

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Protein-Engineering eines Anticalins mit Bindungsspezifität für DC-SIGN

Andrea Dorothee Holla

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 04.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.07.2012 angenommen.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Antikörper als diagnostische und therapeutische Biomoleküle	1
1.2	Antigen-bindende Proteine mit alternativer Proteingerüststruktur	3
1.3	Anticaline als künstliche Antigen-bindende Proteine	4
1.3.1	Struktur und Funktion der Lipocaline	5
1.3.2	Vorteile der Lipocaline gegenüber Antikörpern.....	7
1.3.3	Das humane Tränenlipocalin als Gerüstprotein zur Herstellung von Anticalinen	8
1.4	Die <i>Phage Display</i> Technologie zur Selektion von Anticalinen.....	11
1.5	Hapten- und Protein-bindende Anticaline	13
1.6	DC-SIGN als Zielmolekül für die Anticalinentwicklung.....	14
1.7	Aufgabenstellung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Bakterienstämme	16
2.1.2	Bakteriophagen	16
2.1.3	Plasmide	16
2.1.4	Oligodesoxynukleotide.....	17
2.1.5	Enzyme und sonstige Proteine.....	18
2.1.6	Chemikalien.....	19
2.1.7	Standards und Kits.....	23
2.1.8	Geräte.....	24
2.1.9	Sonstiges Material	27
2.1.10	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	29
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	34
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	34
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	35
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	36
2.2.5	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	39
2.2.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	44
2.3	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	45
2.3.1	Periplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben und Zellernte	45

2.3.2	Cytoplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben, Zellernte und Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörpern.....	46
2.3.3	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter	46
2.4	Phagemidproduktion und Selektion bindungsaktiver Varianten	48
2.4.1	Propagation von Helferphagen.....	48
2.4.2	Präparation rekombinanter Phagemide	49
2.4.3	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	51
2.4.4	Titerbestimmung von Phagemidlösungen.....	52
2.4.5	Kolonie-Filterstapel-Test	52
2.5	Proteinchemische Methoden.....	55
2.5.1	Chromatographische Verfahren	55
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.5.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	58
2.5.4	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	59
2.6	Biophysikalische Methoden.....	61
2.6.1	CD-Spektroskopie.....	61
2.6.2	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie	64
2.6.3	Fluoreszenz-Anisotropiemessungen	65
2.7	Computerprogramme und Datenbanken.....	69
3	Ergebnisse	70
3.1	Produktion und Charakterisierung des Zielproteins DC-SIGN	70
3.1.1	DC-SIGN CRD (<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>).....	70
3.1.2	DC-SIGN ECD (<i>Extracellular Domain</i>).....	73
3.2	Selektion eines DC-SIGN-bindenden Anticalins mit Hilfe der <i>Phage Display</i> -Technologie	74
3.2.1	Selektionsversuch in Gegenwart von Calcium und durch kompetitive Elution der gebundenen Phagemide	75
3.2.2	Selektion durch saure Elution der gebundenen Phagemide	76
3.2.3	Selektion in Gegenwart von EDTA und durch saure Elution der gebundenen Phagemide.....	76
3.2.4	Analyse selektierter Varianten im Kolonie-Filterstapeltest.....	77
3.2.5	Funktionelle Untersuchungen der Varianten 3.92 und 3.149	82
3.3	Verbesserung der Bindungsaffinität des Anticalins 3.92A durch Affinitätsmaturierung.....	85
3.3.1	Selektion einer Variante von 3.92A mit erhöhter Bindungsaffinität zu DC-SIGN aus einer <i>Error Prone</i> PCR Bibliothek.....	85

3.3.2	Affinitätsmaturierung von 3.92A durch ortsgerichtete Zufallsmutagenese an ausgewählten Positionen und anschließende Selektion.....	90
3.4	Analyse des Dimerisierungsverhaltens der Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18.....	93
3.5	Funktionelle Charakterisierung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18.....	97
3.5.1	Untersuchung der Bindung der Anticaline an DC-SIGN durch ELISA.....	98
3.5.2	Untersuchung der Epitopspezifität der Anticaline mittels kompetitivem ELISA.....	99
3.5.3	Untersuchung der Assoziations- und Dissoziationsraten der Bindung der Anticaline an immobilisiertes DC-SIGN mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie.....	100
3.5.4	Analyse der Bindung zwischen den Anticalinen und DC-SIGN in Lösung mittels Fluoreszenz-Anisotropiespektroskopie.....	102
3.6	Physikochemische und strukturelle Untersuchungen der Anticaline.....	103
3.6.1	Untersuchung der Sekundärstruktur der Anticaline.....	103
3.6.2	Thermische Stabilität der Anticaline.....	103
3.6.3	Reinigung des Komplexes aus 3.92A2.18 und der DC-SIGN CRD.....	104
4	Diskussion.....	106
4.1	Periplasmatische Produktion der DC-SIGN CRD in <i>E. coli</i>	106
4.2	Vorteile des humanen Tränenlipocalins als Gerüstprotein für die Herstellung eines DC-SIGN-bindenden Anticalins.....	108
4.3	Selektion DC-SIGN-bindender Anticaline.....	109
4.3.1	<i>Phage Display</i> Selektion.....	109
4.3.2	Kolonie-Filterstapeltest.....	110
4.4	Verbesserung der DC-SIGN-Bindung durch <i>in vitro</i> Affinitätsmaturierung.....	112
4.5	Dimerisierungstendenz der isolierten Anticaline.....	113
4.6	Apparente Dissoziationskonstanten der DC-SIGN/Anticalin-Komplexe im Vergleich.....	117
4.7	Potential der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 als Mikrobizide.....	119
5	Zusammenfassung.....	121
6	Abkürzungen.....	123
7	Literaturverzeichnis.....	125
8	Anhang.....	142
8.1	Ausschnitt aus den Expressionsplasmiden zur Produktion von rekombinantem DC-SIGN.....	142
8.1.1	pDC1 zur Produktion der DC-SIGN CRD <i>strepII</i>	142

8.1.2	pDC9 zur Produktion der DC-SIGN-ECD <i>strepII</i>	143
8.2	Schematische Darstellung der Expressionsplasmide pTlc26 – 28.....	146

1 Einleitung

1.1 Antikörper als diagnostische und therapeutische Biomoleküle

Antikörper sind Proteine, die körperfremde Zielstrukturen, sogenannte Antigene, spezifisch erkennen und binden können. Aufgrund dieser Eigenschaft kommen Antikörper bei einer Vielzahl von biotechnologischen, diagnostischen und therapeutischen Anwendungen zum Einsatz. Wenigstens 10000 natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Antikörper sind derzeit bekannt (Michaud *et al.*, 2003).

Im Rahmen der humoralen Immunantwort werden Antikörper, die auch als Immunglobuline bezeichnet werden, von B Lymphozyten produziert, um in den Körper eingedrungene Fremdstoffe, wie zum Beispiel Krankheitserreger, zu erkennen und zu beseitigen. Dabei können sie verschiedenste Antigene wie Proteine, Peptide, Zucker, Lipide und auch kleine Moleküle spezifisch binden und dadurch Effektorfunktionen wie die Aktivierung des Komplementsystems oder cytotoxischer Zellen zur Eliminierung des Antigens auslösen (Janeway & Travers, 1995). Im Bereich der Biotechnologie und medizinischen Diagnostik spielen Antikörper vor allem beim Nachweis sowie bei der selektiven Abtrennung, Anreicherung oder Reinigung von Antigenen eine große Rolle. Für die medizinische Therapie sind mehr als 20 verschiedene Antikörper als Biopharmazeutika zum Beispiel zur Bekämpfung von Krebs oder Autoimmunkrankheiten zugelassen (Carter, 2006). Dabei erfüllen sie zumeist die Aufgabe, eine bestimmte Zielstruktur durch Bindung zu blockieren oder eine Effektorfunktion wie die Aktivierung der körpereigenen Abwehrreaktionen zu vermitteln.

Trotz ihres großen Erfolgs in der Biotechnologie, Diagnostik und Biomedizin bringen Antikörper vor allem wegen ihres komplizierten Aufbaus einige Nachteile mit sich (Abbildung 1). Antikörper bestehen aus vier Polypeptidketten – zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten – die sich zum funktionellen Immunglobulin zusammenlagern und falten. Die Ausbildung von mehr als 15 Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den einzelnen Ketten und die Glykosylierung in der Effektorregion sind in aller Regel für die korrekte Faltung und Funktionalität der Antikörper notwendig (Janeway & Travers, 1995).

Dieser komplizierte Aufbau kann zu Schwierigkeiten bei der gentechnischen Herstellung von Antikörpern führen. Bei der Klonierung und Expression von Antikörpern ist die Handhabung von zwei Genen erforderlich (Skerra, 2003). Die Produktion im reduzierenden bakteriellen Cytoplasma ist zumeist nicht möglich, da dort keine Disulfidbrücken ausgebildet werden und auch keine Glykosylierung stattfindet. Deshalb werden Antikörper häufig mit großem

technischem Aufwand durch Sekretion in eukaryontischen Zelllinien hergestellt (Werner, 2004).

Das Paratop, die Antigen-Bindungsstelle der Antikörper, wird im Bereich der variablen Regionen aus sechs verschiedenen CDRs (*Complementary Determining Regions*) gebildet, von denen jeweils drei auf der leichten Kette und drei auf der schweren Kette liegen. Soll die Antigen-Bindungsstelle manipuliert werden, um die künstliche Generierung eines Antikörpers zu ermöglichen, müssen also sechs verschiedene Segmente auf zwei verschiedenen Genen variiert werden (Skerra, 2003). Der konstante Fc-Teil eines Antikörpers dient zur Vermittlung der Effektorfunktionen (Abbildung 1). Dies kann vor allem beim Einsatz von künstlichen Antikörpern im medizinischen Bereich zu unerwünschten und unkontrollierbaren Nebeneffekten führen (Armour *et al.*, 1999).

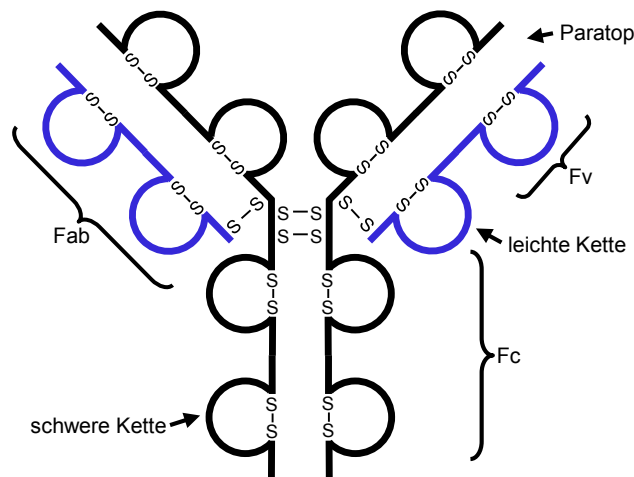


Abbildung 1: Aufbau eines typischen humanen Antikörpers der Klasse IgG1. Gezeigt ist der Aufbau eines Antikörpers aus zwei schweren Ketten (schwarz) und zwei leichten Ketten (blau). Insgesamt 16 Disulfidbrücken stabilisieren die Tertiär- und Quartärstruktur. Der konstante Fc-Teil dient der Vermittlung von Effektorfunktionen. Das Fv- und Fab-Fragment sind Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers, die sich gentechnisch in *E. coli* herstellen lassen. Die Antigenbindung erfolgt durch das Paratop, das aus sechs CDRs gebildet wird.

Des Weiteren sind Antikörper vergleichsweise große Biomoleküle. Die Größe der Antikörper kann bei bestimmten Anwendungen von Nachteil sein. Beispielsweise ist die Gewebepenetration von Antikörpern begrenzt (Christiansen & Rajasekaran, 2004). Kleinere, funktionelle Fragmente von Antikörpern, wie die Fv- oder Fab-Fragmente (Abbildung 1), lassen sich zwar gentechnisch in prokaryontischen Zellen wie *E. coli* produzieren (Skerra & Pluckthun, 1988; Skerra & Pluckthun, 1991), sie tragen aber dennoch weiterhin für die Faltung wichtige multiple Disulfidbrücken und neigen im Allgemeinen zur Aggregation (Worn & Pluckthun, 2001). Zudem hat der jahrzehntelange, kommerzielle Gebrauch von Antikörpern inzwischen zu einer komplizierten patentrechtlichen Situation geführt, so dass

die kommerzielle Einführung von neuen künstlich hergestellten Antikörpern mit Schwierigkeiten verbunden ist (Milstein, 2000).

1.2 Antigen-bindende Proteine mit alternativer Proteingerüststruktur

Wegen der vielfältigen Nachteile werden neben Antikörpern auch alternative Gerüststrukturen zur Generierung Antigen-bindender Proteine verwendet. Dieses recht junge Forschungsgebiet hat sich inzwischen zu einem weiten Feld entwickelt, wobei eine Vielzahl von Proteingerüsten zur Entwicklung von spezifisch und hoch-affin bindenden Proteinreagenzien untersucht wurden. Im Folgenden werden erfolgreiche Konzepte anhand von ausgewählten Beispielen vorgestellt (siehe Skerra, 2007):

Bei der Gruppe der Ig (Immunoglobulin)-ähnlichen Domänen handelt es sich um eine Klasse von Proteinen, deren Gerüststruktur auf der der Antikörper basiert. Beispielsweise produzieren Kamelide Antikörper-ähnliche Proteine, die nur aus zwei schweren Ketten – statt zwei leichten und zwei schweren Ketten – aufgebaut sind. Die sogenannte VHH-Domäne am N-Terminus jeder Kette dient der Antigenbindung. Das Paratop der VHH-Domäne wird aus nur drei CDRs, die auf einer Kette liegen, statt wie bei konventionellen Antikörpern aus sechs CDRs, die auf zwei Ketten liegen, gebildet (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Antigenbindung erfolgt auch durch isolierte VHH-Domänen, sogenannte *Nanobodies*, die leichter als konventionelle Antikörper gentechnisch manipuliert und produziert werden können. So wurden *Nanobodies* entwickelt, die bei der Affinitätsaufreinigung im Zusammenhang mit Biosensoren oder als Therapeutika Anwendung finden (Harmsen & De Haard, 2007).

Ein zweites Konzept zur Herstellung von künstlichen Antigen-bindenden Proteinen ist die Einführung einer variablen Peptidkette in ein stabiles Proteingerüst. Ein Beispiel hierfür sind die sogenannten Peptid-Aptamere. Ein Peptid mit variabler Aminosäuresequenz und Länge wird dabei in eine kurze Peptidschleife des stabilen, kompakten Proteins Thioredoxin aus *E. coli* integriert, so dass das Peptid durch Thioredoxin als Gerüstprotein präsentiert wird. Die Bindung des Antigens erfolgt durch dieses konformationell eingeschränkte Peptid. Peptid-Aptamere wurden bislang hauptsächlich als Inhibitoren von Cdk2 (*Cyclin-dependent kinase 2*), der E2F Transkriptionsfaktoren und anderer Signalmoleküle, die im Zusammenhang mit Krebs eine Rolle spielen, entwickelt (Borghouts *et al.*, 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung künstlicher, Antigen-bindender Proteine ist die Präsentation einer variablen Oberfläche auf einer stabilen Sekundärstruktur. Die sogenannten *DARPs* (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*) wurden nach Sequenzvergleich von natürlich vorkommenden *Ankyrin Repeat* Proteinen entworfen. Sie bestehen aus einer variierenden Anzahl (in der Regel drei) von Untereinheiten (*Repeats*) aus je 33 Aminosäuren, die aus einem β -turn, zwei antiparallelen α -Helices und einer Peptidschleife, an die sich die folgende Untereinheit anschließt, aufgebaut sind. Sechs ausgewählte Aminosäurereste pro Untereinheit

werden variiert, so dass nach erfolgreicher Herstellung eines *DARPin*s eine komplementäre Oberfläche zum Antigen ausgebildet wird (Binz *et al.*, 2004). *DARPin*s, die an Rezeptoren, Cytokine, Proteasen, Kinasen, Membranproteine und Viren binden, konnten selektiert werden (Stumpp & Amstutz, 2007).

Des Weiteren wurden künstliche, oligomere Proteine entwickelt, die bei der Antigenbindung eine hohe Affinität durch multiple Bindungsdomänen unter Ausnutzung des Aviditätseffektes erzielen. Ein Beispiel für solche oligomere Antigenbindungsproteine sind die sogenannten *Avimere*. Dabei handelt es sich um künstliche Proteine, die von der Struktur der sogenannten A-Domänen humaner Zelloberflächenrezeptoren abgeleitet sind. Nur zwölf der ungefähr 35 Aminosäuren sind für die Ausbildung des Proteingerüsts einer *Avimer*-Untereinheit notwendig, das unter anderem drei Disulfidbrücken und eine Calciumbindestelle umfasst. Die anderen Aminosäurepositionen können zwecks Generierung der gewünschten Antigenbindeaktivität im Prinzip variiert werden. Dabei erfolgt die Entwicklung eines *Avimers* schrittweise, indem nach der erfolgreichen Selektion einer Antigen-bindenden *Avimer*-Untereinheit durch erneute Selektion eine weitere *Avimer*-Untereinheit, die an ein zweites Epitop des Antigens bindet, kettenförmig angefügt wird. So konnten *Avimere* aus zwei bis drei Untereinheiten erzeugt werden, die zum Teil im pM-Bereich an die Proteine cMet, CD40L, IL-6, CD28 und BAFF binden (Silverman *et al.*, 2005).

Ein alternatives Konzept zur Entwicklung von Antigen-bindenden Proteinen ist die Modifikation von Proteinen mit stabiler Gerüststruktur, die benachbarte, hypervariable Schleifen fixiert. Eine der wenigen Proteinfamilien, die einen solchen Aufbau zeigt, sind die Lipocaline. Die Gerüststruktur der Lipocaline ist ein 8-strängiges antiparalleles β -Barrel, das an seiner offenen Seite vier strukturell flexible Peptidschleifen aufweist. Zur Herstellung eines Antigen-bindenden Proteins, das dann als *Anticalin* bezeichnet wird, werden die Aminosäurereste dieser Peptidschleifen variiert, um eine komplementäre Oberfläche zum Antigen zu schaffen (Beste *et al.*, 1999; Skerra, 2008).

1.3 Anticaline als künstliche Antigen-bindende Proteine

Anticaline weisen im Gegensatz zu Antikörpern hinsichtlich der Nutzung im Bereich der Biotechnologie, Diagnostik und Biomedizin wichtige Vorteile auf und sind ein exzellentes Beispiel für die erfolgreiche Herstellung von Antigen-bindenden Proteinen auf der Basis eines alternativen Proteingerüsts. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Struktur und Funktion der Lipocaline, das Konzept, das hinter der Entwicklung von Anticalinen steht, sowie der Prozess der Herstellung von Anticalinen und einige bereits erfolgreich entwickelte Anticaline und ihre Anwendung beschrieben.

1.3.1 Struktur und Funktion der Lipocaline

Die Lipocaline umfassen eine große Familie von Proteinen von 160 bis 180 Aminosäuren mit einer geringen Homologie auf der Ebene der Primärstruktur, aber einer ausgeprägten Tertiärstrukturhomologie (Flower *et al.*, 2000).

Lipocaline wurden in verschiedenen Spezies, von Bakterien (Bishop, 2000) über Pflanzen (Hieber *et al.*, 2000) bis hin zum Menschen (Breustedt *et al.*, 2006), gefunden. Folgende humane Proteine wurden der Lipocalin-Familie zugeordnet: das α_1 -Azides Glykoprotein (AGP; Fournier *et al.*, 2000), das Apolipoprotein D (ApoD; Dilley *et al.*, 1990), das Apolipoprotein M (ApoM; Xu & Dahlback, 1999), die Komplement Faktor 8 γ Kette (C8 γ ; Schreck *et al.*, 2000), das Glycodelin (GLY; Halttunen *et al.*, 2000), das α_1 -Microglobulin (α_{1m} ; Akerstrom *et al.*, 2000), das Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL; Kjeldsen *et al.*, 2000), das Odorant-bindungsprotein (OBP; Tegoni *et al.*, 2000), die Lipocalin Typ Prostaglandin D Synthase (PDGS; Urade & Hayaishi, 2000), das Retinol-bindungsprotein (RBP; Newcomer & Ong, 2000) und das Tränenlipocalin (Tlc; Redl, 2000).

Viele Lipocaline spielen eine Rolle beim Transport und der Speicherung von schlecht wasserlöslichen oder chemisch sensitiven Substanzen wie zum Beispiel Vitaminen, Steroiden und Metaboliten (Flower, 1995). Sie erfüllen hierbei diverse physiologische Funktionen, wie zum Beispiel die Vermittlung von Pheromon-Aktivität (Cavaggioni *et al.*, 1987), olfaktorische Reizleitung (Pevsner *et al.*, 1985), Speicherung von Pigmenten (Kayser, 1984) und enzymatische Katalyse (Urade *et al.*, 1989). Des Weiteren sind Lipocaline an Zellregulationsprozessen (Flower, 1994) und der Immunmodulation (Logdberg & Wester, 2000) beteiligt, und sie spielen eine Rolle als bakteriostatische Agenzien (Goetz *et al.*, 2002).

Die Struktur der Lipocaline wird durch ein β -Barrel aus acht antiparallelen β -Strängen (A bis H) mit (+1)₇ Topologie gebildet, wobei die β -Stränge konisch um eine zentrale Achse gewunden sind, so dass Strang A und H in Kontakt treten und so die kreisförmige Anordnung schließen (Abbildung 2). Die β -Stränge sind über Schleifenstrukturen miteinander verbunden. An einem Ende ist das β -Barrel verschlossen. Der N-Terminus bildet zusammen mit den Schleifen, die die Stränge B und C bzw. F und G miteinander verbinden, den Boden des β -Barrels. Auf der gegenüberliegenden Seite ist das β -Barrel zum Lösungsmittel hin geöffnet. Der Eingang zu dieser Bindungstasche wird durch die vier Schleifenelemente L1 bis L4 geformt, welche die Stränge A/B, C/D, E/F und G/H paarweise verbinden. Am äußersten N-Terminus der Lipocaline befindet sich eine kurze 3_{10} -Helix, am C-Terminus eine α -Helix, gefolgt von einem einzelnen mit I bezeichneten Strang (Flower *et al.*, 2000).

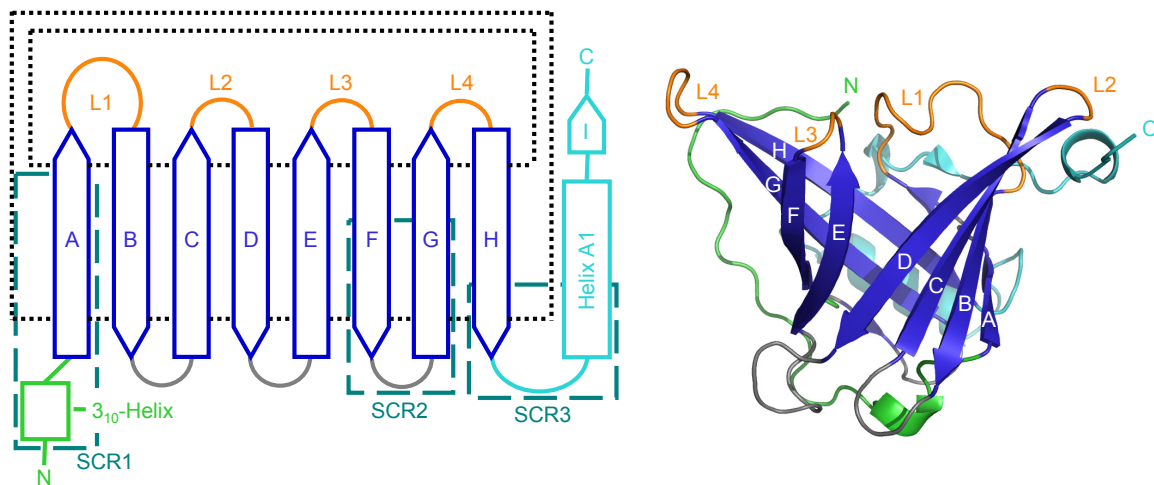


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus und Kristallstruktur eines typischen Lipocalins. Gezeigt ist die Lipocalinfaltung anhand einer senkrecht zur Achse des β -Barrels entwundenen Struktur angelehnt an Flower (1996). In blau dargestellt sind die acht antiparallelen Stränge A bis H des β -Barrels. Den Eingang zur Bindungstasche des β -Barrels bilden die vier mit L1 bis L4 bezeichneten Loops (orange). Am N-Terminus befindet sich eine 3_{10} -Helix (grün), am C-Terminus eine α -Helix, gefolgt von dem gestrecktem Strang I (türkis). Die Position der drei SCRs (*Structurally Conserved Regions*), anhand der auf Basis der Primärstruktur die Zuordnung zur Familie der Lipocaline vorgenommen werden kann, sind mit einem gestrichelten Kasten gekennzeichnet. Rechts neben diesem Schema ist die Kristallstruktur des BBP (Bilin-Bindungsprotein) aus *Pieris brassicae* nach Huber (1987b) dargestellt. Die Farbkodierung der einzelnen Strukturelemente ist entsprechend zu A gewählt.

Trotz der im Allgemeinen geringen Sequenzhomologie der Lipocaline untereinander weisen drei Bereiche eine Konservierung der Aminosäuresequenz auf. Dazu zählen die 3_{10} -Helix am N-Terminus mit dem Beginn von Strang A, die Stränge F und G mit dem verbindenden Loop und der Strang H mit dem Beginn der C-terminalen α -Helix (Flower, 1996; Flower *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu der strukturell stark konservierten β -Barrel-Struktur der Lipocaline weisen die Schleifenelemente eine ausgeprägte Variabilität der Aminosäurekomposition, Konformation und Länge auf (Skerra, 2000). Aufgrund dessen unterscheiden sich die Bindungstaschen der einzelnen Lipocaline in Bezug auf Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit, so dass die Bindung einer Vielzahl von verschiedenen Liganden möglich ist (Breustedt *et al.*, 2006).

Die Spezifität und Bindungsstärke zwischen Lipocalinen und niedermolekularen Liganden ist im Allgemeinen eher gering, was sich durch die Funktion vieler Lipocaline als physiologischer Puffer für ihren Liganden erklären lässt. Hohe Spezifität zeigen das RBP, das Retinol komplexiert (Kanai *et al.*, 1968), oder auch das ApoD, das Progesteron und Arachidonsäure bindet (Vogt & Skerra, 2001).

1.3.2 Vorteile der Lipocaline gegenüber Antikörpern

Lipocaline sind für die Herstellung von Antigen-bindenden Proteinen von Interesse, weil sie analog zu Antikörpern eine konservierte Gerüststruktur aufweisen, die eine flexible Bindungsregion stabilisiert (Skerra, 2000). Gegenüber Antikörpern weisen Lipocaline allerdings in Bezug auf die Anwendung in Biotechnologie, Diagnostik und Biomedizin zahlreiche vorteilhafte Eigenschaften auf:

Die Struktur der Lipocaline ist weniger kompliziert als die der Antikörper. So bestehen Lipocaline aus einer statt zwei verschiedenen Peptidketten, so dass bei ihrer gentechnischen Herstellung nur ein Gen manipuliert werden muss. Überdies sind Lipocaline im Gegensatz zu Antikörpern kleine, monomere Proteine (Schlehuber & Skerra, 2005).

Die Bindungstasche der Lipocaline wird durch nur vier variable Schleifenelemente am Eingang der Bindungstasche geformt, wohingegen die Paratope der Antikörper aus sechs hypervariablen Segmenten gebildet werden, die auf zwei verschiedenen Genen liegen. Somit ist die Bindungstasche der Lipocaline leichter genetisch zu modifizieren (Schlehuber & Skerra, 2005).

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung von Proteinen in der Biotechnologie, Diagnostik oder Biomedizin ist deren Stabilität (Binz *et al.*, 2005). Lipocaline sind im Vergleich zu anderen Proteinen verhältnismäßig stabil (Schlehuber & Skerra, 2002). Beispielsweise zeigt das humane Tränenlipocalin bei der Untersuchung der thermischen Stabilität mittels CD-Spektroskopie eine Schmelztemperatur von 91 °C (Sabine Rauth, unveröffentlicht).

Lipocaline besitzen als sekretorische Proteine zwar Disulfidbrücken und sind zum Teil glykosyliert, lassen sich aber im bakteriellen Periplasma von *E. coli* mit sehr guten Ausbeuten als funktionelle Proteine produzieren. Glykosylierung ist bei der Entwicklung und Produktion von Anticalinen ohne funktionelle Bedeutung (Hohlbaum & Skerra, 2007). Antikörper hingegen müssen mit großem technischem Aufwand mit Hilfe von humanen Zelllinien hergestellt werden. Eine korrekte Faltung und Glykosylierung und somit die Produktion von funktionellen Antikörpern ist in bakteriellen Organismen in der Regel nicht möglich (Werner, 2004).

Im Gegensatz zu Antikörpern, die über den konstanten Fc-Teil immunologische Effektorfunktionen vermitteln und so unerwünschte Reaktionen hervorrufen können, sind für Lipocaline keine entsprechenden Funktionen bekannt. Zudem findet auch keine Ligandenbindung im Organismus statt, da die Bindungstasche der natürlichen Lipocaline in ihrer Struktur modifiziert wird (Skerra, 2007).

1.3.3 Das humane Tränenlipocalin als Gerüstprotein zur Herstellung von Anticalinen

Für die Entwicklung von Anticalinen wurden bislang verschiedene Lipocaline als Gerüstproteine herangezogen. Dazu gehört das BBP (Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae*; Beste *et al.*, 1999), NGAL (Schlehuber & Skerra, 2005), ApoD (Vogt & Skerra, 2004) und Tlc (Skerra & Nasreen, 2007). Im Folgenden werden Vorkommen, Funktion sowie strukturelle und biophysikalische Besonderheiten des humanen Tlcs beschrieben. Diese Eigenschaften spielen für die Auswahl eines Lipocalins als Gerüstprotein eine große Rolle.

