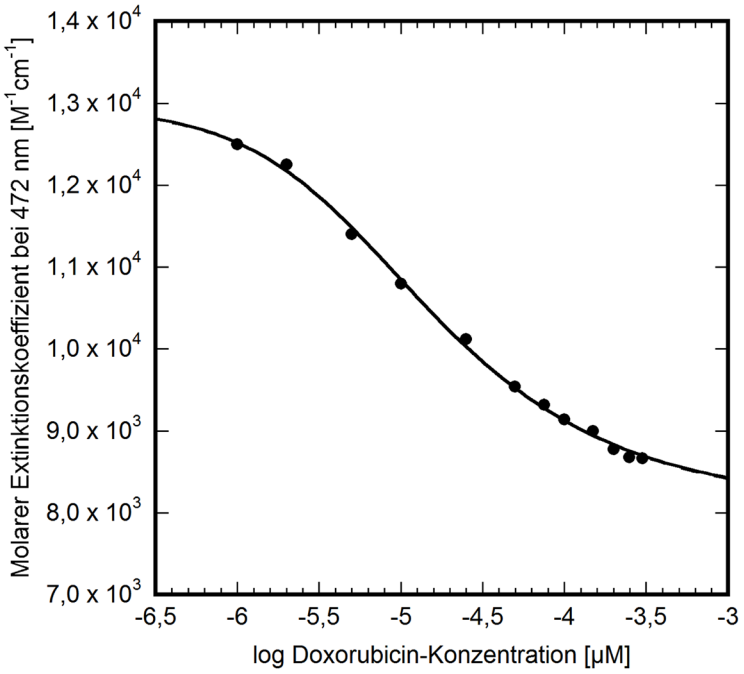

Abbildung 8: Untersuchung der Selbstassoziation des Doxorubicins mittels Absorptionsspektroskopie; die Absorption des Doxorubicins wurde bei einer Wellenlänge von 472 nm durch Verdünnung in PBS/E pH 7,4 in einem Konzentrationsbereich von 1,0 – 300 µM bestimmt. Aus den, um den Leerwert des Puffers bereinigten Absorptionswerten, wurde der Extinktionskoeffizient der Doxorubicinlösung bei der jeweiligen Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz Gleichung (1) berechnet. Nach halblogarithmischer Auftragung des Extinktionskoeffizienten gegen die Doxorubicinkonzentration wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse die Dissoziationskonstante K_D sowie die Extinktionskoeffizienten ε der Selbstassoziationsprodukte ermittelt (siehe Abschnitt 2.7.3). Die mittels des (- -) Monomer-Dimer-Modells der Selbstassoziation nach Gleichung (13) und des (—) isodesmischen Modells nach Gleichung (40) erhaltenen Kurvenanpassungen waren nahezu deckungsgleich.

Doxorubicinmoleküle ist im Wesentlichen auf *Very Short-Range Forces* zurückzuführen, weshalb ein indefinites Bindungsmodell mit isodesmischer Konstante physikalisch sinnvoll erscheint (Evstigneev *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 1988; Martin, 1996; Rodriguez *et al.*, 1995). Aus Gleichung (40) ist ersichtlich, dass die Kettenverlängerung des Polymers dabei unbegrenzt mit gleicher Bindungskonstante für jedes neu an das bereits vorhandene Polymer assoziierende Monomer voranschreitet. Die Auswertung der Absorptionsmessung (Abbildung 8) mittels dieses isodesmischen Modells (Rodriguez *et al.*, 1995) offenbarte in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Fluoreszenzmessung (siehe Abschnitt 3.1.2.2) eine niedrigere Dissoziationskonstante von 7,92 ± 0,02 µM. Der berechnete Extinktionskoeffizient des Monomers betrug praktisch unverändert 13,10 ± 0,06 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$. Die im Inneren des Polymerstapels liegenden Doxorubicinmoleküle zeigten mit ε_{int} = 7,92 ± 0,04 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (Gleichung (14), (15) und (17)) erwartungsgemäß einen niedrigeren Koeffizienten als die Moleküle an den Rändern ε_{ext} = 10,04 ±0,20 x 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (Gleichung (14), (15) und (16)). Wegen der Additivität von ε_{kalk} nach Gleichung (14) und der *Nearest Neighbour*-Annahme, wonach jeglicher Kontakt zwischen zwei in einem Stapel befindlichen, benachbarten Molekülen – unabhängig vom angenommen Assoziationsmodell – einen Beitrag zu ε_{kalk} leistet, können die beiden untersuchten Selbstassoziationsmodelle nicht aufgrund der Qualität

der Kurvenanpassung mittels Absorptionsspektroskopie erhaltener Messwerte unterschieden werden (Evstigneev *et al.*, 2012; Martin, 1996). Vielmehr führt diese Tatsache zur beobachteten Deckungsgleichheit bei der Kurvenanpassung beider Modelle (Abbildung 8). Aus Gleichung (7) und (40) geht zudem hervor, dass beide Selbstassoziationsmodelle abgesehen von einem Faktor 2 algebraisch identisch sind und daher wie auch hier beobachtet für die resultierende Dissoziationskonstante $K_{DDim} = 2K_{DIso}$ bzw. für $\Delta\varepsilon = \varepsilon_M - \varepsilon_D = 2(\varepsilon_M - \varepsilon_{ext})$ gilt (Evstigneev *et al.*, 2012).

3.1.2.2 Selbstassoziation von Doxorubicin – Fluoreszenzspektroskopie

Die relative Intensität der Fluoreszenzemission des bei 472 nm monochromatisch angeregten Doxorubicins in PBS/E pH 7,4 wurde bei 585 nm erfaßt (siehe Abschnitt 2.7.4.3). Die graphische Darstellung der bei konstanter Temperatur von 25 °C gemessenen Fluoreszenzemission ist selbst im niedrigen Konzentrationsbereich von 0 – 10 µM Doxorubicin nicht-linear und zeigt extrapoliert eine Sättigungskurve (Abbildung 9). Die apparente Fluoreszenzintensität wich in Übereinstimmung mit den Befunden von Karukstis (1998) bei 10 µM Doxorubicin bereits um mehr als 50 % von der Linearität ab. Der im Verlauf des Titrationsexperiments auf eine Endkonzentration von 1 % zunehmende DMF-Gehalt wurde dabei vernachlässigt und hätte allenfalls die Löslichkeit des Doxorubicins in der Pufferlösung erhöht. Rapoport & Pitina (1998) fanden eine Linearitätsabweichung dieses Ausmaßes erst ab ~ 70 µM. Demgegenüber wurde die Abnahme der Fluoreszenzintensität des C14-Dehydroxy-Derivats Daunorubicin ebenso bereits in dem Konzentrationsbereich um 10 µM beobachtet und als Ergebnis nicht-fluoreszenter Selbstassoziationsprodukte interpretiert (Chaires *et al.*, 1982; Karukstis *et al.*, 1998; Martin, 1980). Auch die Selbstassoziation des Doxorubicins wurde einem nicht-fluoreszente Polymere bildenden Prozess zugeschrieben (Karukstis *et al.*, 1998; Rizzo *et al.*, 1989), wodurch die *Nearest Neighbour*-Prämisse (siehe Abschnitt 3.1.2.1) für die hier durchgeführte Fluoreszenzmessung nicht zutrifft.

Die nicht-lineare Regressionsanalyse mittels des Monomer-Dimer-Modells in Gleichung (35) (Abbildung 9; gestrichelte Kurve) zeigte im Vergleich zum isodesmischen Modell der Polymerisation nach Gleichung (34) und (40) (Abbildung 9; durchgezogene Kurve) eine stärkere Abweichung von den gemessenen relativen Fluoreszenzintensitäten. In der Tat war in beiden Fällen eine physikalisch sinnvolle Kurvenanpassung nur bei Interpretation der monomeren Spezies als einzig fluoreszierendem Molekül in Lösung möglich, weshalb Dimerisierung als oberster Assoziationsgrad wegen der höheren Signifikanz der isodesmischen Kurvenanpassung unwahrscheinlich war. Die resultierende Dissoziationskonstante des Monomer-Dimer-Modells betrug 2,54 ± 0,72 µM und wich damit um den Faktor 6 von dem bei der Absorptionsmessung – unter identischen Pufferbedingungen – erhaltenen Wert ab. Dagegen war die Dissoziationskonstante der isodesmischen Anpassung mit 11,0 ± 0,4 µM dem Wert der Absorptionsmessung vergleichbar. Die von Rizzo (1989) mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesene Selbstassoziation des Doxorubicins folgte – unter anderen Pufferbedin-

gungen – im Einklang mit vorliegender Arbeit ebenso einer isodesmischen Polymerisation mit einer Dissoziationskonstante von 22,7 µM, wohingegen die dort bestimmte Dissoziationskonstante für die Dimerisierung bei 13,7 µM lag.

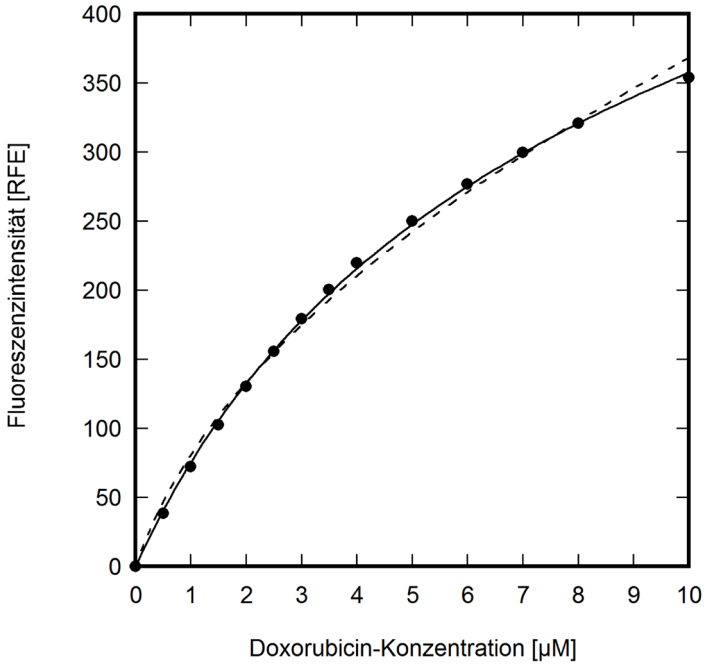

Abbildung 9: Untersuchung der Selbstassoziation des Doxorubicins mittels Fluoreszenzspektroskopie; die konzentrationsbedingte Abnahme der bei 472 nm angeregten intrinsischen Fluoreszenz des Doxorubicins wurde durch Titration des Fluorophors in den Puffer PBS/E pH 7,4 bis zu einer Endkonzentration von 10,0 µM bei 585 nm verfolgt. Nach Abzug des Fluoreszenzbeitrags des Puffers wurden die erhaltenen relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Gesamtkonzentration des Doxorubicins aufgetragen und durch nicht-lineare Regressionsanalyse die Dissoziationskonstante K_D der Selbstassoziation und die molare Fluoreszenz f_L des monomeren Doxorubicins ermittelt (siehe Abschnitt 2.7.4.3). (- -) Monomer-Dimer-Modell der Selbstassoziation nach Gleichung (35), (—) isodesmisches Modell nach Gleichung (34) und (40).

Als Konsequenz dieses ausgeprägten Selbstassoziationsverhaltens wurde, soweit experimentell möglich, bei den späteren Untersuchungen der Komplexierung des Doxorubicins durch Biomakromoleküle eine Liganden-Endkonzentration von 5,0 – 10,0 µM nicht überschritten (Husain *et al.*, 1993). Bei entsprechend hochaffiner Bindungsaktivität des makromolekularen Partners gegenüber Doxorubicin sollte das Selbstassoziationsverhalten in diesem Konzentrationsbereich vernachlässigbar sein.

3.1.2.3 Selbstassoziation von Doxorubicin – isotherme Titrationskalorimetrie

Ausgehend von einer hochkonzentrierten 3,75 mM Stammlösung des polymerisiert vorliegenden Doxorubicins in deionisiertem Wasser wurde das Dissoziationsverhalten des Haptens mittels isothermer Titration in die den Puffer (50 mM Hepes/NaOH-Puffer pH 7,4) enthaltende Messzelle des Kalorimeters bei 25 °C bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.2).

Die Auftragung der Wärmeänderung pro Mol injiziertem Doxorubicin gegen die Doxorubicinkonzentration in der Messzelle wies im Einklang mit der angenommenen indefiniten isodesmischen Selbstassoziation einen hyperbolischen Verlauf auf (Abbildung 10). Die bei

einem solchen Titrationsexperiment beobachteten endothermen Verdünnungswärmen sind charakteristisch für Dissoziationsreaktionen (McPhail & Cooper, 1997). Wie bereits für die UV-/Vis-Spektroskopie (siehe Abschnitt 3.1.2.1) gezeigt wurde, ist auch mittels kalorimetrisch bestimmter Messwerte, die einen Selbstassoziationsprozess beschreiben, keine Unterscheidung zwischen Dimerisierung und isodesmischer Polymerisation anhand der Kurvenanpassung möglich (Buurma & Haq, 2007; Martin, 1996; McPhail & Cooper, 1997; Stoesser & Gill, 1967). Deshalb wurde für die nicht-lineare Regressionsanalyse das in der VP™-ITC Version 7.0 des Datenanalyseprogramms Origin™ integrierte Monomer-Dimer-Modell nach Gleichung (7), (8) und (9) benutzt und die so erhaltenen Werte für die Enthalpieänderung ΔH und die Dissoziationskonstante K_D dem isodesmischen Modell angepasst (siehe Abschnitt 2.7.2 und 2.9). Die Enthalpieänderung der exothermen Assoziationsreaktion entspricht dabei $\Delta H_{Iso} = \Delta H_{Dim}/2$ und die Dissoziationskonstante $K_{DIso} = K_{DDim}/2$.

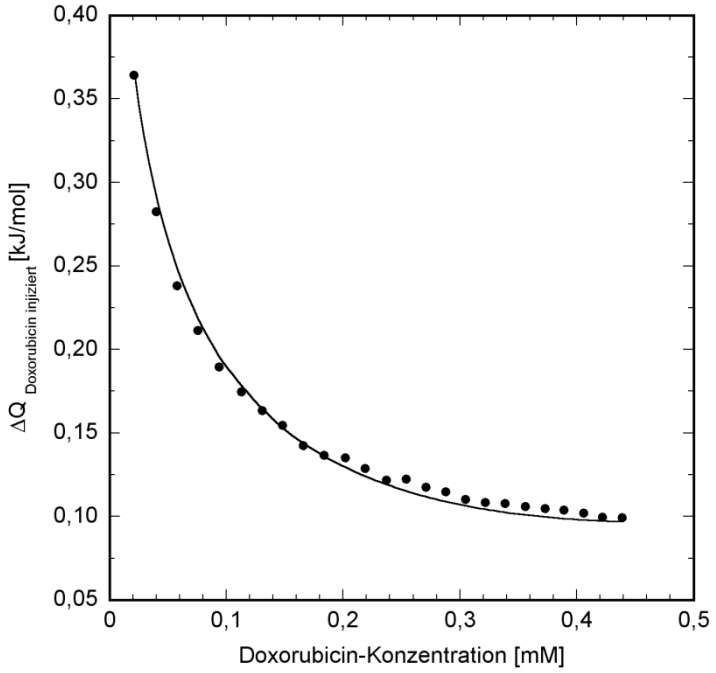

Abbildung 10: Untersuchung der Selbstassoziation des Doxorubicins mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC); Messung der Wärmeänderung ΔQ [kJ/mol] bei Verdünnung einer konzentrierten Lösung des Doxorubicins in die mit Puffer (50 mM Hepes/NaOH pH 7,4) gefüllte Probenzelle bei 25 °C. Die Titration wurde ausgehend von 3,75 mM Doxorubicin in H_2O (Millipore) in Schritten von je 7,0 µl bei einer Durchmischung der Probenzelle mit 310 *rpm* durchgeführt. Die dabei erhaltenen Verdünnungswärmen wurden zunächst um die Werte einer analog durchgeführten Referenzmessung durch Titration von H_2O (Millipore) in den Puffer bereinigt. Anschließend wurden die Dissoziationskonstante K_D und $\Delta H_{Dissoz} = -(\Delta H_{Dim})$ graphisch durch nicht-lineare Regression bestimmt (siehe Abschnitte 2.7.2 und 2.9).

Die Enthalpieänderung ΔH_{Dim} betrug $-38{,}16 \pm 0{,}33$ kJ/mol und $\Delta H_{Iso} = -19{,}08 \pm 0{,}17$ kJ/mol bei einer K_{DDim} von 246 ± 9 µM und K_{DIso} von 123 ± 5 µM. Mit den experimentell bestimmten Werten der Enthalpie und der Assoziationskonstante wurden die freie Enthalpie ΔG und die Entropieänderung ΔS des Assoziationsprozesses unter den vorliegenden Standardbedingungen berechnet (Gleichung (10)). ΔG_{Dim} betrug dabei –

20,60 kJ/mol und $\Delta S_{Dim} = -58{,}82\ J\ mol^{-1}K^{-1}$. ΔG_{Iso} entsprach −22,32 kJ/mol bei einer Entropieänderung von $\Delta S_{Iso} = +10{,}86\ J\ mol^{-1}K^{-1}$. Die Selbstassoziation des Doxorubicins ist folglich unter den vorliegenden Versuchsbedingungen aufgrund des negativen ΔH-Werts ein enthalpiegetriebener Prozess, der bedingt durch den negativen Wert der freien Enthalpie exergon ist und somit einer freiwillig ablaufenden Reaktion entspricht (Atkins & De Paula, 2005). Die assoziative Stapelung planarer, aromatischer Ringsysteme ist vielfach als enthalpiegetriebener Prozess beschrieben (Bouma *et al.*, 1986; Chaires *et al.*, 1982; Evstigneev *et al.*, 2006; Martin, 1996). Zur thermodynamischen Stabilität des Assoziationskomplexes trägt grundsätzlich auch ein positiver Wert der Entropie bei. Jedoch erhöht sich im Verlauf der Selbstassoziation und damit verbundener Einschränkung der Freiheitsgrade der einzelnen Doxorubicinmoleküle die Ordnung, wodurch sich ΔS erniedrigt (Jelesarov & Bosshard, 1999). Dieser Effekt ist erkennbar am negativen Entropiewert der Dimerisierung. Durch einen anzunehmenden höheren Desolvatisierungsgrad bei isodesmischer Polymerisation könnte es hier zu einer Überkompensation der negativen Entropie kommen und dazu führen, dass die Komplexbildung hier insgesamt auch entropisch begünstigt ist (Jelesarov & Bosshard, 1999; Rether, 2010).

In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erhaltenen thermodynamischen Daten wurde zuvor von McLennan (1985) mittels NMR allerdings für ein Dimerisierungsmodell die freie Enthalpie ΔH zu −14,44 kJ/mol bei einer Entropieänderung ΔS von $+12{,}56\ J\ mol^{-1}K^{-1}$ des Doxorubicins bestimmt. Der im Vergleich zur Absorptions- und Fluoreszenzmessung um mehr als den Faktor 10 höhere Wert der isodesmischen Dissoziationskonstante der Doxorubicin-Polymerisation läßt sich mit den geringeren kosmotropen Eigenschaften des Hepes-Puffers im Vergleich zu PBS/E erklären (Salay & Schreier, 2004). Zur eindeutigen Klärung bedarf es jedoch einer analog durchzuführenden kalorimetrischen Bestimmung in PBS/E-Puffer. Diese wurde hier nicht vorgenommen, da die kalorimetrische Bestimmung der Selbstassoziation im Wesentlichen zur Vorbereitung auf die ITC-Messung der Komplexierung des Doxorubicins durch die selektierte BBP-Variante F1K27 (siehe Abschnitt 3.6) – die jedoch ergebnislos blieb – diente. Kalorimetrische Bindungsstudien erfordern in der Regel hohe Konzentrationen beider Komplexierungspartner in Lösung (Turnbull & Daranas, 2003); sowohl die Löslichkeit der Proteine in ihrer nativen Tertiärstruktur als auch die monomere Form des Liganden muss dabei gewährleistet sein. Außerdem darf der Puffer nur eine niedrige Protonierungswärme aufweisen (Baker & Murphy, 1996), weshalb 50 mM Hepes/NaOH-Puffer pH 7,4 verwendet wurde. Andererseits konnte dieser Puffer nicht durchgängig verwendet werden, da die Laborroutine zeigte, dass er für eine stabile, längerfristige Lagerung der BBP-Varianten bei 2 – 8°C nicht geeignet war.

3.2 Lipocaline – Ein Faltungsmuster für künstliche Bindeproteine zur Komplexierung des Liganden Doxorubicin

Die Proteinfamilie der Lipocaline ist weit verbreitet und dient in vielen Organismen dem Transport und der Speicherung schlecht löslicher oder chemisch labiler Vitamine, Hormone und Sekundärmetaboliten (Åkerström *et al.*, 2000). Doxorubicin zeigt hinsichtlich seiner geringen Größe, mit einer molaren Masse von 543,52 g/mol, und wegen seines hydrophoben Charakters ähnliche Eigenschaften wie die nativen Lipocalinliganden und sollte deshalb, wenn auch mit moderater Affinität, bereits durch natürliche Lipocaline komplexiert werden können. Das Bindungsverhalten einer Reihe natürlicher Lipocaline gegenüber Doxorubicin wurde durch Protein-Fluoreszenztitration (siehe Abschnitt 2.7.4.2) untersucht. Fünf Lipocaline, AGP, BBP, NGAL, RBP und TLC, wurden mit Doxorubicin bis zu einer Endkonzentration von 10,0 µM titriert. Alle Proteine zeigten ein geringes *Quenching* ihrer Primärfluoreszenz im Bereich von etwa 3 – 9 %, wobei das TLC den geringsten und das AGP den stärksten *Quenching*-Effekt erfuhren (Abbildung 11A). Dies deutete insgesamt auf eine niedrige, aber signifikante Bindungsaffinität der Lipocaline für diesen Liganden hin.

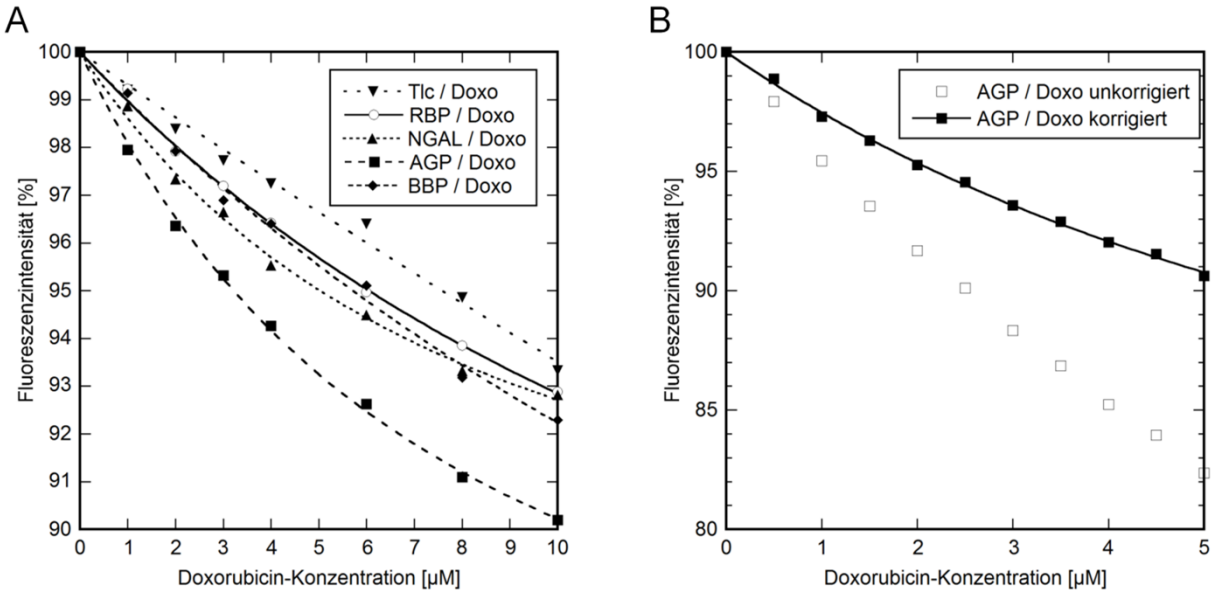

Abbildung 11: Fluoreszenztitration der Lipocaline AGP, BBP, NGAL, RBP und Tlc mit Doxorubicin; die Proteine wurden in *E. coli* produziert und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt (freundlicherweise von D. Breustedt und D. Schönfeld in homogener Form zur Verfügung gestellt; (Breustedt *et al.*, 2006)). Eine 1,0 µM Lösung (**A**) jedes der Lipocaline in PBS/E pH 7,4 wurde mit Doxorubicin bis zu einer Endkonzentration von 10 µM titriert. Dabei wurde die Abnahme der Proteinfluoreszenz bei der Trp-Anregungswellenlänge von 295 nm und der Emissionswellenlänge 345 nm in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration verfolgt. Die Anpassung der um den Puffer-Leerwert bereinigten und auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % skalierten Messwerte erfolgte nach Korrektur des inneren Filtereffekts des Doxorubicins – in (**B**) am Beispiel des AGP als Einfluss der Eigenabsorption des Doxorubicins bei 295 nm gezeigt – durch nicht-lineare Regression mittels Gleichung (31).

Die stärkste Fluoreszenzlöschung mit einer Asymptote von 25,2 ± 2,0 % wurde für das α_1-*Acid Glycoprotein* (AGP) (Hochepied *et al.*, 2003) beobachtet. Die dabei ermittelte Dissoziationskonstante für Doxorubicin betrug 8,05 ± 0,95 µM. Damit war das AGP mit seiner im

Vergleich höchsten intrinsischen Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin das interessanteste der getesteten Lipocaline. Literaturwerte der Dissoziationskonstante des AGP/Doxorubicin-Komplexes variieren im Bereich von 10,8 – 108 µM (Chassany *et al.*, 1996; Finlay & Baguley, 2000; Husain *et al.*, 1993). Deshalb wurde die Bindung des Doxorubicins an AGP mittels Fluoreszenzanisotropie und Gleichgewichtsdialyse genauer untersucht.

3.2.1 Nachweis des AGP/Doxorubicin-Komplexes: Fluoreszenzanisotropie

AGP wurde aus dem Periplasmaextrakt mit den Plasmiden pAGP1 und pTUM4 transformierter MC4100Δ*skp*-Zellen (freundlicherweise von D. Schönfeld zur Verfügung gestellt) durch Reinigung mittels SA-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1.1) und nachfolgender Gelfiltration (siehe Abschnitt 2.6.1.2) mit hoher Reinheit (Abbildung 29) erhalten. Als Ausgangswert diente die nach Gleichung (53) berechnete Anisotropie r_f von 0,066 ± 0,001 einer 1,0 µM Lösung des freien Doxorubicins in PBS/E pH 7,4 bei 25 °C. Anschließend wurde die AGP/Doxorubicin-Komplexbildung nach Einstellung des Gleichgewichts in Mischungen bestehend aus 1,0 µM Doxorubicin mit zunehmenden AGP-Konzentrationen von 0 – 50 µM verfolgt. Die Anisotropie stieg dabei auf einen Wert r von 0,094 ± 0,020. Bei Auftragen der Anisotropie gegen die eingesetzte AGP-Konzentration wurde eine Sättigungskurve für die Bildung des AGP/Doxo-Komplexes erhalten (Abbildung 12).

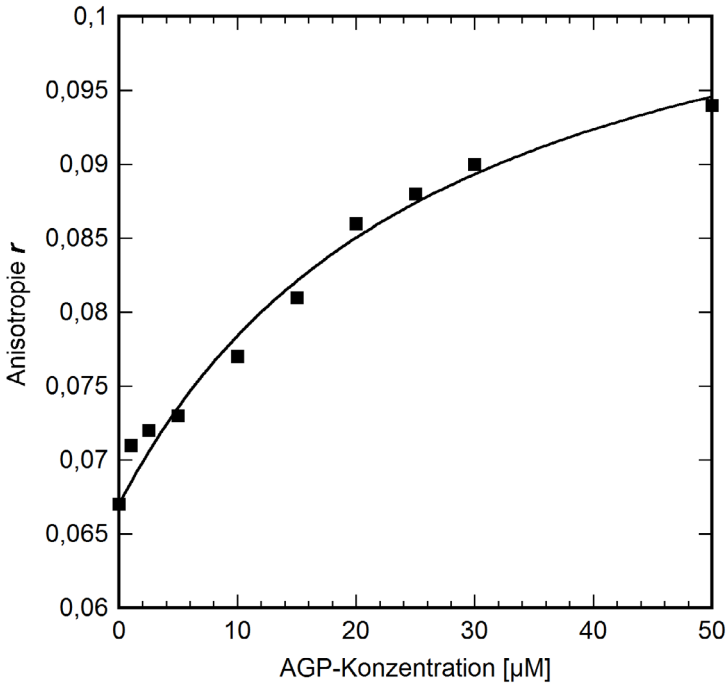

Abbildung 12: Fluoreszenzanisotropie zum Nachweis der AGP/Doxorubicin-Komplexbildung; Die Messung der Anisotropie des Hapten-Fluorophors Doxorubicin bei Komplexierung mit dem Protein erfolgte ausgehend von 1,0 µM Doxorubicin in PBS/E pH 7,4 mit unterschiedlichen Konzentrationen des Proteins von 0 – 50 µM in einem Gesamtvolumen von 150 µl. Das Ausmaß der Komplexbildung im Gleichgewicht als Ausdruck des Anisotropiewertes r wurde bei 25 °C bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm und einer Wellenlänge der Emission von 585 nm nachgewiesen. Die mittels Gleichung (53) berechnete Anisotropie r wurde gegen die AGP-Konzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression mittels Gleichung (56) die Dissoziationskonstante K_D, die Anisotropie des freien Liganden r_f und die maximale Anisotropie für den vollständig gebunden Liganden r_k ermittelt (siehe Abschnitt 2.7.4.5).

Der durch Kurvenanpassung mittels Gleichung (56) extrapolierte obere Plateau-Wert r_k der Anisotropie von 0,109 ± 0,005 entspricht dabei dem Wert für den vollständig komplexierten Liganden. Die erhaltenen Ergebnisse stimmten mit den von Husain (1993) mittels Fluoreszenzanisotropie ermittelten Werten von $r_f = 0{,}07$ und $r_k = 0{,}12$ für den Komplex aus glykosyliertem AGP mit Doxorubicin weitestgehend überein. Die in vorliegender Arbeit beobachtete starke Abweichung des r_k-Werts vom theoretischen Maximalwert von 0,40 der fundamentalen Anisotropie, die die Abwesenheit von Depolarisationseffekten und somit den in seiner Rotationsdiffusion komplett eingeschränkten Liganden beschreibt (Burke & Tritton, 1985), bedeutete vermutlich eine schwache Komplexierung des Doxorubicins in der Bindungstasche des AGP (Husain *et al.*, 1993). Dazu passte auch die hier mittels Gleichung (56) bestimmte moderate Affinität des AGP gegenüber Doxorubicin mit einer Dissoziationskonstante von 26,3 ± 5,8 µM, die um den Faktor 3 höher als bei der Proteinfluoreszenztitration (siehe Abschnitt 3.2) war.

3.2.2 Nachweis des AGP/Doxorubicin-Komplexes: Gleichgewichtsdialyse

Die Gleichgewichtsdialyse wurde mit jeweils 100 µM AGP und variierenden Doxorubicinkonzentrationen im Bereich von 5,0 – 200 µM in einem Gesamtvolumen von 75 µl durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.1). Nach Gleichgewichtseinstellung bei 25 °C für 24 h erfolgte eine Absorptionsmessung bei 472 nm, wodurch unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes nach Gleichung (1) jeweils die Konzentration des Doxorubicins auf der Proteinseite (AGP-ligandenbeladen und unbeladen) und der korrespondierenden Pufferkammerseite (unkomplexierter Ligand) bestimmt wurde. Zur Berechnung wurde als Extinktionskoeffizient vereinfacht der Wert für ε_{intern} des indefiniten Polymerisationsmodells aus Abschnitt 3.1.2.1 mit 7920 $M^{-1}cm^{-1}$ verwendet. Dies erschien wegen der eingesetzten Ligandenkonzentration von bis zu 200 µM sinnvoll, um den Effekt der Selbstassoziation des Doxorubicins (siehe Abschnitt 3.1.2.1) zu berücksichtigen.

Bei Auftragen der Konzentration des mit dem AGP komplexierten Doxorubicins – ausgedrückt als Sättigungsgrad des Proteins mit dem Liganden in Prozent – gegen die Konzentration an frei in Lösung befindlichem Liganden wurde die erwartete Sättigungskurve (Abbildung 13A) mit einer Dissoziationskonstante von 68,4 ± 7,4 µM (Gleichung (3)) erhalten. Im Einklang mit einer einzelnen Bindungsstelle innerhalb des AGP (100 µM) näherte sich die Konzentration des gebundenen Liganden asymptotisch einem Wert von 93,0 ± 5,1 µM. Die eingesetzte Konzentration des Proteins betrug 100 µM. Deutlich erkennbar wurde die 1/1-Stöchiometrie des AGP/Doxo-Komplexes bei doppelt reziproker Auftragung, dem sogenannten Scatchard-*Plot* (Scatchard, 1949b), dessen Ausgleichsgerade einen Abszissenschnittpunkt von 0,96 (Gleichung (4)) – bei einer Dissoziationskonstante von 73,2 ± 0,4 µM – aufwies, was nur geringfügig von dem theoretischen Wert 1,0 für eine einzige Bindungsstelle abwich (Abbildung 13B).

Die Interpretation einer einzigen Bindungsstelle des AGP für Doxorubicin wird durch frühere Absorptions- und Fluoreszenzstudien von Husain (1993) gestützt. Auch hat wohl die 24-stündige Inkubationsdauer des Doxorubicins bei Raumtemperatur – während der Einstellung des Gleichgewichts – keine partielle Degradation des Chromophors und somit keine Verfälschung der Ergebnisse bewirkt (Eksborg *et al.*, 1982).

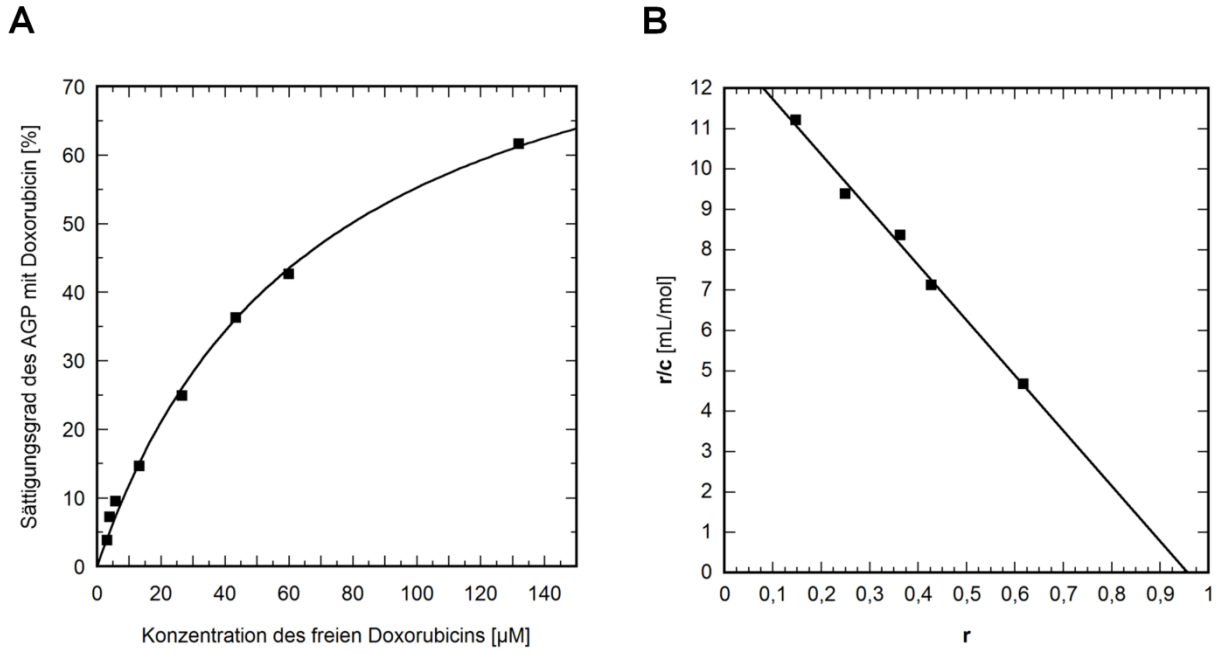

Abbildung 13: Gleichgewichtsdialyse zum Nachweis der AGP/Doxorubicin-Komplexbildung; (**A**) nichtlineare Regression gemäß Gleichung (3) und (**B**) lineare Regression gemäß Gleichung (4) (r entspricht dem Bruchteil des komplexierten Proteins; c ist die Konzentration des freien Haptens).

Um Doxorubicin für bioanalytische, biophysikalische oder medizinische Zwecke hochaffin komplexieren zu können, waren die genannten Lipocaline trotz nachgewiesener spezifischer Bindungsaktivität noch ungeeignet. Abhilfe verspricht das Protein-Engineering von Liganden-Bindungsproteinen, wie mit den sogenannten Anticalinen schon im Fall der Lipocaline erfolgreich demonstriert worden ist (Beste, 1998; Schlehuber, 2001). Die *In-vitro*-Evolution von Proteinen mit maßgeschneiderten Eigenschaften erfährt durch die Verknüpfung kombinatorischer biochemischer Methoden wie dem *Phage Display* mit dem rationalen Proteindesign hohe Effizienz. Eine sinnvolle Substitution der für die Bindung des Zielmoleküls verantwortlichen Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche eines Proteins setzt die Kenntnis seiner dreidimensionalen Struktur voraus. Für das als Gerüststruktur (Protein-*Scaffold*) geeignet erscheinende AGP fehlten diese Strukturdaten zum Zeitpunkt des Projektbeginns. Im Gegensatz dazu ermöglichte das Bilin-Bindungsprotein (BBP) mit seiner bekannten Kristallstruktur (Huber *et al.*, 1987) eine sinnvolle Auswahl der zu mutierenden Aminosäurepositionen und besaß deshalb vielversprechende Ausgangsbedingungen für die Komplexierung des Haptenliganden Doxorubicin durch ein maßgeschneidertes Anticalin.

3.3 Herstellung einer nativen BBP-Zufallsbiblothek

Da die durch kombinatorische Selektion, z.B. mit *Phage Display*, maximal erreichbare Affinität mit der Komplexität der eingesetzten molekularen Bibliothek korreliert (Perelson & Oster, 1979; Waterhouse *et al.*, 1993), wurde das hinsichtlich vieler Parameter bereits etablierte und optimierte BBP-Selektionssystem (Beste *et al.*, 1999; Schlehuber *et al.*, 2000) einer weiteren Feinjustierung unterzogen.

Um die bestehende, auf dem Strukturgen des Bilin-Bindungsproteins basierende Zufallsbibliothek in höchstmöglicher Komplexität zu präparieren, wurde durch Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.4.2) von 200 µg entsprechend 72,0 pmol des Phasmidvektors pBBP38 (Abbildung 3) mit *Bst*XI das natürliche BBP-Strukturgen ausgeschnitten, und das Vektorrückgrat isoliert. Gleichzeitig wurden durch zweistufige Polymerasekettenreaktion (PCR) die gewünschten Zufallsmutationen (Beste *et al.*, 1999) in die *bbp*-Sequenz eingeführt (siehe Abschnitt 1.5.1). 18,0 µg entsprechend 77,0 pmol des assemblierten *PCR*-Produktes wurden ebenfalls mit *Bst*XI geschnitten, um kompatible Enden zur gerichteten Inserierung in den Phasmidvektor pBBP38 zu erzeugen. Durch gelelektrophoretische Trennung und nachfolgende Phenol/Chloroform-Extraktion wurde das beidseitig verdaute Insert bei hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 20 % isoliert. Die präparierten DNA-Fragmente für Insert und Vektorrückgrat wurden anschließend in einem 15,0 pmol Ansatz im molaren Verhältnis 1:1 ligiert und anschließend gefällt (siehe Abschnitt 2.2.4.3 und 2.2.6.2). Die Transformation des für das *Phage Display* geeigneten *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* mit der ligierten BBP-Zufallsbibliothek erfolgte mittels 23 Elektroporationsansätzen mit jeweils 2,0 µg DNA. Die mit 100 ng Phasmidvektor pBBP38 getestete Transformationseffizienz der Zellen betrug $8{,}2 \times 10^9$ pro µg DNA. Die erhaltene Bibliothek zeigte mit einer Komplexität von $2{,}5 \times 10^{10}$ unabhängigen Transformanden eine Verbesserung um nahezu den Faktor 70 im Vergleich zu der BBP-Zufallsbibliothek von Beste *et al.* (1999).

3.3.1 Optimierung der Komplexität der BBP-Zufallsbibliothek

Diese erhebliche Steigerung der Komplexität war einerseits auf Erhöhung der DNA-Stoffmenge um den Faktor 3,6 von 4,2 pmol auf 15,0 pmol bei der Herstellung des Ligierungsansatzes zurückzuführen. Anderseits resultiert sie wesentlich (nahezu um den Faktor 20) aus der Optimierung experimenteller Abläufe, wie erhöhter Transformationseffizienz der elektrokompetenten Zellen des *E. coli*-Stamms XL1-*Blue* und verbesserter Ligierungseffizienz.

3.3.1.1 Optimierung der Transformation des *E. coli*-Wirtsstamms XL1-*Blue*

Die Effizienz der hier präparierten elektro-kompetenten Zellen betrug $8{,}2 \times 10^9$ pro µg DNA für den Phasmidvektor pBBP38, was einer Steigerung um den Faktor ~14 im Vergleich zu $6{,}0 \times 10^8$ pro µg DNA des Phasmidvektors pBBP20 bei (Beste, 1998) entspricht. Zusätzlich wurde die Anzahl der benötigten Elektroporationsansätze minimiert, um die bereits transformierten Ansätze schnellstmöglich weiter zu verarbeiten. Deshalb wurde pro Elektro-

porationsansatz eine DNA-Menge von 2,0 µg verwendet. Diese lag über der maximalen Menge von 1,3 µg DNA pro Ansatz bis zu der die Zahl der erhaltenen Transformanden nach früheren Erkenntnissen proportional steigt (Stibora, Beste & Skerra, unveröffentlicht). Allerdings bezieht sich diese Proportionalität auf Testtransformationsansätze mit zirkulärem Vektor. Dessen Anteil lag in den durchgeführten Ansätzen wegen der Obergrenze der Ligierungseffizienz von etwa 10% (siehe Abschnitt 3.3.1.2) bei etwa 200 ng. Aus diesem Grund war auch die mit der Positivkontrolle von 100 ng Phasmidvektor pBBP38 ermittelte Transformationseffizienz nur als Richtwert für die Eignung der elektro-kompetenten Zellen zur Herstellung einer hochkomplexen BBP-Zufallsbibliothek zu verstehen.

Im Vorfeld wurde pro Elektroporationsansatz lediglich ein dreifacher Überschuss eingesetzter Zellen zur Molekülanzahl des ligierten, zirkulären Vektors errechnet. Um trotzdem eine maximale Effektivität der Transformation sicher zu stellen, wurden die elektro-kompetenten Zellen unmittelbar vor der Transformation frisch hergestellt (Noren & Noren, 2001). Bei früheren Versuchen war pro Einfrier-Auftau-Zyklus der Zellen ein Abfall der Transformationseffizienz um bis zu einem Faktor 10 beobachtet worden.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Elektroporation war die Vermeidung von Lichtbogenbildung, was die Überlebensfähigkeit der Zellen drastisch senkt. Die Thermoemission kann durch Herabsetzung der Leitfähigkeit der Elektroporationsansätze verringert werden. Deshalb wurde die, für die Elektroporation bestimmte, ligierte DNA nach der Fällung in H_2O bidest. gelöst (siehe Abschnitt 2.2.6.2). Auch die elektro-kompetenten Zellen wurden entgegen der bisherigen Vorschrift nicht mit GYT-Medium (Beste, 1998; Dower *et al.*, 1988) sondern lediglich in H_2O bidest. gewaschen und darin letztlich resuspendiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4), um sämtliche ionischen Rückstände zu entfernen.

3.3.1.2 Maßnahmen zur Optimierung der Ligierungseffizienz

Zur gerichteten Klonierung der mutierten Zufallsvarianten der *bbp*-Gensequenz auf den Phasmidvektor pBBP38 (Abbildung 3) mit hoher Ausbeute war zunächst quantitativer Verdau mit der Endonuklease *Bst*XI entscheidend (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Insbesondere galt dies für das durch PCR erzeugte Insert, auf dem sich die Erkennungssequenzen der Endonuklease nur wenige Basenpaare entfernt vom 5'- bzw. 3'-Ende des linearen DNA-Fragments befanden. Aufgrund der sehr geringen Größenunterschiede ist bei der elektrophoretischen Trennung eine eindeutige Abtrennung des doppelt verdauten Inserts, von unverdauten Produkten erschwert. Zudem ist bekannt, daß Restriktionsenzyme nah am Ende eines DNA-Doppelstrangs mit verminderter Effizienz schneiden (Kaufman & Evans, 1990). Durch die Verunreinigung mit nur einfach geschnittenem Insert wäre es deshalb zu ineffizienter Ligierung gekommen.

Die Produkte des ersten PCR-Schritts, Fragment A und Fragment B (Abbildung 4), wurden deshalb über ein 2,0% *Low Melting Point*-Agarosegel hoher Reinheit getrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.1), bei einer Wellenlänge von 365 nm im langwelligen UV-Bereich sichtbar

gemacht, und zügig unter Verzicht eines dokumentarischen Photos ausgeschnitten, um eine UV-Schädigung der DNA zu vermeiden (Duro *et al.*, 1993). Die Isolierung der DNA erfolgte mit JETSORB-Partikeln (siehe Abschnitt 2.2.6.3). Bei der Reinigung des im Anschluss erzeugten assemblierten *PCR*-Produkts wurde auf eine elektrophoretische Trennung zugunsten der Reinigung des *PCR*-Produkts mittels des E.Z.N.A.® *Cycle-Pure Kits* (siehe Abschnitt 2.2.6.4) verzichtet. Diese Prozedur entfernte die *Taq*-DNA-Polymerase, die Oligodesoxynukleotide sowie die Desoxynukleotidtriphosphate quantitativ. Nicht abgetrennte Agaroserückstände und an diesen anhaftende Verunreinigungen, wie andere Polysaccharide hätten andernfalls zusätzlich inhibitorisch auf die Restriktionsendonukleasen wirken können (Duro *et al.*, 1993; Roberts & Murray, 1976).

Als weitere Ursachen für einen ineffizienten oder unspezifischen DNA-Verdau waren die relaxierte Erkennungssequenzspezifität des Restriktionsenzyms, die als *Star*-Aktivität bezeichnet wird (Nakamura *et al.*, 2001), wie auch eine Kontamination der Restriktionsenzyme mit bakteriellen Exonukleasen, in Betracht zu ziehen (Hashimoto-Gotoh, 1995). *Star*-Aktivität bedingende Faktoren wie extensive Inkubationszeit, hohe Enzymkonzentration und suboptimale Pufferbedingungen – aufgrund zu geringer Ionenstärke oder falschen pH-Werts sowie durch Spuren organischer Lösungsmittel verursacht – waren durch die vorliegende Arbeitsvorschrift bereits weitgehend minimiert (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Die *Bst*XI-Restriktionsendonuklease des Herstellers Promega zeigte im Vergleich zu Enzymen anderer Hersteller eine höhere Effizienz und Spezifität der Spaltung.

Das mit dem Enzym *Bst*XI geschnittene Vektorrückgrat bzw. Insert wurde anschließend über ein 0,8% respektive 1,5% *LMP*-Agarosegel elektrophoretisch getrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.1), bei 365 nm illuminiert, und wiederum zügig ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mittels quantitativer Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.6.5). Dieses von Wieslander (1979) etablierte Verfahren lieferte bei nachfolgender Ethanolfällung DNA hoher Reinheit. Nicht nur erlaubte es die rückstandslose Abtrennung des Restriktionsenzyms und des BSA aus dem Restriktionsansatz sondern in Verbindung mit der bei niedrigen Temperaturen schmelzenden *LMP*-Agarose eine, die DNA schonende, quantitative Beseitigung der Matrix. Die durch diese Vorgehensweise erzielte hohe Reinheit der DNA war neben der Verwendung der T4-DNA-Ligase des Herstellers Promega, die im Vergleich zu Ligasen anderer Hersteller – nach persönlicher Erfahrung – effektiver arbeitete, entscheidend für eine hohe Ligierungseffizienz (Fransen *et al.*, 1998).

3.3.2 Verbesserung der Integrität der BBP-Zufallsbibliothek

In insgesamt fünf Selektionszyklen wurden die aus einer nativen BBP-Zufallsbibliothek mit einer Diversität von 1,26 x 10^9 unabhängigen Transformanden bei 50% Integrität – die eigens vor den Optimierungsarbeiten zur Komplexitätssteigerung (siehe Abschnitt 3.3.1) nach dem Protokoll von Beste (1998) hergestellt worden war – angereicherten, mit Doxorubicin-SS-

Biotin/Streptavidin komplexierten Phagemide jeweils unter den potentiell milden Bedingungen der reduktiven Spaltung der Disulfidbrücke innerhalb des *Linkers* mit 50 mM DTT eluiert (Chames *et al.*, 2000). Das in diesem Fall komplexiert bleibende Hapten beeinträchtigt die Infektivität der Phagemide normalerweise nicht (Kobayashi *et al.*, 2005). Die Analyse fünf zufällig gepickter Klone aus der Selektionsrunde 3 (Abbildung 14) offenbarte mit nur einer einzigen funktionellen *BBP*-Sequenzvariante einen niedrigen Anteil funktioneller Fusionsproteine kodierender Phasmide. Die übrigen vier Sequenzen zeigten einzelne Nukleotid-Deletionen bzw. -Insertionen. Die beobachteten Insertionen und Deletionen führen zur Verschiebung des natürlichen Leserahmens und in der weiteren Sequenzabfolge zur Ausprägung von TAA (*Ochre*)- und TGA (*Opal*)-Stoppkodons, die in dem *E. coli*-Amber-Suppressorstamm XL1-*Blue* nicht überlesen werden. Folglich bewirken die Stoppkodons bei der Proteinbiosynthese einen Kettenabbruch und führen letztlich dazu, dass gar kein pIII-Fusionsprotein in der Phagemidhülle verankert wird. Für eine erfolgreiche Affinitätsanreicherung ist es jedoch erforderlich, den Prozentsatz der Fusionsgene mit Stopkodons oder im Leserahmen verschobener Mutanten so gering wie möglich zu halten (Carcamo *et al.*, 1998).

Das Auftauchen dieser Klone in Anreicherungszyklus 3 wurde durch Vorteile bei der Replikation dieser Phagemide begründet. Die beobachteten Mutationen wurden, da sie im Bereich der synthetischen Oligodesoxynukleotide lagen, auf die Verwendung nicht gereinigter *Primer* bei der Herstellung der für das *Phage Display* eingesetzten Genbibliothek zurückgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Außerdem können innerhalb des Wirtsstamms auch Rekombinationsereignisse stattfinden, die evolutiv dazu dienen toxische Genprodukte unschädlich zu machen (Brown & Campbell, 1993; Skerra, 1994). Eine einzige der erhaltenen Mutanten besaß ein zusätzliches, inseriertes Basenpaar außerhalb der beschriebenen *Primer*-Regionen und war vermutlich durch die natürliche Mutationsrate (etwa 10^{-4} pro bp) der *Taq*-DNA-Polymerase (Bracho *et al.*, 1998; Eckert & Kunkel, 1990; Ling *et al.*, 1991) verursacht, da sie keine Korrekturaktivität besitzt.

Im Gegensatz zu den wirtseigenen Prozessen ließ sich die Herstellung der BBP-Gensequenzen beeinflussen. Neben der Einstellung optimaler Pufferbedingungen, um die Einbaurate falscher Basen durch die verwendete *Taq*-DNA-Polymerase so gering wie möglich zu halten, erwies sich dabei die korrekte Sequenz der synthetischen, degenerierten Oligodesoxynukleotide als entscheidend.

Deshalb wurden die bei einem kommerziellen Hersteller synthetisierten Oligodesoxynukleotide (siehe Abschnitt 2.1.2) vor dem Einsatz in der *PCR* präparativ durch eine Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.5.2; Abbildung 15). Dabei wurden Oligodesoxynukleotide kürzerer Sequenz, die während der PCR Deletionsmutanten erzeugt hätten, als Nebenprodukte der DNA-Synthese abgetrennt. Eine Sequenzanalyse zufällig ausgewählter Klone zeigte einen hohen Prozentsatz funktioneller BBP-Gensequenzen mit 80 % bei Verwendung der gereinigten Oligodesoxynukleotide.

```
          BstXI                                Loop 1                                                                  Loop 2
          20                          30                          40                          50                                  60
          SerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAsnSerValGluLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAsnTyrHisValIle
Wt-bbp:   TCCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCAACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTGCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGAACTACCACGTAATC
Bib.   :.........................................NNKNMSNNSNNK.......................................................................NNS...NNK......
P3K1   : .........................................TTTCACT.C.........................................................................G...ATT......
                                                  PheHisPhe                                                                   Lys   Ile
P3K3   : .........................................TTTGTCT.CT.T.......................................................G...GTGG-......
                                                  PheValPheTyr                                                                AspGlnTrp End
P3K5   : .........................................CCG.AC.CGCT.........-.............................................C....ATT......
                                                  ProTyrAlaLeu        Ser AlaAspGlyLeuSerThrLeuLeuLysAlaArgValSerLysPheArgProThrLeuEnd
P3K6   : .........................................TTT..CCCGT.........................................................C.C..-CG......
                                                  PheSerProTyr                                                                ThrHis ArgEnd
P3K7   : .........................................C.T.AGCCC..........................................................CG....T.G......
                                                  HisGlnProAsp                                                                Arg...Gln
```

```
                                                                                                Loop 3
                                70                          80                          90                          100
          HisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnValPheAsnValLeuSerThrAsp
Wt-bbp:   CACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAACTGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCACAGCCTGACTTACGGAGGTGTCACCAAGGAGAACGTATTCAACGTACTCTCCACTGAC
Bib.   : ................NNS.....T..C.............................................NNS...NNK......NNS...VVS...NNK.......................
P3K1   : ................TCG.....T..C.............................................TACC...CCG......CC....GGC....TG.......................
                         Ser                                                       Thr   Pro      Pro   Gly   Met
P3K3   : ................G.C.....T..C.............................................TAC....TT........G....CC...TTG.......................
P3K5   : ................CCG.....T..C.-...........................................GGC....TT.............GC...C.G.......................
P3K6   : ................CCC.....T..C.............................................G......TT.......CG...CCC...CGG.......................
P3K7   : ................TCG....AT..C.............................................GAC...G.T......C.G...GC....TGG.......................
                         Ser   Asp                                                 Asp   Asp      Leu   Ala   Trp
```

```
                                Loop 4                                                                  BstXI
                    110                         120                         130
          Asn LysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyrAspGluAspLysLysGlyHisGlnAspPheVal TrpValLeuSerArgSerMetVal
Wt-bbp:   AAC~AAGAACTACATCATCGGATACTACTGCAAATACGACGAGGACAAGAAGGGACACCAAGACTTCGT~CTGGGTGCTCTCCAGAAGCATGGTC
Bib.   : ...~....................NNK...NNS.......................NNS...NNK..~.........................
P3K1   : ...~....................A.G....GG.......................ACC....CG..~.........................
                                 Lys   Arg                         Thr   Ser
P3K3   : ...~....................TG...CTC.......C................GGC...CAT..A.........................
P3K5   : ...~.......................T.....G.......................A.C...C.G..A.........................
P3K6   : ...~....................CAG...CTC.........................G....CG..A.........................
P3K7   : ...T....................TG....CG.......................A.C...GGT..A.........................
            End
```

Abbildung 14: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenzen, der aus der ersten nativen Bibliothek selektierten BBP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BBP; zufällig ausgewählte Klone aus dem 3 Anreicherungszyklus. Der hier gezeigte Ausschnitt aus der Sequenz des Wt-BBP umfasst die Aminosäurepositionen 20 bis 136. Das mit den degenerierten *Primer*-Paaren GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 in einer zweistufigen *PCR*-Reaktion randomisierte Gensegment besitzt flankierende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI (CCAN$_6$TGG, grau hinterlegt). Die variablen *Loop*-Regionen des Wt-BBP sind unterstrichen. Die Aminosäurepositionen innerhalb des Wt-BBP, die für die Konstruktion der Bibliothek einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind grün hervorgehoben (34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127). Dazugehörige Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz des BBP ebenfalls in grün angegeben. Die zugelassenen Zufallskodons in der Nomenklatur entsprechend NC-IUB (1986) sind rot markiert. Ebenso wie Basensubstitutionen innerhalb der Varianten, die nicht auf die gerichtete Zufallsmutagenese zurückzuführen sind. Die geänderte Basensequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 (leicht lila hinterlegt) ist auf die Einführung der *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragmentes im Verlauf der *PCR*-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998). Für die selektierten Varianten sind nur die von der Sequenz des Wt-*bbp* bzw. Wt-BBP verschiedenen Basen bzw. Aminosäuren angegeben. Deletionen innerhalb der DNA-Sequenz sind gestrichelt dargestellt und gelb hinterlegt. Insertionen auf DNA-Ebene sind magentafarben hinterlegt. Die durch genannte Deletionen und Insertionen erzeugten *Ochre*(TAA)- und *Opal*(TGA)-Stoppkodons sind auf Aminosäureebene als *End* beschriftet und in orange hervorgehoben. Das teilweise supprimierte *Amber*-Stoppkodon TAG ist in den DNA-Sequenzen der BBP-Varianten blau hinterlegt.

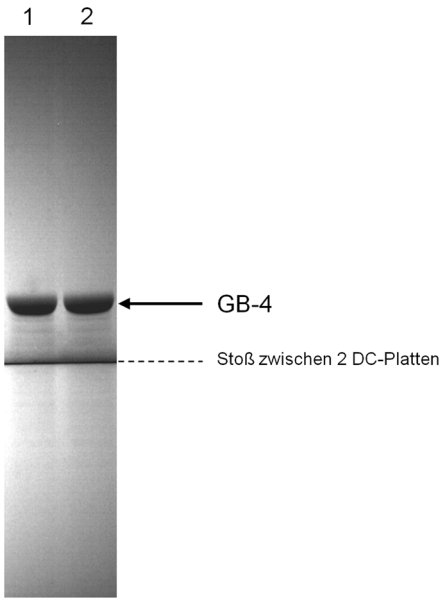

Abbildung 15: Reinigung des degenerierten Oligodesoxynukleotids GB-4 mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese zur Herstellung der BBP-basierten Molekülbibliothek; durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor fluoreszierendem Hintergrund auf DC-Kieselgelplatten mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F_{254}) sichtbar gemacht (UV-*Shadowing*; siehe Abschnitt 2.2.5.2).

3.4 Herstellung immobilisierbarer Konjugate des Liganden Doxorubicin

Die Affinitätsanreicherung bindungsaktiver Phagemide gegenüber einem Zielmolekül mittels *Phage Display* setzt die funktionelle Immobilisierung des Liganden voraus (siehe Abschnitt 2.3.3). Kovalente Konjugate von Doxorubicin sowohl mit Biotin als auch mit Digoxigenin boten in Verbindung mit gegen Biotin bzw. Dig gerichteten paramagnetischen Partikeln den Vorteil, dass diese die Komplexbildung der Phagemid-präsentierten Proteinvarianten mit dem Liganden sowohl an einer Festphase wie auch in Lösung erlaubten. Die Doxo-Biotin-Konjugate ermöglichten überdies die Immobilisierung an Streptavidin als *quasi*-Festphase adsorptiv auf Nunc-Immuno™-Flügelstiften. Zusätzlich dienten beide Konjugate später als sensitive Nachweisreagenzien für die Bindungsaktivität der selektierten Proteinvarianten im Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 1.5.2 und 2.4).

3.4.1 Synthese von Doxorubicin-Biotin und -Digoxigenin

Zur kovalenten Kopplung von Doxorubicin mit Biotin bzw. Digoxigenin (siehe Abschnitt 2.8.1) standen beide Markermoleküle als aktivierte Carbonsäureester-Derivate in Form des NHS-X-Biotin und des Dig-NHS (= NHS-X-Digoxigenin) zur Verfügung (Abbildung 16). Die bei beiden Derivaten inserierte ε-Aminocapronsäure diente als molekularer Abstandshalter, um gleichzeitig eine Komplexierung von Biotin bzw. Dig mit entsprechenden Biomakromolekülen zu erlauben und die sterische Zugänglichkeit des Doxorubicins für die tiefe Bindungstasche der Anticalin-Varianten sicherzustellen.

Primäre, nukleophile Amine bilden mit NHS-Estern bereits unter milden leicht basischen Bedingungen in wässrigem Puffer bei pH 7,0 – 9,0 – durch Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff-Atom und unter Abgang der Hydroxysuccinimidgruppe – stabile Amidbindungen aus. Da der aktivierte Ester grundsätzlich hydrolyseempfindlich und das Doxorubicin in wässrigem Puffer schlecht löslich war, wurde die Kopplung demnach in wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) durchgeführt. Durch Vorinkubation von Doxorubicin mit stöchiometrischen Mengen der Hünig-Base N-Ethyldiisopropylamin wurde der nukleophil reaktive deprotonierte Zustand der 3'-Aminogruppe des Daunosaminrings gewährleistet (Chen *et al.*, 2003). Dabei zeigte sich im Verlauf der Experimente, dass ein deutlicher Überschuss (50-fach) an N-Ethyldiisopropylamin die Kopplungseffizienz nochmal deutlich steigerte und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wesentlich verbesserte. Bei der schwach nukleophilen Hünig-Base handelt es sich um ein tertiäres Amin, dessen Stickstoffatom durch die Substituenten sterisch dermaßen abgeschirmt ist, dass lediglich ein Wasserstoffatom Zugang hat (Sorgi, 2001). Eine Inkubationszeit von 2 – 3 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit, um die lichtinduzierte Dekomposition des Chromophors zu vermeiden, führte zu Ausbeuten von schätzungsweise 80 – 90 % (bestimmt durch Sichtprüfung; siehe Abbildung 17 und Tabelle 3). Für die quantitative Produktbildung war eine 1,5 – 2-fache Stöchiometrie des Biotin-Derivates bzw. 3-fache des Dig-Derivates gegenüber Doxorubicin notwendig.

Der Nachweis der Produkte Doxorubicin-Biotin und -Dig erfolgte durch analytische Dünnschichtchromatographie (siehe Abschnitt 2.8.2). Die polare, stationäre Phase bestand aus Aluminiumplatten, die mit Mn^{2+}-aktiviertem Zinkkieselgel beschichtet waren und dadurch bei 254 nm die Anregung grüner Fluoreszenzemission erlaubten (Chen *et al.*, 2003). Das Doxorubicin selbst sowie seine biotinylierten bzw. digoxigenierten Konjugate wurden direkt durch die Rotfärbung im sichtbaren Bereich identifiziert. Die nicht farbigen Reaktionskomponenten N-Ethyldiisopropylamin und NHS-X-Biotin und Dig-NHS konnten teilweise durch Löschen der Fluoreszenz ebenfalls nachgewiesen werden. Als Lösungsmittel diente ein Chloroform/Methanol-Gemisch (3/1; *v/v*), wobei Doxorubicin am Punkt der Probenauftragung immobilisiert blieb.

Unter vorliegenden Bedingungen war der Retentionsfaktor R_f (Gleichung (58)) von Doxorubicin nahezu 0,0 (Abbildung 17). Für ein 2/1 (*v/v*) $CHCl_3$/ MeOH-Lösungsmittelgemisch wurde ein R_f-Wert von 0,15 beschrieben (Demant *et al.*, 1991). Der Unterschied in der Retention lässt sich durch die geringere Polarität des hier verwendeten Lösungsmittelgemisches erklären. Im Vergleich zum freien Doxorubicin zeigten die Konjugate, die als einzige Produktbande sichtbar waren, ein deutlich verändertes Laufverhalten mit einem R_f-Wert von 0,45 für das mit NHS-X-Biotin hergestellte

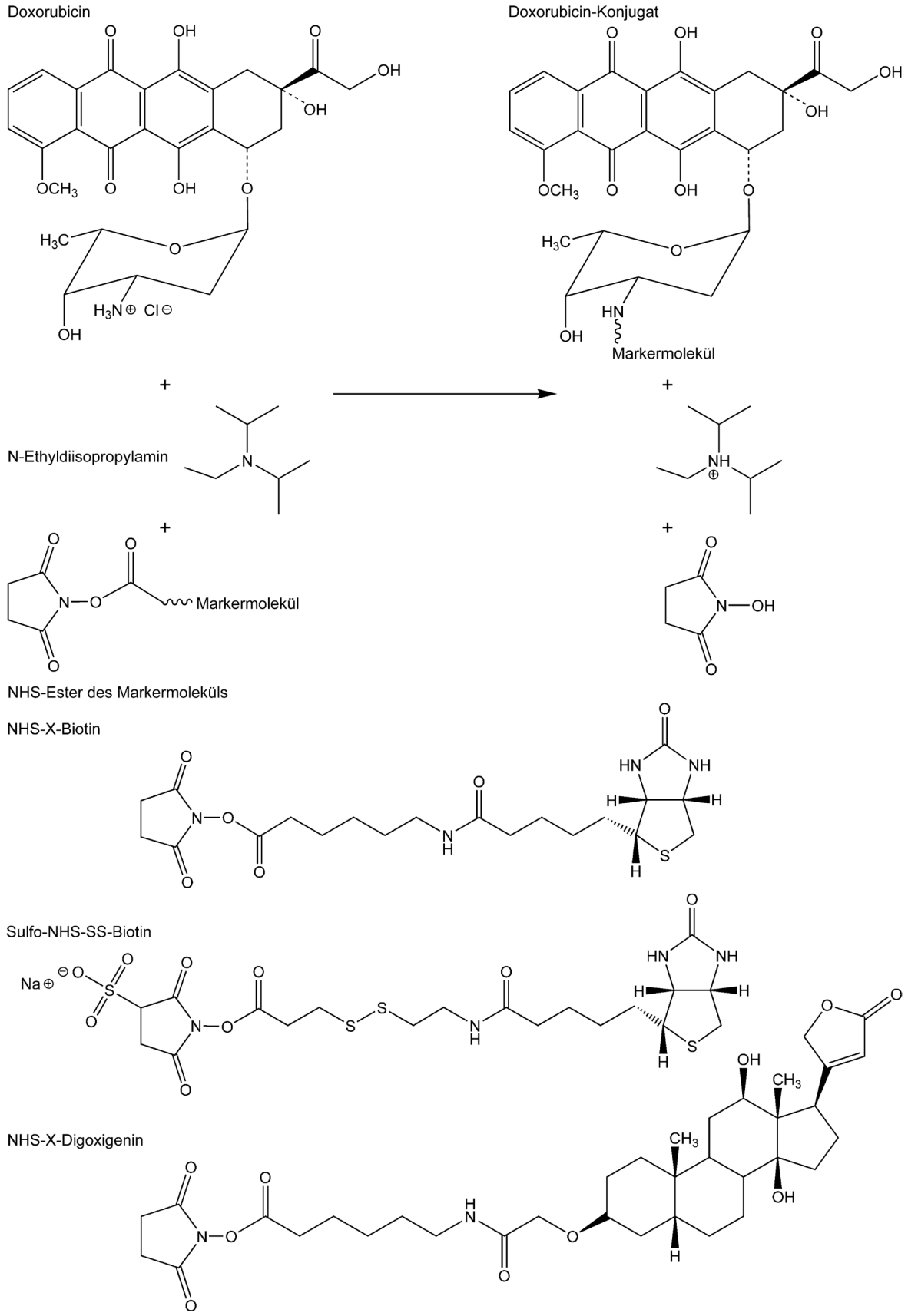

Abbildung 16: Kopplungsschema von Doxorubicin mit den Markermolekülen Biotin und Digoxigenin in Form aktivierter N-Hydroxysuccinimidester-Derivate; die lichtgeschützt in wasserfreiem DMF und Gegenwart von Hünig-Base stattfindende Reaktion führt zur kovalenten Verknüpfung beider Moleküle unter Abspaltung der N-Hydroxysuccinimidgruppe (siehe Abschnitt 2.8.1).

Doxo-Biotin bzw. von 0,82 für das mit Dig-NHS hergestellte Doxo-Dig (Abbildung 17). Für ein identisches, gereinigtes Doxo-Biotin-Konjugat wurde von Allart et al. (2003) ein R_f-Wert von 0,15 bei einem Chloroform / Methanol-Gemisch (4 / 1; v / v) gefunden. Das verstärkte lipohile Verhalten der Konjugate im Vergleich zum Doxorubicin ist dem Einfluss des aliphatischen *Linkers* zuzuschreiben (King *et al.*, 2002). Zudem spiegelten die gezeigten Unterschiede der Retentionsfaktoren der beiden in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Konjugate, die geringere Hydrophilie des Digoxigenins im Vergleich zum Biotin wider.

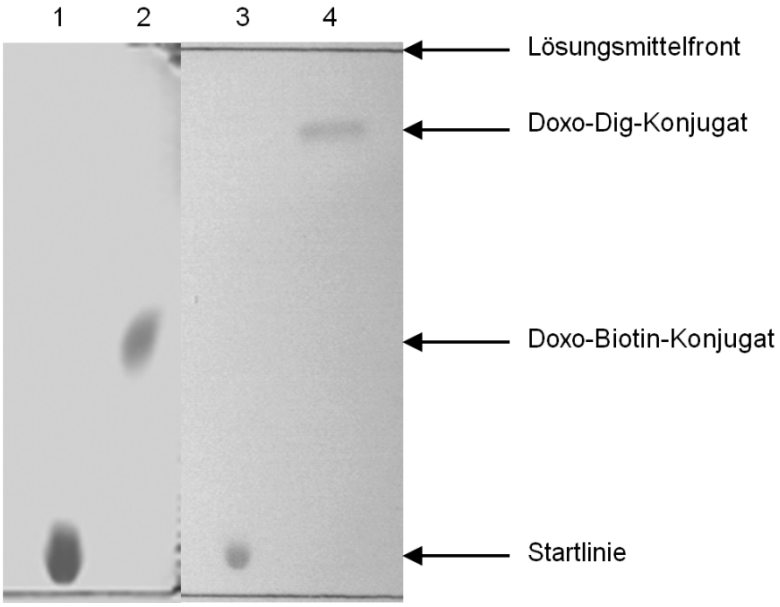

Abbildung 17: Nachweis der chemischen Kopplung von Doxorubicin mit Biotin bzw. Digoxigenin mittels Dünnschichtchromatographie; an der Startlinie der Dünnschichtplatte wurden die Proben der Konjugate wie auch von Doxorubicin aufgetragen. Die chromatographische Trennung wurde anschließend vertikal in einer mit dem Lösungsmittelgemisch CHCl/MeOH (3/1; *v/v*) gesättigten Kammer durchgeführt. Der Retentionsfaktor R_f wurde aus der Laufstrecke der jeweiligen Substanz im Verhältnis zur Lösungsmittelfront bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.2).

Tabelle 3: Übersicht der hergestellten niedermolekularen Konjugate des Liganden Doxorubicin

Molekül	Reaktions-stöchiometrie	R_f-Wert[a]	Ausbeute [%]	R_f-Wert (Literatur)
Doxorubicin	–	0,00	–	0,15[b]
Doxo-Biotin	1/1,5–2	0,45	80–90	0,15[c]
Doxo-SS-Biotin	1/2	0,49	80–90	–
Doxo-Dig	1/3	0,82	80–90	–

[a]Chloroform/ Methanol-Gemisch 3/1 (*v/v*); [b]2/1 (*v/v*) $CHCl_3$/MeOH (Demant *et al.*, 1991) und [c]4/1 (*v/v*) $CHCl_3$/MeOH (Allart *et al.*, 2003)

In analoger Weise wurde auch das Doxo-SS-Biotin-Konjugat unter Verwendung von Sulfo-NHS-SS-Biotin (Abbildung 16) hergestellt (siehe Abschnitt 2.8.1), um später gebundene Phagemide durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücke eluieren zu können (siehe Abschnittee 2.3.3.3 und 3.3.2). Die Dünnschichtchromatographie zeigte wiederum Ausbeuten

von 80 – 90 %. Der beobachtete Retentionsfaktor von 0,49 für das einzig nachweisbare Produkt lag geringfügig über dem des Doxo-Biotin-Konjugats.

Herstellung von Kontrollreagenzien:

Für den Einsatz z.B. im Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 3.5.3) wurden gegenüber dem Doxo-Biotin bzw. Doxo-Dig entsprechende Negativkontrollen benötigt (siehe Abschnitt 2.8.1). Dazu wurde sowohl NHS-X-Biotin als auch Dig-NHS in Gegenwart von 50 mM Tris/HCl pH 8,0 – 9,0 inkubiert. Neben der Hauptreaktion der Amidbildung mit dem primären Amin des Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan wurde als Nebenreaktion eine einfache Hydrolyse des aktivierten Carbonsäureesters erwartet (Abbildung 16). Der Einsatz einer sterisch gehinderten Base war in diesem Fall wegen des basischen Milieus der Puffersubstanz nicht erforderlich. Wegen der sehr förderlichen Reaktionsbedingungen war hier kein chromatographischer Nachweis der Produkte erforderlich.

Um Restspuren reaktiver N-Hydroxysuccinimidester in den für die Affinitätsanreicherung und den Kolonie-Filterstapeltest bestimmten Ansätzen der Doxorubicin-Konjugate (siehe Abschnitt 2.8.1, 3.5.2 und 3.5.3) auszuschließen, wurde für 15 – 30 min in dem Puffer PBS respektive PBS/T bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Bei Raumtemperatur sollte diese Inkubation zu einer ausreichend effizienten hydrolytischen Abspaltung der verbliebenen, reaktiven NHS-Gruppen geführt haben (Hermanson, 1996).

3.4.2 Reinigung und Charakterisierung des Wt-Streptavidin/Biotin-Doxo-Komplexes

Der initiale Selektionsprozess ausgehend von der nativen Zufallsbibliothek ist entscheidend für die erfolgreiche Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten. In diesem Zusammenhang wurde die kompetitive Elution gebundener Phagemide gegenüber unspezifischen Methoden bevorzugt (Schlehuber *et al.*, 2000; Skerra, 2001). Um dabei die ausgeprägte toxische Wirkung des niedermolekularem Doxorubicins für den bakteriellen Wirtsorganismus *E. coli* zu umgehen (Anderson *et al.*, 1993), wurde das Doxo-Biotin-Konjugat nach vorheriger Komplexierung mit löslichem Streptavidin als Kompetitor eingesetzt (siehe Abschnitt 2.3.3.3 und 3.5.2).

Da die nicht-kovalente Interaktion des Streptavidins mit Biotin mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-13} M extrem stabil ist (Weber *et al.*, 1992), wurden für die Bildung des Komplexes aus Doxo-Biotin und Streptavidin beide Komponenten in einer 1:1-Stöchiometrie eingesetzt (siehe Abschnitt 2.8.4). Für den späteren Einsatz musste etwaiges nicht gebundenes Doxo-Biotin-Konjugat abgetrennt werden. Vorversuche, um das lösliche Streptavidintetramer mittels Gelfiltration (siehe Abschnitt 2.6.1.2) über eine Superdex™75 HiLoad 16/60-Säule zu reinigen, scheiterten aufgrund der Aggregation und Adhäsion des Proteins auf der Säule. Das Streptavidin konnte lediglich unter harschen Bedingungen mit 0,5 M NaOH eluiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Reinigung über die aus einer hydrophileren Matrix bestehende

HiPrep™16/60 Sephacryl S-300 HR-Säule das erwartete Laufverhalten des tetrameren Proteins (Kurzban *et al.*, 1991; Sano & Cantor, 1991).

Auf diese Weise konnte der Komplex aus Streptavidin und Doxo-Biotin durch Elution mit PBS gereinigt werden. Dazu wurde die Säule mit einem Bettvolumen von 120 ml mit 4% SV an Probe bei einer Proteinkonzentration von 8,4 mg/ml beladen. Die Chromatogramme der Absorptionsmessung bei 280 nm zeigten jeweils ein einziges breites Elutionsmaximum (Abbildung 18) mit einem Elutionsvolumen zwischen 60 – 80 ml. Für den tetrameren Proteinkomplex mit Doxo-Biotin wurde ein leicht retardiertes Laufverhalten im Vergleich zum unbeladenen Protein beobachtet. Die durch den gebundenen Chromophor Doxorubicin sichtbar rot gefärbten Proteinfraktionen wurden vereinigt und einer weiteren Analyse unterzogen. Ebenso konnten durch Rotfärbung Reste ungebundenen Doxo-Biotin-Konjugats identifiziert werden, die ein stark retardiertes Laufverhalten mit etwa 170 ml Elutionsvolumen (1,4 SV) zeigten.

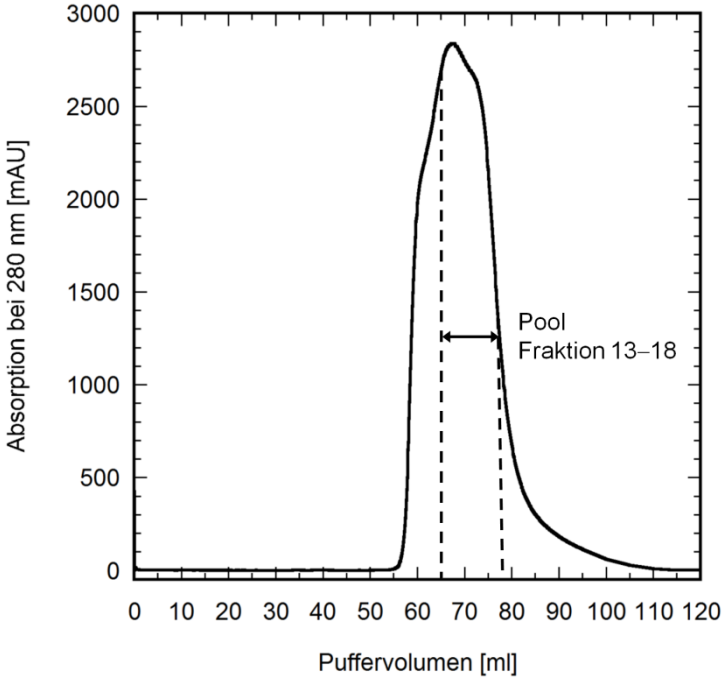

Abbildung 18: Chromatogramm der Gelfiltration des Doxo-Biotin/Streptavidin-Komplexes zur Abtrennung freien Doxo-Biotins; der Doxo-Biotin/Streptavidin-Komplex wurde über eine *HiPrep*™16/60 Sephacryl S-300 HR-Säule durch Elution mit PBS Puffer vom freien Doxo-Biotin abgetrennt und durch Absorptionsmessung bei 280 nm identifiziert (siehe Abschnitt 2.6.1.2 und 2.8.4). Die durch den gebundenen Chromophor Doxorubicin sichtbar rot gefärbten Proteinfraktionen 13 – 18 wurden vereinigt.