Das humane Tlc macht 15 bis 33 % der Proteine in der Tränenflüssigkeit aus. Es wird von verschiedenen sekretorischen Drüsen und Geweben wie der Tränendrüse, den Drüsen der Zunge und Nasenschleimhaut, den Drüsen des Tracheobronchialtraktes, den Schweißdrüsen, den Brustdrüsen, den Drüsen der Nebenniere, der Prostata, dem Thymus und der Hypophyse produziert (Fattori *et al.*, 1998; Lacazette *et al.*, 2000; Redl, 2000; Wojnar *et al.*, 2002). Wie andere Lipocaline bindet Tlc hydrophobe Moleküle wie Fettsäuren, Alkylalkohole, Alkylamine, Phospholipide, Glykolipide, Cholesterol, Retinol, Arachidonsäure und Isoprostane. Die Bandbreite an Liganden ist im Vergleich zu anderen Lipocalinen ungewöhnlich hoch (Glasgow *et al.*, 1995; Lechner *et al.*, 2001; Redl, 2000). Die Bindungsstärke korreliert mit der Länge der Alkylgruppe, so dass Tlc am stärksten die am wenigsten löslichen Lipide bindet. Diese Lipide werden von Tlc vermutlich zur Verbesserung der Löslichkeit, zum Schutz und für den Transport gebunden (Gasymov *et al.*, 1999), so dass Tlc so eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Oberflächenbeschaffenheit des Tränenfilms und beim Schutz der Oberflächen von Epithelien spielt (Nagyova & Tiffany, 1999; Redl, 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass Tlc neben Lipiden auch Eisensiderophore von Bakterien und Pilzen komplexieren kann und so möglicherweise antibakteriell und fungizid wirkt (Fluckinger *et al.*, 2004). Des Weiteren scheint Tlc Cysteinproteasen zu inhibieren und als unspezifische Endonuklease zu fungieren (van't Hof *et al.*, 1997; Yusifov *et al.*, 2000).

Tlc weist die typischen Merkmale der Lipocalinarchitektur auf (Abbildung 3). Die Gerüststruktur von Tlc besteht aus einem 8-strängigen, antiparallelen β -Barrel. Der N-Terminus verläuft zwischen den Peptidschleifen, die die Stränge B und C bzw. F und G miteinander verbinden. Der C-Terminus bildet eine α -Helix und einen gestreckten Strang I und ist von außen an eine Seite des β -Barrels angelagert. Am offenen Ende des β -Barrels befindet sich die Bindungstasche, deren Eingang von den vier Peptidschleifen 1 bis 4 gebildet wird. Drei der vier Peptidschleifen – vor allem *Loop 1*, aber auch *Loop 2* und *Loop 4* – sind ungewöhnlich lang und in der Kristallstruktur zum Teil ungeordnet. Am N-terminalen Ende von *Loop 1* befindet sich eine kurze α -Helix. Die *Loops 2* und *4* bilden β -Hairpins, wohingegen *Loop 3* an der Spitze der Peptidschleife eine kurze 3_{10} -Helix ausbildet. Im Vergleich mit anderen Lipocalinen ist die Bindungstasche von Tlc ungewöhnlich groß. Die Öffnung der Bindungstasche misst 10 Å im Durchmesser, die Tiefe der Bindungstasche

beträgt 15 Å. Am Eingang der Bindungstasche befinden sich negativ geladene (insbesondere Glu-34 und Asp-80) und hydrophobe Aminosäuren. Die Bindungstasche selbst ist leicht positiv geladen (His-86, Lys-114), allerdings hauptsächlich hydrophob (vor allem Met-39 und Phe-99). Am Boden der Bindungstasche befinden sich zwei Ausbuchtungen (Breustedt *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde kürzlich eine zweite Kristallstruktur von Tlc mit 1,4-Butandiol als Liganden gelöst. Der Vergleich mit der schon länger bekannten apo-Struktur zeigt eine hohe konformelle Flexibilität der Peptidschleifen am Eingang der Bindungstasche, einiger Stränge des β -Barrels und auch einzelner Aminosäuren in der Bindungstasche (Breustedt *et al.*, 2009).

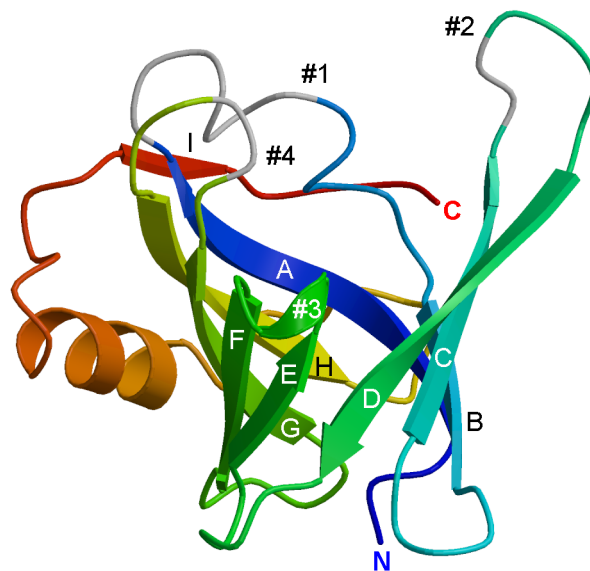


Abbildung 3: Kristallstruktur des humanen Tränenlipocalins (Tlc). Tlc weist eine typische Lipocalinstruktur mit einem β -Barrel aus acht antiparallelen Strängen (A bis H) auf. Auf der offenen Seite des β -Barrels liegt eine Bindungstasche, deren Eingang von vier Loops (#1 bis 4) geformt wird (oben). Am C-Terminus befindet sich eine α -Helix, gefolgt von einem gestreckten Strang (I). In grau dargestellt sind Aminosäuren in Loop 1 (Asp-25 bis Met-31), Loop 2 (Leu-56 und Ile-57), und Loop 4 (Leu-105 und His-106), die in der Kristallstruktur keine eindeutige Elektronendichte zeigten und aus diesem Grund gemodelt wurden (Abbildung aus Breustedt *et al.*, 2005, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Arne Skerra).

Tlc weist drei Cysteinreste auf (Cys-61, Cys-101 und Cys-153), wobei Cys-61 und Cys-153 eine Disulfidbrücke ausbilden, die den C-Terminus an Strang D fixiert (Glasgow *et al.*, 1998). Alle drei Cysteinreste können ohne signifikanten Effekt auf die Sekundärstruktur gegen Serinreste ausgetauscht werden. Die C61S/C101S/C153S-Variante von Tlc kann im bakteriellen Periplasma mit einer Ausbeute von 3 mg pro Liter Kultur rekombinant hergestellt werden (Cirl, 2004). Tlc zeichnet sich des weiteren durch eine hohe Thermostabilität aus. Die

Vorhandensein von Varianten mit der gewünschten Spezifität für ein Zielprotein durchmustert wird. Eine solche Bibliothek auf der Basis des Tlc wurde von Dr. Amber Nasreen und Prof. Arne Skerra zur Herstellung von Protein-bindenden Anticalinen konstruiert (Abbildung 4).

Als Gerüststruktur wurde eine Variante des Tlc verwendet, die die Aminosäuren 5 bis 157 des humanen Wildtyp Tlc umfasst. Neben den C61S/C101S/C153S-Mutationen zur Eliminierung des freien Cysteinrests und der Disulfidbrücke trägt die Variante die Mutationen R111P sowie K114W. Diese Mutationen wurden zur Einführung einer zusätzlichen *Bst*XI-Schnittstelle am C-terminalen Ende von *Loop* 4 eingeführt, die neben der *Bst*XI-Schnittstelle am N-terminalen Ende von *Loop* 1 zur Klonierung der Bibliothek verwendet wird. Darüber hinaus wurde dadurch eine sperrige Aminosäure am Eingang zur Bindungstasche eingeführt, die einen stabilisierenden Effekt hat und verhindern soll, dass kleine Moleküle in der Bindungstasche gebunden werden können. Auf der Basis der Kristallstruktur des Tlc wurden 18 Aminosäuren in den Peptidschleifen zur Randomisierung ausgewählt, neun in *Loop* 1, drei in *Loop* 2, zwei in *Loop* 3 und vier in *Loop* 4. Die Positionen wurden so gewählt, dass der Austausch der Aminosäureseitenketten die Gerüststruktur nicht nennenswert beeinflusst und dennoch die Entstehung einer neuen Oberflächenstruktur mit Komplementarität zum vorgegebenen Zielprotein ermöglicht.

1.4 Die *Phage Display* Technologie zur Selektion von Anticalinen

Zur Selektion von Varianten des Gerüstproteins aus einer Bibliothek, die ein vorgegebenes Zielmolekül binden, sind derzeit fünf Methoden bekannt: das *Phage Display* (Bratkovic, 2009; Smith, 1985), das *Bacterial Surface Display* (Chen *et al.*, 2001), das *Yeast Surface Display* (Boder & Wittrup, 1997), das *Mammalian Cell Surface Display* (Ho *et al.*, 2006) und das *Ribosome Display* (Hanes & Pluckthun, 1997). Genotyp und Phänotyp werden bei diesen Methoden physikalisch gekoppelt. Beim *Phage Display* gelingt dies durch die Präsentation einer Variante als Fusionsprotein auf der Oberfläche eines Phagenpartikels, während die genetische Information für diese Variante im demselben Phagen verpackt ist. Entsprechend wird beim *Bacterial Surface Display*, *Yeast Surface Display* und *Mammalian Cell Surface Display* eine Bakterienzelle bzw. eine Hefe- oder humane Zelle statt eines Phagen zur Präsentation des meist extrachromosomal kodierten Proteins eingesetzt. Beim *Ribosome Display* ist die genetische Information in Form von RNA nichtkovalent an das Ribosom und die zellfrei synthetisierte Variante gebunden. Der gesamte Komplex wird zur Selektion der gesuchten Varianten verwendet (Lipovsek & Pluckthun, 2004). Das *Phage Display* System hat aufgrund der gut etablierten Handhabung die weiteste Verbreitung gefunden (Bratkovic, 2009).

Phage Display wurde erstmals 1985 von Smith und Kollegen zur Präsentation von einem Peptidsegment der Restriktionsendonuklease *Eco*RI auf filamentösen Phagen beschrieben

(Smith, 1985). Beim *Phage Display* werden die Varianten als Fusionsproteine mit einem der Hüllproteine der filamentösen M13-Bakteriophagen präsentiert. Bei der Biosynthese der Phagenpartikel in infizierten *E. coli* Bakterien wird das Fusionsprotein zusammen mit der genomischen ssDNA, die unter anderem für das Fusionsprotein kodiert, zur inneren Membran bzw. in das bakterielle Periplasma transportiert und in das dort entstehende Phagemidpartikel integriert. Auf diese Weise wird die Variante auf der Oberfläche des Phagen, der zugleich die genetische Information für die Expression dieser Variante trägt, präsentiert. Bibliotheken von Peptid- oder Proteinvarianten können in dieser Form auf ausgewählte Eigenschaften der präsentierten Varianten wie zum Beispiel Antigenbindung untersucht werden. Dazu wird eine Bibliothek aus typischerweise $10^8 - 10^{10}$ unterschiedlichen Phagemidpartikeln, welche die Proteinvarianten als Fusionsproteine präsentieren, mit dem Zielmolekül, das an eine Festphase gekoppelt ist, inkubiert. Phagenpartikel, die nicht mittels der präsentierten Varianten an das Zielmolekül binden, werden durch Waschen entfernt und die selektierten Phagen anschließend durch Infektion von *E. coli* Bakterien vermehrt. Drei bis fünf *Phage Display* Zyklen sind üblicherweise nötig, um eine ausreichende Anreicherung bindender Phagemidpartikel zu erreichen. *Phage Display* ermöglicht die Selektion von Antigenbindenden Varianten aus Peptid- oder Proteinbibliotheken mit Dissoziationskonstanten im nano- bis mikromolaren Bereich (Barbas *et al.*, 2001).

Die gebräuchlichste Form des *Phage Displays* zur Präsentation von Proteinen ist die monovalente Präsentation als Fusionsprotein mit einer verkürzten Version des Hüllproteins pIII, das in fünf Kopien in die Phagenhülle integriert wird (Barbas *et al.*, 1991). pIII besteht aus drei durch Glycin-reiche tetra- und pentapeptide *Repeats* getrennte Domänen N1 (Aminosäuren 1-66), N2 (Aminosäuren 88-216) und C (Aminosäuren 257-406). Während die Domäne C unter anderem für die Verankerung von pIII in der Phagenhülle verantwortlich ist, spielen N1 und N2 vor allem bei den initialen Schritten der Infektion eine große Rolle (Holliger *et al.*, 1999; Stengele *et al.*, 1990). Die Fusion der präsentierten Proteine kann beispielsweise mit den Aminosäuren 217 bis 406 von pIII erfolgen. Im Gegensatz zur Fusion mit dem Volllänge pIII und anderen N-terminal verkürzten Varianten, wurde in diesem Fall eine verbesserte Phagemidproduktion beobachtet (Beste, 1998).

Sogenannte Phasmidvektoren tragen neben der kodierenden Sequenz für das Fusionsprotein unter anderem den Fd *origin of replication*, so dass die Produktion des entsprechenden einzelsträngigen Vektors und die anschließende Verpackung in die Phagenhülle erfolgen kann. Neben der Transformation der *E. coli* Zellen mit dem Phasmidvektor ist für die Produktion von Phagemiden die Superinfektion mit sogenannten Helferphagen notwendig. Alle Wildtyp-Phagenproteine, notwendig für Replikation des Phasmidvektors und die Assemblierung der Phagemide, werden in den infizierten *E. coli* Zellen vom Helferphagen-Genom kodiert. Helferphagen tragen eine Mutation im *origin of replication*, die zur einer

ineffizienten Verpackung des Genoms führt, so dass die entstehenden Phagemide fast ausschließlich den Phasmidvektor tragen. Durch Genregulation kann das Verhältnis von pIII-Fusionsprotein zu nativem pIII so eingestellt werden, dass etwa 10 % der Phagemide ein Fusionsprotein und bloß ca. 1 % der Phagemide zwei oder mehr Fusionsproteine präsentieren (Barbas *et al.*, 2001).

1.5 Hapten- und Protein-bindende Anticaline

Die Anticalintechnologie hat inzwischen mehrere Antigen-bindende Proteine auf der Basis der Lipocalinstruktur hervorgebracht, darunter DigA16, das Digoxigenin komplexiert (Schlehuber *et al.*, 2000; Schlehuber & Skerra, 2002) sowie ein den Rezeptor CTLA-4 bindendes Anticalin (Schonfeld *et al.*, 2009).

Digoxigenin ist ein cardioaktives Steroid, das in der glykosylierten Form Digoxin bei der Therapie von Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen eingesetzt wird. Allerdings kann eine Überdosierung zu Arrhythmien und Herzstillstand führen (Hauptman & Kelly, 1999). Schlehuber und Skerra gelang es, das Digoxigenin-bindende Anticalin DigA16, das mit einer Dissoziationskonstante von etwa 30 nM an Digoxigenin bindet, auf der Basis des BBP zu entwickeln (Schlehuber & Skerra, 2002). Die Weiterentwicklung von DigA16 brachte eine Variante hervor, die Digoxin mit einer besonders niedrigen Dissoziationskonstante von etwa 800 pM komplexiert (Peim und Skerra, unveröffentlicht). Im Meerschweinchen-Modell konnte gezeigt werden, dass der toxische Effekt einer Überdosis von Digoxin durch Injektion von DigA16 umkehrbar ist (Schlehuber & Skerra, 2005).

CTLA-4 ist ein T-Zell-Korezeptor, der zwei bis drei Tage nach der T-Zell Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Die Bindung von CTLA-4 an Antigen-präsentierende Zellen mittels CD80 oder CD86 führt zu einer Deaktivierung der T-Zellen (Davis *et al.*, 2003). In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Blockade von CTLA-4 mit einem entsprechenden Antikörper zur Stimulation der Immunantwort führt und von therapeutischem Nutzen in der Krebstherapie ist (Phan *et al.*, 2003). Ein CTLA-4-bindendes Anticalin wurde auf der Basis von NGAL mit einer Dissoziationskonstante von etwa 10 nM entwickelt. Mit CHO (*Chinese Hamster Ovarian*) Zellen, die mit humaner CTLA-4 cDNA transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass dieses Anticalin an das native CTLA-4 bindet (Schlehuber & Skerra, 2005).

In beiden Fällen wurde die Kristallstruktur des Anticalins sowohl in komplexierter als auch in der freien Form gelöst (Korndorfer *et al.*, 2003; Schonfeld *et al.*, 2009). Die großen Ähnlichkeiten im Bindungsmechanismus gegenüber natürlichen Lipocalinen einerseits und Antikörpern andererseits haben das Konzept der Anticalin-Technologie auch aus struktureller Sicht bestätigt. Dies zeigt, dass sich das Lipocalin-Proteingerüst für die Herstellung von

Antigen-bindenden Proteinen generell eignet. Dies gilt sowohl für Haptene wie Digoxigenin als auch für Proteine wie CTLA-4 als Zielstrukturen.

1.6 DC-SIGN als Zielmolekül für die Anticalinentwicklung

Die Infektion mit HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) hat sich in den letzten 25 Jahren zu einer Pandemie entwickelt. Nach Schätzungen der UNAIDS waren 2005 in etwa 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert und es kam zu etwa 4 Millionen Neuinfektionen. Aufgrund dieser erschreckenden Zahlen sind immer mehr Forschungsprojekte von Interesse, die nicht nur die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung der HIV-Infektion bzw. von AIDS zum Ziel haben sondern auch die Entwicklung von Wirkstoffen, die zur Prävention von HIV-Neuinfektionen beitragen können.

So war es das Ziel von EMPRO (*European Microbicide Project*) neuartige Wirkstoffe zu entwickeln, die die Fusion des HI-Virus mit Immunzellen in den genitalen Schleimhäuten verhindern. Diese Wirkstoffe sollen als Creme oder Gel appliziert werden können und in dieser Form vor allem Frauen, die aus kulturellen, sozialen oder wirtschaftlichen Gründen einem hohen HIV-Infektionsrisiko ausgesetzt sind, einen Schutz vor Infektion bieten.

In diesem Rahmen sollten Wirkstoffe entwickelt und getestet werden, die die initiale HIV-Infektion von Zellen durch Blockieren von Hüllproteinen des HI-Virus oder von entsprechenden zellulären Rezeptoren verhindern. In diesem Zusammenhang ist DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*), ein spezifischer Rezeptor dendritischer Zellen (DC), ein interessantes Zielprotein.

DC-SIGN ist ein Typ II Membranprotein, das zu der Familie der Calcium abhängigen C-typ Lektine zählt. Das Protein besteht aus einer cytoplasmatischen, einer transmembranen und einer extrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne des Proteins wird aus den sogenannten *Neck Repeats*, die für die Tetramerisierung von DC-SIGN verantwortlich sind sowie der C-terminalen *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) gebildet (Curtis *et al.*, 1992). Die CRD komplexiert Calcium-abhängig verschiedene Saccharidstrukturen, vor allem Glykoproteine, welche N-glykosidische Zuckerseitenketten des *High Mannose* Typs tragen (Mitchell *et al.*, 2001).

DC-SIGN vermittelt die Migration der DCs und deren Bindung an T-Zellen (Geijtenbeek *et al.*, 2000a; Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Außerdem wurde gezeigt, dass DC-SIGN an glykosylierte Hüllproteine von FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*; de Parseval *et al.*, 2004), HIV (Curtis *et al.*, 1992), SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*; Pohlmann *et al.*, 2001a), CMV (*Cytomegalo Virus*; Halary *et al.*, 2002), Hepatitis C (Lozach *et al.*, 2003), des Ebola (Alvarez *et al.*, 2002) und Dengue Virus (Tassaneetrithep *et al.*, 2003) sowie an Oberflächenstrukturen von nichtviralen Pathogenen wie *Leishmania amastigotes* (Colmenares

et al., 2002) *Schistosoma mansoni* (van Die *et al.*, 2003), *Helicobacter pylori* und *Mycobacterium tuberculosis* (Appelmelk *et al.*, 2003) bindet und bei der Infektion durch diese Organismen eine wichtige Rolle spielt.

Bei der sexuellen Übertragung von HIV muss das Virus zunächst die Epithelien der genitalen Mucosa, die eine physikalische Barriere darstellen, durchdringen. Im submucosalen Gewebe ist die Konzentration von Zellen, die den eigentlichen HIV-Rezeptor CD4 exprimieren, zu gering für eine effiziente Infektion. HIV bindet in der Submucosa über das glykosylierte Hüllprotein gp120 an DC-SIGN auf den DCs. Diese Bindung kann einerseits zur sogenannten *cis*-Infektion von immaturren DCs führen. Andererseits wird HIV durch die Bindung an DC-SIGN auf der Oberfläche der DCs konzentriert und gelangt so mit den migrierenden DCs in Gewebe, in denen die Konzentration von CD4-positiven T-Zellen höher ist. HIV wird dort den T-Zellen präsentiert, was zu einer raschen Infektion der T-Zellen über CD4 führt. Dieser Mechanismus wird als *trans*-Infektion bezeichnet (Figdor *et al.*, 2002).

Es wurde gezeigt, dass DC-SIGN-spezifische Antikörper, aber auch Calcium-Chelatoren oder Saccharide, die Bindung von HIV an DC-SIGN-exprimierende Zellen verhindern (Baribaud *et al.*, 2002; Pohlmann *et al.*, 2001a). Auch die *trans*-Infektion von T-Zellen durch DCs *in vitro* kann durch diese Reagenzien reduziert werden (Baribaud *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002). Somit ist DC-SIGN eine Zielstruktur für die Entwicklung von blockierenden Anticalinen, die eine HIV-Infektion einschränken und verhindern sollen. Vor allem in Kombination mit CD4-bindenden Anticalinen hat dieses Konzept ein großes Potential.

1.7 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein DC-SIGN-antagonistisches Anticalin entwickelt werden, das die Bindung zwischen dem HIV Hüllprotein gp120 und dem Rezeptorprotein DC-SIGN zu verhindern vermag. Dazu sollte zunächst rekombinantes DC-SIGN als Zielstruktur produziert werden. Dieses Protein sollte anschließend verwendet werden, um eine vorhandene Zufallsbibliothek des T1cs mit Hilfe von der *Phage Display* Methode auf bindungsaktive Anticaline zu durchmustern. Nach der Selektion entsprechender Anticaline sollten diese hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens, ihrer Faltung und Stabilität untersucht und ggf. weiterentwickelt werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden Materialien und Methoden aufgeführt, die im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet wurden.¹

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

JM83	ara, Δ (lac-proAB), rpsL (= strA), ϕ 80, lacZ Δ M15 (Yanisch-Perron et al., 1985), von Prof. A. Skerra, TU München
TG1-F ⁻	supE, hsd Δ 5, thi, Δ (lac-proAB), von Prof. A. Skerra, TU München
W3110	F ⁻ , λ^- (Bachmann, 1972), von Prof. A. Skerra, TU München
XL1-Blue	endA1, hsdR17(rk-mk+), supE44, thi-1, λ^- , recA1 gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF) U169 [F': proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10(Tet ^r)] (Bullock et al., 1987), von Prof. A. Skerra, TU München

2.1.2 Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg
---------	--

2.1.3 Plasmide

pApoDhis	Dr. Hyun Jin Kim aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München
pASK75strepII	Skerra, 1994b
pIBA5	IBA GmbH, Göttingen
pLA1	Benedikt Kaufer aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München
pDC4	Benedikt Kaufer aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München
pTlc26	Dr. Amber Nasreen aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München
pTlc27	Dr. Amber Nasreen aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München

¹ Bei den Texten aus dem Material und Methodenteil handelt es sich zum Teil um allgemeine Arbeitsvorschriften aus der Gruppe von Prof. Dr. Arne Skerra, die aus Schlaspschy (2004), Schlehuber (2001) und Cirl (2004) in angepasster Form übernommen wurden.

pTlc28	Dr. Amber Nasreen aus der Gruppe von Prof. A. Skerra, TU München
pTUM4	Schlapschy <i>et al.</i> , 2006
V147	von Dr. Tim Sparwasser, Klinikum Rechts der Isar, München
pDC1	wie pASK75 <i>strepII</i> mit ompA-dc-sign-crd- <i>strepII</i>
pDC2	wie pASK75 <i>strepII</i> mit ompA-dc-sign-crd-his-6
pDC9	wie pSA1 mit dc-sign-eed- <i>strepII</i>

2.1.4 Oligodesoxynukleotide

2.1.4.1 Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

Primer für die Sequenzierung standen im Labor von Prof. A. Skerra zur Verfügung:

D20	5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'
F83	5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
PR1	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'
TI50	5'-TAT CTG AAG GCC ATG ACG GTG GAC-3'
TL51	5'-TGC CCA CGA GCC ACA CCC CTG GGA-3'
SaM5	5'-ACC ACA ACG GTT TCC CTC-3'

2.1.4.2 Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

Das Oligodesoxynukleotid DC6 wurde inhaus synthetisiert. N58L, N58Lrev, R60K, R60Krev, S61R, S61Rrev, Q62Y, Q62Yrev, V64A und V64Arev wurden in HPLC-gereinigter Form von IBA GmbH, Göttingen bezogen, alle anderen Oligodesoxynukleotide von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm. AH_LW2 wurde zusätzlich mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.4) gereinigt.

DC-SIGN-for	5'-CCC AGC CCT GTC CCT GGG AAT GG-3'
DC-SIGN-rev	5'-GCT CTT TTT GCA GAT CCA GAA TTT GGC-3'
DC6	5'-CCC TCT CAT ATG GCT ATC TAC CAG AAC CTG ACC-3'
AH3.149.1	5'-CCG GGG GGT GAA CTC CTT CGT GTC GGT G-3'

AH3.149.2	5'-CAC CGA CAC GAA GGA GTT CAC CCC CCG G-3'
AH3.92.1	5'-CCT CAA CTC CCA GTC CTT GGC CCT CGC G-3'
AH3.92.2	5'-CGC GAG GGC CAA GGA CTG GGA GTT GAG G-3'
AH_LW1	5'-AAG GCC GTC CTG GAG AAG-3'
MSTlc1	5'-GGT GAA GGC CGT CCT GCA GAA AAC TGA CGA GCC-3'
MSTlc2	5'-GGC TCG TCA GTT TTC TGC AGG ACG GCC TTC ACC-3'
MSTlc3	5'-CGT GGC ATA CAT CAT CAG ATC TCA CGT GAA GGA CCA CTA C-3'
MSTlc4	5'-GTA GTG GTC CTT CAC GTG AGA TCT GAT GAT GTA TGC CAC G-3'
AH_LW2	5'-CTT CTC CAG GAC GGC CTT SNN CTC SNN SNN SNN GCC SNN SNN GAC CAT GGT GAC CTT GGC-3'
Q58L	5'-GTC ACC ATG GTC AGC TTG GGC CGG TCC CAG-3'
Q58Lrev	5'-CTG GGA CCG GCC CAA GCT GAC CAT GGT GAC-3'
R60K	5'-GGT CAG CCA GGG CAA GTC CCA GGA GGT GAA G-3'
R60Krev	5'-CTT CAC CTC CTG GGA CTT GCC CTG GCT GAC C-3'
S61R	5'-CAG CCA GGG CCG GCG CCA GGA GGT GAA GGC-3'
S61Rrev	5'-GCC TTC ACC TCC TGG CGC CGG CCC TGG CTG-3'
Q62Y	5'-GCC AGG GCC GGT CCT ACG AGG TGA AGG CCG-3'
Q62Yrev	5'-GGC CTT CAC CTC GTA GGA CCG GCC CTG GC-3'
V64A	5'-CGG TCC CAG GAG GCC AAG GCC GTC CTG GAG-3'
V64Arev	5'-CTC CAG GAC GGC CTT GGC CTC CTG GGA CCG-3'

2.1.5 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus Arctic Shrimp	USB, Cleveland, Ohio, USA
Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Aprotinin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Benzonase [®] , Reinheitsgrad I,	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH &Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	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
Pfu DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Stratagene, Amsterdam, Niederlande
PfuUltra DNA Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase- Konjugat	IBA GmbH, Göttingen
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase- Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Transferrin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.6 Chemikalien

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
--------	---------------------------------

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

Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Stratagene, Amsterdam, Niederlande
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
6-[Fluorescein-5(6)-carboxamido]hexanoic acid N-hydroxysuccinimidester (NHS)	Fluka-Chemie AG, Buchs
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt

N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan® für die Gewebebezug (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt;
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, USA
Phenol, ≥ 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.7 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

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

Protein-Größenstandards:

Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Page Ruler Prestained Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Kit for Molecular Weights 6,500-66,000	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Kits zur DNA-Isolierung:

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

Kits zur DNA-Sequenzierung:

DNA-Sequencing Kit, Big Dye™	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Terminator Cycle Sequencing	
T7-Sequencing™ Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

2.1.8 Geräte

ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Varioklav® Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Sanoclav Typ LaS-201	Wolf, Geislingen
Bio-Mag 10 Magnetrührer	BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:

B 5060 EK	Heraeus Christ GmbH, Osterode
BM800h	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Pelion	Bayer, Frankfurt/Main

Durchflussdetektoren:

UV/Vis Filter Photometer	Knauer, Berlin
Variable Wavelength Monitor	Knauer, Berlin
2138 Uvicord	SLKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV/Vis UV-1 Photometer	Rainin, Woburn, USA
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau
Elektrophoresekammern	Eigenbau; Biometra, Göttingen

Fraktionssammler:

Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111LKB	Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211LKB	Instrument GmbH, Gräfelfing
Ultrarac 7000LKB	Instrument GmbH, Gräfelfing
Glasspritze 500 µl, 1 ml	Hamilton Company, Reno, USA

Heizrührer:

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

Metallblockthermostate:

Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld

Netzgeräte:

TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197 Power supply	SLKB Instrument GmbH, Gräfelfing
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen

Peristaltische Pumpen:

Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

pH-Meter:

E512	Metrohm, Herisau, Schweiz
pH 526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin

Pipettierhilfen:

Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet®	Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Signalschreiber:

REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
SE 120ABB	Goerz AG, Wien, Österreich

Schüttelinkubatoren:

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

Spektrophotometer:

Ultraspec 2000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

Waagen:

Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000 CW	Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 AW	Wolfinger GmbH, Straubenhardt
R160P-*D1	Sartorius GmbH, Göttingen
U5000D	Sartorius GmbH, Göttingen

Wasserbäder:

Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo PC/8A	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Julabo UC/5B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Thermomix 1460	Braun Melsungen AG, Melsungen
Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen

Zentrifugen:

Biofuge A	Heraeus Christ GmbH, Osterode
J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman Instruments, München
Labofuge 6000	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus, mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RMC 14	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.9 Sonstiges Material

Diafilm	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
---------	---------------------------------------

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 GmbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 50 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen

Größenausschlusschromatographie:

Superdex 75 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Konzentratoren:

Amicon-Ultra 4, MWCO: 10 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Amicon-Ultra 15, MWCO: 10 kDa	

Kunststoffröhrchen:

Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

Membranfilter:

Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Immibilon P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
PVDF-Membran (Typ GVWP, 0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Pipettenspitzen:

blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Reaktionsgefäße:

0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Schwan-Stabilo®-Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main

Säulenmaterialien:

Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
-------------------------------	---

SDS-PAGE:

Apparaturen, Glasplatten, Spacer	Amersham Pharmacia Biotech Europe
Dichtungen, Kämme	GmbH, Freiburg Biometra, Göttingen

Sterilfilter:

Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Membransterilfilter (0,45 µm; 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München

Zentrifugenbecher:

JA-10 und JA-20 für Beckman-Rotoren, S- Nalgene Company, New York, USA
34, SLA-1500 und SLA-3000 für Sorvall-
Rotoren

2.1.10 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen für DNA-Arbeiten mit doppelt-destilliertem Wasser und alle Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen mit Millipore® Wasser hergestellt. Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen und DNA wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen wurden bei Bedarf filtriert und entgast.