Die Bestimmung der Konzentrationen der über die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung verbundenen Partner Doxorubicin und Streptavidin erfolgte spektroskopisch. Aus den für die aromatischen Aminosäuren des Streptavidins spezifischen Absorptionswerten bei 280 nm und den für das Doxorubicinchromophor spezifischen Absorptionswerten bei 495 nm wurden die Konzentrationen nach Gleichung (59) – (61) berechnet (siehe Abschnitt 2.8.3 und 2.8.4). Dabei wurde der Absorptionsbeitrag des aromatischen Ringsystems des Doxorubicins bei der

Wellenlänge von 280 nm durch Einführung des Korrekturfaktors $Q = \varepsilon_{Doxo280}/\varepsilon_{Doxo495}$ berück–sichtigt (siehe Abschnitt 2.8.3). Aus den bekannten Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{Doxo280} = 5814\ M^{-1}cm^{-1}$ und $\varepsilon_{Doxo495} = 8030\ M^{-1}cm^{-1}$ des Doxorubicins (Dreher *et al.*, 2003; Willner *et al.*, 1993) ergab sich ein Wert für Q von 0,724. Der Extinktinktionskoeffizient einer monomeren Untereinheit des *Core*-Streptavidins betrug $\varepsilon_{280} = 35600\ M^{-1}cm^{-1}$. Für zwei unabhängige Komplexbildungsansätze wurde ein Beladungsgrad von 0,46 bzw. 0,59 erhalten, gleichbedeutend mit etwa einem Doxorubicinmolekül je zwei Untereinheiten Streptavidin. Der Unterschied zu dem früher beobachteten Wert von 0,88 gebundenen Biotinmolekülen je Unterheit (Schmidt & Skerra, 1994b) erklärt sich durch den vor Komplexbildung mit Streptavidin nicht abgetrennten Überschuss von 0,5 – 1,0 Moläquivalenten des Biotin-Reagens gegenüber dem Doxorubicin aus dem Doxo-Biotin-Kopplungsansatz (siehe Abschnitt 2.8.1 und 3.4.1), wodurch die restlichen Biotinbindungsstellen abgesättigt wurden.

3.5 Selektion von Anticalinen mit Bindungsaktivität für Doxorubicin aus der BBP-Zufallsbibliothek

Die Erzeugung einer maßgeschneiderten BBP-Anticalin-Variante mit Bindungseigenschaften gegenüber Doxorubicin mittels einer kombinatorischen Zufallsbibliothek durch *Phage Display* erforderte geeignete Bedingungen zur selektiven Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten. Zudem wurde ein evaluierbarer Assay, wie der Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 1.5.2), zur Identifizierung einzelner, bindungsaktiver Varianten aus dem Repertoire der Kandidaten, die aus dem Anreicherungsprozesses resultierten, benötigt.

3.5.1 Optimierung der Versuchsbedingungen für die Affinitätsanreicherung

Um selektiv Proteinvarianten anzureichern, die Haptenliganden komplexieren, war eine Optimierung hinsichtlich der Art der immobilisierten Doxorubicin-Konjugate unter Berücksichtigung sterischer Zugänglichkeit, Löslichkeit und unspezifischer Interaktionen mit Trägerproteinen oder Blockierungsreagenzien erforderlich (Skerra, 2001). Zudem musste die Stringenz der Waschschritte, zum Zweck der Abtrennung nicht oder unspezifisch gebundener Phagemide, und die Wahl der Elutionsmethode für spezifisch mit dem Zielmolekül komplexierter Phagemide geeignet eingestellt werden.

Aus einer nativen BBP-Zufallsbibliothek mit einer Diversität von $1{,}26 \times 10^9$ unabhängigen Transformanden bei 50 % Integrität, die eigens vor den Optimierungsarbeiten zur Komplexitätssteigerung (siehe Abschnitt 3.3.1) nach dem Protokoll von Beste (1998) hergestellt worden war, konnten keine Proteinvarianten mit ausgeprägter Bindungsaktivität für Doxorubicin angereichert werden. Allerdings konnten aus diesen vorangegangen Experimenten entscheidende Parameter für eine erfolgreiche Selektion gegen diesen Liganden abgeleitet werden.

3.5.1.1 Verbesserung der Immobilisierung von Doxorubicin

Die initiale *Phage Display*-Selektion aus der nativen BBP-Zufallsbibliothek erschien in Lösung unter Verwendung paramagnetischer Streptavidinpartikel zur Immobilisierung des Liganden sinnvoll (Parmley & Smith, 1988). Grundsätzlich ist hier eine selektive Anreicherung vergleichsweise hochaffiner Varianten möglich (Kobayashi *et al.*, 2005), wobei eine Liganden-Konzentration bei der Einstellung des Bindungsgleichgewichts gewählt werden sollte, die unterhalb der gewünschten Dissoziationskonstante für den Komplex aus Protein und Haptenantigen liegt (Hawkins *et al.*, 1992).

Durch Vorinkubation der Phagemide mit dem biotinylierten Liganden Doxorubicin in Gegenwart eines Blockierungsreagens wurde unspezifisches Bindungsverhalten der Phagemide minimiert. Der Komplex wurde anschließend durch das Streptavidin während kurzer Inkubation eingefangen, die Partikel gewaschen, und gebundene Phagemide schließlich sauer eluiert (siehe Abschnitt 2.3.3.3). Im Zuge dieser Vorgehensweise wurde jedoch keine spezifische Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten festgestellt, was an der hohen Stringenz der Selektion in Lösung gelegen haben kann (Kobayashi *et al.*, 2005). Zusätzlich kann die Bildung eines Metall/Doxorubicin-Chelatkomplexes durch Freisetzung von Fe^{3+}-Metallionen aus den paramagnetischen Partikeln nicht ausgeschlossen werden. Dies kann eine Modifizierung des Hydroxyanthrachinonrestes (Muindi *et al.*, 1984) oder eine Metall-induzierte Zersetzung des Doxorubicins bewirkt haben (Fiallo *et al.*, 1998; Tomlinson & Malspeis, 1982). Allerdings sprach die niedrige eingesetzte Doxorubicin-Stoffmenge von 40 – 100 pmol (je nach Anreicherungszyklus) in Gegenwart der paramagnetischen Partikel gegen einen solchen Mechanismus (Gelvan & Samuni, 1988).

Alternativ wurde eine Festphasenimmobilisierung des Doxorubicins über kovalente Kopplung an die Trägerproteine BSA und RNase A (siehe Abschnitt 2.8.3) getestet. Durch nukleophilen Angriff der Aminogruppe des Daunosaminzuckerrestes des Doxorubicins wurde unter Ringöffnung des Glutarsäureanhydrides Glutarylamido-Doxorubicin synthetisiert, welches eine aliphatische Carbonsäuregruppe trägt. Im Anschluss wurde das Glutarylamido-Doxorubicin mittels EDC/NHS zu einem reaktiven Carbonsäureester umgesetzt, und der so modifizierte Ligand an die ε-Aminogruppen von Lysinseitenketten der Trägerproteine gekoppelt (Abbildung 19). Dabei wurde durch photometrische Absorptionsmessung bei 280 nm und 495 nm (siehe Abschnitt 2.8.3) bei einer Stöchiometrie von 10:1 Doxorubicin-NHS/BSA oder 4:1 Doxorubicin-NHS/RNase A ein Beladungsgrad von 4,0 bzw. 1,2 erhalten (Balsari *et al.*, 1988; Beste, 1998; Hurwitz *et al.*, 1975).

Die beiden oben genannten, über PD-10-Säulen gereinigten Doxorubicin-Trägerprotein-Konjugate wurden zum Zweck der Affinitätsanreicherung zunächst bei äquimolarer Konzentration in Mischung an der Polystyroloberfläche der Flügelstifte adsorbiert und dann mit der Phagemid-Bibliothek inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Flügelstifte, wurden die gebundenen Phagemide schließlich sauer eluiert (siehe Abschnitt 2.3.3.3). Die

Sequenzanalyse (siehe Abschnitt 2.2.7) der Selektionsrunde 4 zeigte bei den 6, mittels Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4) ausgewählten Klonen eine Leserahmenverschiebung ab *Loop* 2 oder 3 innerhalb der für die BBP-Varianten kodierenden Sequenzen, die nach *Loop* 4 wieder in den eigentlichen Leserahmen zurückfielen (Abbildung 20), so dass letztlich Fusionsproteine mit durchgängigem Leseraster, wenn auch defektem Proteingerüst, präsentiert wurden. Die Herstellung der Variante K4.2.1 als lösliches Protein (siehe Abschnitt 2.5.1) ergab dementsprechend eine äußerst geringe Ausbeute von 43,8 µg/L-Medienkultur, was in der Regel auf schlechte Faltungseffizienz und zelltoxische Wirkung schließen läßt. Eine nachfolgende analytische Gelfiltration (siehe Abschnitt 2.6.1.2) bestätigte diese Vermutung, da Trimere und höhermolekulare Oligomere (Proteinaggregate) oberhalb des Ausschlussvolumens nachgewiesen wurden. Die CD-Messung (siehe Abschnitt 2.7.5) der Variante ergab einen im Vergleich zum Wt-BBP ähnlich hohen β-Faltblattanteil. Diese Ergebnisse deuteten auf eine gefaltete, aber durch exponierte hydrophobe Bereiche adhäsive Proteinvariante hin, deren Anreicherung vermutlich unspezifisch durch Bindung an Plastik oder hydrophobe Kontaktflächen der Trägerproteine und nicht durch Bindung an das niedermolekulare Doxorubicin vermittelt worden war.

Ursächlich für die unspezifische Anreicherung kann auf den gewählten Trägerproteinen schlecht zugänglich präsentiertes Doxorubicin sein. BSA ist für seine Bindungskapazität gegenüber einer ganzen Reihe hydropher Moleküle bekannt (Kragh-Hansen, 1981). Eine Komplexierung des Doxorubicins in Kavitäten des BSA war durch Gleichgewichtsdialyse (Eksborg *et al.*, 1982) und Gelfiltrationsexperimente (Demant & Friche, 1998a) gezeigt worden. Demgegenüber war für das kleine hydrophile Trägerprotein RNase A bei kovalenter Kopplung eine effiziente Oberflächenpräsentation des Doxorubicins erwartet worden. Hier kann die Ausbildung von Doxorubicin-RNase A Oligomeren zu sterisch bedingter Maskierung des Liganden geführt haben und somit für die fehlende spezifische Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten verantwortlich sein. Solche Aggregationskomplexe wurden von Demant *et al.* (1991) bei der Kopplung des Doxorubicins mittels des homobifunktionellen Reagens DSS (Disuccinimidylsuberat) an das – ebenso wie die RNase A – hydrophile Trägerprotein Transferrin beobachtet.

In einem weiteren Versuch wurde daher für die Präsentation des Doxorubicins eine quasi-Festphasenimmobilisierung mittels des nicht-kovalenten Komplexes aus Doxo-Biotin/Streptavidin eingesetzt (siehe Abschnitt 3.4.2 und Abschnitt 3.5.2). Die Vorteile dieses Systems lagen in der reproduzierbaren Herstellung des Doxo-Biotin-Konjugats mit hoher Ausbeute und Reinheit (siehe Abschnitt 2.8.1 und 3.4.1) verbunden mit der Tatsache, dass der starre molekulare Abstandshalter das Doxorubicin vom Trägerprotein Streptavidin abschirmt.

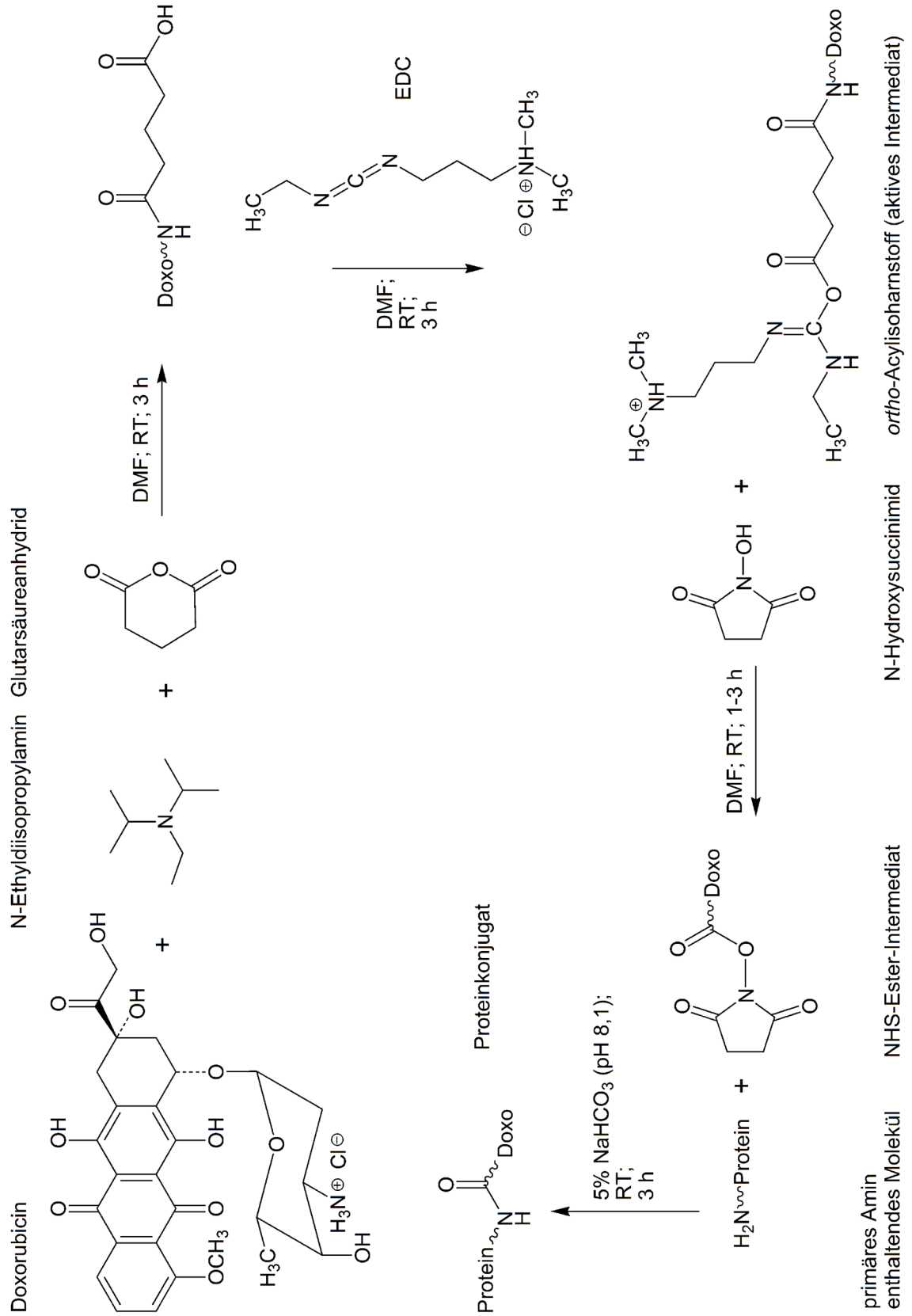

Abbildung 19: Kopplungsschema von Doxorubicin an RNase A über Glutarsäureanhydrid und EDC/NHS; nach Umwandlung der primären Aminogruppe des Daunosaminzuckers des Doxorubicins mittels Glutarsäureanhydrid in eine endständige Carboxylgruppe erfolgt die Umsetzung mit EDC zu einem *ortho*-Acyl-Isoharnstoff-Zwischenprodukt, das anschließend mit N-Hydroxysuccinimid aktiviert wird. Die kovalente Verknüpfung des Doxorubicins mit der RNase A erfolgt im letzten Schritt an den primären Aminogruppen der Lysinseitenketten des Proteins unter Abspaltung der N-Hydroxysuccinimidgruppe (siehe Abschnitt 2.8.3).

```
                BstXI                          Loop 1                                                                  Loop 2
          20                          30                          40                          50                                  60
          SerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAsnSerValGluLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAsnTyrHisValIle
Wt-bbp  : TCCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCAACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTGCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGAACTACCACGTAATC
Bib.    : ........................................NNKNMSNNSNNK.......................................................NNS...NNK......
K4.2.1  :                                          SerTyrPheCys                                                          Pro   Arg
K4.6.0  :                                          PheAlaLeuGln                                                          Gln   Pro
K4.7.1  :                                          ArgProLeuTrp                                                          Asp   Pro
K4.12.5:                                           PheLysSerLeu                                                          Pro   Ser
K4.14.5:                                           Phe       ---                                                         Lys   Pro
K4.30.5:                                           LysThrCysAla                                          Asn             Gln   Pro

                                                                                                Loop 3
                        70                          80                                          90                          100
          HisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnValPheAsnValLeuSerThrAsp
Wt-bbp  : CACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAACTGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCACAGCCTGACTTACGGAGGTGTCACCAAGGAGAACGTATTCAACGTACTCTCCACTGAC
Bib.    : ..................NNS.....T..C.............................................NNS...NNK......NNS...VVS...NNK.......................
K4.2.1  :                  His                                                     Ser                                TyrSerThrTyrSerProLeuThr
K4.6.0  :                  ArgGly            GlnLeuValThrProArgLeuGluArgSerThrThrAlaGlyLeuGlyGluValGlyProAlaSerTrpTyrSerThrTyrSerProLeuThr
K4.7.1  :                  Asp               GlnLeuValThrLeuGluArgSerThrThrAlaSerLeuLeuGluValSerProArg------SerTrpTyrSerThrTyrSerProLeuThr
K4.12.5:             ---   ProLysValProProThrGlnLeuValThrProArgLeuGluArgSerThrThrAlaProLeuMetGluValArgProThrArgArgTyrSerThrTyrSerProLeuThr
K4.14.5:                   Ser                                                     Val                                TyrSerThrTyrSerProLeuThr
K4.30.5:                   Ser               GlnLeuValThrProArgLeuGluArgSerThrThrAlaArgLeuTrpGluValAlaProArgArgLeuTyrSerThrTyrSerProLeuThr

                                Loop 4                                                                  BstXI
                    110                         120                                 130
          AsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyrAspGluAspLysLysGlyHisGlnAspPheValTrpValLeuSerArgSerMetVal
Wt-bbp  : AACAAGAACTACATCATCGGATACTACTGCAAATACGACGAGGACAAGAAGGGACACCAAGACTTCGTCTGGGTGCTCTCCAGAAGCATGGTC
Bib.    : ........................NNK...NNS.......................NNS...NNK.........................
K4.2.1  : ThrArgThrThrSerSerAspThrPheAlaArgThrThrArgThrArg          Asp   Ser
K4.6.0  : ThrArgThrThrSerSerAspLysValGlnLeuArgArgGlyGlnGluGlyThrProArgGlnCysLeu---
K4.7.1  : ThrArgThrThrSerSerAspThrSerAlaProThrThrArgThrArgArgAspThrProThrLeuSerGlyLeu---
K4.12.5: ThrArgThrThrSerArg---    Leu   Trp                         Leu   Arg
K4.14.5: ThrArgThrThrSerSerAspThrCysAlaCysThrThrArgThrArg---        Trp   Pro
K4.30.5: ThrArgThrThrSerSerAspThrPheAlaArgThrThr---                 Arg   Gln
```

Abbildung 20: Aminosäure-Sequenzen, der aus der ersten nativen Bibliothek selektierten BBP-Varianten (aus Anreicherungszyklus 4) im Vergleich zum Wildtyp-BBP (DNA-Sequenz mit angegebenen); der hier gezeigte Ausschnitt aus der Sequenz des Wt-BBP umfasst die Aminosäurepositionen 20 bis 136. Das mit den degenerierten *Primer*-Paaren GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 in einer zweistufigen *PCR*-Reaktion randomisierte Gensegment besitzt flankierende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI ($CCAN_6TGG$, grau hinterlegt). Die variablen *Loop*-Regionen des Wt-BBP sind unterstrichen. Die Aminosäurepositionen innerhalb des Wt-BBP, die für die Konstruktion der Bibliothek einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind grün hervorgehoben (34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127). Dazugehörige Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz des BBP ebenfalls in grün angegeben. Die zugelassenen Zufallskodons in der Nomenklatur entsprechend NC-IUB (1986) sind rot hervorgehoben. Die geänderte Basensequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 (leicht lila hinterlegt) ist auf die Einführung der *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragmentes im Verlauf der *PCR*-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998). Für die selektierten Varianten sind nur die von der Sequenz des Wt-BBP verschiedenen Aminosäuren angegeben. Die zusammenhängenden *Frameshift*-Bereiche innerhalb der Varianten sind blau hervorgehoben; mit einem Konsensusbereich, der blau hinterlegt ist. Deletionsbereiche sind gestrichelt dargestellt und gelb hinterlegt. Zusätzliche Aminosäureaustausche, die weder der gerichteten Zufallsmutagenese noch der Sequenzverschiebung geschuldet sind, sind braun hervorgehoben.

3.5.1.2 Wahl der Elutionsmethode für spezifisch gebundene Phagemide

Für die Anreicherung von Proteinen mit der gewünschten Bindungseigenschaft aus der nativen BBP-Zufallsbibliothek, die erwartungsgemäß allenfalls wenige, moderat affine Bindungsproteine für den unnatürlichen Liganden enthielt, war es wichtig, unabhängig von ihren thermodynamischen oder kinetischen Bindungseigenschaften quantitativ zu eluieren.

Als effiziente Elutionsmethode zur Auflösung des Protein/Liganden-Komplexes werden üblicherweise extreme pH-Bedingungen eingesetzt (Kay, 1996). Die im Zuge dieser Arbeit mit sauerer Elution mit 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 (Beste *et al.*, 1999) wie auch mit basischer

Elution mit 0,1 M Triethylamin pH 12,0 (de Bruin *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 1991) durchgeführten Selektionsexperimente, zeigten keine selektive Anreicherung. Dieses hier erzielte negative Ergebnis spiegelte den früheren Befund von Schlehuber (2000) bei der Erzeugung gegen Digoxigenin gerichteter Anticaline erhaltene wider, deren Anreicherung aus einer analogen BBP-Bibliothek mittels Dissoziation bei niedrigem pH-Wert ebenfalls nicht gelang. Als Ursache wurde der Replikationsvorteil einer Phagemid-Population angesehen, die aus dem hohen Anteil unspezifisch bindender und bei den extremen pH-Bedingungen koeluierter Phagemide stammten. Die bereits erwähnte Elution der an Doxo-SS-Biotin/Streptavidin komplexierten Phagemide durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücke innerhalb des *Linkers* (siehe Abschnitt 3.3.2 und 3.4.1) stellte somit eine alternative Methode zur spezifischen Anreicherung bindungsaktiver Proteinvarianten dar. Das komplexiert verbleibende Hapten beeinträchtigt die Infektivität der Phagemide normalerweise nicht (Kobayashi *et al.*, 2005). Die Sequenzauswertung zufällig ausgewählter Klone aus den Anreicherungszyklen 4 und 5 zeigte ausschließlich Varianten mit Deletionen von 100 – 300 bp im 5'-Bereich der Genkassette (Abbildung 21), die den Promotor und die OmpA-Sequenz umfassten. Diese Deletionen könnten durch den toxischen Effekt des durch die reduktive Spaltung komplexiert bleibenden Doxorubicins auf die Wirtszelle während der Infektion begründet sein, was unter anderem den SOS-Reparaturschutzmechanismus induziert (Anderson *et al.*, 1993; Battista *et al.*, 1990; DeMarini & Lawrence, 1992; Gelvan & Samuni, 1986; Kacinski & Rupp, 1984; Ripley *et al.*, 1988). Es wurde angenommen, dass eine für die Überlebensfähigkeit der Zellen kritische, Rekombinationsereignisse auslösende Konzentration des Doxorubicins in dem Eluat erst bei Anreicherung hinreichend hochaffiner Proteinvarianten nach Zyklus 3 erreicht war. Als Indiz für diese Annahme wurde die Zunahme des Phagemid-Titers bis Zyklus 3 angesehen (von 1/700 der eingesetzten Phagemide in Runde 1 auf 1/100 in Runde 3).

Als Alternative zu den genannten Elutionsmethoden, besonders für die ersten Selektionsrunden, wurde die Kompetition mit einem der Liganden betrachtet. Der Vorteil lag dabei in der erwartungsgemäß hohen Spezifität der Anreicherung, die vom strukturellen Kontext des Trägerproteins und des molekularen Abstandshalter unabhängig sein sollte (Charlton *et al.*, 2001; Schlehuber *et al.*, 2000; Sheedy *et al.*, 2007; Skerra, 2001). Gleichzeitig versprach eine kompetitive Elution die Verminderung des Hintergrunds an Phagemiden ohne präsentiertes Fusionsprotein oder im Leserahmen verschobener bzw. schlecht exprimierbarer BBP-Varianten (de Bruin *et al.*, 1999; Goletz *et al.*, 2002). Angesichts der angesprochenen Toxizität des niedermolekularen Doxorubicins für *E. coli* konnte die kompetitive Elution jedoch nicht mit dem freien Liganden durchgeführt werden. Stattdessen wurde der zur Präsentation des Liganden auf der Festphase immobilisierte Doxo-Biotin/Streptavidin-Komplex (siehe Abschnitte 2.8.4 und 3.4.2) nun ebenfalls für die Elution eingesetzt. Durch Isolierung dieses Komplexes mittels präparativer Gelfiltration (siehe Abschnitte 2.6.1.2 und 3.4.2), war sichergestellt, daß kein überschüssiges Doxorubicin eingetragen wurde.

```
         4240                4260            1                 20                40                60
         +         +         +         +     *         +         +         +         +         +         +
pBBP38:  TGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGACCCGACACCATCGAATGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATCATTGATAGAGT
P4K1   : ...................................................................................-------
P4K2   : ...................................................................................---
P4K3   : ...................................................-------------------------------------------
P5K1   : ...........................-------------------------------------------------------------------
P5K2   : ...-------------------------------------------------------------------------------------------
P5K3   : ...................................................................................------------

                                 BstXI                                Loop 1
                            260                 280                 300                 320
                  +         +         +         +         +         +         +         +         +
pBBP38:  ~~~~GACAACTTCGACTGGTCCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCAACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTGCGGA
                                                                      NNKNMSNNSNNK
P4K1   : ~~~~-------------------------------------------.........TTTC.CC.CTG...................
P4K2   : ~~~~------.......................................................G.ACT.CTTT..................
P4K3   : ~~~~------.......................................................TTTA.GA.CT..................
P5K1   : ~~~~-----------------------------------------------.............TTT.AGC.CT...................
P5K2   : ~~~~-----------------.............................................TTG.AGCCGACT.................
P5K3   : ~~~~------.......................................................TTTC.GTCG.T..................
```

Abbildung 21: DNA-Sequenzen der aus der ersten nativen Bibliothek selektierten nicht-funktionellen BBP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BBP; zufällig ausgewählte Klone aus dem 4 und 5 Anreicherungszyklus. Gezeigt ist ein verkürzter Ausschnitt im Bereich der Nukleotide 4220 bis 330 aus dem zirkulären Phasmidvektor pBBP38 mit insgesamt 4276 bp. Das mit den degenerierten *Primer*-Paaren GB-3/FS-15 randomisierte Gensegment besitzt die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI ($CCAN_6TGG$, grau hinterlegt). Die hier gezeigte variable *Loop*-Region 1 des Wt-BBP ist unterstrichen. Die Nukleotide innerhalb des ersten *Loops* des Wt-BBP, die für die Konstruktion der Bibliothek einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind grün hervorgehoben. Die dabei zugelassenen Zufallskodons in der Nomenklatur entsprechend NC-IUB (1986) sind rot markiert. Für die selektierten Klone sind nur die von der DNA-Sequenz des Wt-BBP verschiedenen Nukleotide angegeben. Die ausgeprägten Deletionsbereiche innerhalb der Varianten, die sowohl deren Promotor- als auch die OmpA-Sequenz umfassten – durch Ausparung im Bereich der Nukleotide 61 bis 243 verkürzt abgebildet (blau hinterlegt) –, sind gestrichelt dargestellt und gelb hinterlegt.

3.5.1.3 Auswahl eines geeigneten Blockierungsreagens

Die Identifizierung eines Biomakromoleküls mit selbst schwacher Wechselwirkung mit Doxorubicin, das sich als Blockierungreagens für nicht gesättigte Bindungsstellen der Polystyroloberfläche der verwendeten Nunc-Immuno™-Flügelstifte eignete und das außerdem in hoher Reinheit im Milligrammbereich verfügbar war, bedurfte besonderer Überlegung. Deshalb wurde neben den gängigen Blockierungsreagenzien wie dem bovinen Serumalbumin (BSA) (Trigatti & Gerber, 1995) und dem Ovalbumin (Huntington & Stein, 2001) das seltener verwendete β-Casein (Livney *et al.*, 2004) getestet. Das relativ hydrophobe Casein besaß den Vorteil fehlender Tertiärstruktur und damit potentieller Bindungstaschen für das hydrophobe Doxorubicin. Die Affinitäten des BSA, des β-Caseins und des Ovalbumins gegenüber Doxorubicin wurden zunächst durch Protein-Fluoreszenztitration einer jeweils 1,0 µM Proteinlösung in PBS/E bis zu einer Endkonzentration von 30,0 µM Doxorubicin bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.4.2). Die gegen die eingesetzte Doxorubicinkonzentration aufgetragene Proteinfluoreszenz zeigte jeweils ein Löschen der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Doxorubicinkonzentration (Abbildung 22). BSA wies unter Annahme einer generellen 1/1-Stöchiometrie der Bindung die höchste Affinität mit einer Dissoziationkonstante von $K_D = 26{,}2 \pm 1{,}4$ µM (Gleichung (31)) bei einem *Quenching*-Effekt der intrinsischen Proteinfluoreszenz durch das komplexierte Doxorubicin von 64,6 ± 1,8 %

auf. Für Ovalbumin wurde die Dissoziationskonstante zu 30,5 ± 2,1 µM bei *Quenching*-Effekt von 73,9 ± 2,7 % bestimmt. Das β-Casein zeigte das stärkste Fluoreszenz-*Quenching* von 85,4 ± 4,9 % bei einer K_D von 41,6 ± 3,4 µM. Die nachgewiesenen Affinitäten waren in allen drei Fällen höher als erwartet, da für BSA mittels Wachstumsinhibitionstests und Gelfiltration in früheren Untersuchungen die Dissoziationskonstante im Bereich von 161 – 943 µM bestimmt worden war (Demant & Friche, 1998a; Demant & Friche, 1998b; Finlay & Baguley, 2000). Wegen der bekannten Interaktion des Doxorubicins mit der Säulenmatrix Sephadex G200 bei der Gelfiltration ist die tatsächliche Dissoziationskonstante vermutlich jedoch niedriger als dort beobachtet (Demant & Friche, 1998a).

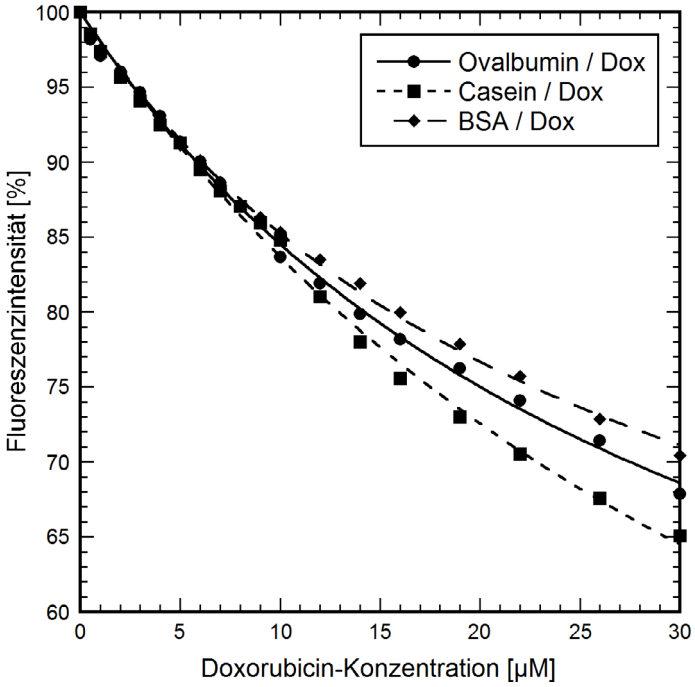

Abbildung 22: Protein-Fluoreszenztitration verschiedener Blockierungsreagenzien mit Doxorubicin; eine 1,0 µM Lösung des jeweiligen Proteins in PBS/E pH 7,4 wurde mit Doxorubicin bis zu einer Endkonzentration von 30 µM titriert. Dabei wurde die Abnahme der Proteinfluoreszenz bei der Anregungswellenlänge von 295 nm und der Emissionswellenlänge 345 nm in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration verfolgt. Die erhaltenen Messwerte wurden um den Puffer-Leerwert bereinigt, auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % skaliert und um den inneren Filtereffekt des Doxorubicins korrigiert (Abschnitt 2.7.4.2). Die Kurvenanpassung erfolgte durch nicht-lineare Regression (Gleichung (31)).

Um diesen Befund zu überprüfen und auch die Affinität, der im Vergleich zu den bisher hier getesteten Proteinen, hydrophileren RNase A (Kartha *et al.*, 1967) gegenüber Doxorubicin zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzemission einer 10,0 µM Doxorubicinlösung in PBS/E bei Titration mit den potentiellen Blockierungsreagenzien bis zu einer Endkonzentration von 100 µM bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm verfolgt (siehe Abschnitt 2.7.4.3; Abbildung 23). Die Titration mit RNase A resultierte im gemessenen Bereich in einem lediglich geringen linearen Abfall der Fluoreszenz um ~6 %, was die Bestimmung einer Dissoziationskonstante nicht ermöglichte. Die in diesem Fall allenfalls schwach affine Wechselwirkung mit Doxorubicin sprach für den Einsatz als

Blockierungsreagenz während des *Phage Display*. Die analogen Titrationsexperimente mit den zuvor analysierten Proteinen zeigten eine wesentlich stärkere Fluoreszenzlöschung des Doxorubicins. Die höchste Affinität für Doxorubicin besaß das Ovalbumin mit einer Dissoziationskonstante von 25,9 ± 2,4 µM (Gleichung (31)), gefolgt von BSA mit 34,5 ± 2,4 µM und Casein mit 45,9 ± 5,5 µM. Die hier bestimmten niedrigen bis moderaten Affinitäten für die Komplexbildung der Blockierungsproteine mit dem Doxorubicin stimmten mit den zuvor mittels Protein-Fluoreszenztitration erhaltenen Werten sehr gut überein. Wegen dieser beim BSA, Casein und Ovalbumin im Vergleich zur RNase A deutlich erkennbaren Bindungsaktivität für den niedermolekularen Liganden (Abbildung 23) schien lediglich die RNase A als Blockierungsreagens geeignet.

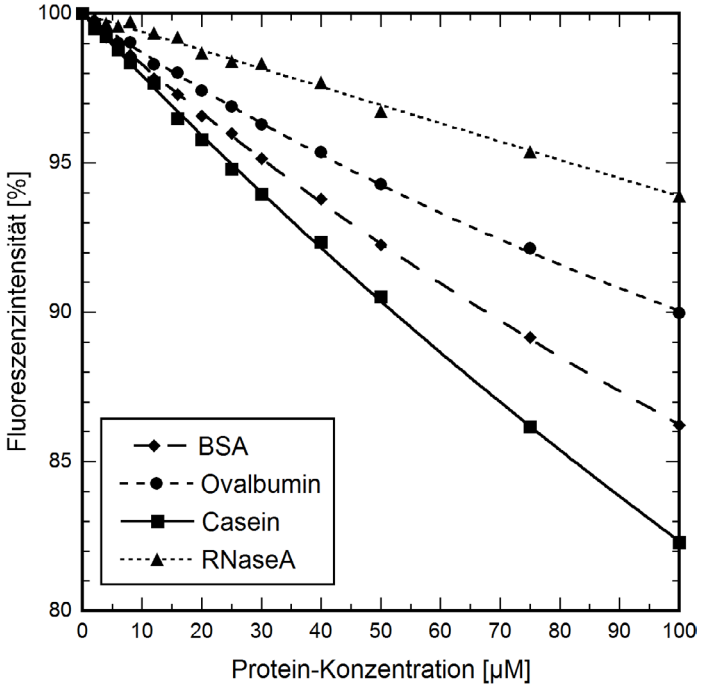

Abbildung 23: Fluoreszenztitration von Doxorubicin mit möglichen Blockierungsreagenzien; eine 10,0 µM Lösung des Doxorubicins in PBS/E pH 7,4 wurde mit dem jeweiligen potentiellen Blockierungsreagens bis zu einer Endkonzentration von 100 µM titriert. Dabei wurde die Abnahme der intrinsischen Fluoreszenz des Doxorubicins bei der Anregungswellenlänge von 472 nm und der Emissionswellenlänge 585 nm in Abhängigkeit der Proteinkonzentration verfolgt. Die erhaltenen Messwerte wurden um den Puffer-Leerwert bereinigt, auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % skaliert und durch nicht-lineare Regression (Gleichung (31)) ausgewertet (Abschnitt 2.7.4.3).

Ferner wurde das nichtionische Tensid Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20) in den Selektionszyklen des *Phage Display* (siehe Abschnitt 2.3.3, 3.5.2 und 3.7) und beim Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitt 2.4 und 3.5.3) zur Blockierung unspezifischer Wechselwirkungen (Bradbury & Marks, 2004) eingesetzt.

Tabelle 4: Mittels Fluoreszenztitration ermittelte Dissoziationskonstanten (K_D) für die Komplexbildung möglicher Blockierungsreagenzien mit Doxorubicin für den Einsatz im *Phage Display*

Reagens	Protein-Fluoreszenztitration		Liganden-Fluoreszenztitration	
	K_D [µM]	Q_{max} [%]	K_D [µM]	Q_{max} [%]
BSA	26,2 ± 1,4	54,6 ± 1,8	34,5 ± 2,4	62,2 ± 3,5
β-Casein	41,6 ± 3,4	85,4 ± 4,9	45,9 ± 5,5	100
Ovalbumin	30,5 ± 2,1	63,9 ± 2,7	25,9 ± 2,4	36,4 ± 2,7
RNase A	–	–	n.d.	n.d.
Angabe des *Quenching*-Effekts (Q_{max} = 100 % – Asymptotenwert); "n.d.": ohne Angabe, da Nachweis nicht möglich				

3.5.2 Affinitätsanreicherung an immobilisierten Doxorubicingruppen

Ausgehend von der auf dem Bilin-Bindungsprotein (BBP) basierenden Genbibliothek erhöhter Diversität mit 2,53 x 10^{10} unabhängigen Transformanden (siehe Abschnitt 2.3.2 und 3.3.1) erfolgte die *Phage Display*-Selektion in Zyklen (siehe Abschnitt 2.3.3), die sich aus den folgenden sechs Schritten zusammensetzten:

I. Immobilisierung des Zielmoleküls in Form eines Streptavidin/Biotin-Doxorubicin-Komplexes (siehe Abschnitt 2.3.3.1) an der Polystyrolfestphase der Nunc-Immuno™-Flügelstifte mit hoher Proteinbindungskapazität;

II. Absättigung freier Bindungsstellen der Polystyroloberfläche mit RNase A, um unspezifische Adsorption der Phagemide zu verhindern;

III. Inkubation der beladenen Flügelstifte mit der Phagemidbibliothek;

IV. Entfernung nicht bindender Phagemide in acht Waschschritten mit PBS/T;

V. spezifische Elution gebundener Phagemide durch Kompetition mit dem Streptavidin/Biotin-Doxo-Komplex (siehe Abschnitt 2.3.3.3);

VI. Amplifizierung der eluierten Phagemide nach Infektion von *E. coli* XL1-Blue (siehe Abschnitt 2.3.4).

Es wurden insgesamt fünf Selektionszyklen durchgeführt. Zur Beurteilung der Anreicherung wurden die Titer der eingesetzten Phagemide sowie ausgewählter Wasch- und der Elutionsfraktionen bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.5). Daraus wurde der relative Anteil bezogen auf die für den Selektionsprozess insgesamt eingesetzten Phagemide errechnet und ein Anreicherungsprofil erstellt (Abbildung 24).

Die für die Adsorption eingesetzten Phagemidzahlen lagen dabei zwischen 1,93 x 10^{11} *cfu* und 1,80 x 10^{12} *cfu*. Alle fünf Anreicherungszyklen zeigten einen steten Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschfraktionen. Der Phagemidtiter der Elutionsfraktion war im Vergleich zu dem des Waschschritts 8 in Runde 1 um den Faktor 2,38 höher. Dieses Verhältnis

sank bis Runde 3 auf 0,76 und stieg in den beiden folgenden Zyklen wieder auf 1,48 bzw. 2,34 an.

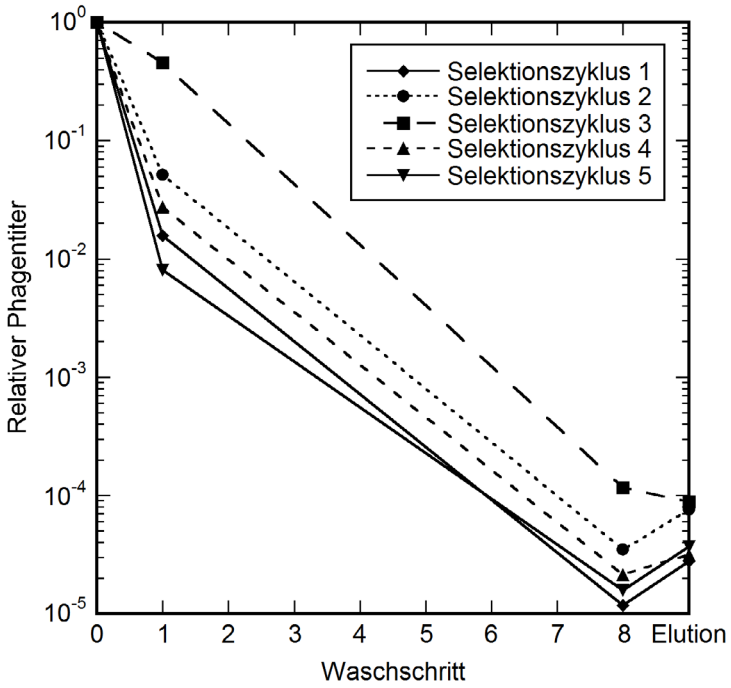

Abbildung 24: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1 – 5 im Verlauf der Anreicherung Doxorubicin bindender BBP-Varianten aus der Zufallsbibliothek mittels *Phage Display*; nach Inkubation eines mit Doxo-Biotin/Streptavidin beschichteten Flügelstifts mit 1,93 – 18,0 x 10^{11} Phagemiden für 1 h wurden nicht bindende Phagemide durch wiederholtes Waschen des Flügelstifts mit PBS/T entfernt. Nach acht Waschschritten wurden die gebundenen Phagemide mit einer 300 µM Lösung von mit Doxo-Biotin/Streptavidin eluiert. Der Phagemidtiter ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion wurden bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen.

3.5.3 Kolonie-Filterstapeltest zur Identifizierung von BBP-Varianten mit Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin

Aus dem präparierten Phasmid-DNA-Genpool des Anreicherungszyklus 5 wurde die mittels *Bst*XI-Verdau isolierte Genkassette der BBP-Varianten und das entsprechend verdaute Plasmid pBBP22 (Abbildung 5) subkloniert (siehe Abschnitt 2.2.4.2 und 2.2.4.3) und *E. coli* TG1-F^- mit dem Ligierungsansatz transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.3). Die BBP-Varianten mit Affinität für Doxorubicin wurden in einem Kolonie-Filterstapeltest (siehe Abschnitte 1.5.2 und 2.4) auf Komplexbildung mit einer 1,0 µM Lösung des Doxo-Biotin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1) bei nachfolgender Inkubation mit ExtrAvidin®-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Nachweisreaktion geprüft (Abbildung 25). ExtrAvidin® wurde verwendet, da es im Gegensatz zu Streptavidin-Reagenzien nicht mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel innerhalb des Fusionsproteins kreuzreagiert (Gaj *et al.*, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). Zudem erlaubte es eine vom makromolekularen Einfluss des Streptavidins, das während der Selektion im Komplex mit Doxorubicin-Biotin eingesetzt wurde (siehe Abschnitt 3.5.2), unabhängige Beurteilung der spezifischen Bindungsaktivität der BBP-Varianten gegenüber Doxorubicin. Die einzelnen Kolonien entsprechenden, punktförmigen Farb-

signale (circa 90 % der untersuchten Transformanden) wiesen sehr ähnliche Morphologie und Intensität auf. Es wurden insgesamt 91 Kolonien zweier auf analoge Weise hergestellter Primärfilter 1 (F1K1 – 41) und 2 (F2K1 – 50) (Abbildung 25) auf eine neue Agarplatte überführt, um mit diesen Klonen nachfolgend einen sekundären Kolonie-Filterstapeltest durchzuführen. Das Hintergrundsignal – durch eine leichte, aber deutlich sichtbare Rotfärbung der Membran ausgewiesen – war auf den mit dem Doxo-Biotin-Konjugat inkubierten Filtern wie erwartet vergleichsweise hoch, da für HSA niedrige intrinsische Affinität für Doxorubicin mit einer K_D = 161 – 385 µM (Chassany *et al.*, 1996; Demant & Friche, 1998a; Finlay & Baguley, 2000) ebenso wie für das als zusätzliches Blockierungsreagens verwendete BSA (siehe Abschnitt 3.5.1.3) beschrieben ist.

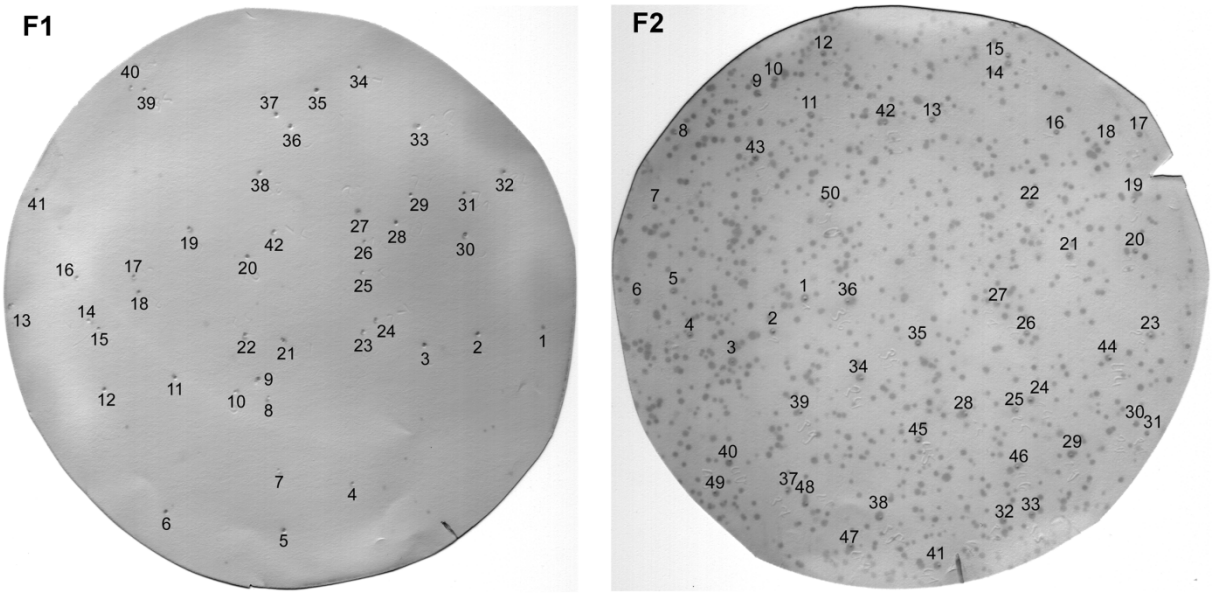

Abbildung 25: Ergebnis des primären Kolonie-Filterstapeltests zur Auswahl von BBP-Varianten mit Affinität für Doxorubicin im Anschluß an das *Phage Display*; die Phasmid-DNA der gepoolten Phagemide aus dem Elutionsschritt des Anreicherungszyklus 5 (Abbildung 24) wurde präpariert und auf dem Vektor pBBP22 (Abbildung 5) subkloniert. BBP-Varianten mit Affinität zu Doxorubicin wurden nach Sekretion in *E. coli* TG1-F⁻ in dem Kolonie-Filterstapeltest anhand ihrer Komplexbildung mit einer 1,0 µM Lösung des Doxo-Biotin-Konjugats (siehe Abschnitt 2.8.1) bei nachfolgender Inkubation mit ExtrAvidin®-Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Nachweisreaktion identifiziert (siehe Abschnitt 2.4). Es wurden insgesamt 91 dazugehörige Kolonien der Filter 1 (F1K1 – 41) und 2 (F2K1 – 50) auf eine neue Agarplatte überführt und einem sekundären Kolonie-Filterstapeltest (Abbildung 26) unterzogen.

Die ausgewählten und erfolgreich kultivierten Kolonien der Filter F1 und F2 (62 der 91 Klone) wurden auf den Sekundärfilter doppelt aufgetragen. Als Kontrolle wurde parallel das Wt-BBP-Fusionsprotein verwendet. Eine mit den identischen Kolonien versehene Negativkontrollmembran, bei der jedoch keine Inkubation mit dem Doxo-Biotin-Konjugat durchgeführt wurde, zeigte keine nennenswerten Farbsignale, was auf spezifische Erkennung des Zielmoleküls durch die BBP-Varianten deutete. Das intrinsische Bindungsaktivität für Doxorubicin aufweisende Bilin-Bindungsprotein (siehe Abschnitt 3.6.4.1) zeigte auf dem sekundären Positivfilter wie erwartet eine schwache Färbung. Eine Reihe der analysierten BBP-Varianten

wies unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Koloniegröße demgegenüber eine stärkere Farbintensität als das Wt-BBP auf (Abbildung 26).

Der gängige biophysikalische Sensorfarbstoff ANS (8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure) weist generelle Affinität für hydrophobe Oberflächen von Makromolekülen auf und wird in der Bindungstasche des Wt-BBP – wie auch in Abschnitt 3.6.4.2 selbst nachgewiesen – mit einer $K_D \approx 9{,}0$ µM komplexiert (Breustedt *et al.*, 2006). Zur Analyse der Bindung von Doxorubicin in der Bindungstasche der selektierten BBP-Varianten wurde daher ein Verdrängungsexperiment durchgeführt. Es wurden zwei Filter mit identischen Koloniedoppelproben hergestellt und mit einer 100 nM Lösung des Doxo-Biotin-Konjugats inkubiert. Einer der Filter wurde zeitgleich mit einem tausendfachen Überschuss entsprechend 100 µM an freiem ANS inkubiert. Nach der Detektion des sekundären Konjugats anhand der Biotingruppe zeigte sich bei allen Klonen eine im Ausmaß variierende Verdrängung des Doxorubicins durch den ANS-Liganden, resultierend in verminderter Signalstärke im Vergleich zu dem nur mit Doxo-Biotin inkubierten Filter (Abbildung 26).

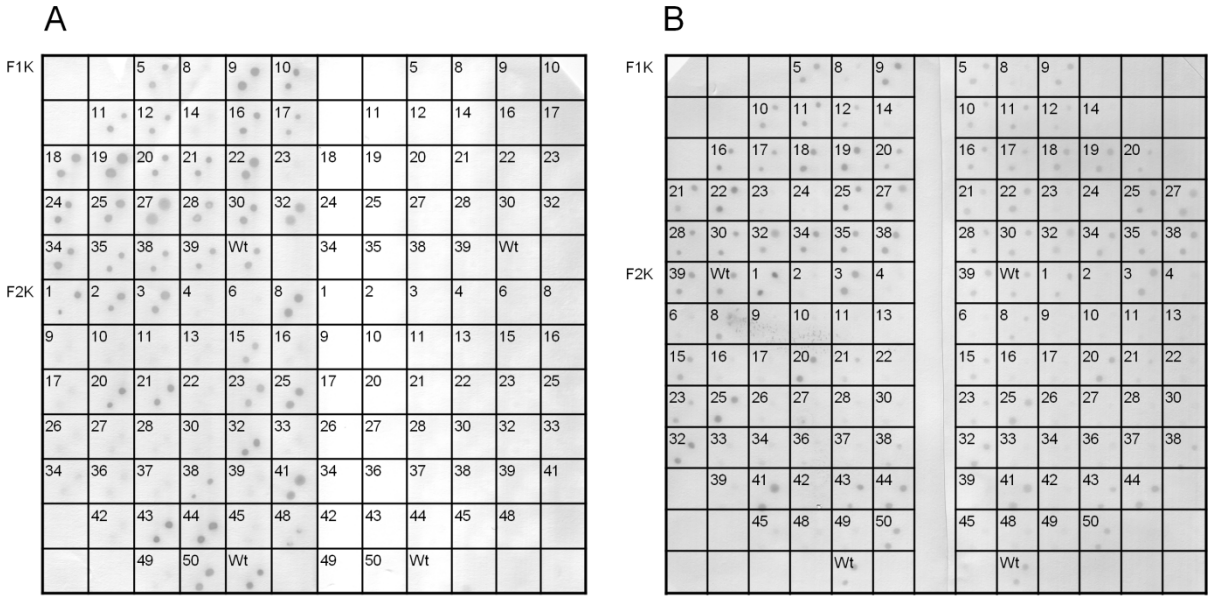

Abbildung 26: Sekundärfilter zur Verifizierung der im primären Filter positiv getesteten Klone auf Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin; auf die sekundären Filter wurden sämtliche erfolgreich gepickten Kolonien (K) der Primärfilter 1 (F1) und 2 (F2) (Abbildung 25) sowie Kolonien, die das Wt-BBP-Fusionsprotein sezernieren, jeweils doppelt aufgetragen. Die BBP-Varianten mit Affinität zu Doxorubicin wurden anhand ihrer Komplexbildung mit einer 1,0 µM (**A**) oder 100 nM (**B**) Lösung des Doxo-Biotin-Konjugats nachgewiesen. Die rechte Seite des Filters **A** entspricht der linken Seite in Abwesenheit des Doxo-Biotin-Konjugats. Die rechte Seite des Filters **B** zeigt die Verdrängung des biotinylierten Doxorubicin-Konjugats in Gegenwart eines tausendfachen Überschusses an ANS (100 µM). Die chromogene Nachweisreaktion erfolgte jeweils nach Inkubation mit dem Biotin-spezifischen ExtrAvidin®-Alkalische Phosphatase-Konjugat (siehe Abschnitt 2.4). Es wurden insgesamt 11 Kolonien (F1K9, K18, K19, K22, K27, K32, K35 und K38 sowie F2K25, K32 und K41) mit intensiven Farbsignalen sowie maximalem Verdrängungseffekt ausgewählt, und einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.7 und 3.6.1).

Die Ursache der nicht absolut quantitativen Verdrängung durch den Kompetitor ANS – sichtbar auf der rechten Seite des Filters B in Abbildung 26 – war vermutlich zum einen die

sterische Umgestaltung der Bindungstasche der BBP-Varianten und zum anderen war es wahrscheinlich, daß die ANS-Konzentration in Lösung wegen hoher Affinität des Liganden gegenüber HSA, mit dem die Filtermembranen beschichtet waren, stark vermindert war. Beschrieben sind zwei Bindungsstellen für HSA. Eine Hauptbindungsstelle in der die *Loops* 7 und 8 umfassenden Subdomäne IIIA (Bagatolli *et al.*, 1996b; He & Carter, 1992) mit $K_D = 0{,}91 - 1{,}32 \times 10^{-6}$ M und eine zweite in der Subdomäne IIA mit $K_D = 12{,}66$ µM (Bagatolli *et al.*, 1996a; Essassi *et al.*, 1990). Die Bindungskapazität des verwendeten humanen Serumalbumins für ANS war durch Rückstände gebundener Fettsäuren allerdings vermutlich leicht erniedrigt. Da die innerhalb des HSA zwischen Domäne II und III gelegene Bindungsstelle für die Albumin-Bindungsdomäne des Fusionsproteins ebenfalls den Bereich der *Loop*s 6 – 8 umfasste (Falkenberg *et al.*, 1992; Lejon *et al.*, 2004), war auch hier ein Kompetitionseffekt denkbar, der ebenfalls geringere Signalstärke im Vergleich zum Positivfilter verursachen konnte.

Acht Klone des ersten Primärfilters und drei des zweiten Filters, die im sekundären Filterstapeltest im Vergleich zum Wt-BBP die intensivsten Farbsignale zeigten, und zudem im kompetitiven Test die deutlichsten Signalunterschiede aufwiesen, wurden nachfolgend einer Sequenzanalyse unterzogen.

3.6 Charakterisierung aus der nativen BBP-Zufallsbibliothek selektierter Varianten

3.6.1 DNA-Sequenzanalyse

Von den elf im Filterstapeltest ausgewählten *E. coli*-Kolonien wurde die isolierte Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.3.1) im Bereich des mutierten *BBP*-Strukturgens sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.7). Dabei wurden im Gegensatz zur Anreicherung von gegen Fluorescein (Beste, 1998) und Digoxigenin (Schlehuber, 2001) gerichteten BBP-Varianten keine mehrfach auftretenden Aminosäuresequenzen erhalten (Abbildung 27). Dies ließ sich auf die erhöhte Diversität der nativen BBP-Zufallsbibliothek und zugleich geringere Anzahl an Selektionsrunden zurückführen. Innerhalb des Abschnittes der randomisierten *Bst*XI-Genkassette zeigten alle Klone einen Leserahmen, der für funktionelle BBP-Varianten und somit auf dem Phagemid präsentierte Fusionsproteine kodierte (Abbildung 27 und Tabelle 5). Allerdings besaßen drei der Varianten jeweils ein zusätzliches freies Cystein; bei F1K19 in der ersten und bei F1K22 bzw. F2K32 in der zweiten *Loop*-Region. Eine unerwünschte kovalente Dimerisierung durch Bildung einer Disulfidbrücke konnte für diese Varianten nicht ausgeschlossen werden.

F2K32 wies zudem ein *Amber*-Stoppkodon und damit vermutlich Wachstumsvorteile aufgrund der geringeren Gendosis auf (siehe Abschnitt 1.5.1). Bei den selektierten Varianten wurden vereinzelt auch Aminosäuresubstitutionen außerhalb der eigentlichen Mutationspositionen, jedoch innerhalb der durch die Oligodesoxynukleotide definierten Bereiche

Tabelle 5: Bewertung der mittels Kolonie-Filterstapeltest gegenüber Doxorubicin bindungsaktiven Klone inklusive Sequenzanalyse

Klon	**Signalstärke Sekundärfilter vs. Koloniengröße**		**DNA- bzw. Protein-sequenz**	**Rang**	**funkt. *ORF***	**apolare AS-Subst. > ∅ 6,2**	**freies Cystein (Position)**	**2 Proline in *loop* 4 (Position)**	**zusätzl. AS-Subst. (Position)**	***Amber*-Stopp (Position)**
	A	**B**								
F1K9	○	○	–	5 (– 1)	+	–	–	–	–	–
F1K18	○	○	+	4 (+ 1)	+	11	–	112; 114	–	–
F1K19	+	++	×	n.r.	+	–	58	–	–	–
F1K22	+	–	×	n.r.	+	–	114	–	–	–
F1K27	+	+	+	**1** (+ 3)	+	10	–	112; 125	Gly^{75}→Arg	–
F1K32	–	○	–	6 (– 2)	+	–	–	–	His^{84}→Pro	–
F1K35	○	– –	–	7 (– 3)	+	–	–	–	–	–
F1K38	○	– –	–	7 (– 3)	+	–	–	–	Pro^{31}→Ser Ile^{60}→Phe	–
F2K25	○	++	+	**1** (+ 3)	+	9	–	–	–	–
F2K32	+	–	×	n.r.	+	–	114	–	–	58
F2K41	++	+	○	**1** (+ 3)	+	–	–	–	–	–

A und **B** entspricht den beiden Sekundärfiltern (Abbildung 26), anhand derer eine skalierte Beurteilung der Signalstärke der Klone in Relation zur Koloniegröße auf der hydrophilen Membran (nicht gezeigt) vorgenommen wurde. Dabei entspricht "++" = sehr intensiv, sehr gut; "+" = intensiv, gut; "○" = mittel, befriedigend; "–" = schwach, ausreichend; "– –" = sehr schwach, mangelhaft; die Bewertung der DNA- bzw. Proteinsequenz – nähere Informationen zu den Sequenzen sind der Abbildung 27 bzw. dem rechten Teil dieser Tabelle zu entnehmen – erfolgte unter Verwendung obiger Skala zuzüglich der Bewertung "×" = ungenügend (Ausschlusskriterium, welches für Sequenzen mit zusätzlichen *Amber*-Stoppkodons und freien Cysteinresten vergeben wurde). Der Rang ergibt sich aus der Summe der Bewertungen (in Klammern) in Relation aller getesteten und sequenzierten Klone untereinander, wobei Klone die ein Ausschlusskriterium erfüllten in die Rangliste ohne Bewertung ("n.r.") eingegangen sind.

```
                BstXI                                   Loop 1                                                                                  Loop 2
        20                              30                              40                              50                                              60
        SerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAsnSerValGluLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAsnTyrHisValIle
Wt-bbp: TCCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCAACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTGCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGAACTACCACGTAATC
Bib.  :.......................................NNNKNMSNNSNNK.......................................................................NNS...NNK......
F1K9  : .......................................TGGA.AACTCT.......................................................................G.....G......
                                               MetGluAsnSer                                                                            Lys   Gln
F1K18 : .......................................GTTATC.C...A.......................................................................CT....A.G......
                                               ValIleAla                                                                               Leu   Lys
F1K19 : .......................................TCTCTGC.GCC.........................................................................C.....TGT......
                                               SerLeuLeuPro                                                                            His   Cys
F1K22 : .......................................TCTC.GA.CCT.........................................................................CG...G.T......
                                               SerProIleLeu                                                                            Thr   Asp
F1K27 : .......................................GCT.ACT.C.GT.........................................................................GC....GCG......
                                               AlaTyrPheGly                                                                            Ala   Ala
F1K32 : .......................................T.CTGCAG..A.........................................................................G.....GG......
                                               IleLeuGln                                                                               Ser   Arg
F1K35 : .......................................C.GGA....AT.........................................................................GG.....CG......
                                               GlnGlu   Met                                                                           Gly   Pro
F1K38 : ....................................T..C.T.ACTC.TG.........................................................................CG...T..
                                            SerHisTyrSerTrp                                                                                  Pro   Phe
F2K25 : .......................................GTTG.TA.C..A.........................................................................CT....A.T......
                                               ValAlaIle                                                                               Leu   Asn
F2K32 : .........................................ATGTGGC.T.........................................................................CG...T.G......
                                                  MetTrpHis                                                                            Thr   End
F2K41 : .......................................TGGC.G.C.ATC.........................................................................GC.....CG......
                                               TrpProAlaLeu                                                                            Ala   Pro
```

```
                                                                                                Loop 3
                                70                              80                              90                              100
        HisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnValPheAsnValLeuSerThrAsp
Wt-bbp: CACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAACTGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCACAGCCTGACTTACGGAGGTGTCACCAAGGAGAACGTATTCAACGTACTCTCCACTGAC
Bib.  :..................NNS.....T..C.............................................NNS...NNK......NNS...VVS...NNK.......................
F1K9  : ..................CGC.....T..C.............................................ACC...GTT......TCG...G.C....TT.......................
                          Arg                                                       Thr   Ser      Val   Asp   Ile
F1K18 : ..................CCG.....T..C.............................................GC.....TG.............GC....GTG.......................
                          Pro                                                       Ala   Leu            Ala   Ile
F1K19 : ...................GC.....T..C.............................................T......CT......CG....GGC...CTG.......................
                          Ser                                                            Ser      Arg   Gly   Leu
F1K22 : ....................C.....T..C.............................................T.....GCT.......GG...CG....G.T.......................
                                                                                         Ala      Gly   Arg   Asp
F1K27 : ..................GGC.....T..C........T...C..................................GGC...GCT......TCG...GC....TCT.......................
                          Gly                     Arg                                    Gly   Ala      Ser   Ala   Ser
F1K32 : ..................CC.....T..C.......................................C....AAC....CG......CGG...GCC.....T.......................
                          Thr                                                  Pro   Asn   Ser      Arg   Ala
F1K35 : ..................CAC.....T..C.............................................TG....ATG......CC....CG....GTG.......................
                          His                                                       Trp   Met      Pro   Arg   Val
F1K38 : ..................C.C.....T..C.................................................CG......AG....C.C.....G.......................
                          Leu                                                            Ser      Ser   His   Lys
F2K25 : ...................AG.....T..C.............................................GC....GCT......T.....GGC...TCG.......................
                          Lys                                                       Ala   Ala      Phe   Gly   Ser
F2K32 : ...................AG.....T..C.............................................T.C...TT.......A.....CC...TCT.......................
                          Lys                                                       Phe   Phe      Asp   Thr   Ser
F2K41 : ...................GAC.....T..C.............................................TG....GGT......C.....G.....TCT.......................
                          Asp                                                       Trp   Gly      Leu   Glu   Ser
```

```
                        Loop 4                                                                  BstXI
                110                             120                             130
        AsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyrAspGluAspLysLysGlyHisGlnAspPheValTrpValLeuSerArgSerMetVal
Wt-bbp: AACAAGAACTACATCATCGGATACTACTGCAAATACGACGAGGACAAGAAGGGACACCAAGACTTCGTCTGGGTGCTCTCCAGAAGCATGGTC
Bib.  : .......................NNK...NNS.......................NNS...NNK.......................
F1K9  : .......................AGT...GTG.......................GTG....CT.......................
                               Ser   Val                        Val   Ser
F1K18 : .......................CCT...CCT.......................TC.....G.......................
                               Pro   Pro                        Leu   Leu
F1K19 : .......................C.G...G.C.......................TCC...CCG.......................
                               Gln   Asp                        Ser   Pro
F1K22 : .......................A.T...TGC.......................GGC...CGT.......................
                               Asn   Cys                        Gly   Arg
F1K27 : .......................CCG...GTG.......................GCG...CCT.......................
                               Pro   Val                        Ala   Pro
F1K32 : .......................A.G.....G.......................GGC...CCG.......................
                               Lys                              Gly   Pro
F1K35 : .......................GTT...TTG.......................A.C.....T.......................
                               Val   Leu                        Asn
F1K38 : .......................GTG...CCC.......................ATG...CAT.......................
                               Val   Pro                        Met   His
F2K25 : .......................C.T...GTG.......................A.C...GGG.......................
                               His   Val                        Asn   Gly
F2K32 : .......................ACT...TGC.......................ACC...G.G.......................
                               Thr   Cys                        Thr   Val
F2K41 : .......................GCT...C.G.......................GCG...GAT.......................
                               Ala   Gln                        Ala   Asp
```

Abbildung 27: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenzen, der aus der nativen Bibliothek mit erhöhter Diversität (2,53 x 10^{10} unabhängige Transformanden) selektierten BBP-Varianten mit Affinität für Doxorubicin aus dem Anreicherungszyklus 5 (siehe Abschnitt 3.5.2) im Vergleich zum Wildtyp-BBP; der hier gezeigte Ausschnitt aus der Sequenz des Wt-BBP umfasst die Aminosäurepositionen 20 bis 136. Das mit den degenerierten *Primer*-Paaren GB-3/FS-15 bzw. GB-11/GB-4 in einer zweistufigen *PCR*-Reaktion randomisierte Gensegment besitzt flankierende Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI (CCAN$_6$TGG, grau hinterlegt). Die variablen *Loop*-Regionen des Wt-BBP sind unterstrichen. Die Aminosäurepositionen innerhalb des Wt-BBP, die für die Konstruktion der Bibliothek einer gerichteten Zufallsmutagenese unterzogen worden waren, sind grün hervorgehoben (34 bis 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 und 127). Dazugehörigen Nukleotide, die zur Herstellung der Bibliothek randomisiert wurden, sind unterhalb der Sequenz des BBP ebenfalls in grün angegeben. Die zugelassenen Zufallskodons in der Nomenklatur entsprechend NC-IUB (1986) sind rot hervorgehoben. Für die selektierten Varianten sind nur die von der Sequenz des Wt-BBP verschiedenen Basen und die gegebenenfalls verschieden kodierten Aminosäuren angegeben. Identische Basen hingegen sind durch Punkte markiert. Die geänderte Basensequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 (blau hinterlegt) ist auf die Einführung der *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragments im Verlauf der *PCR*-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998).

gefunden. Sie waren offenbar bedingt durch Fehler bei der Synthese der Oligodesoxynukleotide oder entstanden im Verlauf der *PCR* (siehe Abschnitt 3.3.2).

Die Sequenzanalyse der angereicherten BBP-Varianten zeigte im Vergleich zum Wt-BBP im Einklang mit dem hydrophoben Charakter des neuen Liganden eine Vielzahl apolarer Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungstasche. Drei selektierte Varianten, F1K18, F1K27 und F2K25, besaßen mit 11, 10 und 9 neuen hydrophoben Resten einen deutlich erhöhten Anteil gegenüber der durchschnittlichen Anzahl von 6,2 neuen hydrophoben Resten für alle sequenzierten Varianten (Tabelle 5). Diese drei Varianten zeigten bei der späteren Titration mit Doxorubicin auch die deutlichste Löschung der intrinsischen Proteinfluoreszenz (siehe Abschnitt 3.6.4.1). Ferner deutete der Einbau kleinerer aliphatischer Aminosäuren – vor allem im Fall der hinsichtlich der spektroskopischen Eigenschaften interessantesten Mutanten F1K18 und F1K27 (Abbildung 30) – auf einen raumschaffenden Effekt innerhalb der Bindungstasche. Der Einbau jeweils zweier Prolinreste im vierten *Loop* dieser Varianten könnte eine strukturelle Umorientierung dieses Bereiches induziert haben. Eine Weitung der Bindungstasche wurde von Brown (2000) auch für Antikörper aus der späten Phase der Immunantwort mit erhöhter Affinität gegenüber präsentiertem Haptenantigen gefunden.

3.6.2 Bakterielle Produktion der BBP-Varianten F1K18 und F1K27 in löslicher Form

Im Folgenden werden lediglich die nachträglich spektroskopisch am interessantesten erscheinenden Varianten F1K18 und F1K27 (Abbildung 30) behandelt. Analysiert wurden jedoch auch die Klone 9, 19, 22 und 32 des ersten Filters sowie die Klone 25 und 41 des zweiten Filters (Abbildung 26 und Tabelle 5). Um das Bindungsverhalten der erhaltenen BBP-Varianten gegenüber Doxorubicin unabhängig vom Einfluss der fusionierten Albumin-Bindungsdomäne oder der Konjugatpartner für den Liganden zu untersuchen und mit dem Wt-BBP als Ausgangspunkt der Selektion zu vergleichen, waren Interaktionsmessungen in Lösung notwendig. Dazu wurden die selektierten BBP-Varianten F1K18 und F1K27 neben den als Kontrollen fungierenden Proteinen Wt-BBP, FluA (Beste, 1998) und DigA16 (Schlehuber, 2001) gentechnisch in dem Expressionsplasmid pBBP21 (Beste, 1998) (Abbildung 28) in dem *E. coli*-Stamm JM83 produziert (siehe Abschnitt 2.5.1). Die für die jeweilige Variante kodierende *bbp*-Genkassette wurde durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI aus dem Plasmid pBBP22 herausgeschnitten (siehe Abschnitt 2.2.4.2 und 3.5.3; Abbildung 5). Nach Isolierung des Inserts folgte die Subklonierung durch Ligierung mit analog präparierten Vektorrückgrat von pBBP21 (siehe Abschnitt 2.2.4.2 und 2.2.4.3). Mit dem Ligierungsansatz wurden chemisch kompetente Zellen des Expressionsstamms JM83 transformiert, gefolgt von Plasmidisolierung und analytischem Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.2.2.3, 2.2.3.1 und 2.2.4.2).

Die Herstellung der löslichen Proteine mit den beiden korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken bedurfte der Sekretion in das oxidierende Milieu des Periplasmas, weshalb N-terminal eine

OmpA-Signalsequenz an die BBP-Varianten angehängt wurde. Unterstützt wurde die korrekte Faltung des rekombinanten Proteins durch dicistronische Überexpression des für eine endogene *E. coli* Protein-Disulfidisomerase kodierenden *dsb*C Gens (Schmidt *et al.*, 1998). Die effiziente Repression des Tetrazyklin-Promotors gewährleistete eine hohe Zelldichte vor Induktion der Proteinbiosynthese (Skerra, 1994).

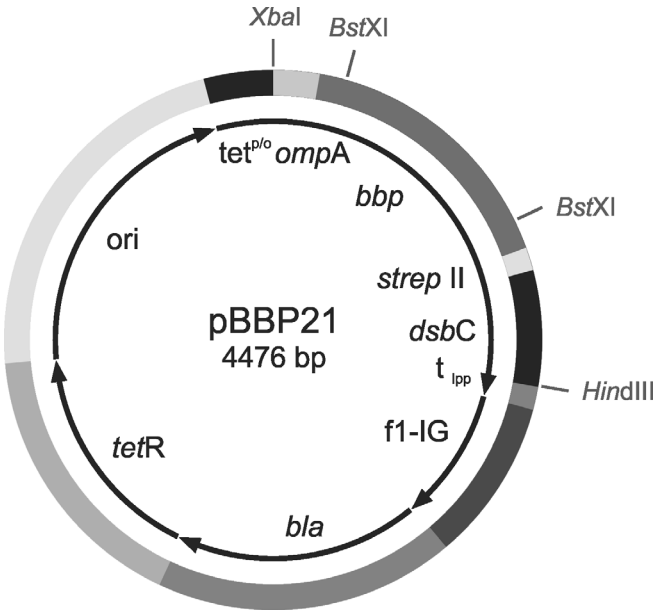

Abbildung 28: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pBBP21; das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus OmpA-Signalpeptid, BBP und dem *Strep*-tag II steht unter Kontrolle des Tetrazyklin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$). Der Leserahmen wird zur Steigerung der Ausbeute korrekt gefalteten Proteins von der Gensequenz für die Protein-Disulfidisomerase DsbC einschließlich deren ribosomaler Bindungsstelle gefolgt, und die Disulfidisomerase somit überexprimiert (Beste *et al.*, 1999). *Xba*I, *Bst*XI, und *Hin*dIII bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Die restlichen Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 3.

3.6.3 Reinigung der rekombinanten BBP-Varianten

Das C-terminale *Strep*-tag II der Fusionsproteine diente der Einstufenreinigung des rekombinanten Proteins aus der periplasmatischen Proteinfraktion durch Streptavidin-Affinitätschromatographie (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt & Skerra, 2007). Dazu wurde der periplasmatische Proteinextrakt nach Dialyse gegen Chromatographiepuffer über eine mit der Wt-Streptavidinmutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997) beladene, äquilibrierte Säule geschickt. Nach Entfernung ungebundener *E. coli* Proteine durch Waschen der Säule mit SA-Puffer wurde das rekombinante Protein unter milden Bedingungen kompetitiv mit *D*-Desthiobiotin in löslicher, nativer Form von der Säule eluiert (siehe Abschnitt 2.6.1.1).

Im Anschluß an die Affinitätschromatographie erfolgte in Abhängigkeit der Proteinreinheit bestimmt durch HPLC-Analytik an Superdex™75 HR 10/30 gegebenenfalls noch eine Gelfiltrationsreinigung der monomeren Proteinpopulation an einer präparativen Superdex™75 HiLoad 16/60 *Prep Grade*-Säule (siehe Abschnitt 2.6.1.2).

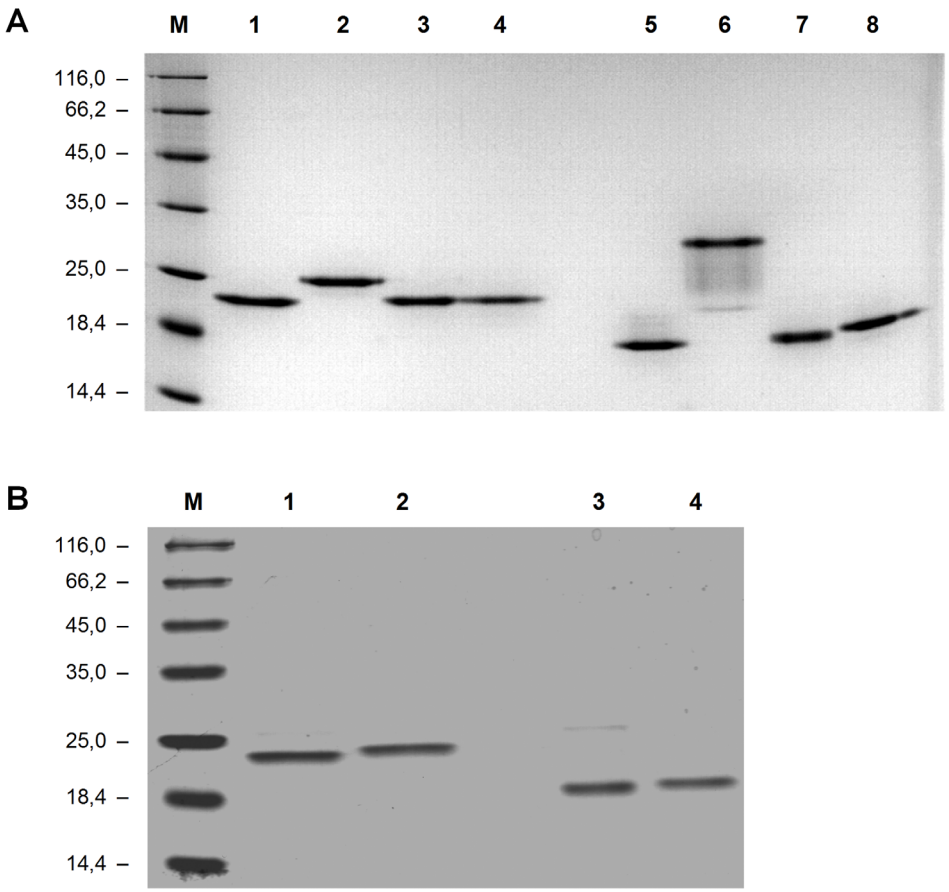

Abbildung 29: Analyse der durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltrations-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1) gereinigten Lipocaline Wt-BBP, AGP sowie der BBP-Varianten DigA16, FluA, F1K18 und F1K27 mittels *SDS-PAGE*; die Proteinproben wurden mit und ohne Reduktion der Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol auf ein 15 % *SDS*-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brillantblau R250 angefärbt (siehe Abschnitt 2.6.2). (**A**) Spur M: Protein-Größenstandard (kDa); Spur 1 und 5 – Wt-BBP; Spur 2 und 6 – AGP; Spur 3 und 7 – DigA16; Spur 4 und 8 – FluA (jeweils unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen); (**B**) Spur M: Protein-Größenstandard (kDa); Spur 1 und 3 – BBP-Variante F1K18; Spur 2 und 4 – BBP-Variante F1K27 (jeweils unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen).