Antibiotika- und Induktor-Stammlösungen:

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

Ampicillin (Amp):

100 mg/ml in H₂O (1:1000 zum Medium)

Chloramphenicol (Cam):

30 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000 zum Medium)

Kanamycin (Kan):

35 mg/ml in Wasser (1:500 zum Medium)

Tetracyclin (Tet):

10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol (1:1000 zum Medium)

Anhydrotetracyclin (aTc):

2 mg/ml oder 5 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium)

Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG):

1 M in H₂O (1:1000 zum Medium)

LB-Medium:

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

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

SOB-/SOC-Medium:

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

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

Jeweils 1 ml 1 M MgCl₂ und 1 MgSO₄, bzw. im Fall von auch SOC 2 ml sterile Glucose zu 98, bzw. 96 ml Medium gegeben

Lösungen für die Fermentation:

Mineralsalzlösung:

31 mM Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O	5,51 g/l
19 mM KH ₂ PO ₄	2,58 g/l
25 mM NH ₄ Cl	1,33 g/l
5 mM Na ₃ -Citrat•2 H ₂ O	0,47 g/l

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

Glucoselösungen:

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

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

MgSO₄-Stammlösung:

1 M MgSO₄ (separat autoklaviert)

Thiamin-Stammlösung:

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

FeCl₃-Stammlösung:

35,0 g/l FeCl₃•6 H₂O (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert und sterilfiltriert)

Zn-Acetat-Stammlösung:

8,0 g/l Zn-Acetat•2 H₂O (sterilfiltriert)

Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

MnCl ₂ •4 H ₂ O	3,0 g/l
CuCl ₂ •6 H ₂ O	0,3 g/l
H ₃ BO ₃	0,6 g/l
CoCl ₂ •6 H ₂ O	0,5 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ •4 H ₂ O	1,2 g/l
EDTA	4 mM

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

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

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

Puffer für die SDS-PAGE:

1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson:

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

4x Lower-Tris:

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

4x Upper-Tris:

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

5x Auftragspuffer:

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

Färbelösung:

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

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

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

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

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol:

Kristallines Phenol $\geq 99\%$ (unter Schutzgas destilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit $\frac{1}{2}$ 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 mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt

LMP-Puffer

Tris	100 mM
NaCl	500 mM
EDTA	5 mM

pH mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt

Sonstige Puffer:**AP-Puffer:**

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

pH 8,8 mit HCl eingestellt

Benzonase-Puffer:

Tris	100 mM
MgCl ₂	5 mM

10 x Formamid-Auftragspuffer:

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

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC-Puffer):

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	100 mM

pH 7,5 mit 5 M NaOH eingestellt

PBS:

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

pH 7,4 stellt sich ein

PBS/T:

PBS mit 0,1 % (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

TB-Puffer:

PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Auf pH 6,7 eingestellt

MnCl ₂	55 mM
-------------------	-------

Sterilfiltriert

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Verwendete Volumina waren 4 ml im 13 ml Kulturröhrchen sowie 50 ml und 2 l im 100 ml- bzw. 5 l-Erlenmeyerkolben mit Verschluss aus Aluminiumfolie. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:40 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 22 °C, 30 °C oder 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der OD₅₅₀ mit Hilfe eines Ultraspec 2000- oder Ultraspec 3000-Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

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

2.2.2.1 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen und anschließende Transformation

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli* Zellen zuvor in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die Transformationsmethode von Inoue eingesetzt (Inoue *et al.*, 1990), wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca. 10⁷ bis 10⁸ Transformanden pro µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

50 ml SOB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 22 °C im Fall von JM83 und TG1-F⁻ bzw. 30 °C im Fall von XL1-Blue inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Kultur 10 min auf Eis inkubiert, in ein 50 ml-Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 3000 rpm, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, wiederum 10 min inkubiert und die Suspension wie zuvor zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nun in 8 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 602 µl DMSO (wasserfrei) versetzt und vorsichtig gemischt (7% (v/v) DMSO Endkonzentration). Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl Zellsuspension mit Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligierungsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 1 min auf 42 °C erwärmt, daraufhin 2 min auf Eis inkubiert und anschließend in 2 ml LB-Medium überführt. Im Fall einer Selektion mit Chloramphenicol wurde diese Zellsuspension für 45 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert und anschließend auf LB/Cam-Agar ausplattiert. Im Fall einer Selektion mit Ampicillin wurden 100 µl dieser Zellsuspension sofort auf LB/Amp-Agar ausplattiert. Die Vermehrung der Plasmid-tragenden Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.2.2 Herstellung von elektrisch kompetenten Zellen und anschließende Elektroporation

Für die Herstellung von hochkomplexen Phagemid-Bibliotheken wurden elektrisch kompetente *E. coli* Zellen hergestellt, da mit diesen – im Gegensatz zu chemisch kompetenten Zellen (siehe Abschnitt 2.2.2.1) – 10^9 bis 10^{10} Transformanten pro µg Plasmid-DNA erhalten werden können.

Eine Kolonie, einer am Vortrag frisch auf einer LB-Agar Platte ausgestrichenen Kultur XL1-Blue *E. coli* Zellen wurde zum Animpfen von 50 ml LB-Medium verwendet. Die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C geschüttelt. 30 ml dieser Kultur wurden in 1,5 l LB-Medium überimpft und bei 26 °C geschüttelt bis nach ca. 6 bis 7 h eine OD_{550} von 0,6 erreicht wurde. Die Kultur wurde auf vier sterile Zentrifugenbecher verteilt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (SLA-3000, 15 min, 4000 rpm, 4 °C). Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit ca. 1 l 10 % Glycerin gewaschen. Dazu wurden die Zellpellets zunächst vorsichtig in ca. 40 ml 10 % Glycerin aufgenommen und anschließend die restliche Waschlösung zugegeben. Die Zellen wurden wiederum durch Zentrifugation sedimentiert (SLA-3000, 13 min, 4000 rpm, 4 °C) und der Waschschrift wurde wiederholt. Die gewaschenen Zellen wurden mit 10 % Glycerin auf ein Endvolumen von ca. 2 ml aufgefüllt.

Für die Elektroporation wurden 10 µl Ligierungsansatz (siehe Abschnitt 2.2.5.7) mit 100 µl elektrokompenten Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Biorad) pipettiert. In dieser wurden die Zellen im Elektroporator (Biorad) einem Puls von 12,5 kV/cm für 6 ms ausgesetzt. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml eiskaltem SOC-Medium aus der Küvette gespült und in einen sterilen Kulturkolben überführt. Für die Herstellung von einer hochkomplexen Phagemidbibliothek wurden 30 Elektroporationen durchgeführt. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim

& Doly, 1979), gefolgt von der selektiven Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA.

2.2.3.1 Plasmid-Präparation aus 4 ml-Kulturen (analytischer Maßstab)

Zur Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden oder der ortsgerichteten Mutagenese erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA aus stationären 4 ml-Übernachtskulturen unter Verwendung des Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Genomed (Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit) nach Herstellerangaben präpariert. Bei der Präparation wurden typischerweise 10 bis 20 µg DNA in 75 µl H₂O erhalten. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Plasmid-Präparation aus 50 ml-Kulturen (präparativer Maßstab)

Um größere DNA-Mengen für den präparativen Restriktionsverdau zu gewinnen, wurde die Plasmid-DNA im 50 ml-Maßstab isoliert. Ausgehend von einer stationären 50 ml-Kultur wurde dazu die DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits gemäß Herstellerangaben präpariert. Die DNA-Ausbeute betrug in der Regel 100 bis 200 µg in 100 µl H₂O. Bis zur Verwendung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Größe wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook & Russel, 2001) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Zur Auftrennung von Oligodesoxynukleotiden zum Zweck der Reinigung wurde dagegen die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 0,7 % bis 1,5 % (w/v) Suspension von Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit 1/10.000 Volumen einer 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Kamm gegossen. Das nach Erkalten der Lösung erhaltene Gel war typischerweise 10,5 cm lang und 7,5 cm breit, bei einer Dicke von ca. 0,5 cm. Anschließend wurde das Gel in eine mit TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Tasche mit 10 µl DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug bis zu 60 min bei einer Spannung von 100 V.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden 0,7 % bis 1,5 % (w/v) "Low Melting Point"-Agarosegele in TAE-Puffer verwendet. Nach dem Erhitzen der Suspension und der Zugabe von 1/10.000 Volumen 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Die Geltaschen, die mit der gesamten Reaktionsmischung aus DNA und Restriktionsenzym (siehe Abschnitt 2.2.5.3) bzw. dem gesamten PCR-Ansatz (siehe Abschnitt 2.2.5.1) nach Zugabe von 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer gefüllt wurden, hatten in diesem Fall eine Breite von ca. 0,5 bis 2 cm. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V durchgeführt. Das Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte zur Vermeidung von Strahlenschäden bei 312 nm mit verminderter Intensität. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und zur weiteren Behandlung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.2.4.3 Reinigung von linearer, doppelstängiger DNA

Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des JETsorb Gel Extraction Kits nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 bis 30 µl H₂O eluiert.

Als eine alternative Methode zur Abtrennung der Agarose wurde die Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Diese Methode wurde bei der Herstellung von Phagemid-Bibliotheken eingesetzt, da hier im Hinblick auf eine hohe Ligierungseffizienz hochreine DNA-Fragmente benötigt wurden. Dazu wurden ca. 200 mg ausgeschnittenes Gelstück mit 200 µl LMP-Puffer für 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung kurz abgekühlt und mit 400 µl Phenol ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation der Suspension (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit 400 µl Phenol/Chloroform und schließlich mit Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die erhaltene wässrige Phase wurde mit 1 ml Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min, 4 °C) und Entfernen des Überstandes wurde die präzipitierte DNA mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 20 µl 1/10 TE aufgenommen.

DNA-Konzentrationen wurden durch analytische Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.1) unter Verwendung eines geeigneten DNA-Größenstandards abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.4 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung einzelsträngiger DNA-Fragmente bei der Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Mit Hilfe von konzentrierten Fertiglösungen (8,3 M Harnstoff sowie 25 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 und 10x TBE) wurde die Gellösung aus 16 % (w/v) Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE hergestellt. Durch Zugabe von 40 µl TEMED und 1 ml 10 % (w/v) APS in Wasser zu 100 ml dieser Lösung unter schnellem Rühren wurde die Polymerisation gestartet.

Die Reinigung von Oligodesoxynukleotiden erfolgte durch vertikale Gelelektrophorese in 1,5 mm dicken Gelen. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit entsprechenden Abstandshaltern durch Klammern fixiert, die polymerisierende Gellösung in die entstandene Gelkammer gefüllt und ein Kamm eingebracht. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TBE verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 40 W für ca. 4 h durchgeführt.

2.2.4.5 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Wie in Abschnitt 2.1.4 angegeben, wurde ein Teil der verwendeten Oligodesoxynukleotide durch präparative Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt. Die Reinigung erfolgte dabei ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes.

Die Hälfte des lyophilisierten Rohproduktes wurde in 20 µl H₂O gelöst, mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf zwei Taschen eines 16 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgels (siehe Abschnitt 2.2.4.4) als möglichst schmale Zone aufgetragen und die Elektrophorese bei 40 W gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor dem fluoreszierendem Hintergrund sichtbar gemacht (*UV-Shadowing*). Die Hauptproduktbande wurde dann möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung des Gelstücks wurde dieses in eine 1 ml-Einwegspritze überführt, deren Spitze vorher über einer Flamme zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 ml TE-Puffer wurde das Gelstück durch die Bohrung gepresst und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die Gelmasse wurde mit Hilfe einer Spin-X-Filtereinheit abgetrennt (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 5 min) und das Filtrat dreimal mit je 1 ml 1-Butanol extrahiert, wobei die

wässrige Phase auf ca. 400 µl eingengt wurde. Nach Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8, 4 µl 1 M MgCl₂ und 1 ml Ethanol (p. a.) wurde die DNA bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min, 4 °C), das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, im Vakuum für 2 min getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

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

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung sowie zur Synthese von Genen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit zur selektiven Amplifizierung von Genen, zur Synthese von Genen (*Assembly PCR*) und zur Einführung von Zufallsmutationen (*Error Prone PCR*) verwendet. Die *Assembly PCR* und die *Error Prone PCR* kamen bei der Herstellung der Bibliotheken von 3.92A-Varianten zum Einsatz.

Amplifizierung eines Gens

Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (*Primer*) flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz.

Wurde für die PCR die *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzt, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten *Primer* vor der 3' zu 5' Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt, indem an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphorthioatbindung eingeführt wurde (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 0,01-1 µg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer (Fermentas, 750 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20 und 20 mM MgCl₂), bzw. 10x *Pfu*-Puffer (Fermentas, 200 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA und 20 mM MgSO₄) sowie 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit H₂O auf 50 µl wurde der Reaktionsansatz im Thermocycler für 1 min auf 94 °C erhitzt und 2,5 U der entsprechenden Polymerase zugegeben (*Hot Start*). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des zu gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1 bis 5 min (je nach Länge der zu amplifizierenden DNA und in Abhängigkeit der verwendeten Polymerase). Der Zyklus wurde 20 bis 30 mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

Error Prone PCR

Bei der *Error Prone* PCR werden in den amplifizierten Genabschnitt Punktmutationen eingeführt, die sich in den einzelnen Kopien des Genabschnitts auf verschiedenen und weitgehend zufälligen Positionen verteilen. In dieser Arbeit wurde die Mutagenese durch den Zusatz der Nukleotidanaloga dPTP und oxodGTP zur PCR-Reaktion hervorgerufen (Zaccolo *et al.*, 1996).

Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl und enthielt ca. 5 ng pTlc26.3.92A als Matrizen-DNA und je 50 pmol der beiden *Primer* TL50 und TL51. Weiterhin waren 10 µl 10x *Taq*-Puffer (Fermentas, 750 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20), 8 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTPs (je 10 mM), jeweils 2,4 µl dPTP und oxodGTP (je 1 mM) und 0,5 µl *Taq*-Polymerase (Fermentas, 5 U/µl) enthalten. Nach Auffüllen mit H₂O wurde das folgende Temperatur/Zeit-Programm gestartet: 1 min, 94 °C, dann 20 mal: 1 min, 94 °C; 1 min, 60 °C; 1,5 min 72 °C und schließlich 5 min, 60 °C.

Anschließend wurde das PCR-Produkt über die *Bst*XI-Schnittstellen in den Vektor pTlc26 kloniert (siehe Abschnitte 2.2.5.3, 2.2.4.3, 2.2.5.7, 2.2.2.1 und 2.2.3.1). Die Plasmid-DNA von acht der resultierenden Klone wurde mit dem *Primer* F83 sequenziert, um die Anzahl der Punktmutationen pro Genkassette festzustellen (siehe Abschnitt 2.2.6).

Um eine für die Herstellung einer Bibliothek von 3.92A-Varianten ausreichende Menge DNA zu produzieren, wurde das *Error Prone* PCR-Produkt durch eine weitere PCR-Reaktion amplifiziert. Das Reaktionsvolumen dieser PCR betrug 1,5 ml und enthielt ca. 150 ng *Error Prone* PCR-Produkt als Matrizen-DNA und je 50 pmol der beiden *Primer* TL50 und TL51. Weiterhin waren 150 µl 10x *Taq*-Puffer (Fermentas, 750 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 % (v/v) Tween 20), 120 µl MgCl₂ (25 mM), 30 µl dNTPs (je 10 mM), und 7,5 µl *Taq*-Polymerase (Fermentas, 5 U/µl) enthalten. Dieser Ansatz wurde zu je 100 µl auf 15 PCR-Reaktionsgefäße verteilt und das folgende Temperatur/Zeit-Programm gestartet: 1 min, 94 °C, dann 20 mal: 1 min, 94 °C; 1 min, 60 °C; 1,5 min 72 °C und schließlich 5 min, 60 °C. Die amplifizierte DNA wurde mit Hilfe des *Cycle Pure Kits* (PeqLab) nach Angaben des Herstellers gereinigt und konzentriert.

Assembly PCR

Mit Hilfe einer *Assembly* PCR können überlappende DNA-Abschnitte zu einem linearen Produkt verknüpft werden.

Zur Herstellung einer Bibliothek von 3.92A mit ortsspezifischen Mutationen wurden die gereinigten Produkte der PCR-Reaktionen mit dem Plasmid pTlc26.3.92A als Matrize und den Oligodesoxynukleotiden TL50 und LW2 bzw. LW1 und TL51 als *Primern* durch *Assembly* PCR zusammengesetzt. Dazu wurden je 4 pmol PCR-Produkt und je 50 pmol der beiden *Primer* TL50 und TL51 eingesetzt. Das Reaktionsvolumen der *Assembly* PCR, weitere Komponenten, die Konzentrationen dieser, das Temperatur/Zeit-Programm und das weitere Vorgehen sind den Angaben bei der *Error Prone* PCR zu entnehmen.

2.2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese mit Hilfe von *Quick Change*®

Durch die *Quick Change*® Mutagenese (Stratagene) können Mutationen an definierten Positionen in doppelsträngige Plasmid-DNA eingeführt werden. Dabei werden *Primer* verwendet, die die einzuführende Mutation enthalten, um mit Hilfe der *UltraPfu*-Polymerase (Stratagene) die Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Anschließend wird die methylierte Matrizen-DNA mit *DpnI* – einem Restriktionsenzym, das ausschließlich die methylierte Erkennungssequenz spaltet – verdaut (siehe Abschnitt 2.2.5.3). Die, die Mutation enthaltene Plasmid-DNA wird durch Transformation in einen geeigneten *E. coli* Stamm und darauffolgender Plasmidpräparation gewonnen (siehe Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.3.1).

Der Mutageneseansatz enthielt folgende Reagenzien: ca. 20 ng Plasmid-DNA, je 30 pmol *Primer*, 5 µl 10x *PfuUltra* Puffer (Stratagene, 200 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA und 20 mM MgSO₄) und 1 µl dNTPs-Mix (jeweils 50 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Der Ansatz wurde mit H₂O auf 49 µl aufgefüllt. Nach 2 min bei 95 °C wurde 1 µl *PfuUltra* Polymerase hinzugefügt und das folgende *Quick Change* Programm 12-16mal durchlaufen: 30 s, 95 °C; 1 min, 55 °C und 4 min, 68 °C. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 µl *DpnI* (New England Biolabs) 1 bis 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem *DpnI*-Verdau wurde die amplifizierte DNA mit Hilfe des *Cycle Pure* Kits (PeqLab) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit 30 µl H₂O. 10 µl der gereinigten DNA wurden in *E. coli* XL1-blue transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die aus einzelnen Klonen gewonnene Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.3.1) wurde im Bereich des Strukturgens mit einem geeigneten *Primer* sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.6).

2.2.5.3 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die

enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt.

Bei analytischen Verdauungen wurden typischerweise ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit 1 bis 5 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl für 1 h inkubiert.

Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 1 bis 2 h durchgeführt. Hierfür wurden 2 bis 10 µg Plasmid-DNA und 20 U eines jeden Restriktionsenzymen eingesetzt. Isolierte PCR-Fragmente wurden ebenso in einem 50 µl Ansatz mit 20 U des jeweiligen Restriktionsenzymen gespalten. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.2) isoliert.

2.2.5.4 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Durch 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden oder auch von ungeschnittenen PCR-Fragmenten wurde deren kovalente Verknüpfung durch T4 DNA-Ligase mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls ermöglicht. Die Phosphorylierung geschah mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK).

Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente (200 pmol) wurden hierzu mit 3 µl 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (Fermentas, 500 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin und 1 mM EDTA), 3 µl 10 mM ATP und 1 µl T4 Polynukleotidkinase (Fermentas, 10 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Produkt wurde anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert, um die Polynukleotidkinase zu inaktivieren. Phosphorylierte Oligonukleotide bzw. PCR-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.5.5 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*Blunt Ends*) wurde das Vektorfragment zur Erhöhung der Ausbeute an korrektem heterodimerem Ligierungsprodukt mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. Dabei wurde die Alkalische Phosphatase in den präparativen Reaktionsansätzen abschließend direkt – unter Verwendung des für die Nuklease empfohlenen Puffers – eingesetzt. 1 µl Alkalische Phosphatase (1 U) wurde 1 h nach Beginn der Restriktionsspaltung zugegeben und der Ansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Phosphatase durch die Reinigung der DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.2) abgetrennt.

2.2.5.6 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Um die DNA im Anschluss an eine der oben beschriebenen Reaktionen von den Enzymen oder nach der Präparation von Plasmid-DNA von restlichen Zellproteinen zu befreien, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen mit H₂O auf 400 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 4 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation wie zuvor abgetrennt.

Für die Ethanol-Fällung - zur Abtrennung vom restlichen Phenol - wurde die wässrige Phase mit 1 ml eiskaltem Ethanol gemischt und mindestens für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das nach Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min, 4 °C) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Abhängig von der weiteren Verwendung wurde das Präzipitat in 20-100 µl 1/10 TE-Puffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.5.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Standardansatz

Für einen Standardansatz wurden dazu in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µl 10x Puffer (Fermentas, 40 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP), 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas, 1 U/µl) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur oder für etwa 16 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Insert der Ligierungsreaktion unterworfen. Die T4 DNA-Ligase wurde anschließend durch zehnmünütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. 10 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation in *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2) verwendet.

DNA-Ligierung bei der Herstellung von Phagemid-Bibliotheken

Für die Herstellung von Phagemid-Bibliotheken wurde 12 pmol des geschnittenen Vektor-Fragments und 32 pmol des geschnittenen PCR-Fragments mit 482 µl 10x T4-DNA Ligase

Puffer (Promega, 300 mM Tris/HCl, pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) und 161 µl T4-DNA Ligase (Promega, 3 U/µl) in einem Volumen von 4,82 ml für 72 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf zwei sterile SS-34 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt mit je 2,41 ml 5 M NH₄OAc, 60,5 µl 10 mg/ml tRNA in TE und 9,65 ml Ethanol (p.a.) gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (SS-34, 20000 g, 30 min, 4 °C) sedimentiert und vorsichtig mit je 2,65 ml 70 % Ethanol (p.a.) gewaschen. Die DNA-Pellets wurden in insgesamt 300 µl H₂O gelöst.

2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Dabei fand der Institut-eigene ABI PRISM[®] 310-Sequenzierautomat in Kombination mit dem ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Verwendung. Dieser enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (AmpliTa[®]; Tabor & Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die naszierende DNA-Kette während der Polymerasereaktion abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente werden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6[™]) aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenzgruppen detektiert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM[®] DNA Sequencing Analysis 3.3) interpretiert.

Zu 4 µl BigDye[™] Ready Reaction Mix wurden je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 200 ng), 2 µl eines geeigneten *Primers* (1,6 µM) und 2 µl H₂O gegeben. Die Mischung wurde folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 1 mal 95 °C, 5 min, 25 mal 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 1 mal 60 °C, 4 min. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA pH 8 und 30 µl Ethanol (p. a.) für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 14.000 rpm, 20 min), mit 125 µl 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) gewaschen, unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und in 14 µl des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Anschließend wurde die Probe in ein dafür vorgesehenes Reaktionsgefäß überführt, im ABI PRISM[®] 310-Sequenziergerät platziert und die Sequenzanalyse schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM[®] 310 Data Collection) gestartet.

2.3 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

2.3.1 Periplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben und Zellernte

Durch die Verwendung von Expressionsvektoren, auf denen das Strukturgen des zu produzierenden Proteins als Fusion mit dem Gen für die bakterielle OmpA-Signalsequenz kodiert ist, erfolgte die Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli* (Schierle *et al.*, 2003; Skerra & Pluckthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

50 ml LB/Amp- bzw. LB/Amp,Cam-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 oder TG1-F⁻ angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 l LB/Amp- bzw. LB/Amp,Cam-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:40 mit der stationären Übernachtkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 1,5 wurde mit 200 µl Anhydrotetracyclinlösung in DMF (2 mg/ml) induziert. Die Induktionsdauer betrug in Abhängigkeit vom zu produzierenden Protein 2 h 45 min (alle Tlc'-Varianten), 3,5 h (DC-SIGN CRD) oder 12 h (Tlc').

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (SLA-3000, 5.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Medienüberstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen unter Kühlung in insgesamt 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und in einem 50 ml Kunststoffröhrchen für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5000 rpm, 15 min, 4 °C sowie SS-34, 15000 rpm, 15 min, 4 °C). Der periplasmatische Extrakt wurde anschließend zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert.

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurde auch eine Gesamtzellprobe der Kultur im kleinen Maßstab hergestellt: 1 ml der Kultur wurde durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 2 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonaselösung (12,5 U/ml in Benzonasepuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen unter vorsichtigem Mischen lysiert. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert. Danach wurde das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

2.3.2 Cytoplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben, Zellernte und Rückfaltung des Proteins aus Einschlusskörpern

Die Synthese der DC-SIGN ECD (*Extracellular Domain*) erfolgte durch cytoplasmatische Produktion in mit dem Expressionsplasmid pDC9 transformierten *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Dazu wurde 50 ml LB/Amp-Medium in einem Schüttelkolben angeimpft und 14 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l Erlenmeyerkolben angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 kultiviert.

Nach der Induktion der DC-SIGN ECD-Produktion mit 2 ml steriler IPTG-Lösung (0,5 M in H₂O) wurde die Kultur für weitere 150 min geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (SLA-3000, 5.000 rpm, 15 min, 4 °C) vom Kulturmedium abgetrennt und in 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,8 gelöst. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 80 µl EDTA-Lösung (0,5 M in H₂O) eingeleitet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte dann nach dem Einfrieren der Zellsuspension bei -20 °C und anschließendem Auftauen in der *French Press* durch drei Durchgänge bei 1000 bar.

Unlösliche Zellbestandteile der resultierenden Suspension inklusive der Einschlusskörper wurden durch Zentrifugation (SS-34, 47000 g, 20 min, 4 °C) präzipitiert. Das Präzipitat wurde zur Abtrennung löslicher Bestandteile mit einem Spatel mechanisch zerkleinert, in 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,8 resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation (SS-34, 47000 g, 20 min, 4 °C) in 10 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 6 M Guanidin/HCl, 2 mM EDTA und 0,02 % β-Mercaptoethanol durch Rollen bei Raumtemperatur gelöst. In diesem Puffer unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (SS-34, 47000 g, 20 min, 4 °C). Die Rückfaltung der DC-SIGN ECD erfolgte durch langsames Zutropfen von 40 ml 25 mM Tris pH 7,8, 1,25 M NaCl und 2 mM CaCl₂ unter Rühren bei 4 °C und anschließender Dialyse gegen 5 l dieses Puffers über Nacht bei 4 °C. Für die auf die Rückfaltung der DC-SIGN ECD folgende Streptavidin-Affinitätschromatographie war eine erneute Dialyse des Rückfaltungsansatzes gegen 5 l SA-Puffer über Nacht bei 4 °C notwendig. Unlösliche Bestandteile im Dialysat wurden abschließend durch Zentrifugation (SS-34, 47000 g, 20 min, 4 °C) abgetrennt.

2.3.3 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Für die Herstellung größerer Mengen eines rekombinanten Proteins wurde eine Fermentation einer der das Protein produzierenden *E. coli* Kultur durchgeführt. Als Expressionsstamm wurde dabei neben dem *E. coli* K12 Wildtyp W3110 der Stamm KS272 verwendet.

Als Vorvorkultur wurden 2 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6 bis 8 h bei 37 °C und 220 rpm

inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 360 ml Mineralsalzlösung, der 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO_4 , 400 μl Antibiotika-Stammlösung und 400 μl Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden war. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise $\text{OD}_{550} = 1,5$ bis 2,0.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 l Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 30 °C temperiert und über einen Trichter 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO_4 , je 8 ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl_3 - und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung sowie 200 μl 30 %ige Antifoam A-Lösung hinzugegeben. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, worauf dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert ≥ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (400 ml) angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und nochmals 600 μl Antifoam A zugegeben.

Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose ab $\text{OD}_{550} = 7,5$ mit 28 ml/h, ab $\text{OD}_{550} = 12,5$ mit 40 ml/h, ab $\text{OD}_{550} = 18,5$ mit 60 ml/h sowie ab $\text{OD}_{550} = 22,5$ mit 80 ml/h zudosiert.

Weiterhin wurden der Kultur bei $\text{OD}_{550} = 13$ nochmals je 4 ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{550} = 20$ bis 25 durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg Anhydrotetracyclin je Liter Kultur induziert, die Kultivierung wurde für weitere 2 bis 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A- Rotor, 5000 rpm, 30 min, 4 °C) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 1 l-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer für 10 min durch Rühren resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2 ml $\text{l}^{-1} \text{OD}^{-1}$. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 μg Lysozym / ml (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml in Aufschlusspuffer) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt

wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (SLA-1500, 20 min, 11500 rpm, 4 °C) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt.

Der periplasmatische Proteinextrakt wurde gegen 10 l SA-Puffer dialysiert. Ausgefallenes Protein und Partikel wurden durch Sterilfiltrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

2.4 Phagemidproduktion und Selektion bindungsaktiver Varianten

2.4.1 Propagation von Helferphagen

50 ml 2xYT/Tc-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtkultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue in 2xYT/Tc angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,3$ wurden 10 ml der Kultur abgenommen und in einen auf 37 °C vorgewärmten, zuvor sterilisierten 50 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Zellen wurden mit $2 \cdot 10^{10}$ pfu VCS-M13 Helferphagen (Stratagene) entsprechend einer moi von 10 infiziert und für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Endkonzentration von 25 µg/ml eingestellt und zur Produktion der Helferphagen für 8 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Um die Bakterien abzutöten, wurde die Kultur anschließend im Wasserbad für 10 min auf 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt, in einen hitzesterilisierten Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SS-34, 12000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand mit den Helferphagen wurde sterilfiltriert (Porendurchmesser = 0,45 µm), in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen überführt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Zur Titerbestimmung der produzierten Helferphagen wurden 50 ml 2xYT/Tc-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären *E. coli* XL1-Blue-Kultur in 2xYT/Tc angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{550} von 0,5 inkubiert. Mit der Helferphagenlösung wurden zwei Verdünnungsreihen in 2xYT-Medium bis zu einer maximalen Verdünnung von 10^{-9} angelegt. Für jede auszuplattierende Verdünnungsstufe wurden 3 ml verflüssigter 2xYT-Weichagar in ein 13 ml-Kunststoff-Kulturröhrchen überführt und im Wasserbad auf 48 °C temperiert. 100 µl der exponentiell wachsenden Kultur sowie 100 µl der Helferphagenlösung in den Verdünnungsstufen 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} wurden zu dem Weichagar gegeben, vorsichtig vermischt und zügig auf bei 37 °C vortemperierte 2xYT/Tc-Agarplatten gegossen. Um einen einheitlichen Zellrasen zu erhalten, wurde die Zellsuspension jeweils durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Nach Erstarren des Weichagars wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lag typischerweise zwischen 10^{11} und 10^{12} pfu/ml.