Mit den kalkulierten Extinktionskoeffizienten des Wt-BBP sowie seiner Varianten wurden die Proteinkonzentrationen durch Messung der Absorption bei 280 nm nach Gleichung (1) bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.4 und Tabelle 2). Die hergestellten Proteine wiesen untereinander sehr unterschiedliche Ausbeuten auf (Tabelle 6). Die gegen Doxorubicin selektierten BBP-Varianten F1K18 und F1K27 besaßen mit 175 µg bzw. 70 µg je Liter *E. coli*-Kultur die geringsten Ausbeuten, gefolgt von 0,4 mg/L für die gegen Digoxigenin gerichtete Variante DigA16 (Schlehuber, 2001). Die gegen Fluorescein gerichtete Variante FluA (Beste, 1998) offenbarte ein ähnliches Expressionsniveau wie das Wildtypprotein mit Ausbeuten von etwa 0,8 mg/L. Die *SDS-PAGE*-Analyse des gereinigten Wt-BBP sowie der Varianten FluA und DigA16 zeigte im reduzierten Zustand homogene Proteinfraktionen ohne nachweisbare Verunreinigungen (siehe Abschnitt 2.6.2; Abbildung 29). Die nicht-reduzierten Proteinproben wiesen eine einzige diskrete Proteinbande mit erhöhter Mobilität auf, was mit einer kompakteren Form bedingt durch die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken

zusammenhängt (Beste, 1998; Breustedt *et al.*, 2006; Schlehuber, 2001). Die Proteinfraktionen der BBP-Varianten F1K18 und F1K27 enthielten je nach Präparation eine geringe Kontamination mit einem ~17,0 kDa großen Protein. Bei diesem handelte es sich vermutlich um das Chaperonprotein Skp (siehe Abschnitt 3.8.1), das möglicherweise mit dem Fremdprotein im Periplasma des Bakterienstamms JM83 assoziiert (Hayhurst & Harris, 1999; Korndörfer *et al.*, 2004; Schäfer *et al.*, 1999). Beide Varianten zeigten in der *SDS-PAGE* unter reduzierten wie auch nicht-reduzierten Bedingungen diskrete Banden, wobei die Variante F1K27 im Vergleich zu F1K18 entgegen der berechneten molaren Masse (Tabelle 6) eine etwas geringere elektrophoretische Mobilität aufwies. Die beiden Disulfidbrücken schienen auch hier aufgrund des schnelleren Laufverhaltens unter nicht-reduzierenden Bedingungen und des Fehlens weiterer Banden für Disulfidisomere korrekt geknüpft.

Tabelle 6: Proteinchemische Eigenschaften der in *E. coli* produzierten Lipo- und Anticaline

Protein	**Expressions-vektor**	***E. coli*-Stamm**	**pTUM4[a]**	**AS**	**pI**	**MW [Da]**	**Ausbeute/ Liter-Kultur**
Wt-BBP-*Strep*-tag II	pBBP21	JM83	–	184	5,97	21006	0,8 mg
F1K18-*Strep*-tag II	pBBP21	JM83	–	184	5,67	20653	175 µg
F1K27-*Strep*-tag II	pBBP21	JM83 MC4100 Δ*skp*	– +	184	5,86	20502	70 µg 6,25 mg[b]
FluA-*Strep*-tag II[c]	pBBP21	JM83	–	184	7,19	20999	0,8 mg
DigA16-*Strep*-tag II[d]	pBBP21	JM83	–	184	5,65	20806	0,4 mg
AGP-*Strep*-tag II[e]	pAGP1	MC4100 Δ*skp*	+	192	4,97	22669	2,0 mg[f]

[a] Kotransformation mit pTUM4: "+" = ja; "–" = nein; [b] Ausbeute bei Fermentation im 8 L-Maßstab (siehe Abschnitt 2.5.2 und 3.8.1); [c] nach Beste (1998); [d] nach Schlehuber (2001); [e] nach (Breustedt *et al.*, 2006); [f] Ausbeute bei Fermentation im 8 L-Maßstab nach (Schönfeld, 2010)

3.6.4 Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Doxorubicinkomplexierung durch Fluoreszenztitration

3.6.4.1 Vergleich der Varianten F1K18 und F1K27 mit dem Wt-BBP sowie den Anticalinen FluA und DigA16 mittels Proteinfluoreszenzmessung

Die jeweils sechs Trp-Reste der Varianten F1K18 und F1K27, des Wt-BBP und des Anticalins DigA16 (Schlehuber, 2001) sowie die sieben des Anticalins FluA (Beste, 1998) wurden selektiv mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 295 nm angeregt (Laws & Shore, 1978). Die Emissionswellenlänge der maximalen Proteinfluoreszenz wurde bei 345 nm beobachtet. Die korrigierten Prozentwerte der Fluoreszenzintensität einer Titrationsreihe wurden gegen die Doxorubicinkonzentration aufgetragen (Abbildung 30A). Dabei zeigte sich eine zunehmende Löschung der Proteinfluoreszenz mit steigender Doxorubicinkonzentration. Durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (31) wurde die Dissoziationskonstante sowie der Asymptotenwert der maximalen Fluoreszenzlöschung ermittelt (siehe Abschnitt 2.7.4.2).

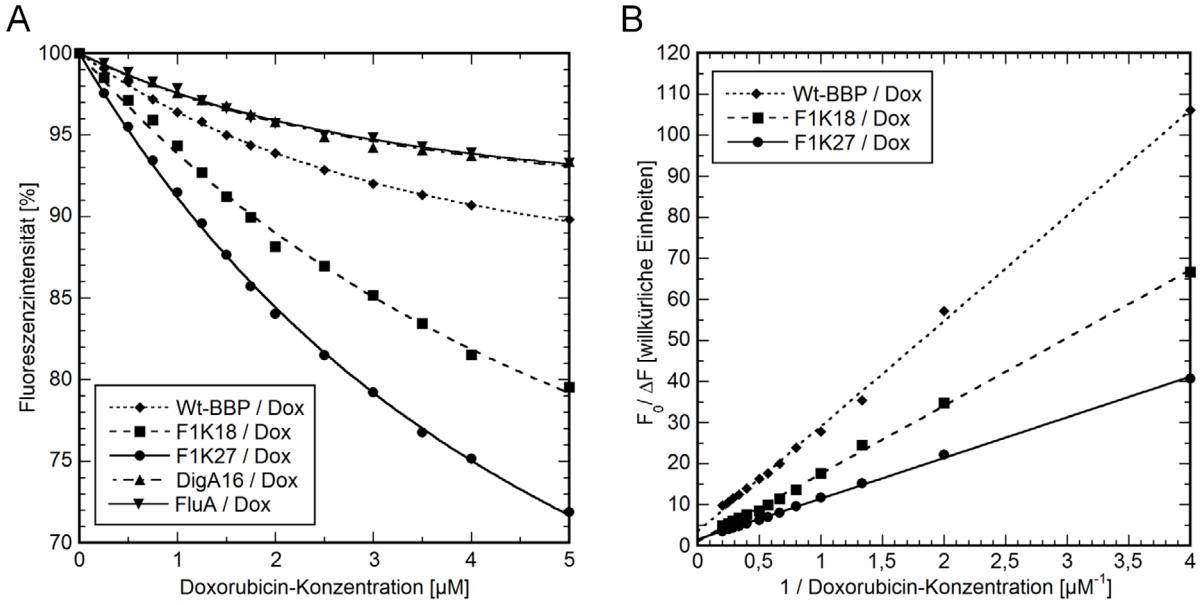

Abbildung 30: Fluoreszenztitration der rekombinanten BBP-Varianten F1K18, F1K27, DigA16 und FluA mit Doxorubicin im Vergleich zum Wildtypprotein; eine 1,0 µM Lösung der gereinigten Proteine (siehe Abschnitt 2.6.1) wurde in PBS/E pH 7,4 mit Doxorubicin bis zu einer Endkonzentration von 5,0 µM titriert. Dabei wurde die Abnahme der Proteinfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm verfolgt. Die erhaltenen Messwerte wurden um den Puffer-Leerwert bereinigt, auf eine Anfangsfluoreszenz von 100 % skaliert, und um den inneren Filtereffekt des Doxorubicins korrigiert (Abschnitt 2.7.4.2). (**A**) nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (31); (**B**) lineare Auftragung des Quotienten $F_0/\Delta F$ gegen den reziproken Wert der Doxorubicinkonzentration in einem nach Samworth *et al.* (1988) modifizierten Stern-Volmer-Diagramm (siehe Abschnitt 2.7.4.2 und Gleichung (33)).

Die beiden als Negativkontrolle dienenden Anticaline FluA und DigA16 wiesen im Einklang mit ihrer für das Zielmolekül Fluorescein bzw. Digoxigenin maßgeschneiderten Bindungstasche die geringsten Absolutwerte des Fluoreszenz-*Quenching* mit ~11 % auf, so dass genauso wie beim Wt-BBP keine verlässliche Dissoziationskonstante ermittelt werden

konnte. Jedoch zeigte das Wt-BBP ein etwas stärker ausgeprägtes Bindungsverhalten gegenüber Doxorubicin mit einem maximalen *Quenching* von 17,4 ± 0,4 %. Die vom Wt-BBP abstammenden hier selektierten Varianten zeigten demgegenüber wesentlich höhere Werte für das maximale Fluoreszenz-*Quenching* von 47,9 ± 3,8 % für F1K18 und 57,7 ± 1,7 % für F1K27. Die Bindungsaffinitäten der Varianten F1K18 und F1K27 gegenüber Doxorubicin wurden mit K_D = 5,95 ± 0,75 µM bzw. 4,69 ± 0,24 µM ermittelt (Tabelle 7). Damit war relevante Bindungsaktivität der beiden ausgewählten BBP-Varianten gegenüber dem vorgegebenen Liganden Doxorubicin nachgewiesen.

3.6.4.2 Vergleich der Variante F1K27 mit dem Wt-BBP sowie dem Anticalin FluA mittels kompetitiver Fluoreszenzmessung

Das bereits in Abschnitt 3.5.3 als kompetitiver Ligand des Doxorubicins für die hydrophobe Bindungstasche des Wt-BBP und seiner selektierten Varianten verwendete ANS wurde hier in Lösung als spektroskopisch aktiver, kompetitiver Komplexierungspartner eingesetzt. Bei Bindung in hydrophober Umgebung zeigt die bei 370 nm angeregte Fluoreszenz des ANS eine drastisch erhöhte Fluoreszenz-Quantenausbeute sowie eine hypsochrome Verschiebung von 512 nm auf 475 nm (Gasymov & Glasgow, 2007). Die Senkung der Fluoreszenzintensität des ANS bei Verdrängung durch Doxorubicin aus einer solchen lipophilen Umgebung kann somit zur Bestimmung der Affinität der Variante F1K27, des Wt-BBP und des Anticalins FluA für das Doxorubicin genutzt werden. Die Bestimmung der Affinität für ANS selbst wurde zunächst gemäß Breustedt (2006) durch Titration einer physiologisch gepufferten 1,0 µM Lösung des jeweiligen Proteins mit ANS und Messung der relativen Intensität der Fluoreszenzemission des ANS durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.4.4; Abbildung 31). Für das Wt-BBP und FluA wurde durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung (31) eine Dissoziationskonstante von 9,19 ± 0,28 µM bzw. 9,19 ± 0,37 µM erhalten. Das Ergebnis der Affinität des natürlichen BBP für ANS stimmte sehr gut mit dem von Breustedt (2006) erhaltenen Wert von ~ 9,0 µM überein. Die Variante F1K27 zeigte demgegenüber eine geringfügig höhere Affinität mit K_D = 8,55 ± 0,37 µM bei deutlich erniedrigter Quantenausbeute. Die kompetitive Verdrängung des ANS aus dem Komplex mit dem jeweiligen Protein wurde nach Gleichgewichtseinstellung in Lösung für 10 min bei 25 °C durch Titration mit Doxorubicin durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 1,0 µM; die Konzentration des ANS lag bei jeweils 9,0 µM. Die Variante F1K27 und das Wt-BBP lagen in PBS/E pH 7,4 vor; das Anticalin FluA in 50 mM Hepes/NaOH pH 7,4. Der Nachweis des Protein/ANS-Komplexes erfolgte bei Anregung bei 370 nm durch Messung der Fluoreszenzemission bei 475 nm (siehe Abschnitt 2.7.4.4). Die gemessenen apparenten Fluoreszenzintensitäten wurden um den inneren Filtereffekt (siehe Abschnitt 2.7.4.2) des Doxorubicins bei der Anregungswellenlänge von 370 nm und den Fluoreszenzbeitrag des unkomplexierten ANS bei der Emissionswellenlänge 475 nm bereinigt.

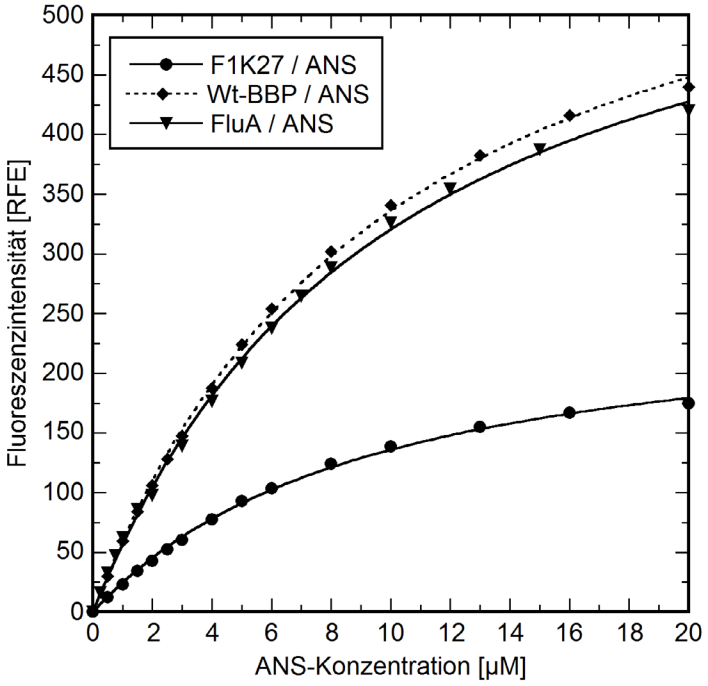

Abbildung 31: Fluoreszenztitration der rekombinanten Lipocaline Wt-BBP, und FluA sowie der BBP-Variante F1K27 mit ANS; eine 1,0 µM Lösung der gereingten (siehe Abschnitt 2.6.1) Proteine Wt-BBP und F1K27 in PBS/E pH 7,4 sowie von FluA in 50 mM Hepes/NaOH pH 7,4 wurde mit einer ANS bis zu einer Endkonzentration von 20,0 µM titriert. Die bei 370 nm angeregte Fluoreszenz des Liganden wurde bei 475 nm verfolgt und die erhaltenen Messwerte um die intrinsische Fluoreszenz von ANS in Abwesenheit von Protein korrigiert. Anschließend wurden die Datenpunkte durch nicht-lineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz nach Gleichung (31) angepasst (siehe Abschnitt 2.7.4.2, 2.7.4.3 und 2.7.4.4).

Bei Auftragung der korrigierten, apparenten Fluoreszenz des ANS in Prozent der Ausgangsintensität gegen die Konzentration des eingesetzten Kompetitors Doxorubicin zeigte sich eine hyperbolische Sättigungskurve für die Ausbildung des Protein/Doxorubicin-Komplexes, entsprechend einer Verringerung der Konzentration des Protein/ANS-Komplexes (Abbildung 32). Durch nicht-lineare Regression mittels Gleichung (49) wurde die Dissoziationskonstante des jeweiligen Proteins für Doxorubicin anschließend nach Gleichung (50) ermittelt. Die Doxorubicin-Dissoziationskonstante für F1K27 lag bei 6,61 ± 0,37 µM und die für das Wt-BBP bei 6,67 ± 0,15 µM (Tabelle 7). Im Gegensatz zur Protein-Fluoreszenztitration, bei der lediglich die beiden selektierten F1K18 und F1K27 signifikante Bindungsaktivität gegenüber Doxorubicin zeigten, ist dieser Effekt hier ebenso für das rekombinante BBP nachweisbar und mit der Dissoziationskonstanten der Variante F1K27 nahezu identisch. Demgegenüber besaß das für Fluorescein spezifische Anticalin FluA eine wesentlich niedrigere Affinität mit K_D = 24,8 ± 0,7 µM.

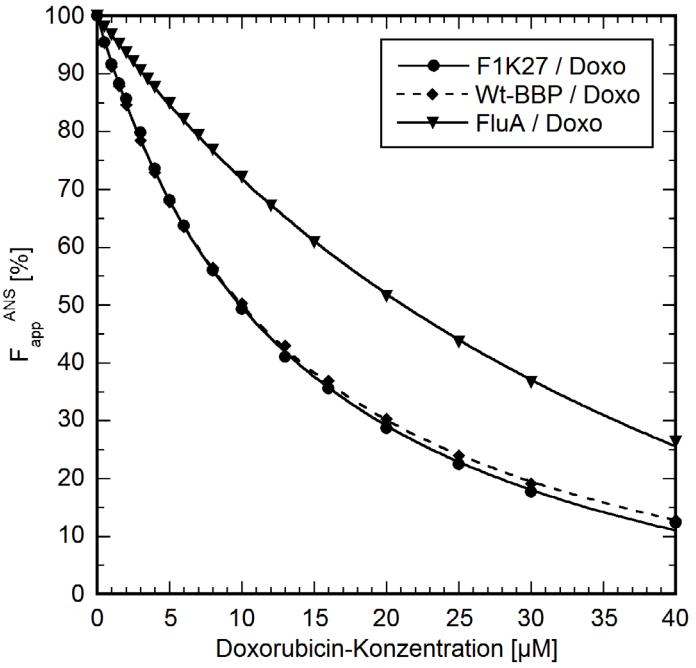

Abbildung 32: Nachweis kompetitiver Verdrängung des spektroskopisch aktiven Ligand ANS durch Doxorubicin für das rekombinante Wt-BBP, FluA und die BBP-Variante F1K27 mittels Fluoreszenztitration; ausgehend von jeweils einer 1,0 µM Lösung der gereinigten (siehe Abschnitt 2.6.1) Proteine Wt-BBP und F1K27 in PBS/E pH 7,4 sowie von FluA in 50 mM Hepes/NaOH pH 7,4 wurde zunächst der Protein/ANS-Komplex durch Zugabe von 9,0 µM ANS ausgebildet – entsprechend der Konzentration halbmaximaler Sättigung der Ligandenbindungsstellen der Proteine, wie anhand der Dissoziationskonstante für ANS (Abbildung 31) zuvor bestimmt. Die kompetitive Verdrängung des ANS aus der Bindungstasche erfolgte durch Zugabe von Doxo bis zu einer Endkonzentration von 40,0 µM. Die Verdrängung wurde durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei spezifischem Nachweis des komplexierten ANS bei einer Anregung von 370 nm und einer Emission von 475 nm verfolgt. Die um den inneren Filtereffekt des Doxorubicins und den Pufferleerwert korrigierten Messwerte wurden durch nicht-lineare Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz nach Gleichung (49) angepasst (siehe Abschnitt 2.7.4.4).

Tabelle 7: Mittels Fluoreszenztitration ermittelte Dissoziationskonstanten (K_D) für die Komplexbildung rekombinanter Lipocaline bzw. Anticaline mit Doxorubicin

Protein	**Protein-Fluoreszenztitration**		**kompetitive Fluoreszenztitration**
	K_D [µM]	**Q_{max} [%]**	**K_D [µM]**
Wt-BBP	n.d.	17,4 ± 0,4	6,67 ± 0,15
F1K18	5,95 ± 0,75	47,9 ± 3,8	–
F1K27	4,69 ± 0,24	57,7 ± 1,7	6,61 ± 0,37
DigA16	n.d.	11,3 ± 0,8	–
FluA	n.d.	11,0 ± 0,7	24,8 ± 0,7
Angabe des *Quenching*-Effekts (Q_{max} = 100 % – Asymptotenwert); "n.d.": ohne Angabe, da Nachweis nicht möglich			

3.7 Affinitätsmaturierung der Variante F1K27

Bei der Reifung von B-Zellen im adaptiven Immunsystem dient die somatische Hypermutation von Antikörpergenen der Erzeugung und Auswahl derjenigen Antikörper, die erhöhte Affinität für ein Antigen besitzen. Der Austausch einiger weniger Aminosäuren ist *in vivo* oft ausreichend, um erhebliche Affinitätsveränderungen zu induzieren und gleichzeitig die Proteinfaltung nicht zu beeinflussen (Berek & Milstein, 1987; Sharon, 1990).

Es erschien sinnvoll, den evolutiven Prozess der somatischen Hypermutation zur Verbesserung der Affinität der Variante F1K27 für Doxorubicin *in vitro* nachzuahmen. Dabei wurde eine moderate Mutationsrate von 2 – 5 Aminosäureaustauschen angestrebt, um eine Affinitätssteigerung zu erzielen, ohne die Proteinarchitektur in Form der vorliegenden Lipocalinfaltung zu beeinträchtigen (Drummond *et al.*, 2005).

3.7.1 Einführung von Punktmutationen in die DNA-Sequenz des Strukturgens der BBP-Variante F1K27 und Herstellung der Phagemid-Bibliothek

Die *PCR*-Vervielfältigung einer DNA-Sequenz in Gegenwart von dNTP-Analoga, deren Basenpaarung promiskuitiv ist, bietet eine etablierte Methode zur zufälligen Einführung von Punktmutationen in das Strukturgen der Variante F1K27. Als tolerierte Substrate der *Taq*-DNA-Polymerase eigneten sich die beiden Analoga dPTP (2'-Deoxy-P-Nukleosid-5'-Triphosphat) und 8-oxo-dGTP (8-Oxo-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat) (Abbildung 6), da diese stabil und stark mutagen sind und sowohl Transitionen als auch Transversionen erlaubten (Zaccolo *et al.*, 1996).

Zufallsmutationen wurden in die Genkassette der BBP-Variante F1K27 – ausgehend von der kodierenden DNA auf dem Expressionsplasmid pBBP21 (Abbildung 28) als Matrize – in einem ersten *PCR*-Schritt (siehe Abschnitt 2.2.4.1) mit den flankierenden Oligodesoxynukleotiden GB1 und GB2 (siehe Abschnitt 2.1.2) in Gegenwart äquimolarer Konzentrationen der dNTPs und je 60 µM der beiden Nukleotidanaloga eingeführt. Der von den Oligodesoxynukleotiden eingeschlossene innere Sequenzbereich innerhalb der *Bst*XI-Kassette umfasste die Aminosäurepositionen 28 bis 127 und beinhaltete alle vier *Loop*-Regionen (Abbildung 4). In einem darauffolgenden zweiten *PCR*-Schritt (siehe Abschnitt 2.2.4.1) wurde das primäre *PCR*-Produkt in Abwesenheit der beiden Nukleotidanaloga vervielfältigt. Die mittels Sequenzanalyse ermittelte Mutationsfrequenz lag bei 0 – 7 Basenpaaren entsprechend 0 – 5 Aminosäuresubstitutionen.

Die hergestellte Zufallsbibliothek (siehe Abschnitt 2.3.2 und 3.3) für die Affinitätsmaturierung beruhte auf einem Ligierungsansatz von 15,0 pmol. Dies entsprach 36,0 µg an mit *Bst*XI verdautem Vektorrückgrat des Plasmids pBBP38 (Abbildung 3) und 4,0 µg der *Bst*XI-Kassette des mutierten Strukturgens der Variante F1K27 (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Die ligierte DNA wurde in neunzehn Elektroporationsansätzen zur Transformation elektrokompetenter

XL-*Blue* Zellen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Die resultierende Zufallsbibliothek der Variante F1K27 besaß mit 1,05 x 10^{10} unabhängigen Transformanden hohe Diversität.

3.7.2 Affinitätsanreicherung an immobilisierten Doxorubicingruppen

Ausgehend von der auf der BBP Variante F1K27 basierenden partiell randomisierten Genbibliothek erfolgte die *Phage Display*-Anreicherung in vier Selektionszyklen (siehe Abschnitt 3.5.2) unter variierenden Bedingungen. Als *Target* wurde das Doxo-Dig-Konjugat (siehe Abschnitt 3.4.1) an mit Anti-Dig-IgG beladenen, magnetischen Zellulose-Eisenoxid-Partikeln verwendet. In den beiden ersten Runden wurde die Doxorubicin-Konzentration mit 600 nM konstant gehalten. In Runde 3 und 4 wurde die Stringenz durch Senkung der Ligandenkonzentration um den Faktor 5 bzw. 10 sowie durch Inkubation der Phagemide mit dem Doxo-Dig-Konjugat in Lösung – vor dem Abfangen mit den magnetischen Partikeln – erhöht. Zur Elution wurden saure pH-Bedingungen gewählt (siehe Abschnitte 2.3.3.3 und 3.5.1.2). Die Titer der eingesetzten Phagemide sowie ausgewählter Wasch- und der Elutionsfraktionen wurden wie zuvor bestimmt (Abbildung 33).

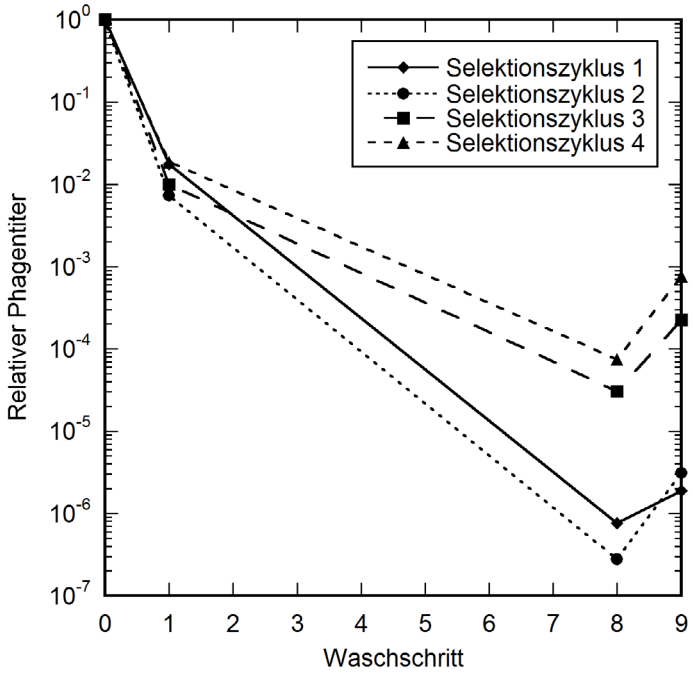

Abbildung 33: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1–4 im Verlauf der Affinitätsanreicherung Doxorubicin bindender BBP-Varianten aus der auf der BBP Variante F1K27 basierenden zufällig randomisierten Genbibliothek mittels *Phage Display*; das Doxo-Dig-Konjugat (siehe Abschnitt 3.4.1) wurde an mit Anti-Dig-IgG beschichteten, magnetisierbaren Zellulose-Eisenoxid-Partikeln immobilisiert. In den beiden ersten Runden wurde die Doxorubicin-Konzentration mit 600 nM konstant gehalten wurde. In Runde 3 und 4 wurde die Stringenz der Selektion durch Senkung der Ligandenkonzentration um den Faktor 5 bzw. 10 und Präinkubation der Phagemide mit dem Doxo-Dig-Konjugat in Lösung erhöht. Nicht bindende Phagemide wurden in acht Waschschritten mit PBS/T abgetrennt. Der Phagemidtiter ausgewählter Waschfraktionen sowie der unter sauren Bedingungen eluierten Phagemid-Fraktion (siehe Abschnitt 2.3.3.3) wurde bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen. Der Ausgangstiter der eingesetzten Phagemide wurde auf den Wert 1,0 normalisiert.

Die für die Adsorption eingesetzten Phagemidzahlen lagen zwischen 2,92 x 10^{11} *cfu* und 1,23 x 10^{12} *cfu*. Alle vier Anreicherungszyklen zeigten jeweils einen steten Abfall des Phagemidtiters im Verlauf der Waschfraktionen. Der Anreicherungsfaktor des Elutionstiters im Vergleich zum Titer des Waschschrittes 8 stieg von Runde 1 mit 2,46 auf 10,28 in Runde 4. Besonders auffällig war zudem die Anreicherung durch Selektion in Lösung ab Runde 3.

Die Identifizierung gegenüber Doxorubicin bindungsaktiver Varianten wurde nach der Anreicherung mit dem Kolonie-Filterstapeltest durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4). Die erhaltenen Signale zeigten im Vergleich zur Ausgangsvariante F1K27 keine deutlich erhöhte Intensität (Daten nicht gezeigt). Acht Klone der Selektionszyklen 3 und 4 mit den stärksten Intensitäten wurden einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.7). Sie wiesen 1 – 6 Aminosäureaustausche verteilt über den gesamten kodierenden DNA-Sequenzbereich der *Bst*XI-Kassette auf (Abbildung 34). Die prominenteste vertretene Substitution war der Austausch der positiv geladenen Lysinseitenkette (AAA oder AAG) gegen das negativ geladene Glutamat (GAA oder GAG), vermutlich in Folge dPTP vermittelter A→G Transition. Ein solcher Glutamat-Austausch wurde sowohl an der Öffnung der Bindungstasche im Bereich der variablen Peptidschleife 1 am Ende des β-Faltblatts A an Position 31, am Beginn des β-Faltblatts B an Position 41 und an Position 65 in der Peptidschleife 2 am Beginn des β-Faltblatts D beobachtet (Abbildung 4). Auch die an der Öffnung der Bindungstasche gelegene Region des *Loops* 4 wies an Position 121 und 123, also dem Beginn des β-Faltblatts H, zwei Substitutionen zu Glu auf. Demgegenüber wurde am geschlossenen Ende der kelchförmigen Lipocalinstruktur lediglich ein Glutamateinbau in Position 83 am Beginn des β-Faltblatts E gefunden. Weitere häufige durch A→G Transition entstandene Aminosäuresubstitutionen waren Lys→Arg, Glu→Gly und Asp→Gly. Am Boden der Bindungstasche wurde zudem zweimal eine Substitution Lys→Gln an Position 107 beobachtet.

Das verstärkte Auftreten des Austausches Lys→Glu im Bereich der für die Bindungsspezifität verantwortlichen *Loop*-Bereiche war nicht nur auf die gwählte Mutagenesemethode zurückzuführen sondern deutete auch darauf hin, dass bei der Elution unter sauren Bedingungen eine Änderung des Ladungszustands durch Protonierung der Glutamatreste eine Rolle spielte.

Deshalb wurde nachfolgend eine erneute Anreicherung von Varianten aus der Zufallsbibliothek basierend auf F1K27 mittels Elution unter basischen Bedingungen (de Bruin *et al.*, 1999; Marks *et al.*, 1991) mit 0,1 M Triethylamin pH 12,0 oder unter denaturierenden Bedingungen (Jacobsson *et al.*, 2003) mit 4,0 M Harnstoff in PBS durchgeführt (siehe Abschnitt 2.3.3.3). Nach jeweils vier Zyklen der Selektion in Lösung (siehe Abschnitt 3.5.2) wurde jedoch keine signifikante Anreicherung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der Stringenz durch Herabsetzung der Konzentration von Doxorubicin auf 156 nM in der initialen Runde der Selektion im Vergleich zum Anreicherungsexperiment mit saurer Elution (600 nM) führte vermutlich zum frühzeitigen Verlust der in geringer Kopienzahl vorhandenen höher affinen Varianten.

```
          BstXI                          Loop 1                                                                  Loop 2
      20                          30                          40                          50                          60
      SerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAlaTyrPheGlyLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAlaTyrAlaValIle
F1K27: TCCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCGCTTACTTCGGTAAGTACGGAAAGTGCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGGCATACGCGGTAATC
P3K1 : ......................................................................................................................................

P3K8 : ......................................................................................................................................

P3K56: ...............................G.G.....................................................G.....................................
                                     Glu                                                   Gly
P4K1 : ...............................................................G.......................................................
                                                                      Glu
P4K39: ...............................................................G.......................................G.....................
                                                                      Glu                                     Arg
P4K41: ...............................................................G.......................G.....................................
                                                                      Glu                     Gly
P4K45: ...............................G.......................................................................................
                                     Glu
P4K55: ......................................................................................................................................
```

```
                                                                                  Loop 3
                                70                          80                          90                          100
      HisGlyLysGluTyrPheGlyGluGlyThrAlaTyrProValArgAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerGlyThrAlaGlyGlySerThrAlaGluSerValPheAsnValLeuSerThrAsp
F1K27: CACGGCAAGGAATACTTTGGCGAAGGTACCGCCTACCCTGTTCGTGACTCCAAGATTGGAAAGATCTACCACAGCGGCACTGCTGGAGGTTCGACCGCGGAGTCTGTATTCAACGTACTCTCCACTGAC
P3K1 : ......................................................................................................................................

P3K8 : ......G.......................................G.....................C.......................................................
             Glu                                     Gly                   His
P3K56: ..........G..............................C..............C.......................................................................
                  Gly
P4K1 : ...............................................G......................................................................
                                                      Gly
P4K39: .......G.......................................................................................T.......................
             Arg                                                                                      Phe
P4K41: ......................................................................................................................................

P4K45: .G........G.............................................GG.....................................................................
       Arg       Gly
P4K55: ...............................................T......................................................................................
                                                      Phe
```

```
                          Loop 4                                                                  BstXI
                  110                         120                         130
      AsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrProCysValTyrAspGluAspLysLysGlyHisAlaAspProValTrpValLeuSerArgSerMetVal
F1K27: AACAAGAACTACATCATCGGATACCCGTGCGTGTACGACGAGGACAAGAAGGGACACGCGGACCCTGTCTGGGTGCTCTCCAGAAGCATGGTC
P3K1 : ...C..................................................................................
          Gln
P3K8 : ...................................G..................................................
                                          Cys
P3K56: .G.G..............................C...................................................
       SerGlu                             His
P4K1 : ...............................................G.......................................
                                                      Arg
P4K39: ......................................G.......................................................
                                            Gly
P4K41: .............T.............................G.......................................
                                                Glu
P4K45: ...................................................A..................................
                                                         Glu
P4K55: ..........................C...........................................................
                                Arg
```

Abbildung 34: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der aus den Selektionszyklen 3 und 4 der Affinitätsmaturierung der Variante F1K27 hervorgegangenen Varianten; der hier gezeigte Ausschnitt, der beiderseits von der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI ($CCAN_6TGG$, grau hinterlegt) flankiert ist, umfasst die Aminosäurepositionen 20 bis 136. Die variablen *Loop*-Regionen der Variante F1K27 sind unterstrichen. Die Aminosäureaustausche der Variante F1K27 im Vergleich zum Wt-BBP, die bewußt auf die Zufallsmutagenese zurückzuführen sind, sind in der Sequenz der Variante F1K27 grün dargestellt. Zusätzliche Aminosäuresubstitutionen in F1K27 sind gelb hinterlegt. Sämtliche substituierte Aminosäure-positionen (orange hinterlegt) der Ausgangsvariante F1K27 sind zusammen mit den korrespondierenden mutierten Nukleotiden (rot) gekennzeichnet. Für die selektierten Varianten sind nur die von der Sequenz der Variante F1K27 unterschiedlichen Basen und gegebenenfalls die verschieden kodierten Aminosäuren angegeben. Identische Basen hingegen sind durch Punkte markiert. Die geänderte Basensequenz im Bereich der Kodon-Positionen 71/72 (blau hinterlegt) ist auf die Einführung der *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken bei der Assemblierung des BBP-Genfragmentes im Verlauf der *PCR*-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998).

3.8 Versuche zur Proteinkristallisation

Um Einblicke in den Bindungsmechanismus der vom Bilin-Bindungsprotein abgeleiteten Variante F1K27 mit dem unnatürlichen Liganden Doxorubicin zu erhalten, wurden Versuche

zur Kokristallisation geplant. Die anhand der Röntgenkristallstrukturanalyse mögliche Identifizierung für die Komplexierung relevanter Aminosäurereste kann der Affinitätsverbesserung durch rationales Proteindesign dienen.

3.8.1 Fermentation der Variante F1K27

Da sich die Variante F1K27 in löslicher Form im Schüttelkolben lediglich mit einer Ausbeute von 175 µg/L *E. coli*-Kultur herstellen ließ (siehe Abschnitt 3.6.2 und 3.6.3), für die Kristallisationsansätze jedoch Milligrammmengen erforderlich waren, wurde das Protein im Fermenter produziert. Die Fermentation wurde im 8 L Maßstab in dem *E. coli*-Wirtsstamm W3110 (Soares *et al.*, 2003) (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.5.2) ausgehend von dem auf dem Expressionsplasmid pBBP 21 (Abbildung 28) kodierten Strukturgen der Variante F1K27 durchgeführt. Nach Reinigung des Proteins aus dem periplasmatischen Extrakt mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie wurde lediglich eine moderate Proteinausbeute von 5,8 mg/8 L-Fermenterkultur erhalten. Problematischer als die ineffiziente Expression war jedoch die Mitreinigung eines etwa 17,0 kDa großen Proteins, mit etwa 50% Gesamtanteil (Abbildung 35). Bei diesem handelte es sich vermutlich um das Chaperonprotein Skp (siehe Abschnitt 3.6.3), das mit dem Fremdprotein im Periplasma des Bakterienstamms assoziiert war (Hayhurst & Harris, 1999; Schäfer *et al.*, 1999; Schlapschy *et al.*, 2004). Der Versuch bei der SA-Chromatographie, durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 500 mM NaCl unspezifische Wechselwirkungen zu vermindern und damit das Skp abzutrennen, zeigte nicht den gewünschten Erfolg.

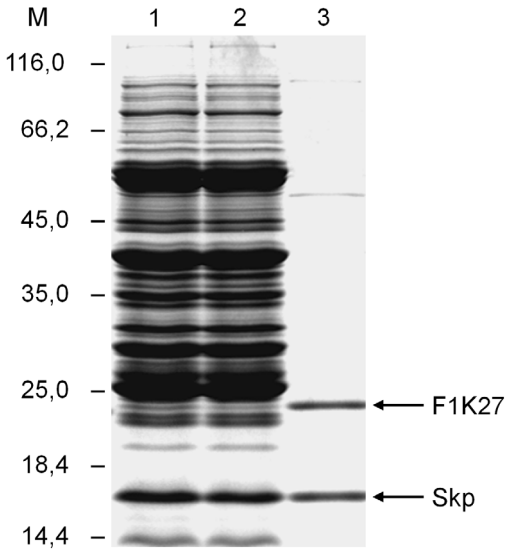

Abbildung 35: *SDS-PAGE* Analyse der löslichen Herstellung der BBP-Variante F1K27 im 8 L-Laborfermenter; die Proteinproduktion erfolgte ausgehend von der auf dem Vektor pBBP21 subklonierten *Bst*XI-Genkassette für die Variante F1K27 nach Transformation des *E. coli*-Stamms W3110 (siehe Abschnitt 2.1.1 und 2.5.2). Nach Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1.1) wurden die Proteinproben auf ein 12% *SDS*-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie-Brillantblau R250 (siehe Abschnitt 2.6.2). Spur M: Protein-Größenstandard (kDa); Spur 1: Periplasmaextrakt; Spur 2: Durchflussfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie; Spur 3: Elutionsfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie der Variante F1K27 verunreinigt mit Skp.

Eine alternative Herstellung der Variante F1K27 in den Skp-defizienten *E. coli*-Stämmen JM83proABΔSkp (Fiedler & Skerra, 2001) und MC4100ΔSkp (Oliver & Beckwith, 1982; Peters *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 1999) verlief ohne Erfolg, da das inkorrekt gefaltete rekombinante Protein in hohem Maße toxisch für den Wirtsorganismus war. So wurde eine ausgeprägte Lyse der transformierten Wirtszellen nicht nur unter den Standardbedingungen der Fermentation sondern auch bei reduzierter Temperatur der Bakterienanzucht von 22 °C statt 25 °C und verminderter Induktionszeit von 2 statt 2,5 h beobachtet.

Die konstitutive Koexpression der auf dem kotransformierbaren Plasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) kodierten Faltungshelfer, nämlich der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA and DsbC, die die Bildung bzw. Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren, und der Peptidyl-Prolyl *cis*/*trans*-Isomerasen mit Chaperonaktivität FkpA and SurA, konnte die angesprochene Zelltoxizität für den Bakterienstamm MC4100Δ*skp* reduzieren. Die Fermentation wurde nach erfolgter Kotransformation dieses Stamms (siehe Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.3) mit pBBP21-F1K27 und pTUM4 (siehe Abschnitt 2.1.1) nach dem Standardprotokoll (siehe Abschnitt 2.5.2) in Gegenwart der Antibiotika Chloramphenicol und Ampicillin durchgeführt. Lediglich die Induktionszeit wurde nach Initialisierung der rekombinanten Proteinbiosynthese auf 1 h 45 min gesenkt. Die optische Dichte der Kultur bei 550 nm betrug zum Zeitpunkt der Zellernte 28,0. Durch präparative SA-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.6.1.1) wurde die Variante F1K27 in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von etwa 50 mg/8 L eluiert. Mittels des Helferplasmids pTUM4 wurde also eine Verbesserung der Ausbeute im Vergleich zu dem initialen Fermentationsversuch um den Faktor 20 erzielt.

Die im Anschluß durchgeführte präparative S75-Gelfiltration (siehe Abschnitt 2.6.1.2) der Variante F1K27 in 50 mM Hepes/NaOH pH 7,4 diente der Abtrennung der dimeren und aggregierten Proteinfraktionen. Der Anteil dieser Proteinspezies war im Vergleich zum löslichen Monomer der Variante F1K27 allerdings gering (Abbildung 36A). Die Analyse der vereinigten Monomerfraktionen mittels *SDS-PAGE* (siehe Abschnitt 2.6.2) zeigte eine homogene Proteinpräparation ohne Verunreinigungen (Abbildung 36B). Dass es sich bei dem gereinigten Protein um die rekombinant hergestellte Variante F1K27 handelte, belegte der *Western-Blot* Nachweis des C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels (siehe Abschnitt 2.6.3; Abbildung 36C).

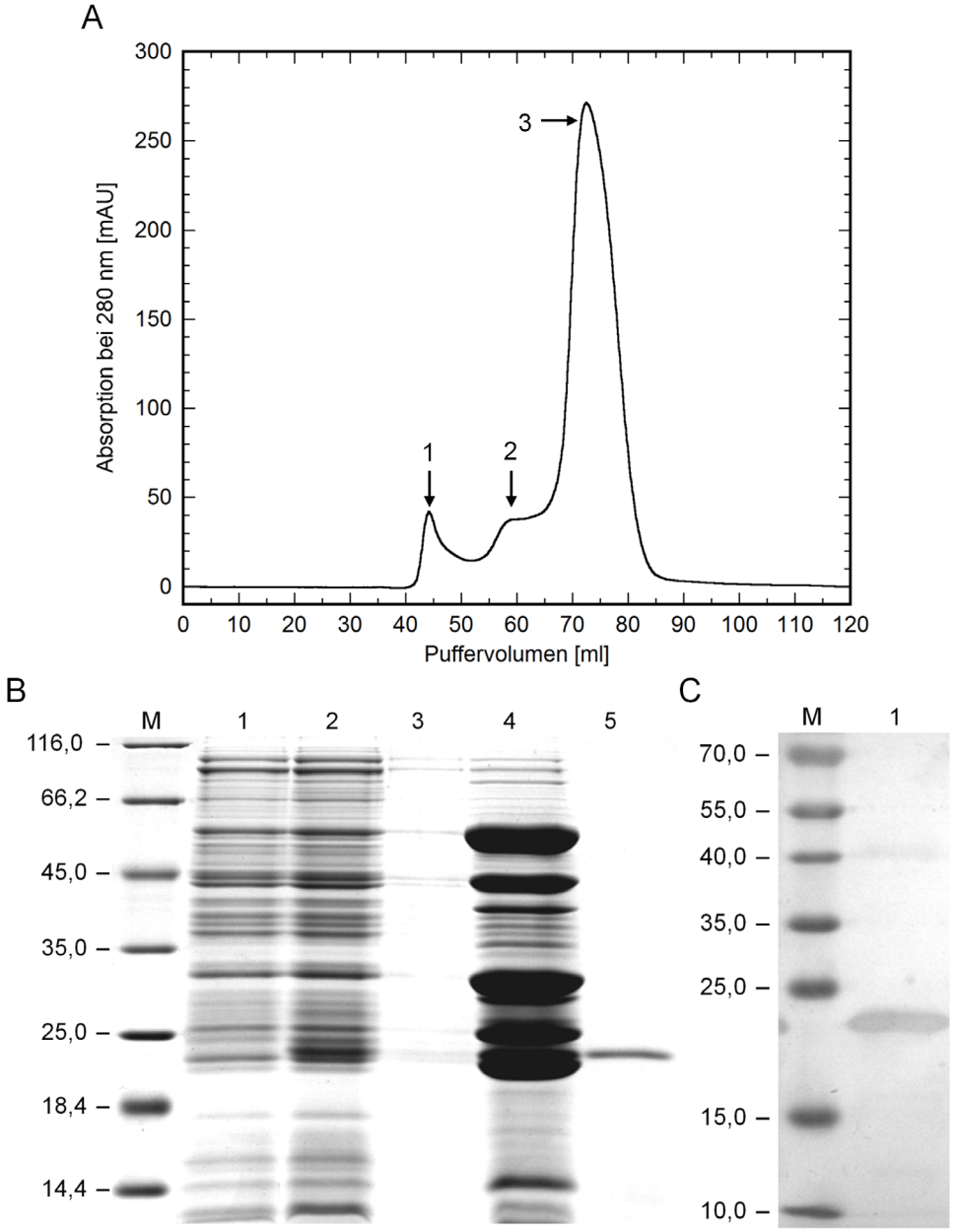

Abbildung 36: Gelfiltrationsreinigung, *SDS-PAGE* und *Western-Blot* der im 8 L-Laborfermenter hergestellten BBP-Variante F1K27 nach Reinigung über Streptavidin-Affinitätschromatographie; (**A**) Chromatogramm der präparativen Superdex™75 HiLoad 16/60 *Prep Grade*-Gelfiltration – 1,5 ml der ~800 µM Proteinlösung entsprechend circa 25 mg an löslicher Variante F1K27 wurden über die Säule gereinigt (siehe Abschnitt 2.6.1.2). Dabei wurde die Absorption der eluierten Lösung bei 280 nm in einem Durchflussphotometer gemessen. 1. Aggregatfraktion; 2: Dimerfraktion der BBP-Variante F1K27; 3: Monomerfraktion der BBP-Variante F1K27. (**B**) Die Proteinproben aus der Gelfiltration wurden auf ein 12% *SDS*-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie-Brillantblau (siehe Abschnitt 2.6.2). Spur M: Protein-Größenstandard (kDa); Spur 1: Gesamtzellaufschluss vor Induktion; Spur 2: Gesamtzellaufschluss nach Induktion (1 h 45 min); Spur 3: Überstand der zentrifugierten Fermenterkultur; Spur 4: Periplasmaextrakt; Spur 5: Elutionsfraktion 3 der Gelfiltration; In Spur 2 und 4 sind die vier periplasmatischen Faltungshelferproteine DsbA, DsbC, FkpA und SurA aus *E. coli*, die mittels des Helferplasmids pTUM4 überexprimiert wurden, zusammen mit der BBP-Variante F1K27 als prominente Banden sichtbar. (**C**) Das mittels *SDS-PAGE* getrennte Proteingemisch eines zweiten Gels wurde durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran übertragen und die BBP-Variante F1K27 über das C-terminale *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel mittels des Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase-Konjugats durch Katalyse einer chromogenen Reaktion nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.6.3). Spur M: vorgefärbter Protein-Größenstandard (kDa); Spur 1: Variante F1K27 aus der Gelfiltration.

4 Diskussion

4.1 Der hydrophobe chromophore Haptenligand Doxorubicin

Doxorubicin wurde in dieser Arbeit als Ligand eingesetzt, wobei die Konzentration, der verwendete Puffer und die Präsentationsform als immobilisiertes oder lösliches Konjugat wie auch freies Molekül variiert wurden. Wegen seines hydrophoben Charakters neigt das Doxorubicin zur Selbstassoziation und generell zu unspezifischer Adsorption. Zudem weist es empfindliche physikochemische Eigenschaften auf wie z.B. Photolabilität – eine umfangreiche Übersicht hierzu findet sich bei (Bouma *et al.*, 1986) und Bosanquet (1986). Eine erfolgreiche Anreicherung und Identifizierung spezifischer, gegen das Doxorubicin gerichteter Anticaline setzte deshalb eine sorgsame Methodenauswahl voraus. Zudem war es zwecks Bestimmung der kinetischen oder thermodynamischen Daten besonders für BBP-Varianten mit moderater Affinität für das Zielmolekül erforderlich, auch die Selbstassoziation des Doxorubicins (Bouma et al., 1986) zu berücksichtigen.

4.1.1 Die Fluoreszenz des Doxorubicins

Die Fluoreszenz des Doxorubicins dient nicht nur der Überprüfung der strukturellen Integrität des Fluorophors sondern kann auch für den biophysikalischen Nachweis der Interaktion mit Biomakromolekülen genutzt werden. Das in dieser Arbeit in PBS/E mit einem Anregungsmaximum bei ~ 470 nm und Emissionsmaxima von ~560 nm bzw. ~590 nm gemessene Fluoreszenzspektrum des Doxorubicins (siehe Abschnitt 3.1.1) stimmt mit bisherigen Studien überein (Andreoni *et al.*, 1992; Karukstis *et al.*, 1998; Sturgeon & Schulman, 1977) und lässt auch bei pH 7,4 in PBS/E die Anwesenheit vor allem der monokationischen Form des Fluorophors mit protonierter 3'-Aminogruppe des Daunosaminringes vermuten. Dabei trägt das tetrazyklische, für die Fluoreszenzemission verantwortliche Ringsystem des Liganden selbst keine Ladung (Abbildung 37). Daneben dürften aber bei pH 7,4 auch geringe Anteile der anionischen sowie der neutralen Form vorliegen (Sturgeon & Schulman, 1977).

Die Wellenlänge des Emissionsmaximums im Bereich von 590 nm wird in wässriger Lösung weder von der Konzentration des Fluorophors noch dem pH-Wert beeinflusst (Karukstis *et al.*, 1998) und eignet sich deshalb als bioanalytisch nutzbare spektroskopische Signatur. Lediglich die Fluoreszenzintensität nimmt mit steigendem pH-Wert deutlich ab. Nur in organischen Lösungsmitteln tritt bei niedriger Dielektrizitätskonstante eine geringfügige Verschiebung des Emissionsmaximums um etwa 5 nm in den blauen Wellenlängenbereich auf (Karukstis *et al.*, 1998). Demgegenüber sind die spektroskopischen Eigenschaften im Bereich des zweiten Maximums bei 560 nm abhängig von der Dissoziation der Wasserstoffionen der Phenolgruppen (Abbildung 37) und damit vom pH-Wert (Sturgeon & Schulman, 1977) sowie

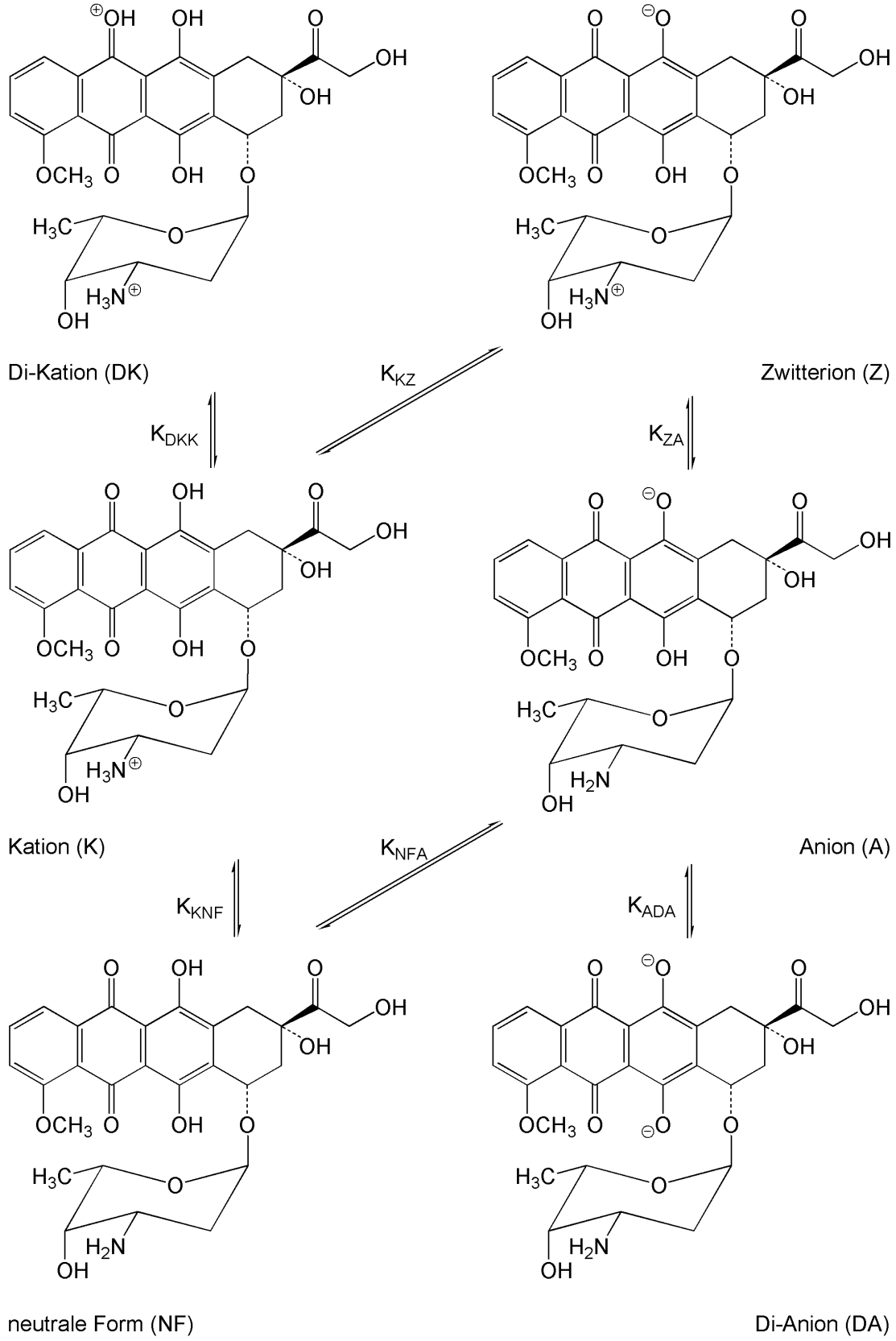

Abbildung 37: Protonierungsschema des Doxorubicins mit den zugehörigen Dissoziationskonstanten (K) für den Dissoziationsprozess vom Di-Kation zum Di-Anion (nach (Sturgeon & Schulman, 1977)); K_{DKK} (Übergang vom Di-Kation zum Kation), K_{KNF} (Übergang vom Kation in die neutrale Form) bzw. K_{KZ} (Übergang vom Kation zum Zwitterion), K_{ZA} (Übergang vom Zwitterion zum Anion), K_{NFA} (Übergang von der neutralen Form zum Anion), K_{ADA} (Übergang vom Anion zum Di-Anion).

darüber hinaus vom Selbstassoziationsgrad des Doxorubicins, da dieses Phänomen die pK_S-Werte des Moleküls beeinflusst (Arcamone, 1981; Eksborg, 1978).

4.1.2 Das Selbstassoziationsverhalten des Doxorubicins

Die in der Literatur mittels UV/VIS-Spektroskopie (Eksborg, 1978; Menozzi *et al.*, 1984; Stutter *et al.*, 1982), Fluoreszenzspektroskopie (Rizzo *et al.*, 1989), ^{1}H-NMR (Evstigneev *et al.*, 2006; McLennan *et al.*, 1985), Cirkulardichroismus (CD) (Gallois *et al.*, 1998) sowie durch Berechnung aus Partitions- und *Plot*-Koeffizienten (Eksborg, 1978) bestimmten Dissoziationskonstanten für die Selbstassoziation des Doxorubicins variieren signifikant mit 2,5 bis 526 µM. Dies spiegelt die grundsätzliche Abhängigkeit dieses Prozesses von der Temperatur (McLennan *et al.*, 1985) und der Zusammensetzung des Puffers einschließlich seiner Ionenstärke (Menozzi *et al.*, 1984) und des pH-Werts (Sturgeon & Schulman, 1977) wider. Zur Berechnung der Konstanten wurden außerdem unterschiedliche Assoziationsgrade von Dimer- und Tetramerbildung bis hin zu Polymeren angenommen (Bouma *et al.*, 1986). Auch beeinflußt die Sensitivität der analytischen Methode gegenüber den unterschiedlichen, im Gleichgewicht der Selbstassoziation vorliegenden Molekülpopulationen des Doxorubicins das Ergebnis (Martin, 1996).

Vergleichbare Abhängigkeiten der Selbstassoziation wurden zum Teil auch in dieser Arbeit beobachtet, wobei die Dissoziationskonstante im Bereich von 2,5 bis 246 µM variierte (siehe Abschnitt 3.1.2 und Tabelle 8). Die sowohl in PBS/E als auch in Hepes/NaOH bei pH 7,4 nachgewiesene Selbstassoziation des Doxorubicins, also des hier hauptsächlich in der monokationischen Form (siehe Abschnitt 4.1.1) vorliegenden Moleküls, wurde so auch von (Menozzi *et al.*, 1984) beobachtet, steht aber im Widerspruch mit anderen Quellen, wonach nur die an der 3'-Aminogruppe deprotonierte Form des Doxorubicins selbstassoziiert (Eksborg, 1978; McLennan *et al.*, 1985). Allerdings führt (Martin, 1996) diesen Befund auf in den genannten Studien falsch angenommene Aziditätskonstanten zurück. Die pK_S-Werte aus der Literatur für die Protonierung der glykosidischen Aminogruppe liegen zwischen 7,2 (Righetti *et al.*, 1979) und 8,2 (Eksborg, 1978; McLennan *et al.*, 1985). Die in dieser Arbeit gefundenen verhältnismäßig niedrigen Dissoziationskonstanten stützen die Vermutung zumindest einer Beteiligung der monokationischen Form des Doxorubicins am Assoziationsprozess, die auch von (Fülöp *et al.*, 2013) gezeigt werden konnte. Ob der bei pH 7,4 in geringem Ausmaß vorhandene Anteil an Phenolatanionen – pK_S-Wert zwischen 8,5 (Kano *et al.*, 1985) und 10,2 (Sturgeon & Schulman, 1977) – aufgrund der negativen Ladung des Tetrazyklus und damit verbundener elektrostatischer Abstoßung zweier Doxorubicinmoleküle, wie von Eksborg (1978) proklamiert, tatsächlich keine Dimerisierungstendenz aufweist, bleibt unklar.

Der deutliche Unterschied der Dissoziationskonstanten (Tabelle 8), die in den hier durchgeführten spektroskopischen und kalorimetrischen Messungen – bei Verwendung

desselbenAssoziationsmodells und identischer Temperatur – beobachtete wurde, ist im Wesentlichen auf die unterschiedliche Pufferzusammensetzung zurückzuführen (Margalit *et al.*, 1983; Martin, 1980; McLennan *et al.*, 1985). So hat Menzozzi (1984) durch die Änderung der Ionenstärke eines Tris/HCl-Puffers pH 7,0 von 50 auf 200 mM durch Zugabe von 150 mM NaCl eine Erniedrigung der Dissoziationskonstante des Doxorubicins um den Faktor 2 beobachtet. Ein Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten Puffer PBS/E und Hepes/NaOH zeigt, dass sowohl die im PBS/E vorhandenen Phosphat- als auch Chlorid-Ionen als kosmotrope Ionen der Hofmeister-Reihe im Gegensatz zu den Ionen des Hepes-Puffer für eine verringerte Löslichkeit des Doxorubicins in wässriger Lösung verantwortlich sind (Al-Maaieh & Flanagan, 2002; Salay & Schreier, 2004). Die bei höherer Ionenstärke gleichzeitig gegebene stärkere Abschirmung elektrostatischer Abstoßung verstärkt so die Tendenz zur hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Doxorubicinmolekülen (Li *et al.*, 1998), auch wenn Buurma & Haq (2008) diesen Zusammenhang bei ähnlichen Untersuchungen im Falle des Bis-Benzimidazol-Farbstoffs Hoechst 33258 nicht nachweisen konnten.

Die durch Fluoreszenzmessung erhaltenen Daten deuten auf ein "indefinites, isodesmisches Polymerisationsmodell" (Martin, 1996) statt eines "Monomer-Dimer-Modells" (Menozzi *et al.*, 1984) zur Beschreibung der Selbstassoziation des Doxorubicins angesichts der besseren Kurvenanpassung bei der nicht-linearen Regression (siehe Abschnitt 3.1.2.2) und der Konsistenz mit dem Ergebnis der Absorptionsmessung (siehe Abschnitt 3.1.2.1). In der Tat wurde von (Fülöp *et al.*, 2013) mittels Elektronenmikroskopie gezeigt, dass Doxorubicin mit steigender Konzentration (eingesetzte Endkonzentration ~1 mM) in wässriger Lösung schrittweise selbstassoziiert und so hochmolekulare sphärische Polymere mit einem Durchmesser von bis zu ~4 nm ausbildet. Da neben dem isodesmischen Modell ähnliche Polymerisationsmodelle bekannt sind, die ebenso zur Beschreibung der Selbstassoziation des Doxorubicins in Frage kommen (Beckerdite *et al.*, 1980; Fülöp *et al.*, 2013; Martin, 1996), erscheinen weitere Untersuchungen zur genauen Aufklärung bei dann identisch zu wählenden Temperatur- und Pufferbedingungen sinnvoll. Geeignete Methoden hierfür sind Sedimentations-, NMR-, Partitions- und osmotische Messungen. Ferner stellt eine bei unterschiedlichen Temperaturen und in Verbindung mit einem Van't Hoff-*Plot* durchgeführte isotherme Kalorimetriemessung ein probates Mittel zum Studium des Mechanismus der Selbstassoziation des Doxorubicins dar (Buurma & Haq, 2008; Evstigneev *et al.*, 2012).

Tabelle 8: Übersicht der in dieser Arbeit mittels verschiedener Meßmethoden erhaltenen Daten für die Selbstassoziation des Doxorubicins unter Verwendung zweier unterschiedlicher Assoziationsmodelle.

Methode	Monomer-Dimer-Modell – nach Gleichung (7)					
	K_D [µM]	ε x 10^3 [$M^{-1}cm^{-1}$]	f_{Dox} [μM^{-1}]	ΔH [kJ / mol]	ΔG [kJ / mol]	ΔS [J $mol^{-1}K^{-1}$]
Absorption[a] Auswertung nach Gleichung (13)	14,8 ± 0,3	Monomer 13,10 ± 0,09	–	–	–	–
		Dimer 7,91 ± 0,02				
Fluoreszenz[a] Auswertung nach Gleichung (35)	2,54 ± 0,72	–	123,31 ± 13,41	–	–	–
Kalorimetrie[b] Auswertung nach Gleichungen (7) – (10)	246 ± 9	–	–	– 38,16 ± 0,33	– 20,60	– 58,82
Methode	**indefinite isodesmische Polymerisation – nach Gleichung (40)**					
	K_D [µM]	ε x 10^3 [$M^{-1}cm^{-1}$]	f_{Dox} [μM^{-1}]	ΔH [kJ / mol]	ΔG [kJ / mol]	ΔS [J $mol^{-1}K^{-1}$]
Absorption[a] Auswertung nach Gleichungen (14) – (17)	7,92 ± 0,02	Monomer 13,10 ± 0,06	–	–	–	–
		extern 10,04 ± 0,20				
		intern 7,92 ± 0,04				
Fluoreszenz[a] Auswertung nach Gleichungen (34) und (40)	11,0 ± 0,4	–	88,86 ± 1,35	–	–	–
Kalorimetrie[b] Auswertung nach Gleichungen (7) – (10) (modifiziert gemäß Abschnitt 3.1.2.3)	123 ± 5	–	–	– 19,08 ± 0,17	– 22,32	10,86

Die unterschiedlichen berechneten Parameter sind die Dissoziationskonstante (K_D), der molare Extinktionskoeffizient ε, der molare Fluoreszenzkoeffizient des monomeren Doxorubicin f_{Dox} sowie die thermodynamischen Parameter der Reaktionsenthalpieänderung ΔH, der freien Enthalpie ΔG und der Entropie ΔS; [a] = Puffer PBS / E pH 7,4; [b] = 50 mM Hepes / NaOH pH 7,4

4.2 Selektion von Doxorubicin-bindenden Anticalinen

Das in dieser Arbeit verwendete stabil gefaltete Bilin-Bindungsprotein (BBP) mit seinem rigiden β-*Barrel* war bereits erfolgreich zur Erzeugung künstlicher Bindungsproteine für die Haptenliganden Fluorescein (Beste, 1998) und Digoxigenin (Schlehuber, 2001) eingesetzt worden. Die vier Peptidschleifen, die den Eingang der Bindungstasche des BBP für seinen natürlichen Liganden Biliverdin IXγ bilden, sind dafür an insgesamt sechzehn Aminosäurepositionen randomisiert worden (Beste *et al.*, 1999). *In silico* ist für diese Molekülbibliothek ein hoher Prozentsatz stabiler Varianten mit 67% (Wiederstein & Sippl, 2005) bestimmt worden, was aus theoretischer Sicht die geeignete Auswahl der Mutationsstellen bestätigte. Alle anderen in der Studie von (Wiederstein & Sippl, 2005) behandelten S*caffold*-Proteine, wie z.B. Fibronectin, Knottin und die Kunitz Protease-Inhibitoren, zeigten dabei zum Teil deutlich geringere Stabilitätswerte für ihre Varianten.

Aus der in dieser Arbeit hergestellten und für die Affinitätsanreicherung eingesetzten naiven Proteinbibliothek mit einer Komplexität von 2,5 x 10^{10} unabhängigen Transformanden (und Integrität des Leserahmens für das zu präsentierende BBP-Fusionsprotein von 80%) wurde mit der Variante F1K27 ein moderat affines, künstliches Bindungsprotein für Doxorubicin mit einer Dissoziationskonstante von ~5 µM selektiert (siehe Abschnitt 0). Die so erhaltene Variante F1K27 bildete in der Bindungstasche vermutlich suboptimale Seitenketteninteraktionen mit dem Liganden aus (siehe Abschnitt 3.6.1). Die Dissoziationskonstante ist aber in der gleichen Größenordnung, wie sie auch bei der Selektion von anderen künstlichen Bindungsproteinen gegen neuartige Liganden aus naiven Molekülbibliotheken erzielt wurden (Hosse *et al.*, 2006). Im Fall von Haptenliganden sind Affinitäten in diesem Bereich auch bei Selektion aus naiven Antikörperbibliotheken beschrieben worden (Irving *et al.*, 1996). Die Affinität des auf der molekularen Architektur des BBP basierenden Anticalins ließ sich im Zuge von nachfolgend durchgeführten Affinitätsmaturierungsexperimenten bislang noch nicht weiter verbessern.

4.2.1 Die Anticalin-Bibliothek

Im Vergleich zu dem Selektionsexperiment, aus dem die Variante F1K27 resultierte, konnte aus einer neu hergestellten naiven Bibliothek geringerer Diversität mit 1,3 x 10^9 unabhängigen Transformanden und etwas niedrigerer Qualität (50% Kodierung für funktionelle Fusionsproteine) keine Anreicherung bindungsaktiver BBP-Varianten festgestellt werden. Vielmehr wurden hier zahlreiche *Frameshift*- und Deletionsmutanten ohne funktionell präsentiertes Fusionsprotein beobachtet. Dies stand im Einklang mit der allgemein postulierten Abhängigkeit einer ligandenspezifischen Anreicherung von der Qualität (Reetz & Carballeira, 2007; Tuck Seng *et al.*, 2007) und Diversität (Firth & Patrick, 2005) der verwendeten randomisierten Molekülbibliothek.

Trotz der hohen Komplexität der Bibliothek, die zur BBP-Variante F1K27 geführt hatte, war darin immer noch lediglich ein geringer Teil des mutierbaren Sequenzraums abgebildet, da theoretisch 3,4 x 10^{23} verschiedene DNA-Sequenzvarianten bzw. unter Berücksichtigung der Triplettkodierung für die Aminosäuren, die eine gewisse Redundanz aufweist, 2,2 x 10^{20} Proteinvarianten möglich waren (Firth & Patrick, 2008). Damit entsprach die Anreicherung aus der naiven Bibliothek mit 2,5 x 10^{10} unabhängigen Transformanden einem *Sparse Sampling* (Olsen *et al.*, 2000; Smith & Petrenko, 1997). Zudem ist die Einführung der Zufallsmutationen mittels degenerierter Oligodesoxynukleotide kodonbedingt mit einer unausgewogenen Aminosäuresubstitution verbunden (Neylon, 2004).

Die eingesetzte Bibliothek begünstigte demnach die für das Doxorubicin ligandenspezifische Anreicherung der Variante F1K27, erklärte aber gleichzeitig die bislang noch moderate Affinität des Anticalins für den neuen Liganden (siehe Abschnitt 0).

4.2.2 Der Selektionsprozess

Der Einbau vornehmlich kleiner aliphatischer Aminosäuren an den randomisierten Positionen ließ vermuten, dass tatsächlich ein Selektionsdruck hinsichtlich des Liganden Doxorubicin erzeugt worden war. Diese Umstrukturierung in der Bindungstasche der BBP-Variante schuf vermutlich Raum für den Liganden im Einklang mit den unpolaren Eigenschaften des Doxorubicins, dessen Komplexierung hydrophober Wechselwirkungen bedarf. Die Anhäufung apolarer Aminosäuren wurde ebenso beim *Majority Sampling* aus einer speziell für die Bindung von Haptenen konstruierten *sc*Fv-Bibliothek gegen verschiedene hydrophobe *Target*-Moleküle beobachtet (Persson *et al.*, 2006).

Um die wenigen für Doxorubicin affinen BBP-Varianten anzureichern und somit eine Identifizierung im nachfolgenden Kolonie-Filterstapeltest wahrscheinlich zu machen, wären vermutlich zusätzliche Selektionszyklen notwendig gewesen. So wurde sowohl das auf dem Lipocalin 2 basierende Anticalin Tb7 mit hoher Affinität (~75 nM) für einen Lanthanid(III)-Chelatkomplex nach 7 Anreicherungszyklen (Kim *et al.*, 2009), als auch das BBP-Anticalin DigA mit hoher Affinität (~300 nM) für Digoxigenin nach 9 Anreicherungszyklen jeweils aus einer naiven Bibliothek isoliert (Schlehuber *et al.*, 2000). Das Hämoglobin komplexierende Anticalin HbgA, das nach Runde 5 der Anreicherung aus einer naiven Bibliothek des ApoD erhalten wurde, weist eine der Variante F1K27 vergleichbare Dissoziationskonstante für seinen Liganden mit knapp über 2 µM auf (Vogt & Skerra, 2004). Demgegenüber konnte das BBP-Anticalin PhtB mit vergleichbarer Affinität für den hydrophoben Liganden Benzylbutylphthalat (K_D ~6 µM) erst aus der *Panning*-Runde 7 isoliert werden (Mercader & Skerra, 2002).

Der Vergleich der Variante F1K27 mit der Variante PhtB deutet auf den positiven Einfluss, den die höhere Diversität der hier verwendeten naiven Bibliothek auf die Anreicherung hatte – bei ähnlich hohem Selektionsdruck. Die Anreicherung des BBP-Anticalins FluA mit hoher

Affinität für Fluorescein und einer Dissoziationskonstante von ~35 nM (Beste *et al.*, 1999) aus einer naiven BBP-Bibliothek schon nach Anreicherungszyklus 5 ist daher als besonders günstiger Fall anzusehen. Die beobachtete Anhäufung positiv geladener Reste – vor allem Arginin – in der Bindungstasche von FluA war für die Bindung des Liganden mit seinen negativ geladenen Gruppen vorteilhaft und auch bereits bei der Anreicherung von Antikörperfragmenten gegen Fluorescein beobachtet worden (Barbas *et al.*, 1992). Solche Argininmutationen waren wahrscheinlich wegen des Kodon-*Bias* in der Bibliothek überproportional vertreten, was die Selektion erleichterte, auch wenn der *Sec*Y-abhängige Sekretionsweg solche Argininvarianten bei der Phagenassemblierung in *E. coli* benachteiligen sollte (Noren & Noren, 2001).

Mit zunehmender Anzahl an Selektionszyklen nimmt allerdings auch die Gefahr der Anreicherung unspezifisch oder gar nicht bindender Phagemide zu, die bei der Reinfektion des Wirtsstamms wegen geringerer Toxizität oder anderer biologischer Effekte Wachstumsvorteile besitzen (Carcamo *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2003). Besonders ausgeprägt ist dieses Problem bei dem hier angewendeten Phagemid/ Helferphagen-System (Skerra, 2001), das einen Hintergrund von über 90% infektiöser Phagemide aufweisen kann, die statt eines Fusionsproteins bloß das native pIII-Hüllprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren. Zum Hintergrund tragen zudem aus der Randomisierung resultierende Fusionsgene mit nicht translatierbaren Stopkodons wie UGA (*Opal*) und UAA (*Ochre*) bei (auch wenn durch die NNS-Mutagenese eigentlich vermieden) oder im Leserahmen verschobene Insertions- und Deletionsvarianten, die für kein funktionelles Fusionsprotein kodieren.

Ähnlich verhält es sich bei Mutanten mit doppelt verschobenem Leserahmen, d.h. deren Leserahmen nach dem Translationsstartkodon im *bbp*-Gen verschoben ist, was aber stromabwärts vor Beginn des für das pIII-Hüllprotein kodierenden DNA-Abschnitts durch geeignete Mutationen wieder korrigiert wird. Ist dabei ein längerer DNA-Abschnitt betroffen, weist das resultierende Fusionsprotein vermutlich nicht mehr das typische β-*Barrel* Faltungsmuster der Lipocaline auf sondern eine fehlgefaltete Tertiärstruktur. Solch gestörte Proteinstrukturen weisen oft exponierte, hydrophobe Oberflächen auf, die eine Bindung an das lipophile Zielmolekül begünstigen. Ferner sind sie aggregationsanfällig und können sogar mit korrekt präsentierten BBP-Varianten gemischte Aggregate ausbilden, was diese dem Selektionsprozess entzieht.

Durch Erhöhung der Stringenz bei der Anreicherung kann man die genannten Probleme teilweise umgehen, aber ein zu hoch gewählter Selektionsdruck kann wegen der geringen Kopienzahl der einzelnen spezifisch bindenden BBP-Varianten ebenfalls diskriminierend wirken. Möglichkeiten, den Hintergrund unspezifisch bindender Phagemide zu verringern, bestehen in der Verbesserung der Integrität der Bibliothek (siehe auch 3.3.2) sowie in Änderungen des Display-Systems und der Anreicherungsstrategie.

4.2.3 Weiteres Verbesserungspotential zur Erzeugung hochaffiner Anticalin-Varianten für Doxorubicin mittels *Phage Display*

4.2.3.1 Optimierung der eingesetzten Zufallsbibliothek

Wie am Beispiel der Fab-Bibliothek HuCAL GOLD® mit synthetisch erzeugten *CDRs* und hochfunktioneller Proteindiversität gezeigt (Rothe *et al.*, 2008), kann die Verwendung von Trinukleotidphosphoramiditen (Kayushin *et al.*, 2000; Yagodkin *et al.*, 2007) bei der Synthese der degenerierten Oligodesoxynukeotide die Qualität der resultierenden DNA-Bibliothek wesentlich verbessern (Neylon, 2004).

Darüber hinaus kann der oben beschriebene Phagemid-Hintergrund durch Einsatz "echter" Phagen reduziert werden. Dies geht jedoch auf Kosten der Vorteile des dualen Phagemid/Helferphagen-Systems, wie einfacherer Handhabung und DNA-Präparation, besserer Propagation, höherer genetischer Stabilität und höherer Transformationseffizienz des entsprechenden Phasmid-Vektors (Amersdorfer & Marks, 2000; O'Connell *et al.*, 2002), was letztlich zu größerer Diversität der Proteinbibliothek führt. Ferner sorgen die "echten" Phagen mit bis zu fünf Kopien des präsentierten Fusionsproteins für Aviditätseffekte während der Affinitätsanreicherung (Bradbury & Marks, 2004), was die Selektion auf hohe Affinität erschwert. Beim *Sparse Sampling* aus naiven Bibliotheken wird diese Polyvalenz allerdings gelegentlich gezielt eingesetzt, um moderataffine Varianten nicht zu diskriminieren (Hoess, 2001)

Alternativ kann der Helferphage so modifiziert werden, dass reine pIII-Wildtyp-Phagemide umgangen werden (Bradbury & Marks, 2004). So wurden zahlreiche fakultativ oder konstitutiv pIII-defiziente Helferphagen, wie *Hyperphage* (Rondot *et al.*, 2001), *Ex-Phage* (Baek *et al.*, 2002), *Phaberge* (Soltes *et al.*, 2003) und weitere Abkömmlinge (Marta & Carl, 1995; Rakonjac *et al.*, 1997) konstruiert, die ansonsten alle für die Verpackung des Phagemids notwendigen Proteine besitzen. Dadurch wird unter Inkaufnahme entstehender Multivalenz die virale Oberflächenpräsentation des Fusionsproteins unter Beibehaltung der Vorteile des Phagemid/Helferphagen-Systems gesteigert.

Dagegen erlauben CT-Helferphagen (Kramer *et al.*, 2003), Helferphagen mit Kodierung für ein pIII-Protein mit Proteaseschnittstelle (Jestin *et al.*, 2001) und selektiv infektiöse Phagen (SIP) (Krebber *et al.*, 1997) unter Nutzung der Vorteile des Phagemid/Helferphagen-Systems die Herstellung bevorzugt univalenter Phagemide bei gleichzeitiger Abreicherung von nichtfunktionellen und Wildtyp-Phagemiden. Die Reinfektion des Wirtsstamms bleibt somit denjenigen Phagemiden vorbehalten, die funktionelles rekombinantes Fusionsprotein präsentieren. Deshalb wurden dabei verbesserte spezifische Anreicherungsraten beobachtet (Kirsch *et al.*, 2005). Ein Nachteil dieser veränderten Helferphagen ist die zum Teil wesentlich schlechtere Propagation (Paschke, 2006).