2.4.2 Präparation rekombinanter Phagemide

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von den Phasmidvektoren pTlc27 produziert. Der Vektor besitzt die für die Replikation und Verpackung als einzelsträngige Phasmid-DNA erforderliche intergenische Region des filamentösen Phagen f1 und kodiert unter Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein aus einer Tlc'-Variante und einer verkürzten Form des Phagenhüllproteins pIII.

2.4.2.1 Produktion von Phagemid-Bibliotheken

Zwei verschiedene Bibliotheken aus Varianten des 3.92A-Fusionsproteins in Form von Phasmidvektoren wurden durch Elektroporation in Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue transformiert. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen wurden Phagemide generiert, welche die Varianten des 3.92A-Fusionsproteins auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die Phagemide wurden in mehreren Schritten gereinigt.

Nach der Elektroporation der Phasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.2.2) wurde die Zellsuspension für 45 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Ermittlung der Diversität der Bibliothek wurde ein Aliquot dieser Zellsuspension abgenommen, Verdünnungen in LB-Medium hergestellt und auf LB/Cam-Agarplatten plattiert. Die restliche Zellsuspension wurde in 2xYT/Cam zu einer OD₅₅₀ von 0,3 verdünnt und anschließend bis zu einer OD₅₅₀ von 0,8 bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Daraufhin wurden 400 ml der Kultur abgenommen, in einen sterilen Schüttelkolben überführt und mit VCS-M13 Helferphagen zu einer moi von etwa 10 infiziert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt, für weitere 10 min bei 26 °C und 160 rpm inkubiert und schließlich die Synthese des 3.92A-Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin zu einer Endkonzentration von 25 µg/l für 7 h bei 26 °C und 160 rpm induziert.

Der Rest der Kultur wurde für die Dauer der Produktion der Phagemide weiterhin bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt, um anschließend ausgehend von dieser Kultur die Plasmid-DNA reinigen zu können (siehe Abschnitt 2.2.3.2).

Im Anschluss an die Produktion der Phagemide wurde die Kultur in sterilen SLA-3000 Zentrifugenbechern abzentrifugiert (SLA-3000, 18000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit einem 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl 2 h auf Eis gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation präzipitiert (SLA-3000, 18000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand wurde abgezogen, und das Präzipitat in 4 ml sterilem, vorgekühltem BBS, 2 mM EDTA, 50 mM Benzamidin pro 100 ml Kultur gelöst und in sterile SS-34 Röhrchen überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile abzentrifugiert (SS-34, 40000 g, 10 min, 4 °C). 1,5 ml des Überstandes wurde

jeweils in ein steriles 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für mindestens 30 min auf Eis gefällt. In dieser Form wurden die Phagemide gegebenenfalls bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurden sie abzentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min, 4 °C) und nach vollständiger Entfernung des Überstandes in je 330 µl sterilfiltriertem, vorgekühltem PBS, 1 mM EDTA gelöst. Die Lösungen wurden nochmals für 30 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 5 min, 4 °C). Der, die Phagemide enthaltene Überstand wurde für die Affinitätsanreicherung verwendet (siehe Abschnitt 2.4.3).

2.4.2.2 Amplifizierung selektierter Phagemide

Die Fraktion von Phagemiden, die im Elutionsschritt der Selektionszyklen erhalten wurde (siehe Abschnitt 2.4.3), wurde vor der darauffolgenden Affinitätsanreicherung amplifiziert.

Hierzu wurde mit 50 bis 500 µl einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue 50 ml 2xYT-Medium angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,6 geschüttelt. Zu den Phagemiden der Elutionsfraktion, die kurz vor der Infektion im Metallblockthermostat auf 37 °C temperiert worden waren, wurden 4 ml der exponentiell wachsenden Kultur gegeben. Die Mischung wurde für 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sedimentiert (Sigma 4K10, 5000 rpm, 3 min, 4 °C), in LB-Medium resuspendiert und auf vier Agarplatten mit LB/Cam-Medium (Durchmesser: 14 cm) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C für 14 h. Der erhaltene Zellrasen wurde vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers unter Zugabe von 10 ml 2xYT/Amp-Medium pro Platte abgeschabt. Die Zellsuspensionen von den vier Platten wurden vereinigt.

Nach Bestimmung der Zelldichte wurden 50 ml 2xYT/Cam Medium mit der Zellsuspension zu einer OD₅₅₀ von 0,1 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur mit VCS-M13 Helferphagen zu einer moi von etwa 10 infiziert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C und 200 rpm wurde eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt, für weitere 10 min bei 26 °C und 160 rpm inkubiert und schließlich die Synthese des Tlc'-Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin zu einer Endkonzentration von 25 µg/l für 7 h bei 26 °C und 160 rpm induziert.

Die Kultur wurde in sterile SS-34 Röhrchen überführt und anschließend abzentrifugiert (SS-34, 10000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit einem 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl über Nacht auf Eis gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation präzipitiert (SS-34, 12200 rpm, 20 min, 4 °C), der Überstand wurde abgezogen, und das Präzipitat in 2 ml sterilem, vorgekühltem PBS, 1 mM EDTA gelöst und in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach 30minütiger Inkubation

auf Eis wurden ungelöste Bestandteile abzentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde jeweils in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühltem und sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für mindestens 30 min auf Eis gefällt. Anschließend wurden die gefällten Phagemide sedimentiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min, 4 °C). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurden die Phagemidpellets in je 330 µl sterilfiltriertem, vorgekühltem PBS, 1 mM EDTA gelöst. Die Lösungen wurden nochmals für 30 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 5 min, 4 °C). Der, die Phagemide enthaltene Überstand wurde für einen weiteren Affinitätsanreicherungszyklus verwendet (siehe Abschnitt 2.4.3).

2.4.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

Zur Anreicherung rekombinanter Phagemide aus den Tlc'-Zufallsbibliotheken wurde biotinyliertes DC-SIGN CRD*strepII* in Kombination mit Streptavidin-paramagnetischen Partikeln verwendet.

Zur Herstellung von biotinyliertem DC-SIGN CRD*strepII* wurde D-Biotinoyl-ε-Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccimidester in DMSO in einem molarem Verhältnis von 2:1 zu DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges Reagenz durch Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 2.5.1.3) von biotinyliertem DC-SIGN CRD*strepII* abgetrennt.

200 µg (*Phage Display* zur Affinitätsmaturierung) oder 1 mg (*Phage Display* zur Affinitätsanreicherung) Streptavidin-paramagnetische Partikel wurden zunächst dreimal mit jeweils 100 µl PBS, 1 mM EDTA gewaschen. Hierbei wurden die Partikel durch Rotation des 1,5 ml-Reaktionsgefäßes um eine um 50 ° vertikal geneigte Achse für 1 min in Suspension gehalten, anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes gesammelt, so dass der Überstand abgezogen werden konnte. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die paramagnetischen Partikel mit 100 µl 2 % (w/v) BSA in PBS/T, 1 mM EDTA für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

290 µl Phagemid-Lösung (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.2) wurde zum Blocken der Phagemide mit 100 µl 8 % (w/v) BSA in PBS, 0,4 % Tween, 1 mM EDTA versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Anreicherung von DC-SIGN-bindenden Phagemiden wurde 10 µl biotinyliertes DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA zu den geblockten Phagemiden gemischt (Endkonzentration: 10 nM (*Phage Display* zur Affinitätsmaturierung) oder 100 nM (*Phage Display* zur Affinitätsanreicherung), Endvolumen: 400 µl) und für 1 h bei Raumtemperatur

inkubiert, so dass sich Komplexe zwischen DC-SIGN und den von den Phagemiden präsentierten Tlc'-Varianten ausbilden konnten.

Die blockierten Streptavidin-paramagnetischen Partikel wurden nach Entfernen des Überstandes in dem Gemisch aus DC-SIGN und Phagemiden gelöst und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt bindet das biotinylierte DC-SIGN CRD_{strepII} an die Streptavidin-paramagnetischen Partikel. Schließlich wurden 10 µl einer Lösung von 4 mM D-Desthiobiotin in PBS, 1 mM EDTA zugegeben, die Suspension wurde für weitere 5 min inkubiert. Auf diese Weise wurde verhindert, dass das *Strep*-tag II als Teil des Fusionsproteins aus den Tlc'-Varianten und dem Fragment des Phagenhüllproteins pIII mit Streptavidin einen Komplex ausbilden kann.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel zehnmal mit jeweils 500 µl PBS/T, 1 mM EDTA gewaschen, mit Hilfe des Magneten gesammelt, und der Überstand abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch 13minütige Inkubation der resuspendierten Partikel in 350 µl 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand erneut abgezogen, und der pH-Wert dieser Lösung wurde sofort durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Tris neutralisiert.

Eluierte Phagemide wurden amplifiziert, bevor sie dem nächsten Anreicherungszyklus zugeführt wurden (siehe Abschnitt 2.4.2.2).

2.4.4 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

Nach jedem Anreicherungszyklus (siehe Abschnitt 2.4.3) wurde die Phagemid-Konzentration der eingesetzten Phagen, ausgewählter Waschlösungen sowie der Elutionslösung bestimmt, um den Verlauf der Selektion beurteilen zu können.

Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem PBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10^{-9} hergestellt. Zu 11 µl der auf 37 °C temperierten Phagemidverdünnungen wurden 100 µl einer exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Blue Kultur (siehe Abschnitt 2.4.2.2) pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit PBS hergestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und die gesamte Suspension von 111 µl auf LB/Cam-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtitel durch Auszählen der Klone als cfu/ml bestimmt und um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

2.4.5 Kolonie-Filterstapel-Test

Die Selektion bindungsaktiver Phagemide mittels *Phage Display* führte zu einer relativen Anreicherung von Tlc'-Varianten aus den Bibliotheken. Um aus der selektierten Fraktion

schließlich diejenigen Varianten zu isolieren, die die höchste Affinität zu DC-SIGN aufweisen, wurde der Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra *et al.*, 1991a) eingesetzt. Hierzu wurden die selektierten Tlc'-Varianten zur funktionellen Immobilisierung als Fusionsprotein mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) produziert.

DC-SIGN CRD*strepII* wurde für den Kolonie-Filterstapel-Test als Ligand eingesetzt. Um dieses Protein nachweisen zu können, wurde ein Konjugat von DC-SIGN CRD*strepII* mit Digoxigenin hergestellt. Eine Lösung aus 7,59 mM Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocarbonsäure-N-hydroxy-succinimidester in DMF wurde mit DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA im molaren Verhältnis 2:1 gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur gerollt und überschüssiges Reagenz mittels Dialyse gegen 2 l PBS, 1 mM EDTA über Nacht bei 4 °C abgetrennt.

Mit der Zellsuspension, die nach der Infektion und Kultivierung von *E. coli* XL1-Blue mit den eluierten Phagemiden aus dem Anreicherungsprozess gewonnen wurde (siehe Abschnitt 2.4.2.2), wurden 50 ml LB/Amp-Medium zu einer resultierenden OD₅₅₀ von 0,1 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm für ca. 7 h bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt und die Phasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Kits Midi nach Angaben des Herstellers isoliert.

Die DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *BstXI* geschnitten (siehe Abschnitt 2.2.5.3) und das kleinere der beiden Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.2) isoliert und gereinigt. In gleicher Weise wurde der Vektor pTlc28 mit *BstXI* geschnitten und das größere der beiden Fragmente isoliert. Zur Ligierung wurden jeweils ca. 50 fmol der beiden DNA-Fragmente eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.5.7). Mit 10 μ l dieses Ligierungsansatzes wurden 200 μ l kompetente Zellen des Stamms *E. coli* TG1-F⁻ transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Die durch *Phage Display* Selektion angereicherten Varianten wurden somit aus dem Phasmidvektor pTlc27 in das Expressionsplasmid pTlc28 kloniert, so dass die Varianten als Fusionsprotein mit der ABD produziert werden konnten.

Dazu wurde auf eine LB/Amp-Agarplatte eine passend zurechtgeschnittene, hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 μ m) plaziert. Auf dieser Membran wurden 200 μ l einer Verdünnung des Transformationsansatzes gleichmäßig ausplattiert, so dass 500 bis 1000 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde bei 37 °C inkubiert bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten (7 bis 8 h).

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene, hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 μ m) nacheinander für je 5 min zunächst in 20 ml Methanol, daraufhin in 20 ml Wasser und dann in 20 ml PBS inkubiert. Anschließend wurde sie für 4 h bei Raumtemperatur in 10 ml 10 mg/ml HSA in PBS geschwenkt. Verbliebene

Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 10 ml 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 10 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie auf eine Kulturplatte aus LB/Amp-Agar, die zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die vorbereitete, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin auf die hydrophobe Membran gelegt. Zur Markierung der Orientierung wurden beide Membranen an drei bis vier Stellen mit einer Nadel durchstoßen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 14 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Tlc'-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und 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 5 min mit 20 ml PBS/T, 1 mM EDTA gewaschen und anschließend für 1 h in 6 ml einer Lösung aus 100 nM (Selektion eines Anticalins aus der Tlc'-Bibliothek) oder 10 nM (Selektion zur Affinitätsmaturierung von 3.92A) digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* in PBS/T, 1 mM EDTA inkubiert.

Um gebundenes, digoxigeneres DC-SIGN CRD*strepII* nachzuweisen, wurde die Membran nach dreimaligem Waschen für 5 min in 10 ml PBS/T, 1 mM EDTA für 1 h mit 6 ml Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:1000 verdünnt in PBS/T, 1 mM EDTA) inkubiert. Die Membran wurde danach für jeweils 5 min zweimal mit 10 ml PBS/T, 1 mM EDTA und einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Für die chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat, p-Toluidin-salz (BCIP, 50 µg/ml in DMF) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 µg/ml in 70 % (v/v) DMF) zugesetzt war, inkubiert bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Tlc'-Varianten für DC-SIGN nachgewiesen. Kolonien, die Anlass zu starken Farbsignalen gaben, wurden ausgewählt, ihre DNA isoliert (siehe Abschnitt 2.2.3.1) und einer Sequenzanalyse (siehe Abschnitt 2.2.6) unterzogen.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Chromatographische Verfahren

2.5.1.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form eines Fusionsproteines mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt & Skerra, 1993; Skerra & Schmidt, 2000) erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die Periplasmafraktion (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde dazu über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997) wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (verfolgt anhand der Absorption bei 280 nm) mit SA-Puffer gespült. Bis zu einem Volumen von 30 ml Periplasmafraktion wurde ein Bettvolumen von 2 ml verwendet. In diesem Fall wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flussrate von 20 ml/h betrieben. Bei größeren Volumina (bis zu 300 ml Periplasmafraktion) wurde eine Säule mit 15 ml Bettvolumen bei einer konstanten Flussrate von 80 ml/h betrieben.

Die Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-tag II gebundene, rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt.

2.5.1.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche – vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten – zu immobilisierten Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli, 1988; Skerra *et al.*, 1991b). Dazu wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner eingesetzt und als Übergangsmetallion

wurde Zn^{2+} verwendet. Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente das C-terminale His₆-tag.

Zur Isolierung eines rekombinanten Proteins aus 20 ml Periplasmaextrakt wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert. Der periplasmatische Proteinextrakt (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde zur Entfernung des Komplexbildners EDTA vor dem Auftragen auf die Säule gegen IMAC-Puffer dialysiert und anschließend sterilfiltriert.

Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von 20 ml/h betrieben und mit 20 ml Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde die Säule mit 10 ml 10 mM $ZnSO_4$ beladen, mit 20 ml Wasser nachgespült und schließlich mit 20 ml IMAC-Puffer äquilibriert.

Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraction aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit IMAC-Puffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 ml Volumen von 0 bis 300 mM Imidazol/HCl und 100 mM bis 1 M NaCl in IMAC-Puffer bei einer verringerten Flussrate von 10 ml/h. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1 ml aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn^{2+} -Ionen mit 20 ml Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und anschließend mit 10 ml Wasser gespült.

2.5.1.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe und Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes und zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen verwendet.

Die im Folgenden verwendeten Chromatographiepuffer wurden sterilfiltriert und durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum unter Rühren für 30 min bei Raumtemperatur entgast. Die Chromatographie wurde mit einem Äkta Purifier oder Äkta Explorer HPLC-System (Amersham Pharmacia Biotech Europe) betrieben. Die Absorptionsmessung bei 280 nm erfolgte dabei mit Hilfe eines Durchflussdetektors.

Es wurde je nach Menge des zu analysierenden oder präparierenden Proteins eine Superdex 75 HR 10/30 oder eine Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade Säule unter Verwendung von üblicherweise PBS, 1 mM EDTA als Laufpuffer eingesetzt. Die Säule wurde zunächst bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min (Superdex 75 HR 10/30) oder 1 ml/ml (Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade) mit dem doppelten Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Danach wurde die Proteinprobe über die Probenschleife auf die Säule gepumpt. Die Elution

erfolgte mit einem Säulenvolumen Laufpuffer. Anschließend wurde die Säule mit einem Säulenvolumen H₂O, einem Säulenvolumen 0,5 M NaOH und zwei Säulenvolumen H₂O regeneriert.

Für Moleküle gleichartiger Form gilt, dass das Elutionsvolumen indirekt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse ist. Durch Kalibrierung einer Säule mit globulären Standardproteinen kann die molekulare Masse eines Proteins unter der Annahme, dass es globulär ist, bestimmt werden.

Dazu wurden folgende Standardproteine zur Erstellung einer Eichgerade verwendet: BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29,0 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa). Für jedes Eichprotein wurde das Elutionsvolumen V_R bestimmt und der Verteilungskoeffizient K_{av} berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_C - V_0} \quad (1)$$

K_{av} = Verteilungskoeffizient; V_R = Elutionsvolumen; V_0 = Ausschlussvolumen (mittels Blue Dextran bestimmt); V_C = Säulenvolumen.

Durch Auftragung des Logarithmus der molekularen Masse des entsprechenden Eichproteins gegen den K_{av} -Wert wurde eine Eichgerade erstellt. Mittels dem errechneten K_{av} des zu analysierenden Proteins konnte dessen molekulare Masse bestimmt werden.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen und deren Mischungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von (Fling & Gregerson, 1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse des Proteins.

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten und einer Gummidichtung zusammengebaut. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt 1,25 ml 4x Lower-Tris sowie 2,5 ml einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,25 µl TEMED und 25 µl 10 % (w/v) APS wurden 4,5 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde mit Wasser gespült. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-

Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 µl TEMED und 18 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie die Gummidichtung vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probenaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA betrieben. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und für 30 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel in Aufbewahrungslösung gelagert.

2.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm – unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des verwendeten Puffers – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$E = c \cdot \varepsilon \cdot d \quad (2)$$

Dabei bezeichnet E die gemessene Extinktion, c die Proteinkonzentration, ε den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm und d die Dicke der Küvette.

Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten ε sowie die molekularen Massen M_w wurden jeweils mit Hilfe des *Protparam tools* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) errechnet:

Protein	ε in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	M_w in g/mol
DC-SIGN CRD <i>strepII</i>	59640	15896,6
DC-SIGN CRD <i>his-6</i>	53770	15521,1
DC-SIGN ECD	75600	36236,8
Langerin CRD <i>strepII</i>	54960	16760,4

Protein	ϵ in $M^{-1}\cdot cm^{-1}$	M_w in g/mol
Tlc'	23470	17891,9
3.92	22190	17609,8
3.92A	22460	17593,7
3.92A4	23950	17675,7
3.92A2.18	23950	17626,8

Tabelle 1: Molekulare Extinktionskoeffizienten und molekulare Masse der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.

Bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten und der molekularen Masse von 3.92, 3.92A4 und 3.92A2.18 wurde nicht berücksichtigt, dass diese Anticaline als Dimer auftraten.

2.5.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bindungsaktivität von Tlc'-Varianten gegenüber DC-SIGN wurde mit Hilfe des ELISAs nachgewiesen. Dazu wurde DC-SIGN an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Nach Inkubation mit Tlc'-Varianten wurde deren Bindung an DC-SIGN mit Hilfe einer chromogenen Enzymreaktion vermittelt durch das Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat detektiert.

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung einer Spalte auf der Mikrotiterplatte jeweils 50 μ l DC-SIGN CRDhis-6 in PBS, 1 mM EDTA pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Proteinlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde jede Vertiefung für 1 h mit jeweils 200 μ l einer Blockierungslösung (3 % (w/v) BSA in PBS, 0,5 % Tween 20, 1 mM EDTA) inkubiert. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit PBS/T, 1 mM EDTA gespült und ausgeklopft.

Anschließend wurde zunächst 50 μ l PBS/T, 1 mM EDTA in jede Vertiefung vorgelegt. 50 μ l der zu untersuchenden Tlc'-Variante mit *Strep*-tag II in PBS/T, 1 mM EDTA wurde mit den 50 μ l PBS/T, 1 mM EDTA in der zweiten Vertiefung in einer Spalte gemischt. Ausgehend von der Mischung in der zweiten Vertiefung wurden 50 μ l entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise eine Verdünnungsreihe in PBS/T, 1 mM EDTA hergestellt. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h wurde wiederum dreimal mit PBS/T, 1 mM EDTA gespült.

Für den Nachweis der gebundenen Tlc'-Varianten über das *StrepII*-Tag wurde Strep-Tactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat 1:1000 in PBS/T, 1 mM EDTA verdünnt und je 50 µl pro Vertiefung zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS/T, 1 mM EDTA und einmal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 100 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat gelöst in AP-Puffer zupipettiert. Die Platte wurde in das auf 37 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt, und nach 5minütiger Äquilibration wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min aufgezeichnet.

Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante mittels ELISA

Für die Protein/Liganden-Komplexbildung wurde eine einfache, monovalente Gleichgewichtsreaktion zwischen dem auf der Mikrotiterplatte adsorbierten Protein (P) und dem in einer Verdünnungsreihe zupipettierten Liganden (L) zugrunde gelegt:



Die Dissoziationskonstante K_D ist definiert als:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]} \quad (4)$$

Hierbei bezeichnet $[P]$ die Konzentration des unkomplexierten Proteins, $[L]$ die Konzentration des nicht an das Protein gebundenen Liganden und $[P \cdot L]$ die des Protein/Liganden-Komplexes. Setzt man anhand der Bilanzgleichungen für die bimolekulare Komplexbildung die Konzentrationen:

$$[P] = [P]_t - [P \cdot L] \quad (5)$$

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

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

$$K_d = \frac{([P]_t - [P \cdot L])([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]} \quad (7)$$

Unter der Annahme, dass $[P]_t \gg [P \cdot L]$, ergibt sich aus der Gleichung 7 durch Auflösung nach $[P \cdot L]$:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t [L]_t}{[P]_t + K_D} \quad (8)$$

$[P \cdot L]$ wird indirekt als ligandengebundes Protein anhand der katalytischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase quantifiziert. Somit verbleiben als anzupassende Parameter bei der Variation von $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des immobilisierten Proteins $[P]_t$ sowie die Dissoziationskonstante K_D . Durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderungen ($\Delta E/\Delta t$) gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe ($[L]_t$) und Anpassung der erhaltenen Kurve mit Hilfe des Computerprogrammes "Kaleidagraph" gemäß Gleichung 8 wurden die Parameter K_D sowie $[P]_t$ (entsprechend dem asymptotischen Maximalwert von $\Delta E/\Delta t$) bestimmt (Voss & Skerra, 1997).

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) tritt auf, wenn sich die Extinktionskoeffizienten ε_R und ε_L für die gegenläufigen, zirkular polarisierten Komponenten, in die sich linear polarisiertes Licht zerlegen lässt, beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium voneinander unterscheiden (Berova & Nakanishi, 2000). Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen unterscheidet man einerseits die Absorptionseigenschaften der Peptidbindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). Letztere erlauben eine Beurteilung ihrer molekularen Umgebung. CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung ergeben dagegen Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen eine Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente. Messungen der CD-Signale im Bereich zwischen 190 und 220 nm eignen sich daher zur Messung von Konformationsänderungen, z. B. bei der thermischen Denaturierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD-Spektroskopie sowohl zur qualitativen Abschätzung struktureller Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen in Tlc'-Varianten als auch für Untersuchungen der Proteinestabilität einzelner Varianten durch thermische Denaturierung eingesetzt (Übersicht in Schmid, 1989).

Zur Vorbereitung für die Messung wurden die zu untersuchenden Tlc'-Varianten nach der Reinigung durch Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 2.5.1.3) zunächst gegen 20 mM KH_2PO_4 , 50 mM K_2SO_4 , pH 7,5 dialysiert und sterilfiltriert (0,45 μM). Dann wurden 300 μl Proteinprobe mit einer Konzentration von 10 bis 22 μM in eine Spezialküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 mm pipettiert, mit einem Deckel luftdicht verschlossen und in den temperierbaren Probenhalter des Jasco J-810 Spektropolarimeters gestellt. CD-Spektren zwischen 190 und 250 nm wurden durch Akkumulation von 20 Einzelspektren (*Scanning mode*: Continuous, *Scan speed* 100 nm/min, *Response* 1 s, *Bandwidth* 1 nm, *Data pitch* 0,1 nm) bei einer Proben temperatur von 25 °C erhalten. Die bei

der Messung der CD-Spektren ermittelten Werte für die Elliptizität (in deg) bei der Wellenlänge λ wurden für jede Tlc'-Variante nach Gleichung 9 auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ (MRW = *Mean Residue Weight*, in deg cm² mol⁻¹) umgerechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta_{(\lambda)} M_R}{1000 c d N_A} \quad (9)$$

Dabei bezeichnet M_R die Molmasse der Tlc'-Variante (in g/mol), N_A die Anzahl der Aminosäuren, c die Konzentration (in mg/ml) und d die Schichtdicke der Küvette (in cm).

Für die Messung des Entfaltungsüberganges wurde die Änderung des CD-Signals bei 212 nm während der gesamten kontinuierlichen Aufwärmphase von 25°C bis 85°C (*Temperaturslope* 60 °C/h, *Data pitch* 0,1 °C) verfolgt und die gemessene Elliptizität Θ gegen die Temperatur aufgetragen. Die übrigen Einstellungen des Spektrometers entsprachen denen für die Aufnahme der CD-Spektren (siehe oben).

Für die Anpassung der Rohdaten wurde ein Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung zugrunde gelegt (Lumry & Biltonen, 1966), welches voraussetzt, dass nur natives (N) und vollständig denaturiertes (U) Protein in signifikanten Mengen vorliegen, nicht jedoch Intermediate.



Die Gleichgewichtskonstante K_U der Denaturierung ist definiert als:

$$K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f(u)}{1-f(u)} \quad (11)$$

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

$$f(u) = \frac{K_U}{1+K_U} \quad (12)$$

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

$$f(u) = \frac{y_{obs} - y_N}{y_U - y_N} \quad (13)$$

bestimmt werden. Die Parameter y_N und y_U bezeichnen dabei die Elliptizitätswerte des vollständig gefalteten bzw. entfaltenen Zustandes und können unter Annahme linearer prä-

bzw. posttransitioneller Steigungen der Denaturierungskurve jeweils folgendermaßen als Funktion der Temperatur ausgedrückt werden:

$$y_N = m_N T + b_N \quad (14)$$

$$y_U = m_U T + b_U \quad (15)$$

Die Parameter b_N und b_U stehen für die Ordinatenabschnitte der Basislinien von nativem und denaturiertem Zustand, während m_N und m_U die Steigungen der jeweiligen Basislinien in Abhängigkeit von der Temperatur beschreiben. Durch Gleichsetzen von Gleichung 12 und 13 und Auflösen der Beziehung nach y_{Obs} ergibt sich:

$$y_{Obs} = \frac{y_U K_U + y_N}{1 + K_U} \quad (16)$$

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

$$K_U = \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \quad (17)$$

Unter Substitution von K_U , y_N und y_U in Gleichung 16 durch Gleichung 14, 15 und 17 erhält man (Brumano *et al.*, 2000):

$$y_{Obs} = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \left\{ \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\}}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (18)$$

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

Um die Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen Tlc'-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung 13 unter Verwendung der aus der nicht-linearen Regression nach Gleichung 18 gewonnenen Parameter

b_N , b_U , m_N und m_U auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Die so erhaltenen normierten Entfaltungskurven konnten anschließend nach Gleichung 19, die sich aus Gleichung 12 und 17 ergibt, angepasst werden:

$$f(u) = \frac{\exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_m}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]} \quad (19)$$

Die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen (25 °C) $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ kann bei Annahme einer temperaturunabhängigen Entfaltungsenthalpie H_m unter Verwendung der *van't Hoff'schen* Reaktionsisochore 17 mit der Schmelztemperatur T_m für $T = 298,15$ K berechnet werden:

$$\Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = -RT \ln K_U^{25^\circ\text{C}} \quad (20)$$

2.6.2 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Für die quantitative Analyse der Bindung eines Analyten an seinen Liganden wurde das BIACORE X System in Verbindung mit dem CM-5 (BIACORE) *Sensorchip* verwendet. Über die Carboxyl-Funktion der Carboxymethyl-dextran-Matrix dieses kommerziell erhältlichen Probenträgers wurde DC-SIGN CRD*strep*II mittels Amin-Kopplung kovalent an der *Sensorchip*-Oberfläche immobilisiert und die Interaktion der DC-SIGN-bindenden Tlc'-Varianten in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen in Echtzeit gemessen. Das mit einem Rechner und der *BIACORE X Control Software* (Version 2.1) gesteuerte System gestattet den kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom über die *Sensorchip*-Oberfläche, wobei entweder Laufpuffer aus einem Reservoir oder die zu untersuchenden Proteinlösungen durch eine der beiden oder beide Flusszellen geleitet werden (Übersicht in Huber *et al.*, 1999).

Die Aktivierung der Carboxymethyl-dextran-Oberfläche erfolgte durch Derivatisierung mit 35 μl einer 1:1 Mischung von 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid als Hydrochlorid) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid), wodurch N-Hydroxysuccinimidester auf der *Sensorchip*-Oberfläche generiert werden. Daraufhin wurden 35 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ DC-SIGN CRD*strep*II in 50 mM NaOAc pH 4,5 durch die Flusszelle 2 geleitet, wobei die kovalente Immobilisierung des Antigens durch Ausbildung von Amidbindungen zwischen seinen freien Aminogruppen und den Carboxygruppen der *Sensorchip*-Oberfläche erfolgte. Nach Absättigung der NHS-Estergruppen von Flusszelle 1 und verbliebener NHS-Estergruppen von Flusszelle 2 durch Injektion von 35 μl 1 M

Ethanolamin war die Chip-Oberfläche für Bindungsanalysen bereit. Flusszelle 1 diente dabei als Kontrolle.

Alle Messungen wurden bei 25 °C und einem kontinuierlichen Pufferfluss von 5 µl/min durchgeführt. Als Laufpuffer und zur Lösung der verwendeten Proteine wurde sterilfiltriertes und entgastes PBS, 0.005 % Tween 20, 1 mM EDTA benutzt. Für eine Interaktionsanalyse wurden 35 bis 90 µl der Tlc'-Varianten mit einer definierten Konzentration in die in Reihe geschalteten Flusszellen injiziert und danach durch kontinuierlichen Pufferfluss für 7 bis 18 Minuten nachgewaschen. Die Regenerierung erfolgte durch alternierende Injektionen von 10 µl 10 mM HCl und 3 M KSCN.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die Messkurven einer kinetischen Gleichgewichtsanalyse unterzogen. Dabei werden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a und Dissoziation k_d durch Anpassung der Messkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der *BIAevaluation Software* (Version 3.0) bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_D errechnet sich aus:

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (21)$$

und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ aus:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (22)$$

2.6.3 Fluoreszenz-Anisotropiemessungen

Fluoreszierende Moleküle absorbieren bevorzugt Photonen, deren elektrischer Feld-Vektor parallel zum Übergangs-Dipolmoment des Fluorophors ausgerichtet ist. Strahlt man daher polarisiertes Licht ein, so gelangen in erster Linie diejenigen Moleküle in einen angeregten Zustand, welche die entsprechende Orientierung aufweisen. Ändert sich während der Lebensdauer des angeregten Zustandes die Ausrichtung des Fluorophores nicht, so weist auch das emittierte Licht Polarisation auf. Aufgrund der Rotation des Fluorophors durch Brownsche Molekularbewegung ist in der Regel jedoch die Orientierung des Emissions-Dipolmoments – abhängig von der Fluoreszenz-Lebensdauer – statistisch verteilt zunehmend ungleich der des Anregungs-Dipolmoments und damit der Grad der Polarisation verringert (Übersicht in Lakowicz, 2006)

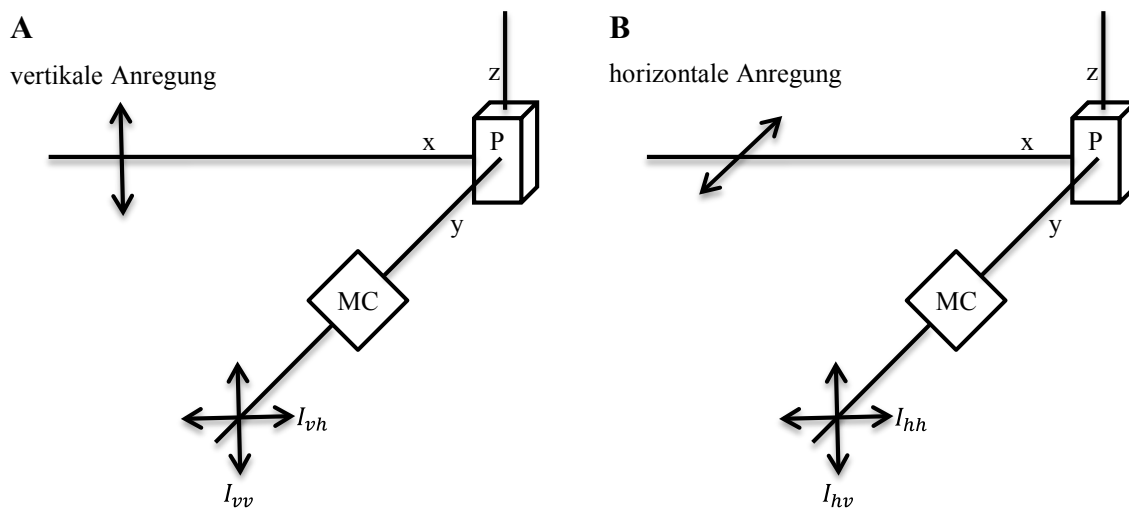


Abbildung 5: Schematisches Diagramm einer Fluoreszenz-Anisotropiemessung in L-Anordnung angelehnt an Lakowicz (2006). Gezeigt ist die Polarisation der Anregung, die Messzelle, in der sich die Probe (P) befindet, der Monochromator (MC) der Emission und die Polarisation der gemessenen Emissionsintensitäten. A) Zur Messung der Anisotropie der Probe wird mit vertikal polarisiertem Licht angeregt. B) Zur Bestimmung des G-Faktors wird die Probe mit horizontal polarisiertem Licht angeregt. Die Messung der Emissionsintensitäten erfolgt in beiden Fällen mit vertikal und horizontal ausgerichteten Polarisatoren.

Um die sogenannte Fluoreszenz-Anisotropie einer Probe zu messen, wird diese mit vertikal polarisiertem Licht angeregt, bei dem der elektrische Vektor parallel zur vertikalen oder z-Achse ist (Abbildung 5). Die Emissionsintensitäten I_{vv} bzw. I_{vh} werden mit vertikal und horizontal ausgerichteten Polarisationsfiltern in einer L-Anordnung gemessen. Die Fluoreszenz-Anisotropie A wird folgendermaßen berechnet:

$$A = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot I_{vh}} \quad (23)$$

Um verfälschende Einflüsse des Geräts zu eliminieren, wird die Probe mit horizontal polarisiertem Licht angeregt und die Intensitäten der horizontal und vertikal polarisierten Komponenten I_{hh} und I_{hv} des emittierten Lichts ermittelt (Abbildung 5). Diese sollten im Idealfall gleich groß sein, weichen jedoch in der Realität voneinander ab, vor allem weil Monochromatoren in der Regel verschiedene Transmissionseffizienzen für vertikal und horizontal polarisiertes Licht aufweisen. Der resultierende Korrekturfaktor wird als G-Wert bezeichnet:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (24)$$

Unter Berücksichtigung des G -Werts berechnet sich die Anisotropie gemäß folgender Formel:

$$A = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \quad (25)$$

Einen wichtigen Einfluss auf die Fluoreszenz-Anisotropie hat – neben Molekülschwingungen und Konformationsfluktuationen – die Eigenrotation der Fluorophore, da sich vor allem dadurch während der Fluoreszenzlebensdauer die Orientierung der Fluorophore und damit die Polarisationssebene des emittierten Lichts ändert. Kleine Moleküle, die eine hohe Rotationsgeschwindigkeit aufweisen, zeigen deshalb eine geringere Fluoreszenz-Anisotropie als größere Moleküle. Durch Fluoreszenz-Anisotropiemessung kann bei der Titration eines fluoreszenzmarkierten Proteins mit einem unmarkiertem Bindungspartner die Dissoziationskonstante der Komplexbildung bestimmt werden, da sich bei der Komplexbildung aufgrund der Größenänderung die Rotationsgeschwindigkeit verringert und sich damit die gemessene Fluoreszenz-Anisotropie erhöht:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} + \frac{\tau RT}{A_0 \eta V} \quad (26)$$

Dabei ist A die Anisotropie, A_0 die Fundamentalanisotropie; τ die Lebensdauer des Fluorophors, R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur, η die Viskosität der Lösung und V das Volumen des rotierenden Moleküls oder Komplexes. Um den größtmöglichen Effekt zu erzielen, wird bevorzugt der kleinere der beiden Bindungspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Für die Anisotropie-Titrationen in dieser Arbeit wurde Fluorescein-markiertes DC-SIGN CRD*strep*II hergestellt. Dazu wurde 6-[Fluorescein-5(6)-carboxamido]hexansäure *N*-hydroxy-succinimidester (8.5 mM in DMSO) mit DC-SIGN CRD*strep*II (13.7 μ M in 100 mM NaHCO₃ pH 9) in einem molarem Verhältnis von 2:1 gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der nicht gekoppelte Farbstoff durch Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 2.5.1.3) abgetrennt.

Von der zu untersuchenden Tlc'-Variante wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von etwa 10 nM bis 30 μ M pipettiert. 150 μ l der einzelnen Verdünnungen wurden mit 50 μ l einer 4 μ M Lösung der Fluorescein-markierten DC-SIGN CRD*strep*II gemischt. Die Proben wurden lichtgeschützt mindestens für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Messung wurden alle Proben zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 30 min), um Partikel zu entfernen. Die Anisotropie von 150 μ l des Überstandes wurde in einem Perkin-Elmer LB-50 Fluoreszenz-Photometer mit eingebauten Polarisatoren bestimmt. Die

Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 512 nm mit der Einstellung *Anisotropy* bei 25 °C durchgeführt (*Slit*: je 10 nm, *Integration*: 10 s). Zunächst wurde der *G*-Wert ermittelt und anschließend die Anisotropie der Proben bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Werte für die I_{vv} und I_{vh} im Bereich von 100 bis 800 cps lagen. Es wurden jeweils drei Messwerte von ein und derselben Probe aufgenommen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde.

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

Bei der Anisotropiemessung lässt sich die Komplexbildung aus Protein und Liganden durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (siehe Abschnitt 2.5.4). Die Auflösung der gemischt quadratischen Gleichung 7 nach $[P \cdot L]$ ergibt folgende Lösung:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \quad (27)$$

Für $[P]$ folgt durch Einsetzen von Gleichung 27 in 5:

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

Die gemessene Gesamtanisotropie ergibt sich anteilig aus der Anisotropie des markierten Proteins und der des Komplexes:

$$A_t = \frac{[P]}{[P]_t} \cdot A_p + \frac{[P \cdot L]}{[P]_t} \cdot A_K \quad (29)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 27 und 28 in 29 ergibt sich folgender Zusammenhang für die gemessene Anisotropie:

$$A_t = \left[\left(\frac{[P]_t - [L]_t - K_D}{2} \right) + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \right] \cdot \frac{A_p}{[P]_t} + \left[\left(\frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} \right) - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t} \right] \cdot \frac{A_K}{[P]_t} \quad (30)$$

Die gemessenen Anisotropiewerte wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Anpassung von K_D , A_p und A_K erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung 30.

2.7 Computerprogramme und Datenbanken

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden durch die Verwendung folgender im World Wide Web zugänglichen Datenbanken erhalten: Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/pdb/>, ExPASy Molecular Biology Server; <http://www.expasy.ch/>.

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE, PEPTIDESORT und der Sequenzeditor SEQED aus dem GCGProgrammpaket eingesetzt. Die molekulare Masse von Proteinen sowie der molekulare Extinktionskoeffizient wurden mit Hilfe des ProtParam Programms (*Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), 571-607) berechnet.

Gele und Membranfilter wurden mit Hilfe eines Scanners und des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die grafische Auswertung von Messwerten erfolgte mit dem Programm Kaleidagraph (Abelbeck).

Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen mit dem Programm PyMOL™ Molecular Graphics System (Warren L. DeLano, „The PyMol Molecular Graphics System“, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA; <http://www.pymol.org>) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines DC-SIGN-bindenden Anticalins. Dazu wurden aus einer existierenden Phagemidbibliothek auf der Basis des humanen Tränenlipocalins (Tlc) entsprechende Anticaline selektiert.

3.1 Produktion und Charakterisierung des Zielproteins DC-SIGN

Zur Entwicklung eines DC-SIGN-bindenden Anticalins war zunächst die Herstellung des Zielproteins in geeigneter Form notwendig. DC-SIGN bindet mittels seiner C-terminalen, extrazellulär lokalisierten CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*) an das HIV Hüllprotein gp120. Für die Selektion der Anticaline wurde daher die DC-SIGN CRD, für deren Charakterisierung zusätzlich die DC-SIGN ECD (*Extracellular Domain*) eingesetzt und produziert.

3.1.1 DC-SIGN CRD (*Carbohydrate Recognition Domain*)

Für die Produktion der DC-SIGN CRD wurde das Plasmid pDC1 konstruiert (Abbildung 6). Dazu wurde der entsprechende Genabschnitt von dem für das vollständige humane DC-SIGN kodierenden Plasmid V147 als Matrize und mit den Oligodesoxynukleotiden DC-SIGN-for und DC-SIGN-rev als *Primern* mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *Eco47III* geschnitten und mit dem großen Fragment des ebenfalls mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnittenen Plasmids pASK75*strepII* (Skerra & Schmidt, 2000) ligiert. Die korrekte Basensequenz des entstandenen Plasmids pDC1 wurde durch Sequenzierung mit den Oligodesoxynukleotiden D20 und PR1 bestätigt.

pDC1 kodiert für die CRD von Aminosäure 254 bis 381 des murenen, humanen DC-SIGNs unter der Kontrolle des *E. coli* Tetracyclin-Promotor/Operators (Anhang, Abbildung 32). Bei der Planung von pDC1 waren folgende Überlegungen von Bedeutung: Da das C-terminale Ende (Aminosäuren 382 bis 404) nicht an der Ausbildung der funktionellen CRD beteiligt ist, wurde dieses nicht berücksichtigt (Feinberg *et al.*, 2001). Eine N-terminale OmpA-Signalsequenz sollte zur Sekretion der DC-SIGN CRD in das oxidierende Periplasma führen, wo die für die Faltung der CRD notwendigen drei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten C256 und C267, C284 und C377 sowie C356 und C369 ausgebildet werden können. Die N-terminale Aminosäure His-254 der DC-SIGN CRD wurde durch Asparagin ersetzt, um die Abspaltung der OmpA-Signalsequenz durch die bakterielle Signalpeptidase zu begünstigen (Geller *et al.*, 1993). Ein C-terminales *Strep*-tag II wurde zwecks Einschnitt-Reinigung der CRD mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie eingeführt (Schmidt & Skerra, 2007; Skerra & Schmidt, 2000).

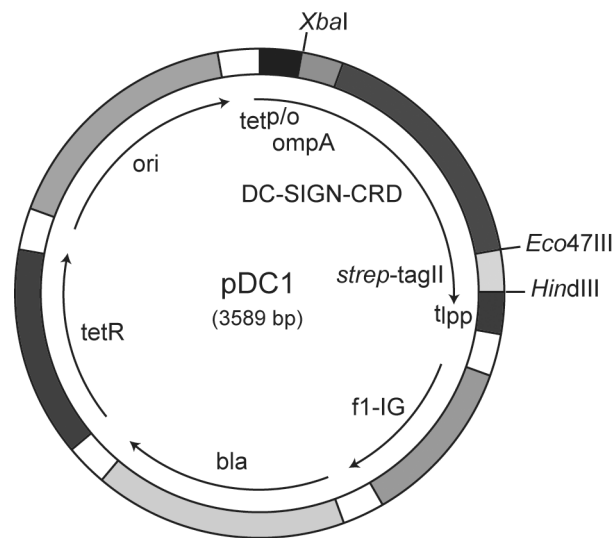


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors pDC1. Der Vektor kodiert unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{p/o}$) für das Fusionsprotein aus OmpA-Signalsequenz, DC-SIGN CRD und *Strep-tag II*. t_{ipp} , f1-IG, bla, tetR und ori bezeichnen den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Phagen f1, das β -Lactamasegen, das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors sowie den Replikationsursprung. *XbaI*, *Eco47III* und *HindIII* sind die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

Für die bakterielle Produktion der DC-SIGN CRD wurde der *E. coli* Stamm JM83 mit pDC1 transformiert. Die Induktion der Expression mit Anhydrotetracyclin erfolgte zunächst bei einer OD_{550} von 0,5 für etwa 2,5 h. Nach Extraktion der Periplasmafraktion und anschließender Streptavidin-Affinitätschromatographie wurden auf diese Weise ca. 45 μ g DC-SIGN CRD*strepII* pro Liter Kultur erhalten. Durch Cotransformation von JM83 mit pDC1 und dem Helferplasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) konnte die Ausbeute auf in etwa 400 μ g DC-SIGN CRD*strepII* pro Liter Kultur gesteigert werden. pTUM4 codiert für die Produktion der periplasmatischen Faltungshelfer FkpA, SurA, DsbA und DsbC, welche die Fehlfaltung und Aggregation von exprimierten Proteinen verhindern können, was die Ausbeute an funktionellem Protein hier signifikant gesteigert hat. Neben der Verwendung von pTUM4 wurde eine weitere Erhöhung der Ausbeute von DC-SIGN CRD*strepII* erreicht, indem die Zelldichte bei der Induktion erhöht und die Produktionsphase von DC-SIGN CRD*strepII* verlängert wurde. Durch Induktion bei OD_{550} von 1,5 statt 0,5 und für etwa 3,5 statt 2,5 h wurden ca. 1,1 mg DC-SIGN CRD*strepII* pro Liter Kultur erhalten. Für die weitere Verwendung wurde DC-SIGN CRD*strepII* abschließend durch Größenausschlusschromatographie gereinigt.

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde gezeigt, dass nach der Induktion der Genexpression eine Überproduktion von DC-SIGN CRD*strepII* in den mit pDC1 und pTUM4 transformierten JM83 *E. coli* Zellen erfolgte (Abbildung 7, Spur 2 und 3). Die schrittweise Reinigung durch Aufschluß des Periplasmas (Abbildung 7, Spur 4), Streptavidin-

Affinitätschromatographie (Abbildung 7, Spur 5) und Größenausschlusschromatographie (Abbildung 7, Spur 6 und 7) führte zur Isolierung einer Präparation hoher Reinheit. Die Produktion von DC-SIGN CRD_{His6} erfolgte entsprechend, wobei Metallchelataffinitätschromatographie zur Reinigung angewandt wurde.

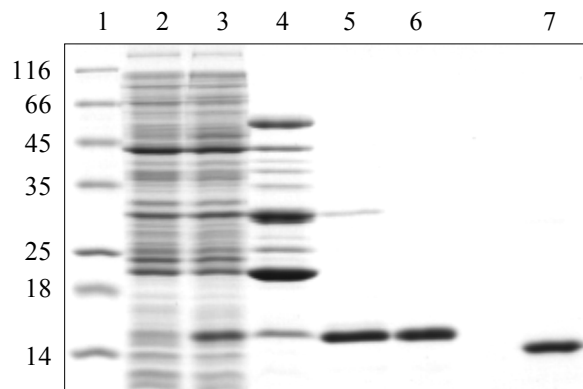


Abbildung 7: SDS-PAGE Analyse der bakteriellen Produktion von DC-SIGN CRD_{strepII} in *E. coli*, der Reinigung durch Streptavidin-Chromatographie und der anschließenden Größenausschlusschromatographie. 1, Proteingrößenstandard (Angaben in kDa); 2, *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion der Genexpression; 3, *E. coli* Zellextrakt nach 3,5-stündiger Induktion der Genexpression; 4, Periplasmaextrakt; 5, vereinigten Elutionsfraktionen nach der Streptavidin-Chromatographie; 6, vereinigten Elutionsfraktionen nach der Größenausschlusschromatographie aufgetragen in reduzierendem Puffer; 7, vereinigten Elutionsfraktionen nach der Größenausschlusschromatographie aufgetragen in nicht-reduzierendem Puffer.

Um die korrekte Faltung der gereinigten DC-SIGN CRD zu überprüfen, wurde die Ausbildung der Disulfidbrücken mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Oligomerisierungszustand mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Die rekombinante DC-SIGN CRD bewegte sich im SDS-Polyacrylamid-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit erhöhter Mobilität verglichen mit reduzierenden Bedingungen, so dass die Ausbildung der drei Disulfidbrücken angenommen werden konnte (Abbildung 7, Spur 6 und 7). Des weiteren eluierte die DC-SIGN CRD bei der Größenausschlusschromatographie als ein homogenes Protein mit einer Molmasse von 12,6 kDa (Abbildung 8 A). Im Rahmen der Messgenauigkeit entsprach das der errechneten molekularen Masse von 15,9 kDa, d.h. der monomeren Form der DC-SIGN CRD_{strepII}.

Eine Größenausschlusschromatographie wurde auch in Gegenwart von Calcium durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war die Elution des Proteins stark verzögert. Da DC-SIGN Calcium-abhängig verschiedene Saccharide und Oligosaccharidstrukturen bindet (Mitchell *et al.*, 2001), wurde aus dieser Beobachtung geschlossen, dass die rekombinante DC-SIGN CRD mit der Matrix (Superdex) der Größenausschlusschromatographiesäule, die aus einer Mischung der Oligosaccharide Agarose und Dextran besteht, interagiert. Die Funktionalität der rekombinanten DC-SIGN CRD wurde zudem mit Hilfe von ELISA überprüft (Abbildung

8 B). Hierbei wurde die Bindung von Digoxigenin-markiertem Agglutinin aus Sojabohnen an immobilisierte DC-SIGN CRDhis6 gemessen. Agglutinin aus Sojabohnen gehört wie HIV gp120 zu den *High-Mannose* Typ Glykoproteinen, die von DC-SIGN bevorzugt gebunden werden (Mitchell *et al.*, 2001) und wurde deshalb als Modellglykoprotein verwendet. Das digoxigenierte Agglutinin wurde tatsächlich in Calcium-abhängiger Weise von der rekombinanten DC-SIGN CRD gebunden, was die Liganden-Bindungsaktivität des rekombinant hergestellten Proteins bestätigte.

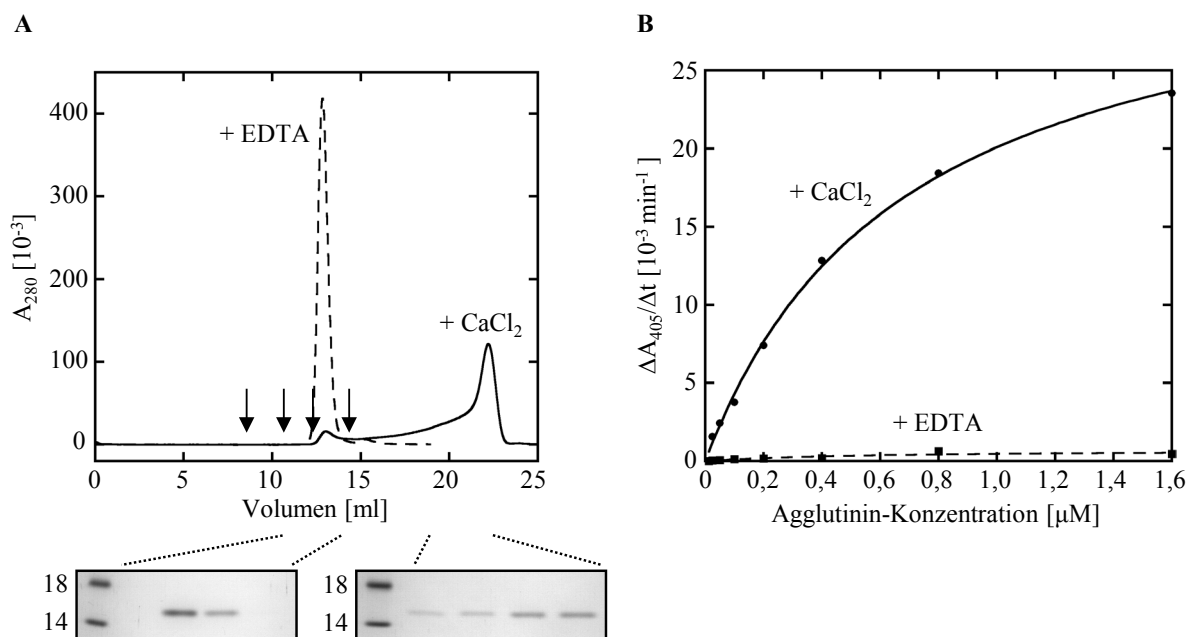


Abbildung 8: Analyse von rekombinanter DC-SIGN CRD*strepII* durch Größenausschlusschromatographie und ELISA. A) Gezeigt sind die überlagerten Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie von DC-SIGN CRD*strepII* mit 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM EDTA (gestrichelt) oder mit 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (durchgezogen) als Chromatographiepuffer. Jeweils 0,5 mg Protein wurden auf eine S75 Superdex (10/30) Säule geladen. Die Pfeile zeigen die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (67 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa). Der Nachweis von DC-SIGN CRD*strepII* in den Elutionsfraktionen erfolgte durch SDS-PAGE. B) Dargestellt ist das Ergebnis eines ELISA zur Untersuchung der Bindung von Agglutinin aus Sojabohnen an immobilisierte DC-SIGN CRD in Gegenwart von 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM EDTA (gestrichelt) oder 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (durchgezogen) als Bindungspuffer. Eine Verdünnungsreihe des digoxigenierten Agglutinins wurde in die mit DC-SIGN CRDhis6 beschichteten Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben. Der Nachweis des gebundenen Agglutinins erfolgte mit einem Konjugat aus Anti-Digoxigenin Fab-Fragment und Alkalischer Phosphatase.

3.1.2 DC-SIGN ECD (Extracellular Domain)

Neben der CRD von DC-SIGN wurde auch dessen komplette extrazelluläre Domäne (ECD) in *E. coli* produziert. Die DC-SIGN ECD besteht aus den sogenannten *Neck Repeats* und der sich C-terminal anschließenden CRD. Für die Synthese der ECD wurde das Plasmid pDC9 konstruiert. Dazu wurde das Amplifikat einer PCR-Reaktion mit den Oligodesoxynukleotiden

DC6 und PR1 als *Primern* und dem Plasmid pDC4 (Kaufer, 2005) als Matrize mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *HindIII* geschnitten. Dieses Fragment wurde mit dem großen Fragment des ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnittenen Expressionsplasmids pSA1 (Schmidt & Skerra, 1994) ligiert. Die Basenfolge des entstandenen Plasmids wurde durch Sequenzierung mit den Oligodesoxynukleotiden SaM5 und Psetrev bestätigt. pDC9 bewirkt die cytoplasmatische Produktion der humanen DC-SIGN-ECD von Aminosäure 76 bis 381 in *E. coli* mit einem C-terminalen *Strep*-tag II unter Kontrolle des T7-Promotors (Anhang, Abbildung 33).

Die Produktion der DC-SIGN ECD erfolgte in mit pDC9 transformierten BL21(DE3) *E. coli* Zellen durch Induktion der Genexpression mit IPTG (Mitchell *et al.*, 2001). Die auf diese Weise überproduzierte ECD wurde als unlösliches Protein in Einschlusskörpern abgelagert. Im Anschluss an die Isolierung des aggregierten Proteins und dessen Rückfaltung wurden Verunreinigungen durch Streptavidin-Affinitätschromatographie abgetrennt. Im SDS-Polyacrylamid-Gel zeigte die rekombinante DC-SIGN ECD unter reduzierenden Bedingungen eine singuläre Proteinbande zwischen 35 und 45 kDa und im Vergleich dazu unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Proteinbande mit erhöhter Mobilität (Daten nicht gezeigt). Die berechnete molekulare Masse von 36,2 kDa sowie die Ausbildung der drei Disulfidbrücken der DC-SIGN ECD wurden auf diese Weise bestätigt.

3.2 Selektion eines DC-SIGN-bindenden Anticalins mit Hilfe der *Phage Display*-Technologie

Zur Selektion eines DC-SIGN-bindenden Anticalins wurde eine vorhandene Anticalinbibliothek auf Basis des Tlc5 mit Hilfe der *Phage Display*-Methode durchmustert. Bei der Herstellung dieser Bibliothek wurden 18 Aminosäurepositionen in den Schleifenregionen des Tlc5 durch gerichtete Zufallsmutagenese randomisiert, so dass die Ausbildung von neuartigen Bindungstaschen ermöglicht wurde. Die Komplexität dieser Bibliothek betrug $2 \cdot 10^9$ Varianten (siehe Abschnitt 1.3.3).

Die Bibliothek wurde auf der Basis des Phasmidvektors pTlc27 erstellt (Anhang, Abbildung 34). Dieser Vektor kodiert für die periplasmatische Expression der in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Mutante von Tlc5 mit der Bezeichnung Tlc5' als Fusionsprotein mit den Aminosäuren 217 bis 406 des Phagenhüllproteins pIII ($\Delta\Delta$ pIII) in *E. coli* unter Kontrolle des tet-Promotor/Operator-Systems. Zusätzlich enthält der Vektor die Phagenverpackungssequenz fl-IG (Skerra & Nasreen, 2007). Bei der Phagemidproduktion wird das Fusionsprotein aus Tlc5' und $\Delta\Delta$ pIII auf der Oberfläche der Phagemide präsentiert und gleichzeitig der entsprechende Phasmidvektor in den Phagemiden verpackt, so dass die proteinbiochemische und auch die genetische Information für die kodierten Tlc5'-Varianten in einem Partikel kombiniert sind.

3.2.1 Selektionsversuch in Gegenwart von Calcium und durch kompetitive Elution der gebundenen Phagemide

Für die Selektion von DC-SIGN-bindenden Anticalinen wurden verschiedene Puffersysteme und Elutionsbedingungen getestet. In einem ersten Experiment wurden die Phagemidbibliothek in einem Calcium-haltigen Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,1 % Tween 20) mit biotinylierter DC-SIGN CRD*strepII* für eine Stunde inkubiert. In Gegenwart von Calcium bindet DC-SIGN diverse Saccharide (Mitchell *et al.*, 2001), so dass vermutlich auch Phagemide, die an die Zuckerbindungsstelle der DC-SIGN CRD binden, kompetitiv eluiert werden können. Die Konzentration der biotinylierten DC-SIGN CRD*strepII* betrug 100 nM, da die zur Selektion eingesetzte Antigenkonzentration höchstens der zu erwarteten Dissoziationskonstante des Antigen/Anticalin-Komplexes entsprechen sollte (Hawkins *et al.*, 1992). Zusätzlich sollte ein Überschuss an Target gegenüber dem Anticalin vorliegen. Aus diesem Grund wurden etwa $2 \cdot 10^{13}$ Moleküle biotinylierte DC-SIGN CRD*strepII* mit $1 \cdot 10^{11}$ Phagemiden versetzt. DC-SIGN-bindende Phagemide wurden mittels Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln immobilisiert. Streptavidin bindet die an die DC-SIGN CRD gekoppelte Biotingruppe und damit die DC-SIGN-bindenden Phagemide. Nicht gebundene Phagemide wurden durch achtmaliges Waschen der paramagnetischen Partikel mit Calcium-haltigem Puffer entfernt.

Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte durch Inkubation der paramagnetischen Partikel mit 100 mM Maltose in Calcium-haltigem Puffer und anschließend mit 25 mM EGTA in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 0,1 % Tween 20. Der hohe Überschuss des Disaccharids Maltose sollte Phagemide, die an die Zuckerbindungsstelle von DC-SIGN binden, kompetitiv verdrängen. Die Chelatisierung des von DC-SIGN komplexierten Calciums durch EGTA wiederum sollte metallvermittelte Wechselwirkungen unterbrechen. Die eluierten Phagemide wurden amplifiziert, vereinigt und einem erneuten Selektionszyklus zugeführt. Insgesamt wurden fünf Selektionszyklen vorgenommen. Im Vergleich zum ersten Selektionszyklus, bei dem 0,00044 % der eingesetzten Phagemide eluiert wurden, wurden im fünften Selektionszyklus 0,27 % der eingesetzten Phagemide eluiert, was auf eine spezifische Anreicherung schließen ließ.