4.2.3.2 Optimierung der Anreicherungsstrategie

Eine weitere Möglichkeit, den Hintergrund zu reduzieren, stellen zwei unterschiedliche C- und N-terminal gegenüber dem *Scaffold*-Protein in das pIII-Fusionsprotein eingefügte Affinitätsanhängsel dar (Cho *et al.*, 2000). Sie ermöglichen auf Proteinebene eine Vorselektion der Gesamtphagemidpopulation auf Integrität des inserierten Strukturgens. Derartige Variationen des *Phage Display*-Prinzips bieten Möglichkeiten, um sowohl den natürlichen Hintergrund der Wildtyp-Phagemide als auch nicht-funktionelle Deletionsvarianten aus dem Anreicherungsprozess auszuklammern. Der in dieser Arbeit angewandte Selektionsprozess auf gegen Doxorubicin gerichtete Phagemide umfaßte neben dem Zielmolekül allerdings auch weitere Komponenten und potentielle Ziel-Strukturen, wie den Biotin-*Linker*-Rest, Blockierungsmoleküle, Plastikoberflächen und Streptavidin.

Daran wird ersichtlich, wie komplex eine Anreicherungsstrategie nach dem Prinzip „You get what you select for“ (You & Arnold, 1996) gestaltet ist. Neben dem Einsatz von Blockierungsreagentien sowie Tensiden in den Waschschritten, um unspezische Bindungsereignisse zu verringern (siehe 3.5.1.3), erscheint zukünftig eine gezielte subtraktive Vorselektion sinnvoll, um unspezifisch bindende Varianten, die einen möglichen Selektionsvorteil gegenüber den Doxorubicin-komplexierenden Phagemiden besitzen, bereits vorab aus der Bibliothek zu entfernen (Barbas *et al.*, 1993; Bradbury & Marks, 2004; Cortese *et al.*, 1996; Sheedy *et al.*, 2007).

Dazu wird die hergestellte Phagemidbibliothek vor dem ersten, optional auch vor jedem weiteren Selektionszyklus, mit den im Prozess enthaltenen Reagenzien in Abwesenheit des Zielmoleküls vorinkubiert und dann nur der Überstand zur eigentlichen Anreicherung weiter verwendet. Bei Elution unter sauren, basischen oder denaturierenden Bedingungen sollte daraus eine Erhöhung des Selektionsdrucks für den Zielliganden resultieren. Bei der Selektion ist in der Regel die Mehrheit der unspezifischen Bindungsproteine gegen die Plastikoberfläche gerichtet (Adey *et al.*, 1995), aber auch die Anreicherung von Phagemiden gegen die Komponenten des Komplexes aus Streptavidin und Biotin ist bereits häufig beobachtet worden (Barrett *et al.*, 1992; Bradbury & Marks, 2004; D'Mello & Howard, 2001). Damit verbunden ist das Problem der bevorzugten Selektion des Haptens im strukturellen Kontext mit dem Trägermolekül oder *Linker* (Moghaddam *et al.*, 2001), die auf der hier größeren Anzahl möglicher Wechselwirkungen zwischen Phagemid und Zielstrukturen beruht (Persson *et al.*, 2006).

Weitere Verbesserung bei der Anreicherung von Phagemiden aus einer naiven Bibliothek kann neben der erwähnten Vorselektion die kompetitive Elution mit dem freien Liganden bringen (Sheedy *et al.*, 2007). Dies war im vorliegenden Fall wegen des zytotoxizischen Effekts des niedermolekularen *Targets* auf *E. coli* nicht möglich. Daher bot sich als Alternative der alternierende Einsatz unterschiedlicher Trägermoleküle in aufeinanderfolgenden Selektionszyklen an. So kann Streptavidin gegen das strukturell unterschiedliche Avidin

unter Beibehaltung des Doxo-Biotin-Konjugats substituiert werden (Bradbury & Marks, 2004), wobei die Elution dann mit einem anderen Doxo-Trägermolekül-Konjugat durchgeführt werden sollte; also z.B. dem Streptavidin als Trägermolekül. Im Prinzip kann auch mit dem freien Liganden eluiert werden, wenn dieser vor Reinfektion des Wirtsstamms aus der Lösung der Phagemide entfernt wird. Eine einfache Reinigung filamentöser Phagemide mittels Gelfiltration auf Sephacryl S-500 wurde von Zakharova *et al.* (2005) beschrieben. Kritisch dabei bleibt jedoch das unspezifische Adsorptionsverhalten des Doxorubicins, das eine Optimierung der chromatographischen Pufferbedingungen erfordert.

Eine Schwierigkeit, die sich aus der Kopplung des Zielmoleküls mit Biotin ergibt, ist die Neutralisierung der unter physiologischen Bedingungen vorhandenen positiven Ladung an der 3'-Aminogruppe des Daunosaminzuckerrestes des freien Doxorubicins (siehe Abschnitt 4.1.1). Der während der Phagemid-Affinitätsanreicherung und bei der Selektion mittels Kolonie-Filterstapeltest eingesetzte Ligand war daher nicht identisch mit der freien Verbindung, die zur funktionellen Charakterisierung der erhaltenen BBP-Varianten verwendet wurde. Demnach ist die Identifizierung lediglich moderataffiner Bindungsmoleküle möglicherweise nicht ausschließlich der Bibliothek bzw. den Anreicherungsbedingungen sondern auch dieser zusätzlichen positiven Ladung geschuldet (Persson *et al.*, 2006).

Eine alternative Kopplungschemie, um zumindest in unmittelbarer räumlicher Nähe zur ursprünglichen positiven Ladung des Doxorubicins eine positive Ladung innerhalb des immobilisierbaren Konjugats einzuführen, bieten Linker mit reaktiven Imidoestern. Diese bilden mit primären Aminen bei pH 8 – 10 stabile, reversible Amidinbindungen aus. Das Amidin ist unter physiologischen pH-Bedingungen protoniert und weist deshalb ebenso eine positive Ladung auf (Hermanson, 1996). Dadurch kann die Ladungseigenschaft des freien Liganden während der Affinitätsanreicherung simuliert werden. Zur Herstellung eines Doxo-Biotin-Konjugats könnte Doxorubicin dafür zunächst mit 2-Iminothiolan (Traut Reagens) unter Ausbildung einer freien Sulfhydrylgruppe umgesetzt werden (Tolan & Traut, 1981). Im nächsten Schritt würde dann die Kopplung an Biotin mittels kommerziell erhältlicher Biotin-Maleimid-Derivate (Saurin *et al.*, 2004; Tarasov *et al.*, 2007) oder mit Biotin-HPDP-Derivaten (Lee *et al.*, 2008) erfolgen. Die Kopplung des Doxorubicins an Trägerproteine könnte ebenso in gerichteter Weise in einer Zweischritt-Reaktion über die Maleimid-Sulfhydrylchemie oder direkt mittels anderer homobifunktioneller Imidoester-Reagenzien vorgenommen werden (Hermanson, 1996).

4.3 Das α1-*Acid Glycoprotein* (AGP) – ein interessantes Protein-*Scaffold*

Das in Säugetieren verbreitete Plasmaprotein AGP spielt bei der Immunantwort und entzündlichen Prozessen eine bedeutende Rolle. Deshalb wird es in die Immunocaline, eine Unterfamilie der Lipocalinproteine eingereiht (Logdberg & Wester, 2000). Es besitzt bei 183 Aminosäuren eine erhöhte Molmasse von 41 – 43 kDa, da es stark glykosyliert (~45 %)

vorliegt, wobei die Art und der Grad der Glykosylierung seine physiologische Funktion mit bestimmt. Ferner sorgt die posttranslationale Sialysierung für eine stark negative Nettoladung des Proteins (pI = 2,7 – 3,1). Primärer Ort der Synthese sind die Hepatozyten, aber auch in nicht-hepatozytärem Gewebe wurde die Biosynthese nachgewiesen (Hochepied *et al.*, 2003). Das in *E. coli* hergestellte Protein bestand wegen des zusätzlich für die affinitätschromatographische Reinigung angehängten *Strep*-tag II aus 192 Aminosäuren. Unter Beibehaltung der zwei nativen Disulfidbrücken resultierte daraus angesichts fehlender Glykosylierung und Sialysierung eine Molmasse von 22,7 kDa. Der berechnete pI-Wert lag bei 5,0 (Breustedt *et al.*, 2006).

Interessant als Protein-*Scaffold* macht AGP vor allem seine hohe Plasmakonzentration von 1 mg/mL im gesunden Menschen (Kremer *et al.*, 1988), die ausgelöst durch Entzündungen sogar bis auf das Fünffache ansteigen kann (Petersen *et al.*, 2004). Zudem sollte dieser humane Vertreter der Lipocaline – im Vergleich zum BBP – vermutlich geringe Immunogenität auch nach Restrukturierung der Bindungstasche hinsichtlich neuer Bindungsspezifitäten zeigen. Demnach könnten davon abgeleitete Anticaline auch von therapeutischem Nutzen sein (Skerra, 2008).

Die hier durchgeführte Bestimmung der Bindungsaffinität des rekombinanten AGP für Doxorubicin (Tabelle 9) zeigte abhängig von der gewählten Analysemethode deutlich variierende Werte – mit bis zu einem Faktor 8. Die höchste Affinität wurde hier mittels Protein-Fluoreszenztitration nachgewiesen, gefolgt von der Anisotropiemessung, wohingegen die niedrigste Affinität bei der Gleichgewichtsdialyse ermittelt wurde (Tabelle 9). Das letztgenannte Verfahren hat den potentiellen Nachteil der Verringerung der effektiven Doxorubicinkonzentration durch Adsorption des hydrophoben Moleküls an die zur Dialyse verwendete Zellulosemembran (Desoye, 1988). In der Tat ließ sich mittels Absorptionsmessung eine durchschnittliche Adsorption von 18,6 % des Doxorubicins an die Zellulosemembran der Dialyseeinheit feststellen, was mit dem in der Literatur beschriebenen Wert von 22,7 % (Eksborg *et al.*, 1982) nahezu übereinstimmte. Dieses Phänomen wurde bei der Bestimmung der Dissoziationskonstante des AGP/Doxo-Komplexes durch Messung der freien Anthrazyklinkonzentration in beiden Dialysekammern explizit berücksichtigt, kann aber dennoch das Resultat beeinflusst haben. Angesichts der erforderlichen hohen Doxorubicinkonzentration kam hier auch noch der störende Einfluss des Selbstassoziationsverhaltens des niedermolekularen Haptenliganden hinzu (siehe Abschnitt 4.1.2).

Der Unterschied zwischen der mittels Protein-Fluoreszenztitration und Anisotropiemessung ermittelten Dissoziationskonstante für den AGP/Doxo-Komplex erklärt sich weder durch mehrfache Bindungsstellen für den niedermolekularen Liganden innerhalb des AGP noch durch unspezifische Bindungsereignisse des Doxorubicins inklusive seiner Selbstassoziation oder gar durch eine Änderung der Fluoreszenzlebensdauer des mit dem AGP komplexierten Doxorubicins im Vergleich zum unkomplexierten Liganden (Husain *et al.*, 1993). Auch spielt

bei der Protein-Fluoreszenztitration eine dynamische Fluoreszenzlöschung (Mukherjee *et al.*, 2012) keine wesentliche Rolle, wie eine Auswertung der Messwerte in einem modifizierten Stern-Volmer-*Plot* nach Gleichung (33) (Samworth *et al.*, 1988) durch den linearen Kurvenverlauf gezeigt hat (Graph nicht gezeigt).

Tabelle 9: In dieser Arbeit mittels verschiedener Messmethoden bestimmte Dissoziationskonstanten (K_D) für den Komplex des AGP mit Doxorubicin im Vergleich zur Literatur

Methode	**K_D [µM]**	
	nicht-lineare Regression	Scatchard-*Plot*
Protein-Fluoreszenztitration[a] Auswertung nach Gleichung (31)	8,05 ± 0,95	–
Fluoreszenz-Anisotropie[a] Auswertung nach Gleichung (56)	26,3 ± 5,8	–
Gleichgewichtsdialyse[a] Auswertung nach Gleichung (3) und (4)	68,4 ± 7,4	73,2 ± 0,4
Liganden-Fluoreszenztitration[b]	56,3 ± 6,3	10,8 ± 5,8
Absorptionsmessung[b]	24,5 ± 1,8	21,8 ± 1,0
Ultrafiltration[c]	108 ± 13	–
Wachstumsinhibition[d]	34,5	–

[a] selbst durchgeführte Messungen; Literaturwerte aus [b] (Husain *et al.*, 1993), [c] (Chassany *et al.*, 1996) und [d] (Finlay & Baguley, 2000)

Die hier nachgewiesene schwache Bindungsaffinität des rekombinanten AGP für Doxorubicin belegt, dass die Wechselwirkungen des Chromophors mit den Aminosäureseitenketten in der Bindungstasche des Lipocalins suboptimal ausgeprägt sind (Tabelle 9). Die Substitution ausgewählter für die Bindung des Zielmoleküls verantwortlicher Aminosäuren in der Bindungstasche eines Proteins-*Scaffold* zum Zweck der Erhöhung der Ligandenaffinität durch rationales Protein-*Engineering* setzt die Kenntnis seiner dreidimensionalen Struktur voraus. Für das grundlegend geeignet erscheinende α1-*Acid Glycoprotein* fehlten diese Strukturdaten zum Zeitpunkt des Projektbeginns. Durch Bindungsstudien mit Arzneimitteln war lediglich bekannt, dass die Aminosäuren 21 – 31 bei der Komplexierung basischer Liganden eine entscheidende Rolle spielen (Husain *et al.*, 1993). Tatsächlich legten experimentelle Studien sogar nahe, dass die Bindungstasche des AGP drei teilweise überlappende Bindungsstellen für neutrale, basische und saure Liganden sowie für Steroidhormonliganden besitzt (Israili & Dayton, 2001; Matsumoto *et al.*, 2002).

Die inzwischen aufgeklärte Kristallstruktur (Schönfeld *et al.*, 2008) ermöglicht nun unter Zuhilfenahme von *in silico* Methoden eine rationale Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren innerhalb der Bindungstasche, um eine maßgeschneiderte Molekülbibliothek für das *Phage Display* gegen Doxorubicin herzustellen. Der insgesamt unpolare Charakter der natür-

lichen Bindungstasche bietet gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Umstrukturierung. Dabei könnte das planare tetrazyklische Ringsystem des Doxorubicins in der relativ großen Kavität des Proteins Platz finden und der Daunosaminzuckerrest gegebenenfalls in einer der beiden benachbarten kleineren, negativ geladenen Kavitäten zu liegen kommen.

Aufgrund der vorhandenen moderaten Bindungsaffinität des rekombinanten AGP für Doxorubicin bietet sich auch eine Kokristallisation mit dem Ligand zwecks Strukturaufklärung des labilen Komplexes an. Dazu ist allerdings eine Modifikation der ersten vier N-terminalen Aminosäuren notwendig, da diese Peptidsequenz in der bisherigen Kristallstruktur in die Bindungstasche hineinragt und deren Beladung blockiert (Schönfeld *et al.*, 2008). Mittels der erhaltenen Komplexstruktur können dann gezielt suboptimal ausgeprägte Seitenkettenkontakte innerhalb der Bindungstasche sowie eventuell sterisch hinderliche Aminosäurereste identifiziert werden.

Das amphiphile Progesteron zeigte bei simuliertem *Docking* seines hydrophoben planaren Ringsystems in die Bindungstasche des AGP (Schönfeld *et al.*, 2008) einen ähnlichen Mechanismus wie es ein Kokristall des humanen Lipocalin Apolipoprotein D mit diesem Liganden offenbarte (Eichinger *et al.*, 2007). Durch systematische Substitution exponierter hydrophober Seitenketten wurde eine gut lösliche Variante des ApoD erhalten (Nasreen *et al.*, 2006), die sich aufgrund des humanen Ursprungs und des unpolaren Charakters und der engen Geometrie der Bindungstasche (Eichinger *et al.*, 2007) ebenfalls als Ausgangspunkt zur Erzeugung eines therapeutisch nutzbaren Anticalins gegen Doxorubicin eignen sollte.

5 Zusammenfassung

Durch kombinierten Ansatz des rationalen (*Molecular Modelling*) und evolutiven (*Phage Display*) Protein-Designs wurde das Lipocalin BBP aus Insekten als Protein-*Scaffold* zur Konstruktion eines sogenannten Anticalins für den Hapten-Liganden Doxorubicin eingesetzt. Die Lipocaline sind den Antikörpern der humoralen Immunantwort, die als prototypische Bindeproteine gelten, strukturell verwandt, besitzen aber den Vorteil des Aufbaus aus einer einzigen Polypeptidkette. Zudem können sie gentechnisch in bakteriellen Expressionsystemen wie *E. coli* einfach produziert werden. Das zu den Anthrazyklinen gehörende fluoreszierende Doxorubicin ist ein klinisch erprobtes und verbreitet eingesetztes Zytostatikum. Wegen seiner Kardiotoxizität weist es allerdings geringe therapeutische Breite auf. Ein gegen diese Verbindung gerichtetes Anticalin erscheint deshalb aus biomedizinischer wie auch biophysikalisch-analytischer Sicht von Interesse und könnte zudem als Antidot oder *Delivery Agent* in der Onkologie Anwendung finden. Die vergleichende Protein-Fluoreszenztitration von fünf Lipocalinen, nämlich des AGP, BBP, NGAL, RBP und Tlc mit Doxorubicin, deutete bereits auf eine intrinsische Bindungsaktivität dieser Proteine. Die höchste Affinität wies dabei das AGP mit 8,05 ± 0,95 µM auf.

Zu Beginn dieser Arbeit lag die Kristallstruktur des AGP nicht vor, wohingegen diese Strukturinformation für das BBP bekannt war. Dessen Faltung ist charakterisiert durch ein unter den Lipocalinen konserviertes achtsträngiges anti-paralleles β-*Barrel* mit vier exponierten Peptidschleifen, die den Eingang zur Ligandenbindungstasche bilden und die Bindungsspezifität des Proteins vermitteln. Das BBP wurde deshalb hier als Ausgangspunkt für das rationale Protein-Design verwendet. Zudem war das BBP früher bereits erfolgreich zur Selektion von Anticalinen gegen die Haptenliganden Fluorescein und Digoxigenin eingesetzt worden.

Die Anreicherung von gegen Doxorubicin gerichteten BBP-Varianten erfolgte ausgehend von einer in dieser Arbeit hergestellten BBP-Zufallsbibliothek mit hoher Komplexität (2,53 x 10^{10} Transformanden) mittels *Phage Display* an einer mit dem Liganden funktionalisierten Polystyroloberfläche. Aufgrund der Zelltoxizität des freien Doxorubicins für den bakteriellen Wirtsstamm erfolgte die Elution der gebundenen Phagemide während der Anreicherungszyklen mit einem zuvor hergestellten Komplex bestehend aus Streptavidin und Biotin-Doxorubicin.

Die mittels *Phage Display* angereicherten Anticaline wurden anschließend mit einem Kolonie-Filterstapeltest auf Bindungsaktivität gegenüber dem Liganden Doxorubicin durchmustert. Dazu wurden die BBP-Varianten C-terminal mit einer bakteriellen Albuminbindungsdomäne fusioniert. Nach Transformation von *E. coli* mit entsprechenden Genkonstrukten wurden die sekretierten Fusionsproteine auf einer mit humanem Serum-Albumin beschichteten Membran lokal immobilisiert und nach Inkubation mit dem funktionalisierten Liganden mit Hilfe einer chromogenen Reaktion auf ihre Affinität für

Doxorubicin untersucht. Auf diese Weise wurde das Anticalin F1K27 identifiziert, das im Vergleich zum wt-BBP eine Vielzahl apolarer Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Bindungstasche aufwies.

Der gehäufte Einbau kleiner aliphatischer Aminosäuren deutete dabei im Einklang mit dem hydrophoben Charakter des relativ großen Liganden auf einen raumschaffenden Effekt in der Bindungstasche hin. Nach Herstellung in *E. coli* und chromatographischer Reinigung des Anticalins F1K27 in löslicher Form wurde deutliche Affinität des Proteins für Doxorubicin nachgewiesen. Die Dissoziationskonstante wurde mittels Protein-Fluoreszenztitration zu 4,7 ± 0,2 µM bestimmt; im Fall kompetitiver Verdrängung der Fluoreszenzprobe 8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure durch Doxorubicin wurde eine inhibitorische Konzentration von 6,6 ± 0,4 µM ermittelt.

Der Nachweis der Komplexbildung wurde dabei durch die ausgeprägte Neigung des Liganden zur Selbstassoziation erschwert. Dieses bekannte, auf *Stacking*-Wechselwirkungen beruhende Verhalten folgt sehr wahrscheinlich dem bei hydrophoben aromatischen Molekülen häufig beobachteten Mechanismus der indefiniten isodesmischen Polymerisation. Die hier bestimmte isodesmische Dissoziationskonstante variierte in einem Bereich von 2,5 bis 246 µM – vermutlich bedingt durch unterschiedliche Ionenstärke und Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Versuche, das Anticalin F1K27 durch Affinitätsmaturierung mittels *Error-Prone-PCR* und erneuter Selektion hinsichtlich seiner Affinität für Doxorubicin zu verbessern, schlugen fehl. Daher wurde ein Verfahren zur Fermentation der Variante F1K27 etabliert, um eine zukünftige Kokristallisation des Anticalins im Komplex mit dem Liganden Doxorubicin zum Zweck der Strukturanalyse vorzubereiten. Zur Fermentation im 8 L-Maßstab wurde der Bakterienstamm MC4100Δ*skp* mit dem Expressionsplasmid pBBP21-F1K27 sowie dem für Faltungshelfer kodierenden Plasmid pTUM4 kotransformiert. Nach erfolgter Proteinbiosynthese wurde die Variante F1K27 aus der geernteten Kultur mittels Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von insgesamt etwa 50 mg gewonnen. Der Einsatz des Helferplasmids pTUM4 steigerte die Ausbeute gegenüber zunächst ohne den Vektor durchgeführten Fermentationsversuchen um den Faktor 20.

Das im Rahmen dieser Arbeit mittels Protein-*Engineering* aus dem natürlichen Lipocalin BBP erzeugte Anticalin F1K27 komplexiert das Anthrazyklin Doxorubicin spezifisch mit einer Dissoziationskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich, was die Eignung der Anticalin-Technologie zur Erzeugung künstlicher Bindeproteine mit neuen Bindungsspezifitäten insbesondere für Hapten-Liganden bestätigt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ABD	Albumin-Bindedomäne
ADC	*Antibody Drug Conjugate*
A_λ	Absorption bei Wellenlänge λ
AGP	α1-*Acid Glycoprotein*
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-Naphtalin-Sulfonsäure
AP	Alkalische Phosphatase
ApoD	Apolipoprotein D
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
aTc	Anhydro-Tetrazyklin
BBP	Bilin-Bindungsprotein
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4-Toluidinsalz
bidest.	bidestilliert
Biotin-HPDP	N-[6-(Biotinamido)Hexyl]-3'-(2'-Pyridyldithio)Propionamid
bla	β-Lactamasegen
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Konzentration
Cam	Chloramphenicol
CCD	*Charge-Coupled Device*
CD	Cirkulardichroismus
CDR	*Complementarity Determining Region*
cfu	*Colony Forming Unit*
DC	Dünnschichtchromatographie
Dig	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doxo	Doxorubicin (Adriamycin)
dPTP	2'-Deoxy-P-Nukleosid-5'-Triphosphat
DsbA	Bakterielle Disulfidisomerase A
DsbC	Bakterielle Disulfidisomerase C
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
EDC	Ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ε	Dielektrizitätskonstante
ε_λ	Molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ
ε_X	Molarer Extinktionskoeffizient einer bestimmten Molekülpopulation X
F	Fluoreszenzintensität
Fab	Antigen-bindendes Antikörperfragment (*Fragment antigen binding*)
Fc	Konstante Region des Antikörpers (*Fragment crystallizing*)
FkpA	FKBP-Typ Peptidyl-Prolyl *cis*/*trans*-Isomerase
FT	Fluoreszenztitration
Fv	Antigen-bindendes Antikörperfragment (*Fragment variable*)
f_X	molarer Fluoreszenzkoeffizient eines Moleküls oder Komplexes X
g	Erdbeschleunigung
ΔG	Änderung der Freien Reaktionsenthalpie
ΔH	Änderung der Enthalpie
HABA	Hydroxyl-Azophenyl-Benzoesäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
*Her*2	*Human Epidermal Growth Factor Receptor* 2
HSA	Humanes Serum Albumin
I	Lichtintensität
Ig	Immunglobulin
K_A	Assoziationskonstante
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_D	Dissoziationskonstante
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Anregungswellenlänge
LMP	*Low Melting Point*
moi	*Multiplicity of Infection*
MW	Molmasse (*Molecular Weight*)
MWCO	molekulare Ausschlussgröße (*Molecular Weight Cut-Off*)
NGAL	Neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NBT	Nitro *Blue* Tetrazolium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*)
OD	Optische Dichte
OmpA	*Outer Membrane Protein* A
p.a.	*pro analysi*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PDB	*Protein Data Bank*
PEG	Polyethylenglykol
pfu	*Plaque Forming Unit*
pI	isoektrischer Punkt
pNPP	*p*-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q_{max}	Fluoreszenz-*Quenching*
r	Fluoreszenzanisotropie
RBP	Retinol-Bindungsprotein
R_f	Retentionsfaktor
RFE	Relative Fluoreszenz-Einheit
RNase A	Ribonuclease A
rpm	*Rounds per Minute* (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
ΔS	Änderung der Entropie
*sc*Fv	*single chain variable antibody fragment*
SDS	Natriumdodecylsulfat
Skp	Siebzehn-Kilodalton-Protein
SurA	Peptidyl-Prolyl *cis*/*trans*-Isomerase
SV	Säulenvolumen
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
Tlc	Tränenlipocalin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	*Unit* (Einheit der Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
Vol	Volumenteil(e)
v/*v*	*Volume per Volume* (Volumen pro Volumen)
Wt	Wildtyp
w/*v*	*Weight per Volume* (Masse pro Volumen)
ZNS	Zentrales Nervensystem
8-oxo-dGTP	8-Oxo-2'-Deoxyguanosin-5'-Triphosphat

7 Literaturverzeichnis

(1986) Nomenclature committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *J. Biol. Chem.* 261, 13-17.

Abraham, S.A., McKenzie, C., Masin, D., Ng, R., Harasym, T.O., Mayer, L.D. & Bally, M.B. (2004) In vitro and in vivo characterization of doxorubicin and vincristine coencapsulated within liposomes through use of transition metal ion complexation and pH gradient loading. *Clin Cancer Res* 10, 728-738.

Adey, N.B., Mataragnon, A.H., Rider, J.E., Carter, J.M. & Kay, B.K. (1995) Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene* 156, 27-31.

Åkerström, B., Flower, D.R. & Salier, J.P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim Biophys Acta* 1482, 1-8.

Åkerström, B., Nielsen, E. & Björck, L. (1987) Definition of IgG- and albumin-binding regions of streptococcal protein G. *J Biol Chem* 262, 13388-13391.

Al-Maaieh, A. & Flanagan, D.R. (2002) Salt effects on caffeine solubility, distribution, and self-association. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91, 1000-1008.

Allart, B., Lehtolainen, P., Yla-Herttuala, S., Martin, J.F. & Selwood, D.L. (2003) A stable bis-allyloxycarbonyl biotin aldehyde derivative for biotinylation via reductive alkylation: application to the synthesis of a biotinylated doxorubicin derivative. *Bioconjug Chem* 14, 187-194.

Allen, T.M. & Cullis, P.R. (2004) Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* 303, 1818-1822.

Amersdorfer, P. & Marks, J.D. (2000) Phage libraries for generation of anti-botulinum scFv antibodies. *Methods Mol Biol* 145, 219-240.

Anderson, R.D., Veigl, M.L., Baxter, J. & Sedwick, W.D. (1993) Excision repair reduces doxorubicin-induced genotoxicity. *Mutat Res* 294, 215-222.

Andreoni, A., Colasanti, A. & Roberti, G. (1992) Excited singlet state properties of anthracenedione photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 14, 319-328.

Arcamone, F. (1981) *Doxorubicin : anticancer antibiotics*. Academic Press, New York; London.

Arcamone, F. (1985) Properties of Antitumor Anthracyclines and New Developments in Their Application: Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 45, 5995-5999.

Arcamone, F., Animati, F., Capranico, G., Lombardi, P., Pratesi, G., Manzini, S., Supino, R. & Zunino, F. (1997) New developments in antitumor anthracyclines. *Pharmacol Ther* 76, 117-124.

Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. & Spalla, C. (2000) Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius var.*

caesius. Reprinted from Biotechnology and Bioengineering, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng* 67, 704-713.

Assez, N., Delangue, C. & Dherbecourt, V. (2009) Efficiency digoxin-specific antibody FAB fragment (Digitot®) after a late diagnosis in digitalis poisoning (article in french). *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 28, 178-179.

Atkins, P.W. & De Paula, J. (2005) *Elements of physical chemistry*. Oxford University Press, Oxford.

Atrazhev, A.M. & Elliott, J.F. (1996) Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation into E. coli. *Biotechniques* 21, 1024.

Back, H., Gustavsson, A., Eksborg, S. & Rodjer, S. (1995) Accidental doxorubicin overdosage. *Acta Oncol* 34, 533-536.

Baek, H., Suk, K.H., Kim, Y.H. & Cha, S. (2002) An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res* 30, e18.

Bagatolli, L.A., Kivatinitz, S.C., Aguilar, F., Soto, M.A., Sotomayor, P. & Fidelio, G.D. (1996a) Two distinguishable fluorescent modes of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate bound to human albumin. *Journal of Fluorescence* 6, 33-40.

Bagatolli, L.A., Kivatinitz, S.C. & Fidelio, G.D. (1996b) Interaction of small ligands with human serum albumin IIIA subdomain. How to determine the affinity constant using an easy steady state fluorescent method. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85, 1131-1132.

Baker, B.M. & Murphy, K.P. (1996) Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophys. J.* 71, 2049-2055.

Balsari, A., Alzani, R., Parrello, D., Morelli, D., Tagliabue, E., Gianni, L., Isetta, A.M., Menard, S., Colnaghi, M.I. & Ghione, M. (1988) Monoclonal antibodies against doxorubicin. *Int J Cancer* 42, 798-802.

Balsari, A., Menard, S., Colnaghi, M.I. & Ghione, M. (1991) Anti-drug monoclonal antibodies antagonize toxic effect more than anti-tumor activity of doxorubicin. *Int J Cancer* 47, 889-892.

Balsari, A., Rumio, C., Morelli, D., Sfondrini, L., Nardini, E., Barajon, I. & Menard, S. (2001) Topical administration of a doxorubicin-specific monoclonal antibody prevents drug-induced mouth apoptosis in mice. *Br J Cancer* 85, 1964-1967.

Balsari, A.L., Morelli, D., Menard, S., Veronesi, U. & Colnaghi, M.I. (1994) Protection against doxorubicin-induced alopecia in rats by liposome-entrapped monoclonal antibodies. *FASEB J* 8, 226-230.

Barbas, C.F., 3rd, Amberg, W., Simoncsits, A., Jones, T.M. & Lerner, R.A. (1993) Selection of human anti-hapten antibodies from semisynthetic libraries. *Gene* 137, 57-62.

Barbas, C.F., Bain, J.D., Hoekstra, D.M. & Lerner, R.A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4457-4461.

Barrett, R.W., Cwirla, S.E., Ackerman, M.S., Olson, A.M., Peters, E.A. & Dower, W.J. (1992) Selective enrichment and characterization of high affinity ligands from collections of random peptides on filamentous phage. *Anal Biochem* 204, 357-364.

Bass, S., Greene, R. & Wells, J.A. (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* 8, 309-314.

Battista, J.R., Donnelly, C.E., Ohta, T. & Walker, G.C. (1990) The SOS response and induced mutagenesis. *Prog Clin Biol Res* 340A, 169-178.

Beckerdite, J.M., Wan, C.C. & Adams, E.T. (1980) Analysis of various indefinite self-associations of the AK type. *Biophysical Chemistry* 12, 199-214.

Berek, C. & Milstein, C. (1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* 96, 23-41.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.

Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R.W. (2000) *Circular Dichroism Principles and Applications*. Wiley-VCH, New York.

Beste, G. (1998) Evolutives Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β-*Barrel*-Proteinarchitektur der Lipocaline. Technische Universität, Darmstadt.

Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. & Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1898-1903.

Bontenbal, M., Sieuwerts, A.M., Peters, H.A., van Putten, W.L., Foekens, J.A. & Klijn, J.G. (1998) Uptake and distribution of doxorubicin in hormone-manipulated human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Research and Treatment* 51, 139-148.

Bosanquet, A.G. (1986) Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. II. Assay methods, adriamycin and the other antitumour antibiotics. *Cancer Chemother Pharmacol* 17, 1-10.

Bouma, J., Beijnen, J.H., Bult, A. & Underberg, W.J.M. (1986) Anthracycline antitumour agents. *Pharmacy World & Science* 8, 109-133.

Boyle, P. & Levin, B. (2008) *World cancer report 2008*. IARC Press, Lyon.

Boyraz, B., Sendur, M.A., Aksoy, S., Babacan, T., Roach, E.C., Kizilarslanoglu, M.C., Petekkaya, I. & Altundag, K. (2013) Trastuzumab emtansine (T-DM1) for HER2-positive breast cancer. *Curr Med Res Opin* 29, 405-414.

Bracho, M.A., Moya, A. & Barrio, E. (1998) Contribution of *Taq* polymerase-induced errors to the estimation of RNA virus diversity. *J Gen Virol* 79, 2921-2928.

Bradbury, A., Persic, L., Werge, T. & Cattaneo, A. (1993) Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology (NY)* 11, 1565-1569.

Bradbury, A.R. & Marks, J.D. (2004) Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods* 290, 29-49.

Breustedt, D.A. (2008) Funktionelle und strukturelle Charakterisierung humaner Vertreter der Lipocalin-Proteinfamilie. Technische Universität München.

Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.

Brown, A.M. (2006) A non-linear regression analysis program for describing electrophysiological data with multiple functions using Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 82, 51-57.

Brown, M., Schumacher, M.A., Wiens, G.D., Brennan, R.G. & Rittenberg, M.B. (2000) The Structural Basis of Repertoire Shift in an Immune Response to Phosphocholine. *J. Exp. Med.* 191, 2101-2112.

Brown, W.C. & Campbell, J.L. (1993) A new cloning vector and expression strategy for genes encoding proteins toxic to *Escherichia coli*. *Gene* 127, 99-103.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. . *Biotechniques* 5, 376–379.

Burke, T.G., Israel, M., Seshadri, R. & Doroshow, J.H. (1989) A fluorescence study examining how 14-valerate side chain substitution modulates anthracycline binding to small unilamellar phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 982, 123-130.

Burke, T.G. & Tritton, T.R. (1985) Structural basis of anthracycline selectivity for unilamellar phosphatidylcholine vesicles: an equilibrium binding study. *Biochemistry* 24, 1768-1776.

Buurma, N.J. & Haq, I. (2007) Advances in the analysis of isothermal titration calorimetry data for ligand-DNA interactions. *Methods* 42, 162-172.

Buurma, N.J. & Haq, I. (2008) Calorimetric and Spectroscopic Studies of Hoechst 33258: Self-association and Binding to Non-cognate DNA. *Journal of Molecular Biology* 381, 607-621.

Carcamo, J., Ravera, M.W., Brissette, R., Dedova, O., Beasley, J.R., Alam-Moghe, A., Wan, C., Blume, A. & Mandecki, W. (1998) Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11146-11151.

Chaires, J.B., Dattagupta, N. & Crothers, D.M. (1982) Self-association of daunomycin. *Biochemistry* 21, 3927-3932.

Chames, P., Hufton, S.E., Coulie, P.G., Uchanska-Ziegler, B. & Hoogenboom, H.R. (2000) Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1–MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7969-7974.

Charlton, K., Harris, W.J. & Porter, A.J. (2001) The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *Biosensors and Bioelectronics* 16, 639-646.

Chassany, O., Urien, S., Claudepierre, P., Bastian, G. & Tillement, J.P. (1996) Comparative serum protein binding of anthracycline derivatives. *Cancer Chemother Pharmacol* 38, 571-573.

Chen, Q., Sowa, D.A., Cai, J. & Gabathuler, R. (2003) Efficient One-Pot Synthesis of Doxorubicin Conjugates Through Its Amino Group to Melanotransferrin P97. *Synthetic Communications* 33, 2401 - 2421.

Cheng, Y. & Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.

Cho, G., Keefe, A.D., Liu, R., Wilson, D.S. & Szostak, J.W. (2000) Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection. *J Mol Biol* 297, 309-319.

Chowdhary, R.K., Shariff, I. & Dolphin, D. (2003) Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative. *J Pharm Pharm Sci* 6, 13-19.

Christiansen, J. & Rajasekaran, A.K. (2004) Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 3, 1493-1501.

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.

Cooper, A., Johnson, C.M., Lakey, J.H. & Nollmann, M. (2001) Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys Chem* 93, 215-230.

Cortes-Funes, H. & Coronado, C. (2007) Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol* 7, 56-60.

Cortese, R., Monaci, P., Luzzago, A., Santini, C., Bartoli, F., Cortese, I., Fortugno, P., Galfrè, G., Nicosia, A. & Felici, F. (1996) Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 616-621.

Cullis, P.R., Hope, M.J., Bally, M.B., Madden, T.D., Mayer, L.D. & Fenske, D.B. (1997) Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1331, 187-211.

Curran, C.F. (1991) Acute doxorubicin overdoses. *Ann Intern Med* 115, 913-914.

D'Mello, F. & Howard, C.R. (2001) An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *J Immunol Methods* 247, 191-203.

de Bruin, R., Spelt, K., Mol, J., Koes, R. & Quattrocchio, F. (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* 17, 397-399.

Demant, E.J. & Friche, E. (1998a) Equilibrium binding of anthracycline cytostatics to serum albumin and small unilamellar phospholipid vesicles as measured by gel filtration. *Biochem Pharmacol* 55, 27-32.

Demant, E.J. & Friche, E. (1998b) Kinetics of anthracycline accumulation in multidrug-resistant tumor cells: relationship to drug lipophilicity and serum albumin binding. *Biochem Pharmacol* 56, 1209-1217.

Demant, E.J., Jensen, P.B. & Sehested, M. (1991) Characterization of the cooperative cross-linking of doxorubicin N-hydroxysuccinimide ester derivatives to water soluble proteins. *Biochim Biophys Acta* 1118, 83-90.

DeMarini, D.M. & Lawrence, B.K. (1992) Prophage induction by DNA topoisomerase II poisons and reactive-oxygen species: Role of DNA breaks. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 267, 1-17.

Demchenko, A.P. & Ladokhin, A.S. (1988) Temperature-dependent shift of fluorescence spectra without conformational changes in protein; studies of dipole relaxation in the melittin molecule. *Biochim Biophys Acta* 955, 352-360.

Desoye, G. (1988) Error analysis in equilibrium dialysis: evaluation of adsorption phenomena. *J Biochem Biophys Methods* 17, 3-16.

Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.

Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* 16, 6127-6145.