Im Anschluss an die *Phage Display* Selektion wurden die selektierten Anticaline mit Hilfe des Kolonie-Filterstapel-Tests und eines ELISAs untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die selektierten Varianten unspezifisch sowohl an DC-SIGN als auch an andere Proteine binden (Daten nicht gezeigt). Das genaue Vorgehen beim Kolonie-Filterstapel-Test und ELISA wird aufgrund dessen anhand der dritten erfolgreichen Selektion in Abschnitt 3.2.3 beschrieben.

3.2.2 Selektion durch saure Elution der gebundenen Phagemide

Eine zweite Selektion wurde mit der gleichen Phagemidbibliothek unter veränderten Bedingungen durchgeführt. Dabei spielten folgende Überlegungen eine Rolle: Da bei der ersten Selektion nur unspezifisch bindende Varianten gefunden wurden und zweiwertige Ionen wie Calcium dafür bekannt sind, dass sie unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln können, wurde die zweite Selektion in PBS (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 115 mM NaCl) in Abwesenheit von Calcium durchgeführt. Zudem wurde bei der zweiten Selektion eine drastischere Elution der Phagemide unter sauren Bedingungen mit 100 mM Glycin pH 2,2 angewandt. Bis auf diese zwei Modifikationen wurden die Selektionsbedingungen nicht verändert. Auch bei der zweiten Selektion wurden fünf Selektionszyklen durchgeführt. Dabei gelang eine Anreicherung von eluierten im Verhältnis zu eingesetzten Phagemiden von 0,00099 % im ersten zu 0,38 % im fünften Zyklus.

Bei der anschließenden Analyse der selektierten Varianten mit dem Kolonie-Filterstapel-Test konnten keine DC-SIGN-bindenden Anticaline detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass bei der beschriebenen zweiten Selektion nur Varianten angereichert wurden, die beispielsweise an BSA, welches zum Blocken der paramagnetischen Partikel verwendet wurde, binden oder an Streptavidin.

3.2.3 Selektion in Gegenwart von EDTA und durch saure Elution der gebundenen Phagemide

Bei der dritten Selektion wurden folgende Bedingungen geändert: Zum einen wurde die Selektion in einem EDTA-haltigen Puffer (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 pH 7,4, 115 mM NaCl, 1 mM EDTA) durchgeführt. Damit sollte verhindert werden, dass beispielsweise im BSA oder in der Phagenpräparation enthaltene Saccharidverunreinigungen Calcium-abhängig von DC-SIGN gebunden werden und somit die Zuckerbindungsstelle blockieren. Zum anderen wurde für die dritte Selektion eine neuere Phagemidbibliothek (unveröffentlicht, Pieris AG) verwendet, die mit der gleichen Randomisierungsstrategie hergestellt wurde wie die für die erste und zweite Selektion eingesetzte.

Eine Phagemidbibliothek umfasst aufgrund von experimentellen Limitierungen bestenfalls in etwa 10^{10} Varianten. Die theoretisch mögliche Zahl der Varianten bei der Randomisierung von 18 Aminosäurepositionen von $1 \cdot 10^{27}$ kann durch eine solche Bibliothek nicht abdeckt werden. In Folge dessen enthalten zwei unabhängig voneinander hergestellte Bibliotheken im Prinzip unterschiedliche Varianten, so dass die Selektionen mit solchen Bibliotheken zu verschiedenen Ergebnissen führen kann. Aus diesem Grund wurde eine unabhängig hergestellte Phagemidbibliothek für die dritte Selektion eingesetzt. Die Komplexität dieser Bibliothek betrug $1 \cdot 10^9$ Varianten.

Bei der dritten Selektion wurden vier Zyklen durchgeführt. Ein Vergleich der relativen Phagentiter ausgewählter Waschfraktionen und der Elutionsfraktion der einzelnen Selektionszyklen zeigte, dass der Anteil der an die paramagnetischen Partikel gebundenen Phagemide von Zyklus 1 bis 4 anstieg (Abbildung 9). In diesem Fall gelang eine Steigerung des Anteils der gebundenen Phagemide von 0,00012 % auf 0,22 % im letzten Zyklus.

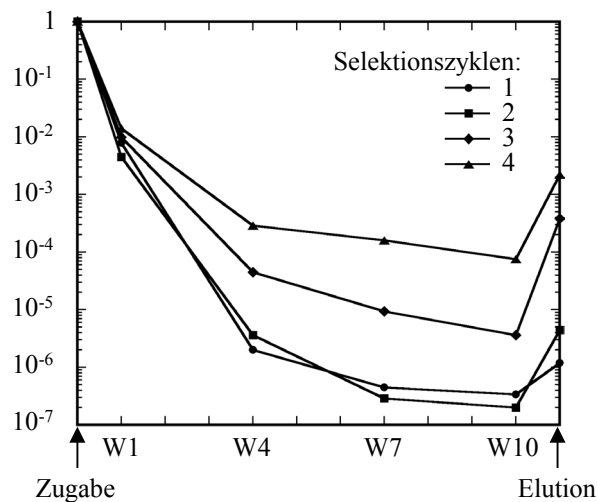


Abbildung 9: Überlagerung der Elutionsprofile der einzelnen Selektionszyklen im Verlauf der Anreicherung DC-SIGN-bindender Tlc'-Varianten aus der Phagemidbibliothek. Nach Inkubation von 100 nM biotinylierter DC-SIGN CRD*strepII* mit Tlc'-Varianten präsentierenden Phagemiden für 1 h erfolgte die Immobilisierung der biotinylierten DC-SIGN CRD*strepII* an Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln und somit indirekt auch der DC-SIGN-bindenden Phagemide. Nach zehn Waschschritten wurden die gebundenen Phagemide mit 100 mM Glycin-HCl pH 2,2 eluiert. Der Phagemidtitel der eingesetzten Phagemide (Zugabe), ausgewählter Waschfraktionen (W1, W4, W7 und W10) sowie der Elutionsfraktion (Elution) wurde bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide halblogarithmisch aufgetragen.

3.2.4 Analyse selektierter Varianten im Kolonie-Filterstapeltest

Zur Analyse der selektierten Varianten wurde wie auch schon nach der ersten und zweiten Selektion ein sogenannter Kolonie-Filterstapel-Test durchgeführt (Schlehuber *et al.*, 2000). Dazu wurde die Phasmid-DNA der eluierten Phagemide aus dem dritten und vierten Selektionszyklus präpariert. Der Genpool der selektierten Varianten wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *BstXI* auf dem Plasmid pTlc28 subkloniert (Anhang, Abbildung 34). pTlc28 bewirkt die periplasmatische Expression der in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Ausgangsmutante Tlc' als Fusionsprotein mit der sogenannten ABD (Albumin-Bindedomäne) in *E. coli* unter der Kontrolle des tet-Promotor/Operator-Systems (Skerra & Nasreen, 2007). Die aus 46 Aminosäuren bestehende Domäne des Proteins G von *Streptococcus* G148 ermöglicht die funktionelle Immobilisierung des Fusionsproteins in Verbindung mit humanem Serumalbumin (HSA; König & Skerra, 1998).

Für den Kolonie-Filterstapeltest wurden mit dem Ligierungsprodukt transformierte *E. coli* TG1-F⁻ Zellen auf eine hydrophile Membran ausplattiert. Nach der Wachstumsphase wurde diese Membran auf eine mit HSA beschichtete hydrophobe Membran überführt und die Produktion des Fusionsproteins mit Anhydrotetracyclin induziert. Das durch partielle Lyse der Bakterienkolonien freigesetzte Fusionsprotein gelangt durch Diffusion zu der mit HSA-beschichteten zweiten Membran und wird dort gebunden. Die so auf der zweiten Membran immobilisierten Varianten wurden im Hinblick auf ihr Bindungsverhalten zu DC-SIGN untersucht.

Dazu wurde die Komplexbildung der Varianten mit DC-SIGN durch Inkubation der zweiten Membran mit 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD_{strepII} ermöglicht und das gebundene Target mit Hilfe eines Digoxigenin-bindenden Antikörpers und einer Farbreaktion sichtbar gemacht (Abbildung 10).

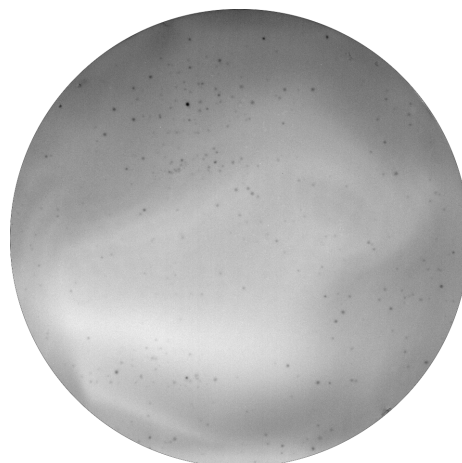


Abbildung 10: Ergebnis des Kolonie-Filterstapeltests zur Untersuchung der durch *Phage Display* angereicherten Tlc'-Varianten. Der Genpool der Tlc'-Varianten aus der Elutionsfraktion des dritten *Phage Display* Selektionszykluses wurde durch einen Kolonie-Filterstapeltest analysiert. Die Fusionsproteine aus Tlc'-Varianten und ABD, die von auf einer hydrophilen Membran wachsenden *E. coli* Kolonien produziert wurden, wurden auf einer darunterliegenden, mit HSA-beschichteten, hydrophoben Membran gebunden. Das Bindungsverhalten der so immobilisierten Tlc'-Varianten gegenüber der DC-SIGN CRD wurde durch Inkubation der Membran mit 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD_{strepII} und anschließender Detektion der DC-SIGN CRD anhand einer von Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat vermittelten Farbreaktion untersucht. Gezeigt ist die entwickelte Membran, auf der *E. coli* Kolonien, die DC-SIGN-bindende Tlc'-Varianten produzieren, als dunkle Flecke zu sehen sind.

Zu den entstandenen Farbpunkten gehörige Bakterienkolonien auf der ersten Membran wurden identifiziert und die Plasmid-DNA aus diesen Klonen präpariert. Die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA aus zwölf Kolonien zeigte, dass insgesamt acht verschiedene Varianten gefunden wurden. Eine der Varianten wurde zweimal, eine andere viermal selektiert (Abbildung 11). Zwei Varianten wiesen ein und zwei Varianten zwei Cysteinreste auf. Ein *Amber*-Stoppkodon (TAG), für das bei der Expression im verwendeten Suppressor-Stamm

TG1-F⁻ ein Glutamin in die Peptidkette eingebaut wird, zeigte sich bei sechs der Varianten. Sieben Varianten wiesen offensichtlich eine konservierte Sequenz in Loop 3 und 4 auf (W83-...-H104-P105-Q106).

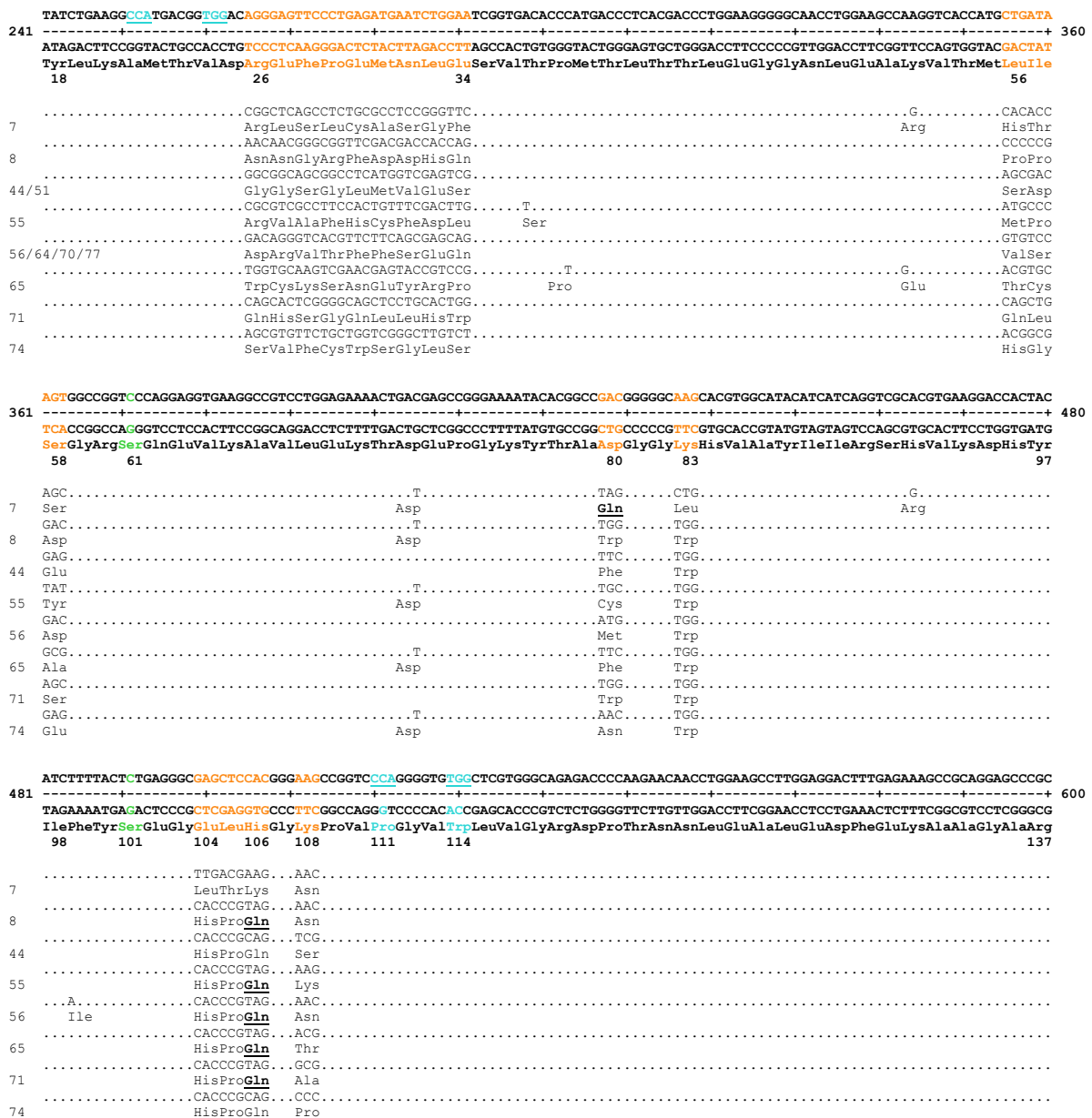


Abbildung 11: Ausschnitt der DNA- und korrespondierenden Aminosäuresequenzen der durch *Phage Display* Selektion erhaltenen Varianten im Vergleich zur Ausgangsmutante Tlc'. Gezeigt sind die Nukleotid- und zugehörigen Aminosäuresequenzen der Ausgangsvariante Tlc' und der erhaltenen Tlc'-Varianten. Diejenigen Aminosäurepositionen von Tlc', die durch ortsgerichtete Mutagenese randomisiert wurden, sind orange gezeigt. Die *Bst*XI-Schnittstellen bzw. die für die Einführung dieser notwendigen Mutationen sind türkis dargestellt. An Aminosäureposition 61 und 101 wurde Cystein durch Serin ersetzt. Diese Positionen sind in grün gezeigt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Tlc'-Varianten ist nur für die randomisierten Bereiche und zusätzlich aufgetretene Mutationen gezeigt.

Bei der Analyse des Bindungsverhaltens dieser Varianten im ELISA zeigte sich allerdings, dass diese Varianten nicht direkt an DC-SIGN binden (Daten nicht gezeigt). Das Farbsignal im Filterstapeltest wurde folglich nicht durch eine Komplexbildung zwischen diesen Varianten und DC-SIGN hervorgerufen, sondern hatte andere Ursachen.

Aus diesem Grund wurden nach einem erneuten Kolonie-Filterstapeltest mit den angereicherten Klonen aus dem dritten Selektionszyklus ausgewählte Varianten mit positivem Signal einer weiteren Analyse mit dieser Art von Test unterzogen (Abbildung 12). Dabei wurde das Bindungsverhalten zu DC-SIGN in einem kompetitiven Ansatz überprüft. Die auf der Membran immobilisierten Varianten wurden mit einem Gemisch aus 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* und 20 µM unmarkierter DC-SIGN CRD*strepII* inkubiert. Die digoxigenerterte DC-SIGN CRD*strepII* wurde detektiert (Abbildung 12, Spalte 1 und 2).

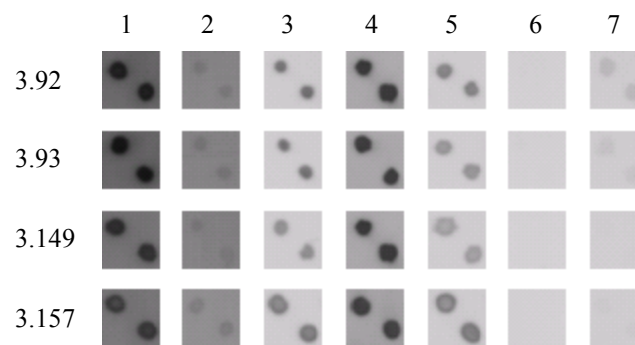


Abbildung 12: Ergebnis des sekundären Kolonie-Filterstapeltests zur Untersuchung der nach dem primären Kolonie-Filterstapeltest ausgewählten Tlc'-Varianten 3.92, 3.93, 3.149 und 3.157. Die auf einer mit HSA beschichteten, hydrophoben Membran immobilisierten Fusionsproteine aus Tlc'-Variante und ABD wurden mit (1) 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA; (2) 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* / 20 µM DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA; (3) 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA; (4) 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRD*strepII* in PBS, 1 mM CaCl₂; (5) 100 nM digoxigenerter DC-SIGN CRDhis-6 in PBS, 1 mM EDTA; (6) 100 nM digoxigenerter Ovalbumin in PBS, 1 mM EDTA sowie (7) 100 nM digoxigenerter Langerin CRD*strepII* in PBS, 1 mM EDTA inkubiert. Die Proteine wurden durch eine von dem Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat vermittelte Farbreaktion sichtbar gemacht. Die entwickelten Membranen der Spalten 1 und 2, bzw. 3 bis 7 stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit den gleichen Klonen.

Nur elf der 91 untersuchten Varianten zeigten im Vergleich zum starken Signal hervorgerufen durch die Bindung an die DC-SIGN CRD*strepII* (Abbildung 12, Spalte 1) ein deutlich schwächeres Signal im kompetitiven Ansatz (Abbildung 12, Spalte 2). Dieses Verhalten wurde erwartet, da die digoxigenerterte DC-SIGN CRD*strepII* durch den 200-fachen Überschuss an unmarkierter DC-SIGN CRD*strepII* verdrängt werden sollte. Varianten, die dieses Verhalten nicht zeigten, wurden verworfen.

Die elf selektierten Varianten wurden einem weiteren Kolonie-Filterstapel-Test unterzogen (Abbildung 12, Spalte 3 bis 7). Dabei wurde das Bindungsverhalten zur digoxigenierten DC-SIGN CRD als *Strep*-tag II- und His₆-tag Variante und in Gegenwart von EDTA oder Calcium untersucht. Des weiteren wurden als Negativkontrollen digoxigeniertes Ovalbumin, welches häufig von kreuzreaktiven Varianten gebunden wird, und das zu DC-SIGN homologe Protein Langerin CRD*strep*II (Holla & Skerra, 2011) als Digoxigenin-Konjugat für die Analyse eingesetzt. Die Varianten 3.92, 3.93, 3.149, 3.157, 3.159, 3.194, 3.195 und 3.198 zeigten Bindung an die DC-SIGN CRD unabhängig vom Affinitätsanhängsel und der Gegenwart von EDTA oder Calcium, jedoch keine oder bloß eine vernachlässigbare Kreuzreaktivität gegenüber Ovalbumin und Langerin.

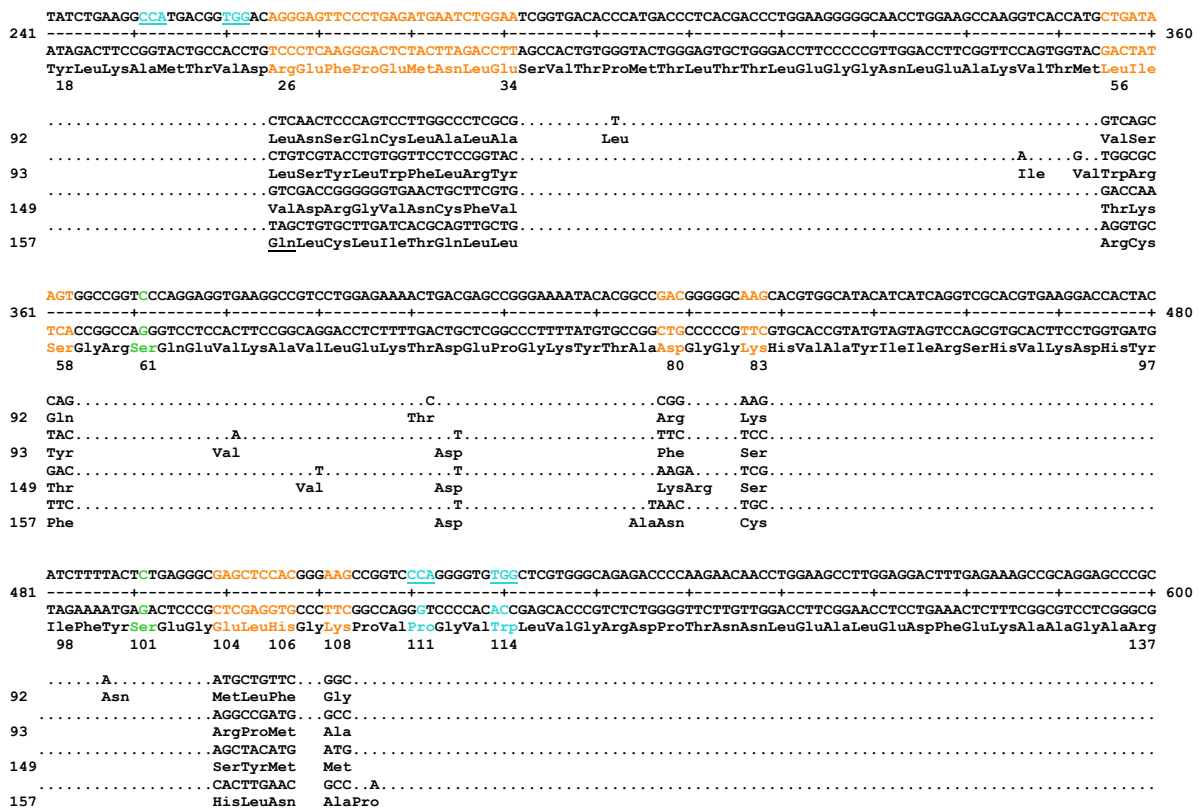


Abbildung 13: Sequenzanalyse ausgewählter Tlc'-Varianten (3.92, 3.93, 3.149 und 3.157). Dargestellt ist die DNA- und korrespondierende Aminosäuresequenz der Tlc'-Ausgangsmutante und ausgewählter Tlc'-Varianten. In orange gezeigt sind die in der Tlc'-Bibliothek randomisierten Bereiche. Die die Genkassette flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen bzw. die für deren Einführung notwendigen Mutationen sind türkis markiert. Grün gezeigt sind die Mutationen, die im Rahmen des Austauschs der Cysteinreste (Aminosäurepositionen 61, 101 und 153) durch Serin erfolgten. Die Variante 3.157 weist ein *Amber*-Stoppkodon (Position 26: TAG) auf, an dessen Position bei der Produktion dieser Variante in dem Suppressorstamm TG1-F⁻ ein Glutamin in die Aminosäurekette eingebaut wird (unterstrichen).

Die Sequenzanalyse dieser ausgewählten Klone lieferte folgende Befunde (Abbildung 13): Eine der kodierten Lipocalin-Varianten wurde zweimal (3.93, 3.198), eine andere viermal (3.157, 3.159, 3.194 und 3.195) gefunden. Alle Varianten zeigten auch Mutationen an nicht randomisierten Aminosäurepositionen. Es ist anzunehmen, dass diese Mutationen durch Fehler der Polymerase bei der Herstellung der Bibliothek entstanden sind. Die Varianten 3.92 und 3.149 wiesen jeweils ein Cystein auf, die Variante 3.157 drei. Bei Variante 3.93 wurden die randomisierten Aminosäuren durch einen ungewöhnlich hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren ersetzt. Durch freie Cysteinreste bzw. durch die Bildung von intra- und intermolekularen Cysteinbrücken können Probleme bei der Herstellung von funktionellen Proteinen entstehen. Diese Gefahr bestand vor allem bei der Variante 3.157. Ein hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren in exponierten Schleifenregionen wie bei der Variante 3.93 führt meist zu einer verstärkten Aggregationstendenz. Aus diesen Gründen wurden zur weiteren Analyse die Varianten 3.92 und 3.149 ausgewählt.

3.2.5 Funktionelle Untersuchungen der Varianten 3.92 und 3.149

Zur funktionellen Untersuchung der Varianten 3.92 und 3.149 wurden deren Gene mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bst*XI auf dem Expressionsplasmid pTlc26 (Anhang, Abbildung 34) subkloniert. pTlc26 kodiert für die periplasmatische Produktion der in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Ausgangsvariante Tlc' mit einem C-terminalen *Strep*-tag II in *E. coli* unter der Kontrolle des tet-Promotor/Operator-Systems (Skerra & Nasreen, 2007).

Da die Varianten 3.92 und 3.149 jeweils einen Cysteinrest trugen, wurde letztere zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Oligodesoxynukleotiden AH3.92.1 und AH3.92.2 bzw. AH3.149.1 und AH3.149.2 jeweils durch Serin ersetzt. Die resultierenden Varianten mit den Mutationen C30S bzw. C32S wurden als 3.92A bzw. 3.149A bezeichnet. Im Folgenden wurden die Varianten 3.92, 3.92A, 3.149 und 3.149A hinsichtlich Sekretionseffizienz in das bakterielle Periplasma, Bindungsaktivität gegenüber DC-SIGN und Epitopspezifität untersucht.

Die Produktion der Varianten erfolgte in *E. coli* JM83 durch periplasmatische Sekretion und Streptavidin-Affinitätschromatographie (Abbildung 14 A). Pro Liter Kultur konnten Ausbeuten von 450 µg für 3.92, 250 µg für 3.92A, 1,6 mg für 3.149 und 350 µg für 3.149A erzielt werden. Bei der anschließenden Größenausschlusschromatographie zeigte sich, dass alle vier Varianten als Gemisch verschiedener Oligomere vorlagen (Abbildung 14 B). Im Fall der Varianten 3.92 und 3.149 bestand der größte Anteil dieses Gemisches aus dimerem Protein. Bei der Analyse der dimeren Fraktion durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen wurde festgestellt (Abbildung 14 A), dass die Dimerisierung sowohl bei 3.92 als auch bei 3.149 zu einem großen Teil kovalent über eine Disulfidbrücke erfolgt. Durch die Eliminierung des Cysteinrests in *Loop* 1

konnte in beiden Fällen eine Erhöhung des Anteils an monomerem Protein erzielt werden (Abbildung 14 B).

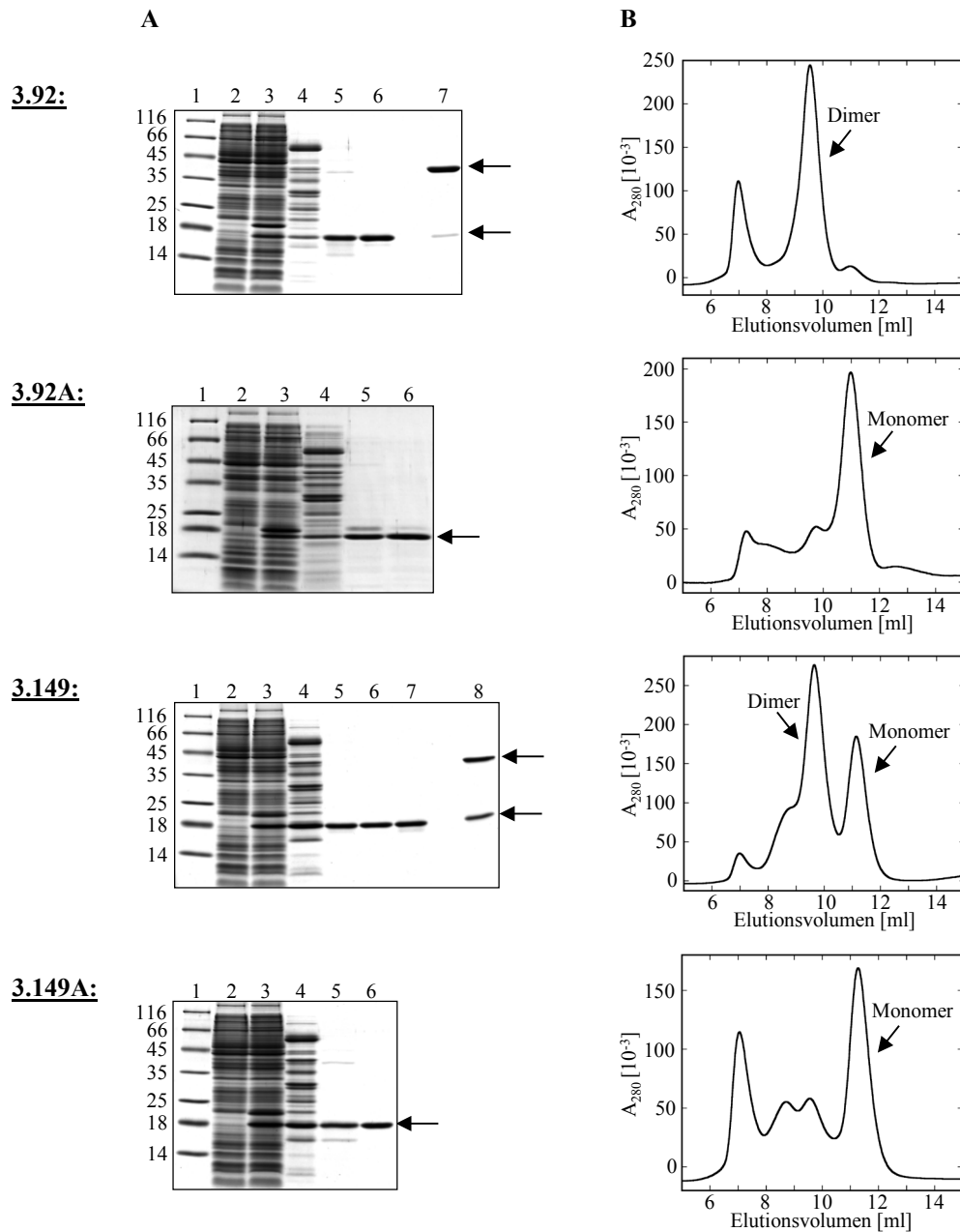


Abbildung 14: Analyse der Produktion und Reinigung der Tlc'-Varianten 3.92, 3.92A, 3.149 und 3.149A. A) Gezeigt ist die Analyse mittels SDS-PAGE der periplasmatischen Produktion der genannten Tlc'-Varianten in *E. coli* und deren anschließende Reinigung durch Streptavidin-Chromatographie und Größenausschlusschromatographie. (1) Proteingrößenstandard (Angaben in kDa); (2) *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion der Genexpression; (3) *E. coli* Zellextrakt nach 2,5-stündiger Induktion der Genexpression; (4) Periplasmaextrakt; (5) vereinigte Elutionsfraktionen nach der Streptavidin-Chromatographie; (6 bis 8) vereinigte Elutionsfraktionen nach der Größenausschlusschromatographie aufgetragen in reduzierendem oder nicht-reduzierendem Puffer; 3.92: (6) dimere Proteinfraction reduzierend aufgetragen; (7) dimere Proteinfraction nicht-reduzierend aufgetragen; 3.149: (6) monomere Proteinfraction reduzierend aufgetragen; (7) dimere Proteinfraction reduzierend aufgetragen und (8) dimere Proteinfraction nicht-reduzierend aufgetragen; 3.92A und 3.149A: (6) monomere Proteinfraction reduzierend aufgetragen. B) Dargestellt ist das Elutionsprofil der

Größenausschlusschromatographie der Varianten 3.92, 3.92A, 3.149 und 3.149A. Aufgetragen wurde jeweils 0,5 mg der Tlc'-Variante auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (10/30) Säule. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min.

Zur Analyse der Bindungsaktivität der Varianten wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem DC-SIGN CRDhis-6 immobilisiert wurde (Abbildung 15). Dabei zeigte sich, dass die monomere Fraktion der Variante 3.92A mit einer K_D von 657 ± 102 nM eine niedrigere Affinität im Vergleich zur dimeren Fraktion der Variante 3.92, mit einer K_D von $62,4 \pm 4,5$ nM, aufwies. Allerdings bindet 3.92 sowie 3.92A stärker an die DC-SIGN CRD als die monomere Fraktion der Variante 3.149 sowie der Variante 3.149A.

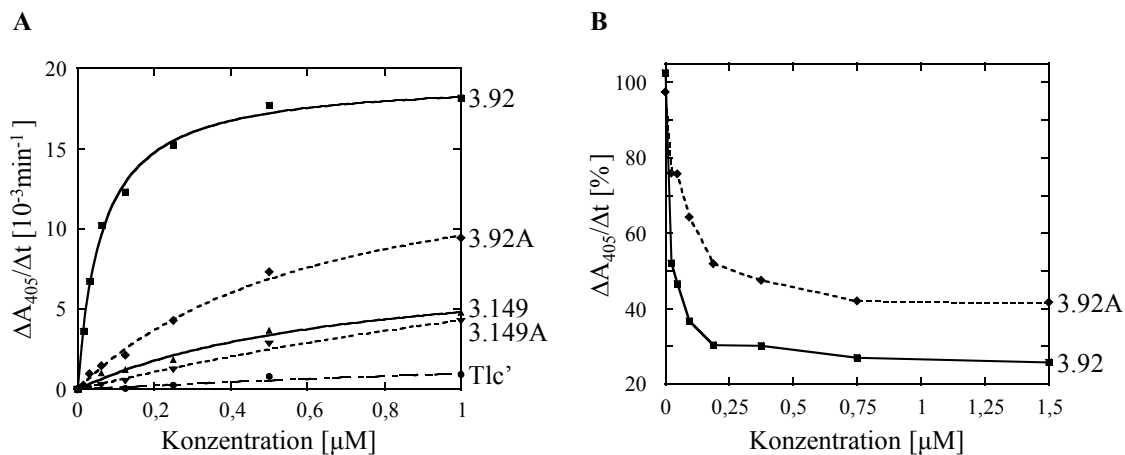


Abbildung 15: ELISAs zur Untersuchung der Bindungsaffinität der Tlc'-Varianten 3.92, 3.92A sowie 3.149 und 3.149A. A) Bindung der Tlc'-Varianten an immobilisiertes DC-SIGN CRDhis-6 in einer Verdünnungsreihe mit Tlc' als Kontrolle. Der Nachweis der gebundenen Tlc'-Varianten erfolgte anhand des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. B) Kompetitiver ELISA zur Untersuchung der Epitopspezifität der Tlc'-Varianten 3.92 und 3.92A. Dazu wurde DC-SIGN CRDhis-6 immobilisiert und einer Mischung aus konstanter Konzentration an digoxigeniertem Agglutinin sowie einer Konzentrationsreihe der Tlc'-Variante in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ inkubiert. Das digoxigenierte Agglutinin wurde schließlich mit dem Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat sichtbar gemacht.

Neben der Bindungsaktivität spielt die Epitopspezifität der Varianten für das weitere Vorgehen eine Rolle. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Varianten die in Abbildung 8 B gezeigte Bindung zwischen immobilisierter DC-SIGN CRDhis-6 und digoxigeniertem Agglutinin zu kompetitieren vermögen. Im Kompetitions-ELISA wurde eine Abnahme an gebundenem Agglutinin mit zunehmender Konzentration von 3.92 oder 3.92A gemessen (Abbildung 15 B). Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass die Varianten 3.92 und 3.92A die Zuckerbindestelle der DC-SIGN CRD blockieren. Für 3.149 und 3.149A konnten keine entsprechenden Ergebnisse erzielt werden (nicht gezeigt).

3.92A ließ sich mit zufriedenstellender Ausbeute von 250 µg pro Liter Kultur und als monomeres Protein produzieren und bindet mit einer Dissoziationskonstante von 657 ± 102 nM gegenüber DC-SIGN (Abbildung 15 A). Des Weiteren wurde für 3.92A Konkurrenz der Bindung zwischen dem *High-Mannose* Typ Glykoprotein Agglutinin und DC-SIGN nachgewiesen (siehe Abbildung 15 B). Diese Beobachtung lieferte Grund zu der Annahme, dass auch die gp120-DC-SIGN Bindung und damit die Bindung von HIV an dendritische Zellen durch 3.92A gestört werden kann. Allerdings ist die Bindung von 3.92A an DC-SIGN mit einer Dissoziationskonstante von 657 ± 102 nM nicht ausreichend für einen medizinisch relevanten Effekt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden versucht, die Dissoziationskonstante durch Affinitätsmaturierung zu verbessern.

3.3 Verbesserung der Bindungsaffinität des Anticalins 3.92A durch Affinitätsmaturierung

Die für die Selektion von 3.92A eingesetzte Bibliothek enthielt mit $1 \cdot 10^9$ Varianten nur einen Bruchteil der bei 18 randomisierten Positionen insgesamt ca. $1 \cdot 10^{27}$ möglichen Varianten. So kann man davon ausgehen, dass die Variante 3.92A an vielen randomisierten Positionen nicht über den optimalen Aminosäurerest für die Bindung an DC-SIGN verfügt. Ferner ist es möglich, dass bislang nicht in die Randomisierungsstrategie einbezogene Aminosäurepositionen ebenfalls eine wichtige Rolle dafür spielen können. Aus diesen Gründen sollte durch eine erneute Zufallsmutagenese von 3.92A in Kombination mit einer stringenteren Selektionsstrategie die Bindungsaffinität zwischen 3.92 und DC-SIGN verbessert werden. Dazu bestand zum einen die Möglichkeit, mittels *Error Prone* PCR Zufallsmutationen über einen weiten Genabschnitt einzuführen. Zum anderen konnte die Zufallsmutagenese auch ortsgerichtet an ausgewählten Positionen erfolgen (Schlehuber & Skerra, 2002). Beide Strategien wurden für die Affinitätsmaturierung von 3.92A angewandt.

3.3.1 Selektion einer Variante von 3.92A mit erhöhter Bindungsaffinität zu DC-SIGN aus einer Error Prone PCR Bibliothek

Für die Affinitätsmaturierung wurde zunächst eine Bibliothek von 3.92A mit Hilfe der *Error Prone* PCR Technik hergestellt, aus der anschließend durch *Phage Display*-Selektion Varianten von 3.92A mit verbesserter Bindungsaffinität zu DC-SIGN gewonnen werden sollten.

Bei der *Error Prone* PCR wird durch geeignete Strategien eine begrenzte Zahl von Mutationen in den amplifizierten Genabschnitt eingeführt. Die Mutagenese kann durch Erhöhung der intrinsischen Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase (Eckert & Kunkel, 1990) oder durch Zugabe von Nukleotidanaloga zur PCR-Reaktion (Zaccolo *et al.*, 1996) erfolgen. Zur Zufallsmutagenese des Anticalins 3.92A wurden die Nukleotidanaloga dPTP, das anstelle

von T oder C in den naszierenden DNA-Strang eingebaut wird, und 8-oxo-dGTP, das anstelle von T oder G eingebaut wird, eingesetzt (Petrie & Joyce, 2010). Die *Error Prone* PCR erfolgte mit dem Plasmid pTlc26.3.92A als Matrize und den Oligodesoxynukleotiden TL50 und TL51 als *Primern*, so dass die Mutationen im Genabschnitt von *Loop* 1 bis 4 eingeführt wurden. Die Konzentrationen der Nukleotidanaloga (jeweils 14 μ M dPTP und 8-oxo-dGTP) wurde so eingestellt, dass durchschnittlich vier (bzw. zwei bis sechs) Mutationen auf Nukleotidebene und drei (bzw. ein bis sechs) Aminosäureaustausche auf Proteinebene auftraten. Das Amplifikat wurde mit dem Restriktionsenzym *Bst*XI verdaut und auf dem ebenfalls mit *Bst*XI geschnittenen Phasmidvektor pTlc27 kloniert. Das Ligierungsprodukt wurde für die Herstellung einer Phagemidbibliothek verwendet. Die Komplexität dieser Bibliothek betrug $5 \cdot 10^8$.

Die Selektion der auf den Phagemiden präsentierten Varianten erfolgte ähnlich der Selektion des Anticalins 3.92A (siehe Abschnitt 3.2.3) mit dem Unterschied, dass die Konzentration des Zielproteins DC-SIGN CRD*strep*II von 100 nM auf 10 nM reduziert wurde. Zur Anreicherung DC-SIGN-bindender 3.92A Varianten wurden drei Selektionszyklen durchgeführt.

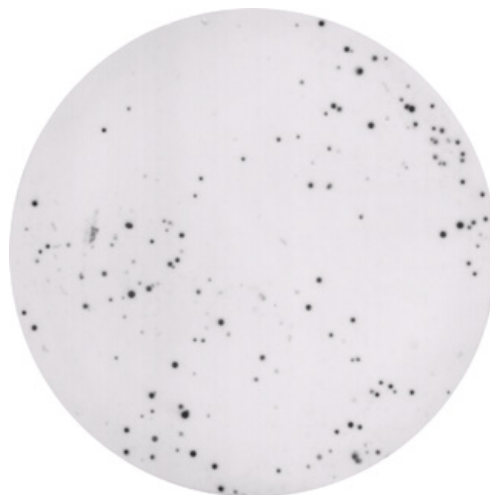
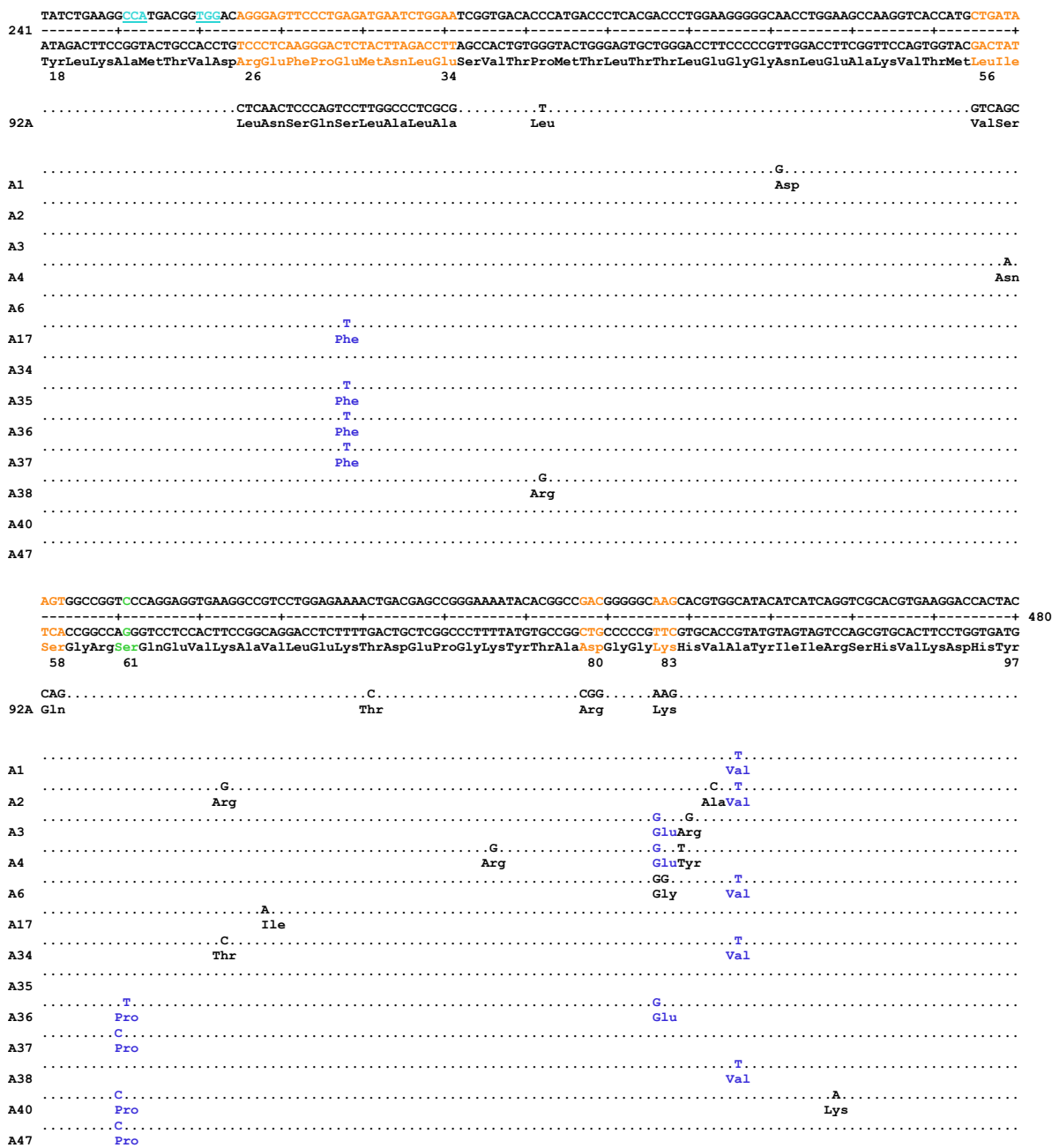


Abbildung 16: Ergebnis des Kolonie-Filterstapeltests zur Untersuchung der durch *Phage Display* angereicherten Tlc'-Varianten aus einer Phagemidbibliothek bei deren Herstellung Punktmutationen durch *Error Prone* PCR in die 3.92A Genkassette eingeführt worden waren. Der Genpool der Tlc'-Varianten der Elutionsfraktion aus dem dritten Zyklus des *Phage Display* Selektionsexperiments wurde durch einen Kolonie-Filterstapeltest untersucht. Das Bindungsverhalten der immobilisierten Tlc'-Varianten wurde durch Inkubation der Membran mit 10 nM digoxigeniertem DC-SIGN CRD*strep*II und anschließender Detektion mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat untersucht.

Die Phasmid-DNA der eluierten Phagemide aus dem dritten Selektionszyklus wurde präpariert und der Genpool der selektierten Varianten mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bst*XI für die weitere Analyse im Kolonie-Filterstapeltests auf dem Plasmid pTlc28 subkloniert. Die

Durchführung des Kolonie-Filterstapeltests erfolgte wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Analog zum Selektionsexperiment wurde allerdings auch hierbei die Konzentration des digoxigenierten Zielproteins DC-SIGN CRD*strepII* von 100 nM auf 10 nM reduziert, um die Stringenz des Experiments zu erhöhen. Die entwickelte Membran zeigte intensive Farbpunkte, wobei sich diese in Intensität und Morphologie unterschieden (Abbildung 16).



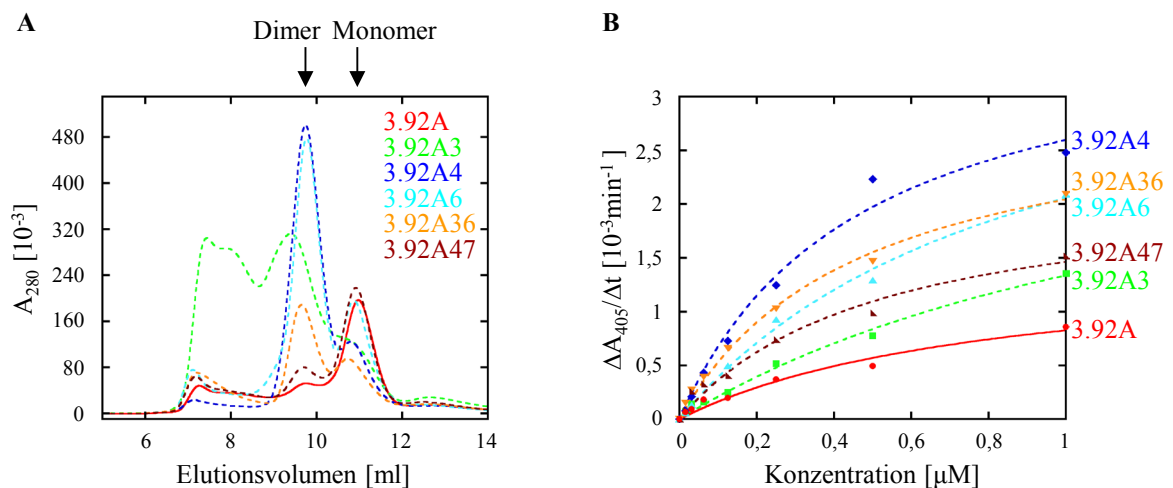


Abbildung 18: Analyse des Oligomerisierungsverhaltens sowie der Bindungsaffinität der monomeren Fraktion ausgewählter 3.92A Varianten (3.92A3, 3.92A4, 3.92A6, 3.92A36 und 3.92A47) gegenüber der DC-SIGN CRD. A) Das Oligomerisierungsverhalten der oben genannten Varianten wurde mittels Größenausschlusschromatographie getestet. Dazu wurden jeweils 0,5 mg der Varianten auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (30/10) Säule aufgetragen. Abgebildet sind die überlagerten Elutionsprofile. B) Ein ELISA Experiment wurde durchgeführt um die Bindungsaffinität der monomeren Fraktion der Varianten gegenüber der DC-SIGN CRD im Vergleich zu 3.92A zu untersuchen. DC-SIGN CRDhis-6 wurde in den Vertiefungen der ELISA Platte immobilisiert und mit einer abnehmenden Konzentration der Varianten inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte über das *Strep*-tagII der Varianten mit dem StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat.

Interessant erschien dagegen die Variante 3.92A4, die fünf Aminosäureaustausche in den Schleifenregionen von *Loop 2* (S57N), *Loop 3* (K83E und H84Y) und *Loop 4* (M104T und G108S) aufwies (Abbildung 17). Die Austausche erfolgten jeweils durch polare Aminosäuren sowie eine negativ geladene. Bemerkenswert sind dabei vor allem die Austausche K83E und H84Y in *Loop 3*, wodurch die positive Ladung dieser Schleifenregion von 3.92A aufgehoben wurde. Die Hauptfraktion dieser Variante (etwa 82 %) eluierte in der Größenausschlusschromatographie allerdings wiederum als Dimer (Abbildung 25). Die Dissoziationskonstante der Komplexbildung zwischen dieser dimeren Fraktion von 3.92A4 und DC-SIGN-CRDhis-6 betrug etwa 75 ± 7 nM (Abbildung 26), so dass gegenüber 3.92A eine Verbesserung um etwa den Faktor 9 erreicht werden konnte.

Ein wichtiger genereller Vorteil von Anticalinen gegenüber Antikörpern besteht allerdings darin, dass sie kleine, monomere Proteine sind. Aus diesem Grund wurde ein erneuter Versuch unternommen, die Affinität des monomeren Anticalins 3.92A gegenüber DC-SIGN zu verbessern.

3.3.2 *Affinitätsmaturierung von 3.92A durch ortsgerichtete Zufallsmutagenese an ausgewählten Positionen und anschließende Selektion*

Eine weitere Strategie zur Affinitätsmaturierung neben der Zufallsmutagenese durch die *Error Prone* PCR-Technik ist die Randomisierung ausgewählter Positionen durch ortsgerichtete Mutagenese (Schlehuber & Skerra, 2002). Neue strukturelle Erkenntnisse über Tlc (Breustedt *et al.*, 2009) gaben Grund zu der Annahme, dass neben den Aminosäureseitenketten der Positionen 56 bis 58 in *Loop 2* auch die Positionen 60 bis 62 und 64 für die Ausbildung neuer Protein-Bindungsfunktionen von Bedeutung sein könnten (siehe Abbildung 4). Aus diesem Grund wurde eine partielle Zufallsbibliothek von 3.92A hergestellt, bei der die Aminosäureposition 60 bis 62, 64 und zusätzlich die schon in der ursprünglichen Bibliothek mutagenisierten Aminosäurepositionen 57 und 58 randomisiert wurden. Die Randomisierung von sechs Positionen führt zu einer möglichen Anzahl von $1 \cdot 10^9$ Varianten. Diese Zahl kann im Prinzip durch eine Phagemidbibliothek abgedeckt werden.

Die Herstellung der Bibliothek erfolgte mit Hilfe einer PCR-Strategie. Der Vektor pTlc26.3.92A diente dabei als Matrize. Zunächst wurden Teilstücke des zu amplifizierenden Bereichs mit den Oligodesoxynukleotiden TL50 und LW2, welches degenerierte Kodons (NNS) an den Aminosäurepositionen 57, 58, 60 bis 62 und 64 aufwies bzw. mit LW1 und TL51 als *Primern* hergestellt. Die Oligodesoxynukleotide LW2 und LW1 hatten am 3'-Ende eine komplementäre Basensequenz. Die separat amplifizierten Teilstücke wurden zusammen mit TL50 und TL51 als *Primern* in eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt. Das dabei erhaltene PCR-Produkt, das die mutagenisierte *BstXI*-Kassette von 3.92A umfasst, wurde mit dem Restriktionsenzym *BstXI* geschnitten und mit dem großen Fragment des entsprechend geschnittenen Phasmidvektors pTlc27 ligiert. Das Ligierungsprodukt wurde zur Herstellung einer Phagemidbibliothek verwendet. Die Komplexität dieser Bibliothek betrug $1 \cdot 10^{10}$.

Die Selektion der von den Phagemiden präsentierten 3.92A-Varianten erfolgte wie in den Abschnitten 3.2.3 und 3.3.1 beschrieben. Zur Anreicherung DC-SIGN-bindender Varianten wurden drei Selektionszyklen durchgeführt. Die Analyse der eluierten Phagemide aus dem dritten Selektionszyklus erfolgte wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben mit Hilfe eines Kolonie-Filterstapeltests (Abbildung 19).

Anhand der Intensität der Farbsignale wurden zehn Klone für weitergehende Untersuchungen ausgewählt (Abbildung 20). Bei der Sequenzierung der jeweiligen Plasmid-DNA zeigte sich, dass der Rest Ser57 bis auf zwei Ausnahmen, bei denen die Seitenkette durch Glutamin oder Glutamat ersetzt worden war, erhalten geblieben ist. Anstelle von Gln58 traten die hydrophoben Aminosäuren Leucin oder Methionin auf. Während sich für Position 60 kein einheitliches Bild ergab, wurde Ser61 hauptsächlich durch die positiv geladenen Aminosäuren

Lysin und Arginin ersetzt. Anstelle Gln62 trat bei den meisten Varianten ein Tyrosin auf. An Position 64 wie auch an Position 60 war keine starke Konservierung zu erkennen. Zwei der Varianten trugen zudem Mutationen außerhalb des randomisierten Bereichs.

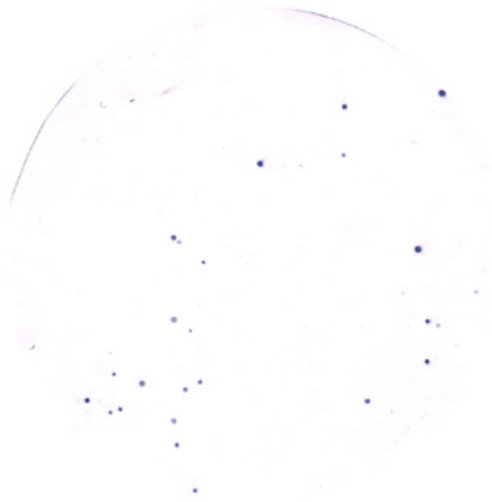


Abbildung 19: Ergebnis des Kolonie-Filterstapeltests zur Untersuchung der durch *Phage Display* angereicherten Tlc'-Varianten aus einer Phagemidbibliothek, bei deren Herstellung eine Randomisierung von ausgewählten Aminosäurepositionen des Anticalins 3.92A erfolgte. Der Genpool der Tlc'-Varianten der Elutionsfraktion aus dem dritten Zyklus des *Phage Display* Selektionsexperiments wurde durch einen Kolonie-Filterstapeltest analog wie in Abbildung 12 beschrieben untersucht.

```

TATCTGAAGGCCA TGACGGTGCACAGGGAGTTCCCTGAGATGAATCTGGAA TCGGTGACACCCATGACCCCTCAGACCCCTGGAAGGGGGCAACTGGAAGCCAAGGTCACCATGCTGATA
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ATAGACTTCCGGTACTGCCACCTGTCCCTCAAGGGACTTACTTAGACCTTAGCCACTGTGGGTACTGGGAGTGC TGGGACCTTCCCCCGTTGGACCTTCGGTTCCAGTGGTACGACTAT
TyrLeuLysAlaMetThrValAspArgGluPheProGluMetAsnLeuGluSerValThrProMetThrLeuThrThrLeuGluGlyGlyAsnLeuGluAlaLysValThrMetLeuIle
18 26 34 56
92A .....CTCAACTCCCAGTCCTTGGCCCTCGCG.....T.....GTCAGC
LeuAsnSerGlnSerLeuAlaLeuAla Leu ValSer
A2.1 .....ACG
Ser
A2.3 .....TCG
Ser
A2.15 .....TCC
Ser
A2.18 .....TCC
Ser
A2.19 .....GAC
Asp
A2.20 .....TCG
Ser
A2.26 .....AGC
Ser
A2.27 .....TCG
Ser
A2.29 .....AAC
Asn
A2.31 .....TCC
Ser

```

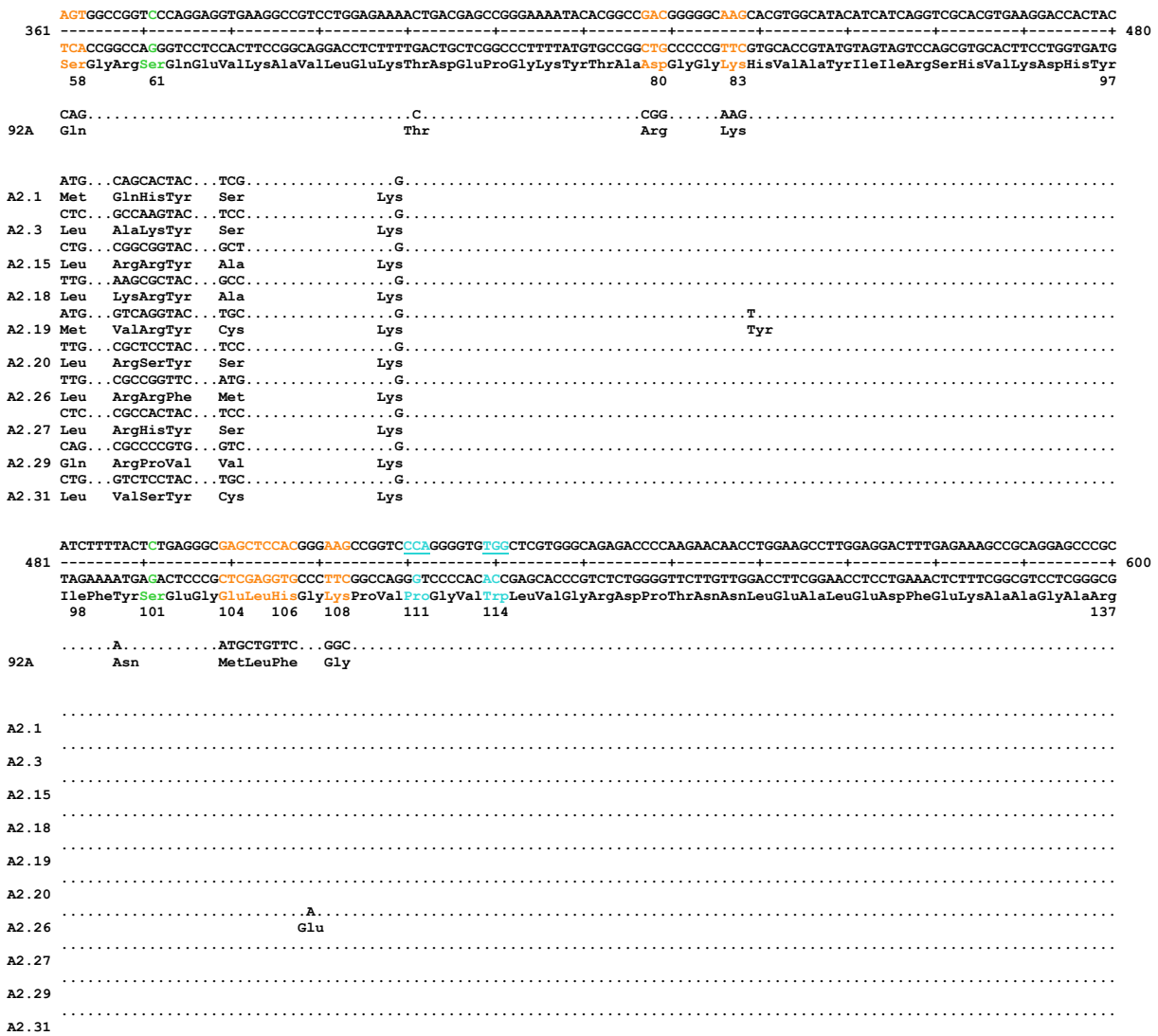


Abbildung 20: Ausschnitt der DNA- und korrespondierenden Aminosäuresequenzen der durch Affinitätsmaturierung von 3.92A mit ortsgerichteter Mutagenese erhaltenen Varianten im Vergleich zur Ausgangsmutante Tlc'. Gezeigt ist die DNA- und Aminosäuresequenz der Ausgangsmutante Tlc', von 3.92A und ausgewählter 3.92A-Varianten. In orange dargestellt sind die in der Tlc'-Bibliothek randomisierten Bereiche. Türkis markiert sind die die Genkassette einschließenden *Bst*XI-Schnittstellen bzw. die für die Einführung dieser notwendigen Mutationen. Grün gezeigt sind die Aminosäurepositionen 61 und 101. An diesen Positionen wurde die Aminosäure Cystein durch Serin ersetzt. Für 3.92A bzw. die 3.92A-Varianten sind nur diejenigen Nukleotid- und Aminosäuresequenzen gezeigt, die sich von Tlc', bzw. 3.92A unterscheiden.