Dreher, M.R., Raucher, D., Balu, N., Michael Colvin, O., Ludeman, S.M. & Chilkoti, A. (2003) Evaluation of an elastin-like polypeptide-doxorubicin conjugate for cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 91, 31-43.

Drummond, D.A., Iverson, B.L., Georgiou, G. & Arnold, F.H. (2005) Why High-error-rate Random Mutagenesis Libraries are Enriched in Functional and Improved Proteins. *Journal of Molecular Biology* 350, 806-816.

Duro, G., Izzo, V. & Barbieri, R. (1993) Methods for recovering nucleic acid fragments from agarose gels. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 618, 95-104.

Eckert, K.A. & Kunkel, T.A. (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 18, 3739-3744.

Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.

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.

Eksborg, S. (1978) Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: self-association in aqueous solution. *J Pharm Sci* 67, 782-785.

Eksborg, S., Ehrsson, H. & Ekqvist, B. (1982) Protein binding of anthraquinone glycosides, with special reference to adriamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 10, 7-10.

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.

Essen, L.O. & Skerra, A. (1994) The de novo design of an antibody combining site. Crystallographic analysis of the VL domain confirms the structural model. *J Mol Biol* 238, 226-244.

Esteva, F.J., Valero, V., Pusztai, L., Boehnke-Michaud, L., Buzdar, A.U. & Hortobagyi, G.N. (2001) Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect in 2001 and beyond. *Oncologist* 6, 133-146.

Evstigneev, M., Khomich, V. & Davies, D. (2006) Complexation of anthracycline drugs with DNA in the presence of caffeine. *European Biophysics Journal* 36, 1-11.

Evstigneev, M.P., Buchelnikov, A.S., Kostjukov, V.V., Pashkova, I.S. & Evstigneev, V.P. (2012) Indistinguishability of the models of molecular self-assembly. *Supramolecular Chemistry* 25, 199-203.

Ewer, M.S., Martin, F.J., Henderson, C., Shapiro, C.L., Benjamin, R.S. & Gabizon, A.A. (2004) Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Semin Oncol* 31, 161-181.

Falkenberg, C., Bjoerck, L. & Aakerstroem, B. (1992) Localization of the binding site for streptococcal protein G on human serum albumin. Identification of a 5.5-kilodalton protein G binding albumin fragment. *Biochemistry* 31, 1451-1457.

Fiallo, M.M., Tayeb, H., Suarato, A. & Garnier-Suillerot, A. (1998) Circular dichroism studies on anthracycline antitumor compounds. Relationship between the molecular structure and the spectroscopic data. *J Pharm Sci* 87, 967-975.

Fiedler, M. & Skerra, A. (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* 274, 111-118.

Finlay, G.J. & Baguley, B.C. (2000) Effects of protein binding on the *in vitro* activity of antitumour acridine derivatives and related anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 45, 417-422.

Firth, A.E. & Patrick, W.M. (2005) Statistics of protein library construction. *Bioinformatics* 21, 3314-3315.

Firth, A.E. & Patrick, W.M. (2008) GLUE-IT and PEDEL-AA: new programmes for analyzing protein diversity in randomized libraries. *Nucleic Acids Res* 36, 281-285.

Flanagan, B. & Jones, A.L. (2001) *Antidotes : principles and clinical applications*. Taylor & Francis, London.

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.

Fornari, F.A., Jarvis, D.W., Grant, S., Orr, M.S., Randolph, J.K., White, F.K. & Gewirtz, D.A. (1996) Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem Pharmacol* 51, 931-940.

Fornari, F.A., Randolph, J.K., Yalowich, J.C., Ritke, M.K. & Gewirtz, D.A. (1994) Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 45, 649-656.

Fransen, E., Van Camp, G. & Winnepenninckx, B. (1998) Dependence of the ligation efficiency of large DNA fragments isolated from agarose gels on the purification method. *Prep Biochem Biotechnol* 28, 235-241.

Fülöp, Z., Gref, R. & Loftsson, T. (2013) A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. *International Journal of Pharmaceutics* 454, 559-561.

Gaj, T., Meyer, S.C. & Ghosh, I. (2007) The AviD-tag, a NeutrAvidin/avidin specific peptide affinity tag for the immobilization and purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 56, 54-61.

Gallois, L., Fiallo, M. & Garnier-Suillerot, A. (1998) Comparison of the interaction of doxorubicin, daunorubicin, idarubicin and idarubicinol with large unilamellar vesicles: Circular dichroism study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1370, 31-40.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M., Appel, R. & Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Walker, J. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.

Gasymov, O.K. & Glasgow, B.J. (2007) ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1774, 403-411.

Gelvan, D. & Samuni, A. (1986) Cellular targets of adriamycin-induced damage in Escherichia coli. *Biochem Pharmacol* 35, 3267-3275.

Gelvan, D. & Samuni, A. (1988) Reappraisal of the association between adriamycin and iron. *Cancer Res* 48, 5645-5649.

Gewirtz, D.A. (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57, 727-741.

Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y. & Inouye, M. (1984) Secretion cloning vectors in Escherichia coli. *Embo J* 3, 2437-2442.

Gianni, L. (2002) The future of targeted therapy: combining novel agents. *Oncology* 63 Suppl 1, 47-56.

Gianni, L., Albanell, J. & Eiermann, W. (2001) Feasibility, Pharmacology, and Antitumor Activity of Herceptin® (H) with Doxorubicin and Taxol Followed by Weekly Taxol (AT&T) in Women with HER2-Positive Advanced Breast Cancer (ABC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:44a, abstr. 174.

Gianni, L., Munzone, E., Capri, G., Fulfaro, F., Tarenzi, E., Villani, F., Spreafico, C., Laffranchi, A., Caraceni, A., Martini, C. & et al. (1995) Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated metastatic breast cancer: high antitumor efficacy and cardiac effects in a dose-finding and sequence-finding study. *J Clin Oncol* 13, 2688-2699.

Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.

Goletz, S., Christensen, P.A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G. & Karsten, U. (2002) Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol* 315, 1087-1097.

Griffin-Green, E.A., Zaleska, M.M. & Erecinska, M. (1988) Adriamycin-induced lipid peroxidation in mitochondria and microsomes. *Biochem Pharmacol* 37, 3071-3077.

Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Frej, A.K., Jornvall, H., Flock, J.I. & Lindberg, M. (1986) Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *Embo J* 5, 1567-1575.

Hashimoto-Gotoh, T. (1995) Quantitative determination of effective nibbling activities contaminating restriction endonuclease preparations. *Anal Biochem* 231, 230-236.

Hawkins, R.E., Russell, S.J. & Winter, G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226, 889-896.

Hayakawa, E., Furuya, K., Ueno, H., Kuroda, T., Moriyama, M. & Kondo, A. (1991) Visible Absorption and Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Self-Association of Doxorubicin in Aqueous Solution. *Chemical & Pharmaceutical bulletin* 39, 1009-1012

Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H. & Horiuchi, T. (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol.* EMBO and Nature Publishing Group.

Hayhurst, A. & Harris, W.J. (1999) *Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr Purif* 15, 336-343.

He, X.M. & Carter, D.C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209-215.

Hengen, P.N. (1996) Methods and reagents. preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 21, 75-76.

Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.

Hochepied, 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.

Hoess, R.H. (2001) Protein design and phage display. *Chem Rev* 101, 3205-3218.

Holla, A.D. (2012) Protein-Engineering eines Anticalins mit Bindungsspezifität für DC-SIGN. Technische Universität München.

Horovitz, A. & Levitzki, A. (1987) An accurate method for determination of receptor-ligand and enzyme-inhibitor dissociation constants from displacement curves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6654-6658.

Hortobagyi, G.N. (1998) Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med* 339, 974-984.

Hosse, R.J., Rothe, A. & Power, B.E. (2006) A new generation of protein display scaffolds for molecular recognition. *Protein Sci* 15, 14-27.

Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Muller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H. (1987) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 A resolution. *J Mol Biol* 198, 499-513.

Huntington, J.A. & Stein, P.E. (2001) Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 756, 189-198.

Hurwitz, E., Levy, R., Maron, R., Wilchek, M., Arnon, R. & Sela, M. (1975) The Covalent Binding of Daunomycin and Adriamycin to Antibodies, with Retention of Both Drug and Antibody Activities. *Cancer Res* 35, 1175-1181.

Husain, N., Agbaria, R.A. & Warner, I.M. (1993) Spectroscopic analysis of the binding of doxorubicin to human α-1 acid glycoprotein. *Journal of Physical Chemistry* 97, 10857-10861.

Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia col*i with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Irving, R.A., Kortt, A.A. & Hudson, P.J. (1996) Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology* 2, 127-143.

Ishida, T., Horiike, K., Tojo, H. & Nozaki, M. (1988) Interaction of protein with a self-associating ligand. Deviation from a hyperbolic binding curve and the appearance of apparent co-operativity in the Scatchard plot. *Journal of Theoretical Biology* 130, 49-66.

Israili, Z.H. & Dayton, P.G. (2001) Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metabolism Reviews* 33, 161-235.

Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J. & Frykberg, L. (2003) Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptins or other Exported Proteins. *Biol Proced Online* 5, 123-135.

Janeway, C.A. (2001) *Immunobiology: The immune system in health and disease*. Garland, New York.

Jelesarov, I. & Bosshard, H.R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* 12, 3-18.

Jensen, P.B., Sorensen, B.S., Sehested, M., Demant, E.J., Kjeldsen, E., Friche, E. & Hansen, H.H. (1993) Different modes of anthracycline interaction with topoisomerase II. Separate structures critical for DNA-cleavage, and for overcoming topoisomerase II-related drug resistance. *Biochem Pharmacol* 45, 2025-2035.

Jestin, J.L., Volioti, G. & Winter, G. (2001) Improving the display of proteins on filamentous phage. *Res Microbiol* 152, 187-191.

Junttila, T., Li, G., Parsons, K., Phillips, G. & Sliwkowski, M. (2011) Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 128, 347-356.

Kacinski, B.M. & Rupp, W.D. (1984) Interactions of the UVRABC endonuclease *in vivo* and *in vitro* with DNA damage produced by antineoplastic anthracyclines. *Cancer Res* 44, 3489-3492.

Kano, K., Konse, T. & Kubota, T. (1985) The Effects of the pH and the Temperature on the Oxidation-reduction Properties of Adriamycin Adsorbed on a Mercury Electrode Surface. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 58, 424-428.

Kartha, G., Bello, J. & Harker, D. (1967) Tertiary structure of ribonuclease. *Nature* 213, 862-865.

Karukstis, K.K., Thompson, E.H., Whiles, J.A. & Rosenfeld, R.J. (1998) Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys Chem* 73, 249-263.

Kaufman, D.L. & Evans, G.A. (1990) Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* 9, 304, 306.

Kay, B.K., Winter, J. & McCafferty, J. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins. A Laboratory Manual*. Academic Press, San Diego.

Kayushin, A., Korosteleva, M. & Miroshnikov, A. (2000) Large-scale solid-phase preparation of 3'-unprotected trinucleotide phosphotriesters - precursors for synthesis of trinucleotide phosphoramidites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19, 1967-1976.

Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009) High-Affinity Recognition of Lanthanide(III) Chelate Complexes by a Reprogrammed Human Lipocalin 2. *Journal of the American Chemical Society* 131, 3565-3576.

Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H. & Toge, T. (2002) Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 50, 343-352.

King, H.D., Dubowchik, G.M., Mastalerz, H., Willner, D., Hofstead, S.J., Firestone, R.A., Lasch, S.J. & Trail, P.A. (2002) Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched peptide linkers: inhibition of aggregation by methoxytriethyleneglycol chains. *J Med Chem* 45, 4336-4343.

Kirsch, M., Zaman, M., Meier, D., Dübel, S. & Hust, M. (2005) Parameters affecting the display of antibodies on phage. *Journal of Immunological Methods* 301, 173-185.

Kiyomiya, K., Kurebe, M., Nakagawa, H. & Matsuo, S. (2002a) The role of the proteasome in apoptosis induced by anthracycline anticancer agents. *Int J Oncol* 20, 1205-1209.

Kiyomiya, K., Matsuo, S. & Kurebe, M. (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res* 61, 2467-2471.

Kiyomiya, K., Satoh, J., Horie, H., Kurebe, M., Nakagawa, H. & Matsuo, S. (2002b) Correlation between nuclear action of anthracycline anticancer agents and their binding affinity to the proteasome. *Int J Oncol* 21, 1081-1085.

Kobayashi, N., Karibe, T. & Goto, J. (2005) Dissociation-independent selection of high-affinity anti-hapten phage antibodies using cleavable biotin-conjugated haptens. *Analytical Biochemistry* 347, 287-296.

König, T. & Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods* 218, 73-83.

Korndörfer, I.P., Dommel, M.K. & Skerra, A. (2004) Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1015-1020.

Kouchakdjian, M., Bodepudi, V., Shibutani, S., Eisenberg, M., Johnson, F., Grollman, A.P. & Patel, D.J. (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in a DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn).dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry* 30, 1403-1412.

Kragh-Hansen, U. (1981) Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev* 33, 17-53.

Kramer, R.A., Cox, F., van der Horst, M., van der Oudenrijn, S., Res, P.C., Bia, J., Logtenberg, T. & de Kruif, J. (2003) A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res* 31, e59.

Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. & Plückthun, A. (1997) Selectively-infective phage (SIP): a mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions. *J Mol Biol* 268, 607-618.

Kremer, J.M., Wilting, J. & Janssen, L.H. (1988) Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* 40, 1-47.

Kretzschmar, T., Zimmermann, C. & Geiser, M. (1995) Selection procedures for nonmatured phage antibodies: a quantitative comparison and optimization strategies. *Anal Biochem* 224, 413-419.

Kreuter, J. (2001) Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 47, 65-81.

Kurzban, G.P., Bayer, E.A., Wilchek, M. & Horowitz, P.M. (1991) The quaternary structure of streptavidin in urea. *J Biol Chem* 266, 14470-14477.

Kuzmič, P., Moss, M.L., Kofron, J.L. & Rich, D.H. (1992) Fluorescence displacement method for the determination of receptor-ligand binding constants. *Analytical Biochemistry* 205, 65-69.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Laws, W.R. & Shore, J.D. (1978) The mechanism of quenching of liver alcohol dehydrogenase fluorescence due to ternary complex formation. *J Biol Chem* 253, 8593-8597.

Lazar, Z. (2007) Protein-Engineering eines Anticalins mit Bindungsspezifität zur Hexahistidin-Sequenz Technische Universität, München.

Lee, S.W., Shin, Y.B., Jeon, K.S., Jin, S.M., Suh, Y.D., Kim, S., Lee, J.J. & Kim, M.G. (2008) Electron beam lithography-assisted fabrication of Au nano-dot array as a substrate of a correlated AFM and confocal Raman spectroscopy. *Ultramicroscopy* 108, 1302-1306.

Lejon, S., Frick, I.-M., Björck, L., Wikström, M. & Svensson, S. (2004) Crystal Structure and Biological Implications of a Bacterial Albumin Binding Module in Complex with Human Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry* 279, 42924-42928.

Levitan, B. (1998) Stochastic modeling and optimization of phage display. *J Mol Biol* 277, 893-916.

Li, X., Hirsh, D.J., Cabral-Lilly, D., Zirkel, A., Gruner, S.M., Janoff, A.S. & Perkins, W.R. (1998) Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1415, 23-40.

Lima, J.J., MacKichan, J.J., Libertin, N. & Sabino, J. (1983) Influence of volume shifts on drug binding during equilibrium dialysis: correction and attenuation. *J Pharmacokinet Biopharm* 11, 483-498.

Lin, P.K.T. & Brown, D.M. (1989) Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing cytosine-thymine analogues. *Nucl. Acids Res.* 17, 10373-10383.

Lindahl, P., Raub-Segall, E., Olson, S.T. & Bjork, I. (1991) Papain labelled with fluorescent thiol-specific reagents as a probe for characterization of interactions between cysteine proteinases and their protein inhibitors by competitive titrations. *Biochem J* 276 (Pt 2), 387-394.

Ling, L.L., Keohavong, P., Dias, C. & Thilly, W.G. (1991) Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, *Taq*, and *vent* DNA polymerases. *PCR Methods Appl.* 1, 63-69.

Livney, Y.D., Schwan, A.L. & Dalgleish, D.G. (2004) A Study of β-Casein Tertiary Structure by Intramolecular Crosslinking and Mass Spectrometry. *J. Dairy Sci.* 87, 3638-3647.

Logdberg, L. & Wester, L. (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* 1482, 284-297.

Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. & Wells, J.A. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30, 10832-10838.

Margalit, R., Shaklai, N. & Cohen, S. (1983) Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative. *Biochem J* 209, 547-552.

Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.

Marta, D. & Carl, A.K.B. (1995) Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophages and the size of antibody libraries. *FEMS Microbiology Letters* 125, 317-321.

Martin, R.B. (1996) Comparisons of Indefinite Self-Association Models. *Chem. Rev.* 96, 3043-3064.

Martin, S.R. (1980) Absorption and circular dichroic spectral studies on the self-association of daunorubicin. *Biopolymers* 19, 713-721.

Matsumoto, K., Sukimoto, K., Nishi, K., Maruyama, T., Suenaga, A. & Otagiri, M. (2002) Characterization of ligand binding sites on the alpha1-acid glycoprotein in humans, bovines and dogs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 17, 300-306.

Mayer, J.-P. (2013) Rationales und kombinatorisches Protein-Engineering mit Lipocalinen. Technische Universität, München.

McLennan, I.J., Lenkinski, R.E. & Yanuka, Y. (1985) A nuclear magnetic resonance study of the self-association of adriamycin and daunomycin in aqueous solution. *Can. J. Chem. :* 63, 1233–1238.

McPhail, D. & Cooper, A. (1997) Thermodynamics and kinetics of dissociation of ligand-induced dimers of vancomycin antibiotics. *J.Chem.Soc. Faraday Trans.* 93, 2283-2289.

Menozzi, M., Valentini, L., Vannini, E. & Arcamone, F. (1984) Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *J Pharm Sci* 73, 766-770.

Mercader, J.V. & Skerra, A. (2002) Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Anal Biochem* 308, 269-277.

Meulenberg, E.P. (2012) Antibodies Applications and New Development. Sharjah, Bentham Science Publishers.

MicroCal, L. (2003) *VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual*. MicroCal, LLC, Northampton, MA, USA.

MicroCal, L. (2004) *ITC Data Analysis in Origin® Tutorial Guide Version 7.0*. MicroCal, LLC, Northampton, MA, USA.

Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor, New York.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. (2004) Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229.

Minotti, G., Recalcati, S., Mordente, A., Liberi, G., Calafiore, A.M., Mancuso, C., Preziosi, P. & Cairo, G. (1998) The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB J* 12, 541-552.

Minotti, G., Ronchi, R., Salvatorelli, E., Menna, P. & Cairo, G. (2001) Doxorubicin irreversibly inactivates iron regulatory proteins 1 and 2 in cardiomyocytes: evidence for distinct metabolic pathways and implications for iron-mediated cardiotoxicity of antitumor therapy. *Cancer Res* 61, 8422-8428.

Moghaddam, A., Løbersli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M. & Marvik, O.J. (2001) Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries. *Journal of Immunological Methods* 254, 169-181.

Morelli, D., Menard, S., Cazzaniga, S., Colnaghi, M.I. & Balsari, A. (1997) Intratibial injection of an anti-doxorubicin monoclonal antibody prevents drug-induced myelotoxicity in mice. *Br J Cancer* 75, 656-659.

Morelli, D., Menard, S., Colnaghi, M.I. & Balsari, A. (1996) Oral administration of anti-doxorubicin monoclonal antibody prevents chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity in mice. *Cancer Res* 56, 2082-2085.

Morelli, D., Menard, S., Pozzi, B., Balsari, A. & Colnaghi, M.I. (1994a) Effect of a bifunctional monoclonal antibody directed against a tumor marker and doxorubicin on the growth of epidermoid vulvar carcinoma grafted in athymic mice. *Cell Biophys* 24-25, 119-126.

Morelli, D., Sardini, A., Villa, E., Villa, M.L., Menard, S., Colnaghi, M.I. & Balsari, A. (1994b) Modulation of drug-induced cytotoxicity by a bispecific monoclonal antibody that recognizes the epidermal growth factor receptor and doxorubicin. *Cancer Immunol Immunother* 38, 171-177.

Movva, N.R., Nakamura, K. & Inouye, M. (1980) Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 255, 27-29.

Muindi, J.R.F., Sinha, B.K., Gianni, L. & Myers, C.E. (1984) Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *FEBS Letters* 172, 226-230.

Mukherjee, M., Sardar, P.S., Ghorai, S.K., Samanta, S.K., Roy, A.S., Dasgupta, S. & Ghosh, S. (2012) Interaction of multitryptophan protein with drug: An insight into the binding mechanism and the binding domain by time resolved emission, anisotropy, phosphorescence and docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 115, 93-104.

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.

Nakamura, S., Ikehata, H. & Ono, T. (2001) Characteristics of mutations generated through digestion with restriction enzyme and ligation in plasmid DNA. *Environ Mol Mutagen* 38, 46-54.

Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2006) Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci* 15, 190-199.

Neylon, C. (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucl. Acids Res.* 32, 1448-1459.

Nilsson, J., Bosnes, M., Larsen, F., Nygren, P.A., Uhlen, M. & Lundeberg, J. (1997) Heat-mediated activation of affinity-immobilized *Taq* DNA polymerase. *Biotechniques* 22, 744-751.

Nilsson, J., Nilsson, P., Williams, Y., Pettersson, L., Uhlen, M. & Nygren, P.A. (1994) Competitive elution of protein A fusion proteins allows specific recovery under mild conditions. *Eur J Biochem* 224, 103-108.

Noren, K.A. & Noren, C.J. (2001) Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23, 169-178.

Nygren, P.A. & Skerra, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 290, 3-28.

Nygren, P.A. & Uhlen, M. (1997) Scaffolds for engineering novel binding sites in proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7, 463-469.

O'Connell, D., Becerril, B., Roy-Burman, A., Daws, M. & Marks, J.D. (2002) Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies. *J Mol Biol* 321, 49-56.

Oda, Y., Uesugi, S., Ikehara, M., Nishimura, S., Kawase, Y., Ishikawa, H., Inoue, H. & Ohtsuka, E. (1991) NMR studies of a DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res* 19, 1407-1412.

Oliver, D.B. & Beckwith, J. (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in escherichia coli. *Cell* 30, 311-319.

Olsen, M., Iverson, B. & Georgiou, G. (2000) High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr Opin Biotechnol* 11, 331-337.

Olsson, A., Eliasson, M., Guss, B., Nilsson, B., Hellman, U., Lindberg, M. & Uhlen, M. (1987) Structure and evolution of the repetitive gene encoding streptococcal protein G. *Eur J Biochem* 168, 319-324.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.

Parmley, S.F. & Smith, G.P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318.

Paschke, M. (2006) Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 2-11.

Pavlov, Y.I., Minnick, D.T., Izuta, S. & Kunkel, T.A. (1994) DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate. *Biochemistry* 33, 4695-4701.

Perelson, A.S. & Oster, G.F. (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J Theor Biol* 81, 645-670.

Persson, H., Lantto, J. & Ohlin, M. (2006) A Focused Antibody Library for Improved Hapten Recognition. *Journal of Molecular Biology* 357, 607-620.

Persson, H., Wallmark, H., Ljungars, A., Hallborn, J. & Ohlin, M. (2008) In vitro evolution of an antibody fragment population to find high-affinity hapten binders. *Protein Engineering, Design and Selection* 21, 485-493.

Peters, J.E., Thate, T.E. & Craig, N.L. (2003) Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol* 185, 2017-2021.

Petersen, H., Nielsen, J. & Heegaard, P. (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35, 163-187.

Pietrzak, M., Wieczorek, Z., Stachelska, A. & Darzynkiewicz, Z. (2003) Interactions of chlorophyllin with acridine orange, quinacrine mustard and doxorubicin analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy. *Biophys Chem* 104, 305-313.

Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 178, 497-515.

Pritchard, K.I., Shepherd, L.E., O'Malley, F.P., Andrulis, I.L., Tu, D., Bramwell, V.H. & Levine, M.N. (2006) HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 354, 2103-2111.

Purmal, A.A., Kow, Y.W. & Wallace, S.S. (1994) 5-Hydroxypyrimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res* 22, 3930-3935.

Putnam, F.W. (1975) *The plasma proteins : structure, function and genetic control*. Academic Press, New York; London.

Rakonjac, J., Jovanovic, G. & Model, P. (1997) Filamentous phage infection-mediated gene expression: construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3. *Gene* 198, 99-103.

Rapoport, N. & Pitina, L. (1998) Intracellular distribution and intracellular dynamics of a spin-labeled analogue of doxorubicin fluorescence and EPR spectroscopy. *J Pharm Sci* 87, 321-325.

Rayson, D., Richel, D., Chia, S., Jackisch, C., van der Vegt, S. & Suter, T. (2008) Anthracycline-trastuzumab regimens for HER2/neu-overexpressing breast cancer: current experience and future strategies. *Ann Oncol* 19, 1530-1539.

Reetz, M.T. & Carballeira, J.D. (2007) Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protocols* 2, 891-903.

Remeta, D.P., Mudd, C.P., Berger, R.L. & Breslauer, K.J. (1991) Thermodynamic characterization of daunomycin-DNA interactions: microcalorimetric measurements of daunomycin-DNA binding enthalpies. *Biochemistry* 30, 9799-9809.

Rether, C. (2010) Neue supramolekulare Bindungsmotive: Untersuchung nicht-kovalenter Wechselwirkungen in polarer Umgebung. Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Essen.

Righetti, P.G., Menozzi, M., Gianazza, E. & Valentini, L. (1979) Protolytic equilibria of doxorubicin as determined by isoelectric focusing and "electrophoretic titration curves". *FEBS Lett* 101, 51-55.

Ripley, L.S., Dubins, J.S., deBoer, J.G., DeMarini, D.M., Bogerd, A.M. & Kreuzer, K.N. (1988) Hotspot sites for acridine-induced frameshift mutations in bacteriophage T4 correspond to sites of action of the T4 type II topoisomerase. *J Mol Biol* 200, 665-680.

Rizzo, V., Battistini, C., Vigevani, A. & N., S. (1989) Association of anthracyclines and synthetic hexanucleotides. Structural factors influencing sequence specificity. *Journal of Molecular Recognition* 2, 132-141.

Roberts, R.J. & Murray, K. (1976) Restriction Endonucleases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 4, 123 - 164.

Rodriguez, F., Tocanne, J.F. & Lopez, A. (1995) Self-association processes involving anthracene labeled phosphatidylcholines in model membrane. *Biophysical Chemistry* 53, 169-180.

Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S. (2001) A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol* 19, 75-78.

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.

Rothe, C., Urlinger, S., Lohning, C., Prassler, J., Stark, Y., Jäger, U., Hubner, B., Bardroff, M., Pradel, I., Boss, M., Bittlingmaier, R., Bataa, T., Frisch, C., Brocks, B., Honegger, A. & Urban, M. (2008) The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel

display method for efficient selection of high-affinity antibodies. *J Mol Biol* 376, 1182-1200.

Salay, L.C. & Schreier, S. (2004) Effect of a kosmotropic ion on doxorubicin self-assembly and interaction with biomimetic systems. *Surface and Colloid Science - Progress in Colloid and Polymer Science* 128, 156-158.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2006) Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006, 4020-4023.

Samworth, C.M., Esposti, M.D. & Lenaz, G. (1988) Quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of mitochondrial ubiquinol-cytochrome-c reductase by the binding of ubiquinone. *European Journal of Biochemistry* 171, 81-86.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Sano, T. & Cantor, C.R. (1991) Expression vectors for streptavidin-containing chimeric proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176, 571-577.

Sardini, A., Villa, E., Morelli, D., Ghione, M., Menard, S., Colnaghi, M.I. & Balsari, A. (1992) An anti-doxorubicin monoclonal antibody modulates kinetic and dynamic characteristics of the drug. *Int J Cancer* 50, 617-620.

Saurin, A.T., Neubert, H., Brennan, J.P. & Eaton, P. (2004) Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17982-17987.

Scatchard, G. (1949a) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 51, 660-672.

Scatchard, G. (1949b) Equilibrium in Non-Electrolyte Mixtures. *Chem. Rev.* 44, 7-35.

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.

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. (2004) Konstruktion eines bispezifischen $F(ab)_2$-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Technische Universität, München.

Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Engineering Design and Selection* 26, 489-501.

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. (2001) Evolutives Protein-Design eines "Anticalins" mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Technische Universität München.

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

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

Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant - a so-called "anticalin" - using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.

Schlehuber, S. & Skerra, A. (2005) Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discov Today* 10, 23-33.

Schmidt & Skerra (1994a) The bilin-binding protein of *Pieris brassica*e. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur J Biochem* 219, 855-863.

Schmidt & Skerra (1994b) 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, A.M., Bloss, I. & Skerra, A. (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*: positive influences of dsbC coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng* 11, 601-607.

Schmidt, F.S. (1995) Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* – die ß-*Barrel* Proteinarchitektur als Grundlage für die evolutive Generierung von Rezeptormolekülen mit neuen Bindungseigenschaften. Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Schmidt, T.G., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255, 753-766.

Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528-1535.

Schönfeld, D.L. (2010) Strukturbiologische Untersuchungen an humanen Lipocalinen und deren Varianten mit neuartigen Bindespezifitäten. Technische Universität, München.

Schönfeld, D.L., Ravelli, R.B.G., Müller, U. & Skerra, A. (2008) The 1.8-Å Crystal Structure of [alpha]1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) Solved by UV RIP Reveals the Broad Drug-Binding Activity of This Human Plasma Lipocalin. *Journal of Molecular Biology* 384, 393-405.

Scopes, R.K. (1974) Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem* 59, 277-282.

Sharon, J. (1990) Structural correlates of high antibody affinity: three engineered amino acid substitutions can increase the affinity of an anti-*p*-azophenylarsonate antibody 200-fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4814-4817.

Sheedy, C., Roger MacKenzie, C. & Hall, J.C. (2007) Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnology Advances* 25, 333-352.

Sikora, K., Advani, S., Koroltchouk, V., Magrath, I., Levy, L., Pinedo, H., Schwartsmann, G., Tattersall, M. & Yan, S. (1999) Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Ann Oncol* 10, 385-390.

Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G., Rajagopalan, S. & Myers, C.E. (1989) Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance. *Cancer Res* 49, 3844-3848.

Siu, W.Y., Lau, A., Arooz, T., Chow, J.P., Ho, H.T. & Poon, R.Y. (2004) Topoisomerase poisons differentially activate DNA damage checkpoints through ataxia-telangiectasia mutated-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 3, 621-632.

Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Skerra, A. (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr Opin Immunol* 5, 256-262.

Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.

Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482, 337-350.

Skerra, A. (2001) "Anticalins": a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J Biotechnol* 74, 257-275.

Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7, 683-693.

Skerra, A. (2007) Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. *Curr Opin Biotechnol* 18, 295-304.

Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: Anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS Journal* 275, 2677-2683.

Skerra, A., Dreher, M.L. & Winter, G. (1991) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal Biochem* 196, 151-155.

Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.

Skerra, A. & Schmidt, T.G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol* 326, 271-304.

Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M.-C., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., Tabah-Fisch, I., Lindsay, M.-A., Riva, A. & Crown, J. (2011) Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 365, 1273-1283.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. & et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.

Smith, G.P. & Petrenko, V.A. (1997) Phage Display. *Chemical reviews* 97, 391-410.

Soares, C.R.J., Gomide, F.I.C., Ueda, E.K.M. & Bartolini, P. (2003) Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λPL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Engineering* 16, 1131-1138.

Soltes, G., Barker, H., Marmai, K., Pun, E., Yuen, A. & Wiersma, E.J. (2003) A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions. *J Immunol Methods* 274, 233-244.

Sorgi, K.L. (2001) Diisopropylethylamine. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.* John Wiley & Sons, Ltd.

Sparano, J.A. & Winer, E.P. (2001) Liposomal anthracyclines for breast cancer. *Semin Oncol* 28, 32-40.

Stewart, B.W., Kleihues, P., International Agency for Research on Cancer. & World Health Organization. (2003) *World cancer report*. IARC Press, Lyon.

Stoesser, P.R. & Gill, S.J. (1967) Calorimetric study of self-association of 6-methyl-purine in water. *J. Phys. Chem.* 71, 564-567.

Sturgeon, R.J. & Schulman, S.G. (1977) Electronic absorption spectra and protolytic equilibria of doxorubicin: direct spectrophotometric determination of microconstants. *J Pharm Sci* 66, 958-961.

Stutter, E., Gollmick, F.A. & Schuetz, H. (1982) Interaction of anthracycline antibiotics with biopolymers. VI. The binding of adriamycin to DNA under equilibrium conditions. *Stud Biophys* 88, 131-138.

Stuyver, L.J., Whitaker, T., McBrayer, T.R., Hernandez-Santiago, B.I., Lostia, S., Tharnish, P.M., Ramesh, M., Chu, C.K., Jordan, R., Shi, J., Rachakonda, S., Watanabe, K.A., Otto, M.J. & Schinazi, R.F. (2003) Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 244-254.

Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the Escherichia coli DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6339-6343.

Tarasov, E., Blaszak, M.M., LaMarre, J.M. & Olsen, K.W. (2007) Synthesis of a hemoglobin polymer containing antioxidant enzymes using complementary chemistry of maleimides and sulfhydryls. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 35, 31-43.

Tellgmann, G. (1998) Messung der Reaktionsenthalpie von Teilreaktionen der visuellen Kaskade. Humboldt-Universität, Berlin.

Thorburn, A. & Frankel, A.E. (2006) Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Mol Cancer Ther* 5, 197-199.

Tolan, D.R. & Traut, R.R. (1981) Protein topography of the 40 S ribosomal subunit from rabbit reticulocytes shown by cross-linking with 2-iminothiolane. *J Biol Chem* 256, 10129-10136.

Tomlinson, E. & Malspeis, L. (1982) Concomitant adsorption and stability of some anthracycline antibiotics. *J Pharm Sci* 71, 1121-1125.

Trigatti, B.L. & Gerber, G.E. (1995) A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. *Biochem J* 308 (Pt 1), 155-159.

Tuck Seng, W., Danilo, R. & Ulrich, S. (2007) Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environmental Microbiology* 9, 2645-2659.

Tung, W.L. & Chow, K.C. (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* 11, 128-129.

Turnbull, W.B. & Daranas, A.H. (2003) On the value of c: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc* 125, 14859-14866.

Verma, S., Dent, S., Chow, B.J., Rayson, D. & Safra, T. (2008) Metastatic breast cancer: the role of pegylated liposomal doxorubicin after conventional anthracyclines. *Cancer Treat Rev* 34, 391-406.

Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an Artificial Receptor Protein ("anticalin") Based on the Human Apolipoprotein D. *ChemBioChem* 5, 191-199.

Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10, 975-982.

Wang, Z.-X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Letters* 360, 111-114.

Ward, S.B., Sjostrom, L. & Ujhelyi, M.R. (2000) Comparison of the pharmacokinetics and *in vivo* bioaffinity of DigiTAb versus Digibind. *Ther Drug Monit* 22, 599-607.

Waterhouse, P., Griffiths, A.D., Johnson, K.S. & Winter, G. (1993) Combinatorial infection and *in vivo* recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res* 21, 2265-2266.

Weber, P.C., Wendoloski, J.J., Pantoliano, M.W. & Salemme, F.R. (1992) Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin. *Journal of the American Chemical Society* 114, 3197-3200.

Weiss, G.A. & Lowman, H.B. (2000) Anticalins versus antibodies: made-to-order binding proteins for small molecules. *Chem Biol* 7, 177-184.

Weiss, R.B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19, 670-686.

Wiederstein, M. & Sippl, M.J. (2005) Protein Sequence Randomization: Efficient Estimation of Protein Stability Using Knowledge-based Potentials. *Journal of Molecular Biology* 345, 1199-1212.

Wieslander, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Analytical Biochemistry* 98, 305-309.

Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D. & Hochstrasser, D.F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112, 531-552.

Willats, W.G. (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50, 837-854.

Willner, D., Trail, P.A., Hofstead, S.J., King, H.D., Lasch, S.J., Braslawsky, G.R., Greenfield, R.S., Kaneko, T. & Firestone, R.A. (1993) (6-Maleimidocaproyl)hydrazone of doxorubicin--a new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin. *Bioconjug Chem* 4, 521-527.

Yagodkin, A., Azhayev, A., Roivainen, J., Antopolsky, M., Kayushin, A., Korosteleva, M., Miroshnikov, A., Randolph, J. & Mackie, H. (2007) Improved synthesis of trinucleotide phosphoramidites and generation of randomized oligonucleotide libraries. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26, 473-497.

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.

You, L. & Arnold, F.H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng* 9, 77-83.

Zaccolo, M., Williams, D.M., Brown, D.M. & Gherardi, E. (1996) An approach to random mutagenesis of DNA using mixtures of triphosphate derivatives of nucleoside analogues. *J Mol Biol* 255, 589-603.

Zakharova, M.Y., Kozyr, A.V., Ignatova, A.N., Vinnikov, I.A., Shemyakin, I.G. & Kolesnikov, A.V. (2005) Purification of filamentous bacteriophage for phage display using size-exclusion chromatography. *Biotechniques* 38, 194-198.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die Ermöglichung der Promotion in diesem methodisch vielfältigen und wissenschaftlich sehr anspruchsvollen Thema. Die fachliche Unterstützung bei der experimentellen Umsetzung und der stete intensive Dialog während der Doktorarbeit haben mir entscheidend den Weg zum wissenschaftlichen Arbeiten gewiesen.

Für die Weitergabe dieses so wichtigen Rüstzeugs für mein späteres Berufsleben danke ich Herrn Prof Dr. Skerra deshalb ganz besonders.

No man is an island, entire of itself; every man is a piece of the continent, a part of the main...

Mein Dank gilt deshalb vor allem auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München für ihre große Unterstützung und wissenschaftliche Kollegialität während meiner persönlichen Zeit am Lehrstuhl.

Besonders hervorheben möchte ich dabei meine langjährigen Weggefährten Daniel Breustedt, Sabine Rauth, meine Labor-„Mitbewohnerin“ Andrea Holla, Zala Lazar, Hilke Zander, Gilbert Haug, Jan-Peter Mayer, Margrit Winkler, Marina Rubini und Michaela Gebauer. Ich danke Euch für die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Gesondert möchte ich in diesem Zusammenhang noch Sven Vopel erwähnen, mit dem ich im Labor eng zusammengearbeitet habe und für dessen experimentelle Unterstützung während meiner Doktorarbeit ich sehr dankbar bin.
Lieber Sven danke für die wertvolle Freundschaft, die daraus erwachsen ist.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dr. Zala Lazar, Dr. Andrea Holla, Dr. Martin Schlapschy, Dr. Gerald Beste, Dr. Steffen Schlehuber, Dr. Jan-Peter Mayer und nicht zuletzt Prof. Dr. Skerra für die Überlassung von Texten für den Material- und Methoden-Teil dieser Arbeit bedanken.

Liebe Eltern, liebe Familie, liebe Freunde und nicht zuletzt meine liebste Bettina:
Euch allen, die Ihr mich während dieser Zeit – mit all Ihren Höhen und den vorhandenen Tiefen – begleitet habt, mich jederzeit uneingeschränkt mit Worten und Taten unterstützt habt, möchte ich von ganzem Herzen dafür danken! Ihr habt mir das notwendige Ur-Vertrauen geschenkt, um diese Arbeit erfolgreich abschließen zu können...*das sind nur wenige Worte für Eure großen Taten; Ihr seid mein Rückhalt!*

... in Gedenken an einen ganz besonderen Menschen und in tiefer Verbundenheit

Für Dich Tina