Das *Bst*XI-Genfragment der Varianten 3.92A2.1, 3.92A2.18, 3.92A2.20, 3.92A2.26 und 3.92A2.27 wurde auf dem Expressionsplasmid pTlc26 subkloniert und die Varianten analog zu 3.92A produziert (siehe Abschnitt 3.2.5) um im Folgenden ihr Oligomerisierungsverhalten und ihre Affinität zu DC-SIGN analysieren zu können (Abbildung 21). Alle untersuchten Varianten eluierten als Dimer und Aggregat in der Größenausschlusschromatographiesäule. Eine nennenswerte Monomerfraktion wurde bei keiner der Varianten erhalten (Abbildung 21 A). Im ELISA zeigten die isolierten Dimerfraktionen der Varianten eine erheblich verbesserte Affinität zu der immobilisierten DC-SIGN CRDhis-6 (Abbildung 21 B). Für das

dimere 3.92A2.18 wurde durch Anpassung der Messpunkte an Gleichung 8 eine Dissoziationskonstante von 12 ± 1 nM ermittelt. Gegenüber 3.92A wurde die Affinität zu der DC-SIGN CRD damit um den Faktor 67 verbessert. Eine monomere Variante von 3.92A mit verbesserter Dissoziationskonstante konnte allerdings nicht gefunden werden.

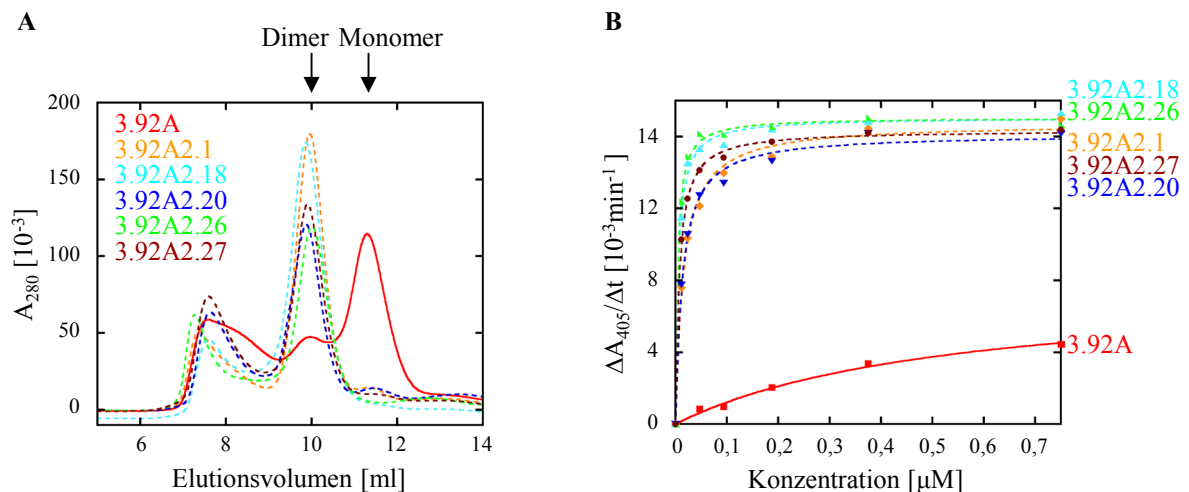


Abbildung 21: Analyse des Oligomerisierungsverhaltens sowie der Affinität der dimeren Fraktion ausgewählter 3.92A-Varianten (3.92A2.1, 3.92A2.3, 3.92A2.18, 3.92A2.20 und 3.92A2.27) gegenüber der DC-SIGN CRD. A) Größenausschlusschromatographie wurde zur Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der Varianten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 0,5 mg der Varianten auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (30/10) Säule aufgetragen. Abgebildet sind die überlagerten Elutionsprofile. B) Um die Bindungsaffinität der dimeren Fraktion der Varianten gegenüber der DC-SIGN CRDhis-6 im Vergleich zu der monomeren Fraktion der Ausgangsvariante 3.92A zu untersuchen, wurde die Bindung an immobilisiertes DC-SIGN CRDhis-6 im ELISA getestet. Der Nachweis der Bindung erfolgte anhand des *Strep*-tag II am C-Terminus der Varianten mit StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat.

3.4 Analyse des Dimerisierungsverhaltens der Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18

Angesichts der ausgeprägten Dimerisierungstendenz der Varianten 3.92A4 sowie 3.92A2.18 wurde analysiert, welche Regionen des Anticalins 3.92A4 für diese Eigenschaft verantwortlich sind. Ebenfalls wurde anhand der dimeren Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 untersucht, ob die Möglichkeit besteht, Mutationen, die für die erhöhte Bindungsaffinität zu DC-SIGN verantwortlich sind, von solchen zu trennen, die zur Dimerisierung dieser Anticaline führen (Zusammenstellung der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 in Abbildung 22).

Für diese Untersuchungen wurden zunächst zwei zusätzliche Restriktionsschnittstellen durch aufeinanderfolgende ortsgerechte Mutagenesen mit den Oligodesoxynukleotiden MSTlc3 und MSTlc4 bzw. MSTlc1 und MSTlc2 in die Expressionsplasmide pTlc26, pTlc26.3.92A und pTlc26.3.92A4 eingeführt. Die resultierenden Plasmide mit den Bezeichnungen pTlc26',

entsprechend bei 3.92A4'2 die Aminosäuresequenz von *Loop 2*, usw. Alle resultierenden Varianten, d.h. 3.92A4', 3.92A4'1, 3.92A4'2, 3.92A4'3 und 3.92A4'4, wurden analog zu 3.92A in *E. coli* produziert (siehe Abschnitt 3.2.5) und mittels Größenausschlusschromatographie sowie ELISA untersucht (Abbildung 23).

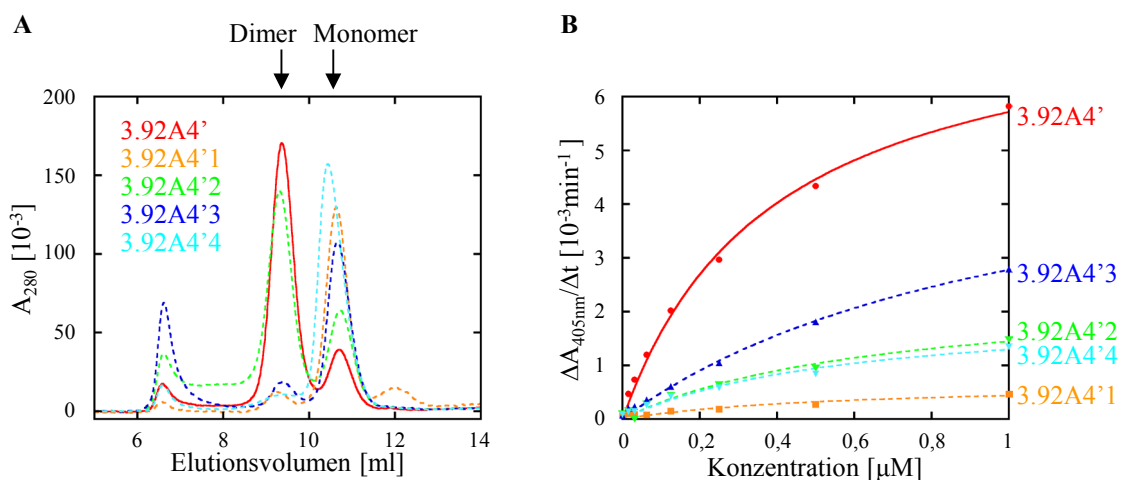


Abbildung 23: Analyse des Dimerisierungsverhaltens von 3.92A4-Varianten mit ausgetauschten Schleifenregionen sowie der Bindungsaffinität gegenüber DC-SIGN. A) Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens dieser Varianten. Jeweils 0,5 mg der Varianten wurde auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (30/10) Säule aufgetragen. B) Bindungsaffinität der monomeren Fraktion dieser Varianten gegenüber der DC-SIGN CRD im Vergleich zu der monomeren Fraktion der Ausgangsvariante 3.92A4' wurde mittels ELISA getestet. Zu diesem Zweck wurde DC-SIGN CRDhis-6 in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der monomeren Fraktion der oben beschriebenen Varianten inkubiert. Der Nachweis der Bindung der Tlc'-Varianten erfolgte über das *Strep*-tag II mit dem StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat.

Wie 3.92A4 eluierte auch die Variante 3.92A4' hauptsächlich als Dimer in der Größenausschlusschromatographie. Wurde dagegen jeweils die Aminosäuresequenz der *Loops* 1, 3 oder 4 von 3.92A4' gegen die Sequenz von Tlc' ausgetauscht, so eluierten die resultierenden Varianten (3.92A4'1, 3.92A4'3 und 3.92A4'4) hauptsächlich als monomere Proteine. Wurde die Aminosäuresequenz von *Loop 2* (3.92A4'2) gegen die von Tlc' ersetzt, war das Verhältnis von Monomer zu Dimer im Vergleich zu 3.92A4' nur leicht zu Gunsten des Monomers verschoben (Abbildung 23 A).

Die Affinität zu DC-SIGN CRDhis-6 im ELISA war bei den Monomerfraktionen der Varianten 3.92A4'2, 3.92A4'3 und 3.92A4'4 im Vergleich zu der der Monomerfraktion von 3.92A4' deutlich erniedrigt. Bei 3.92A4'1 konnte keine Bindung zu DC-SIGN CRDhis-6 festgestellt werden (Abbildung 23 B). Für die Dimerisierung von 3.92A4 waren folglich vor allem *Loop 1* und 4 sowie *Loop 3* verantwortlich. Die Affinität von 3.92A4 zu DC-SIGN wurde maßgeblich von *Loop 1*, aber auch von *Loop 2* und 4 vermittelt.

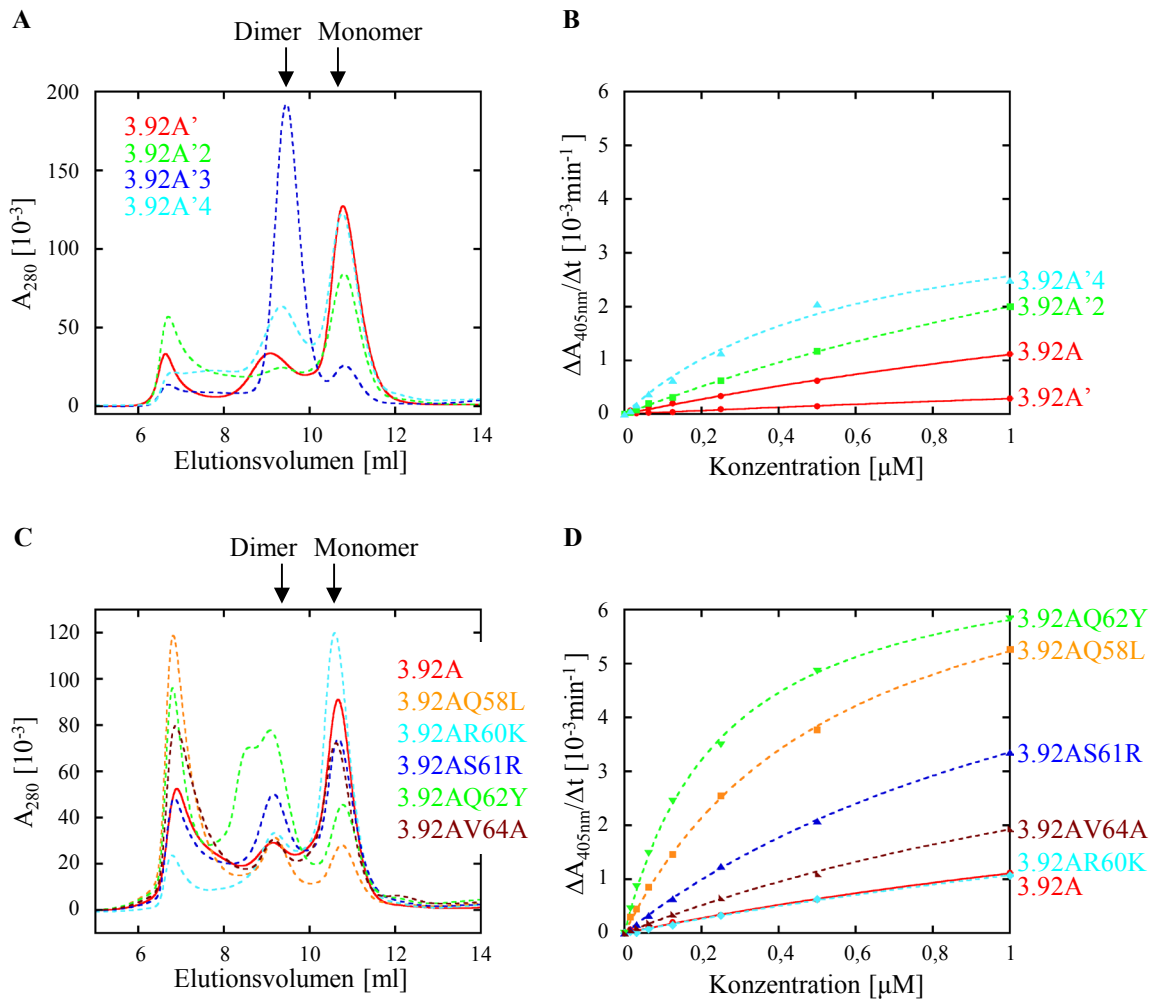


Abbildung 24: Analyse von Mutationen der Varianten 3.92A4 sowie 3.92A2.18 im Hinblick auf die Affinität zur DC-SIGN CRD sowie deren Dimerisierungseigenschaft. A und C) Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Dimerisierungseigenschaften. Jeweils 0,5 mg der Varianten wurde auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (30/10) Säule aufgetragen. B und D) Die Bindungsaffinität der monomeren Fraktion der Varianten gegenüber DC-SIGN im Vergleich zu der monomeren Fraktion der Ausgangsvariante 3.92A wurde mittels ELISA getestet. Dazu wurde DC-SIGN CRDhis-6 in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der monomeren Fraktion der oben beschriebenen Varianten inkubiert. StrepTactin-Alkalische-Phosphatase Konjugat diente zum Nachweis der an die DC-SIGN CRD gebundenen Varianten über das *Strep*-tag II.

Zur Analyse der aus den Affinitätsmaturierungen hervorgegangenen Mutationen von 3.92A4 und 3.92A2.18 wurden zunächst Varianten von 3.92A hergestellt. Durch Subklonierung wurden einzeln die Schleifenregionen 2, 3 bzw. 4 des Anticalins 3.92A' durch diejenigen von 3.92A' ersetzt: 3.92A'2 mit S57N, 3.92A'3 mit K76R, K83E und H84Y, 3.92A'4 mit M104T und G108S. Des Weiteren wurden die Mutationen des Anticalins 3.92A2.18 in der Schleifenregion *Loop 2* durch ortsgerichtete Mutagenese einzeln in 3.92A eingeführt (Varianten: 3.92A(Q58L), 3.92A(R60K), 3.92A(S61R), 3.92A(Q62Y) und 3.92A(V64A)).

Dazu wurden die Oligodesoxynukleotide Q58L und Q58Lrev, R60K und R60Krev, S61R und S61Rrev, Q62Y und Q62Yrev sowie V64A und V64Arev verwendet.

Die resultierenden Varianten wurden analog zu 3.92A in *E. coli* produziert (siehe Abschnitt 3.2.5) und mittels Größenausschlusschromatographie sowie ELISA untersucht, um wiederum zu analysieren, ob eine Trennung der Verbesserung der Bindungsaffinität von 3.92A4 und 3.92A2.18 im Vergleich zu 3.92A von der Dimerisierungstendenz dieser Varianten möglich ist (Abbildung 24).

Dabei stellte sich heraus, dass alle untersuchten Varianten mit Ausnahme von 3.92A'4 und 3.92A(R60K) im Vergleich zu 3.92A eine erhöhte Oligomerisierungstendenz aufwiesen (Abbildung 24 A). Für die Monomerfraktion von 3.92A'4 und 3.92A(R60K) konnte dagegen keine zufriedenstellende Erhöhung der Bindungsaffinität zur DC-SIGN CRDhis-6 festgestellt werden (Abbildung 24 B).

Bei diesen Untersuchungen stellte sich also heraus, dass sich die für die Dimerisierung maßgebliche Region von 3.92A4 über die drei Schleifenelemente 1, 4 und 3 ausdehnt, wobei zwei dieser Schleifenelemente – 1 und 4 – ebenso eine wichtige Rolle bei der Bindung dieses Anticalins an DC-SIGN spielen. Andererseits zeigte sich, dass einzelne Mutationen von 3.92A4 und 3.92A2.18, eingeführt in 3.92A nicht in einer Verbesserung der Affinität gegenüber DC-SIGN unabhängig von der Oligomerisierungstendenz resultierten. Eine Trennung von Strukturelementen dieser Anticaline, die an der DC-SIGN-Bindung beteiligt sind, von denjenigen, die die Oligomerisierung verursachen, war auf diese Weise demnach nicht möglich. Aus diesem Grund bildeten die hier untersuchten Varianten keine vielversprechende Grundlage für eine erneute Affinitätsmaturierung.

3.5 Funktionelle Charakterisierung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18

Um genauere Erkenntnisse über die Bindung von 3.92A (siehe Abschnitt 3.2.5) sowie der maturierten Varianten 3.92A4 (siehe Abschnitt 3.3.1) und 3.92A2.18 (siehe Abschnitt 3.3.2) an DC-SIGN zu erlangen, wurden vergleichende Analysen durchgeführt. Dazu wurden ELISA, Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (BIACORE) sowie Fluoreszenz-Anisotropiespektroskopie eingesetzt. Für diese Untersuchungen wurden homogene Präparationen von monomerem 3.92A und dimerem 3.92A4 sowie 3.92A2.18 jeweils durch periplasmatische Produktion in *E. coli* und anschließende Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie hergestellt (analog zu 3.92A, siehe Abschnitt 3.2.5 und Abbildung 25).

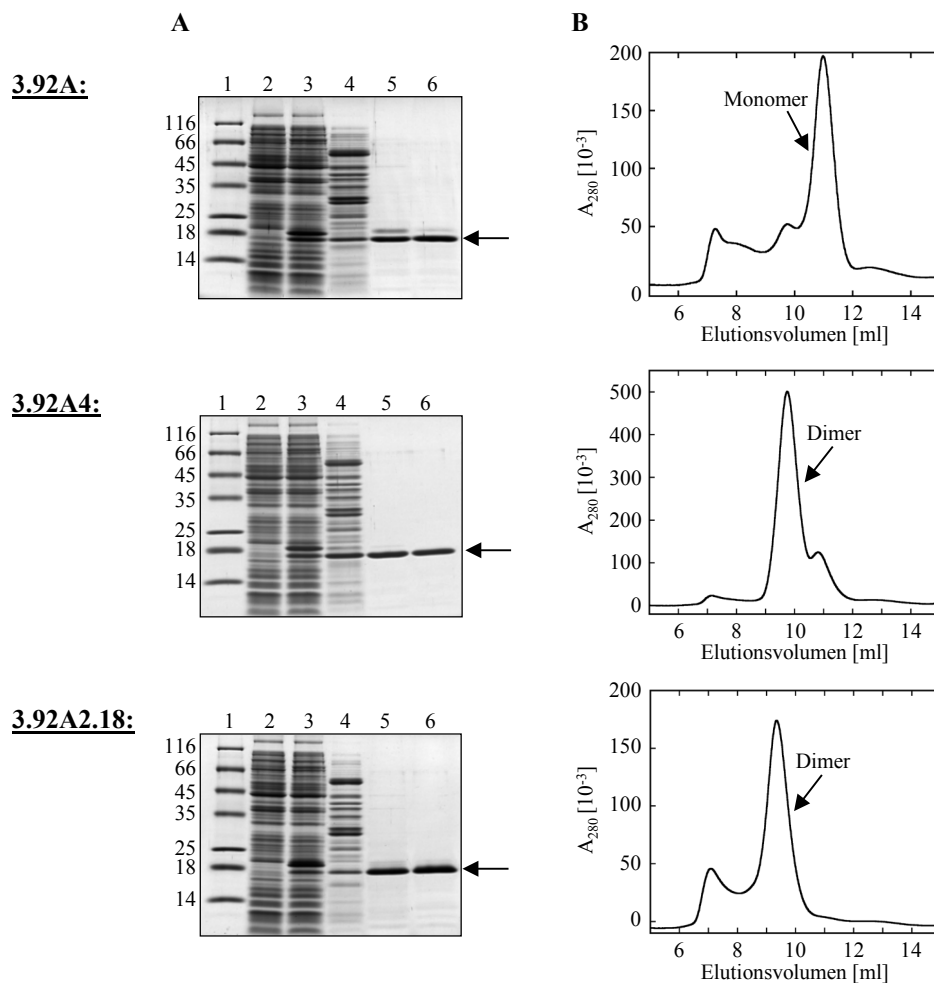


Abbildung 25: Produktion und Reinigung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18. Dargestellt ist die SDS-PAGE der periplasmatischen Produktion der Tlc'-Varianten in *E. coli* und die anschließende Reinigung durch Streptavidin-Chromatographie (A) und Größenausschlusschromatographie (B). A) Spur 1, Proteingrößenstandard (Angaben in kDa); 2, *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion der Genexpression; 3, *E. coli* Zellextrakt nach 2,5-stündiger Induktion der Genexpression; 4, Periplasmaextrakt; 5, vereinigte Elutionsfraktionen nach der Streptavidin-Chromatographie; 6, vereinigte Elutionsfraktionen nach der Größenausschlusschromatographie. B) Auf eine mit PBS, 1 mM EDTA äquilibrierte S75 Superdex (10/30) Säule wurden jeweils 0,5 mg der Anticaline aufgetragen.

3.5.1 Untersuchung der Bindung der Anticaline an DC-SIGN durch ELISA

Die Bindung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 im Vergleich zu Tlc' an immobilisiertes DC-SIGN CRDhis-6 wurde in einem ELISA untersucht (Abbildung 26). Dabei wurden für die Anticaline konzentrationsabhängige Bindungssignale beobachtet, während Tlc' kein Signal zeigte. Die durch Anpassung der Messpunkte an Gleichung 8 erhaltenen Dissoziationskonstanten waren: 712 ± 44 nM für 3.92A, 72 ± 7 nM für 3.92A4 und $11,6 \pm 0,5$ nM für 3.92A2.18. Damit gelang bei den Affinitätsmaturierungen eine 9 bzw. 67-fache Erhöhung der Bindungsaffinität von 3.92A4 bzw. 3.92A2.18 im Vergleich zu 3.92A.

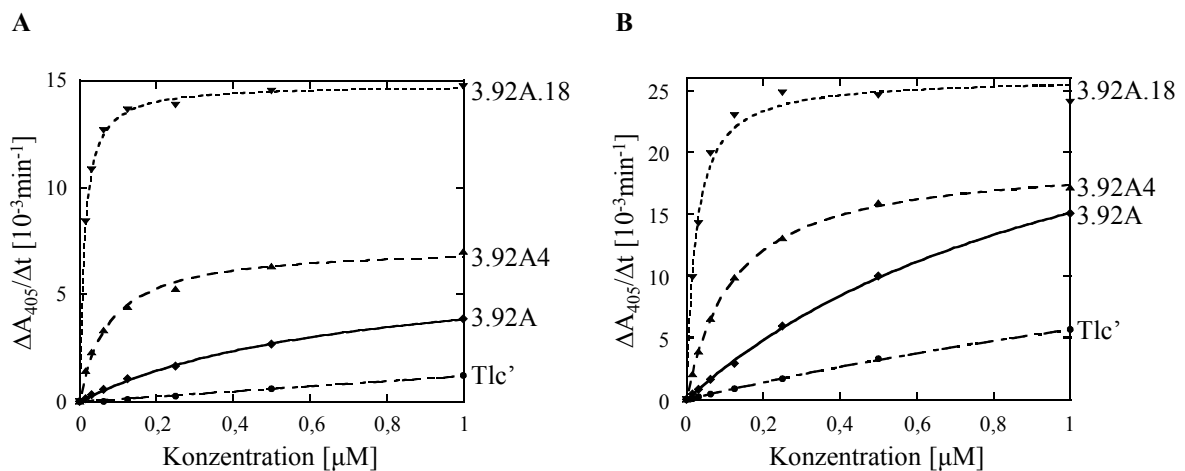


Abbildung 26: Bindungsanalyse der maturierten Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 im Vergleich mit dem Anticalin 3.92A und dem Originalipocalin Tlc'. A) Dargestellt ist das Ergebnis eines ELISA, bei dem die Bindung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 sowie des Tlc' an immobilisiertes DC-SIGN CRD untersucht wurde. Dazu wurde DC-SIGN CRDhis-6 in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und daraufhin mit einer Verdünnungsreihe mit den Tlc'-Varianten inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Anticaline erfolgte mit StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Die Anpassung der Messpunkte wurde durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung 8 vorgenommen. Die so bestimmten Dissoziationskonstanten betragen: 712 ± 44 nM für 3.92A, 75 ± 7 nM für 3.92A4 und $11,6 \pm 4,7$ nM für 3.92A2.18. B) Gemessen wurde die Bindung der digoxigenierten Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 und von Tlc' an die DC-SIGN ECD $strep$ II im ELISA. Dazu wurde DC-SIGN ECD $strep$ II in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit den digoxigenierten Anticalinen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Anticaline erfolgte mit Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat.

Für vorangegangene Untersuchungen wurde die CRD von DC-SIGN für die Analyse der Bindung der Anticaline eingesetzt. *In vivo* liegt DC-SIGN jedoch als Tetramer vor. Die Tetramerisierung wird durch die sogenannten *Neck Repeats*, die wie die CRD in der extrazellulären Domäne (ECD) lokalisiert sind, vermittelt. Um auszuschließen, dass die Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 an eine Region der DC-SIGN CRD binden, die durch die Tetramerisierung unzugänglich wird, wurde ein ELISA mit immobilisierter DC-SIGN ECD $strep$ II (siehe Abschnitt 3.1.2) als Bindungspartner für die Anticaline durchgeführt (Abbildung 26 B). Auch mit dieser Form des Zielproteins wurde eine Interaktion von 3.92A, 3.92A4 sowie 3.92A2.18 und rekombinantem DC-SIGN nachgewiesen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Anticaline im Prinzip *in vivo* an DC-SIGN binden können.

3.5.2 Untersuchung der Epitopspezifität der Anticaline mittels kompetitivem ELISA

Die Eigenschaft der maturierten Anticaline, die Bindung zwischen immobilisierter DC-SIGN CRDhis-6 und digoxigeniertem Agglutinin aus Sojabohnen zu kompetieren, wurde auch im ELISA analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass die Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 wie auch 3.92A digoxigeniertes Agglutinin konzentrationsabhängig aus der Bindung an die immobilisierte DC-SIGN CRDhis-6 verdrängen (Abbildung 27), so dass offensichtlich deren

Zucker-Bindungsstelle als Epitop erkannt wird. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Anticaline auch die Bindung zwischen DC-SIGN und anderen *High Mannose* Typ Glykoproteinen, wie z.B. dem HIV Hüllprotein gp120, stören können.

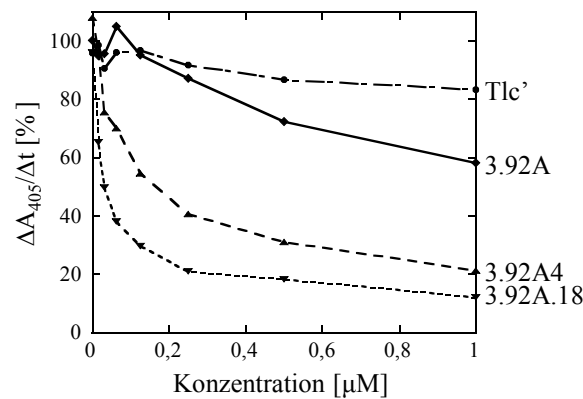


Abbildung 27: Analyse der Epitopspezifität der maturierten Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 im Vergleich mit dem Anticalin 3.92A. Dargestellt ist das Ergebnis eines kompetitiven ELISAs. Dazu wurde DC-SIGN CRDhis-6 in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte immobilisiert und mit einem Gemisch aus einer konstanten Konzentration von digoxigeniertem Agglutinin aus Sojabohnen und einer abnehmenden Konzentration der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 sowie von Tlc' in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 inkubiert. Das an DC-SIGN gebundene Agglutinin wurde mit Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat quantifiziert.

3.5.3 Untersuchung der Assoziations- und Dissoziationsraten der Bindung der Anticaline an immobilisiertes DC-SIGN mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Mit der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (unter Einsatz des BIACORE-Systems) lässt sich die Bindung von Proteinen an ein immobilisiertes Zielmolekül verfolgen. Aus den erhaltenen zeitabhängigen Bindungskurven können die Assoziations- und Dissoziationsraten (k_a und k_d) bestimmt werden (Huber *et al.*, 1999). So können neben den Dissoziationskonstanten, die bereits im ELISA-Experiment ermittelt wurden, zusätzliche Erkenntnisse über die Bindung der Anticaline an DC-SIGN gewonnen werden.

Zur Messung der Bindung der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 an DC-SIGN mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurde DC-SIGN CRD*strepII* durch Aminokopplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Anschließend wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der Anticaline 3.92A, 3.92A4 bzw. 3.92A2.18 über die immobilisierte DC-SIGN CRD geleitet und die Assoziation bzw. Dissoziation im Sensorgramm verfolgt. Trotz einer Injektionszeit von 420 s im Fall von 3.92A bzw. 1080 s im Fall von 3.92A4 und 3.92A2.18 wurde die Gleichgewichtsphase nicht erreicht. Die Auswertung erfolgte durch Anpassung der Messkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der BIAevaluation Software (Abbildung 28).

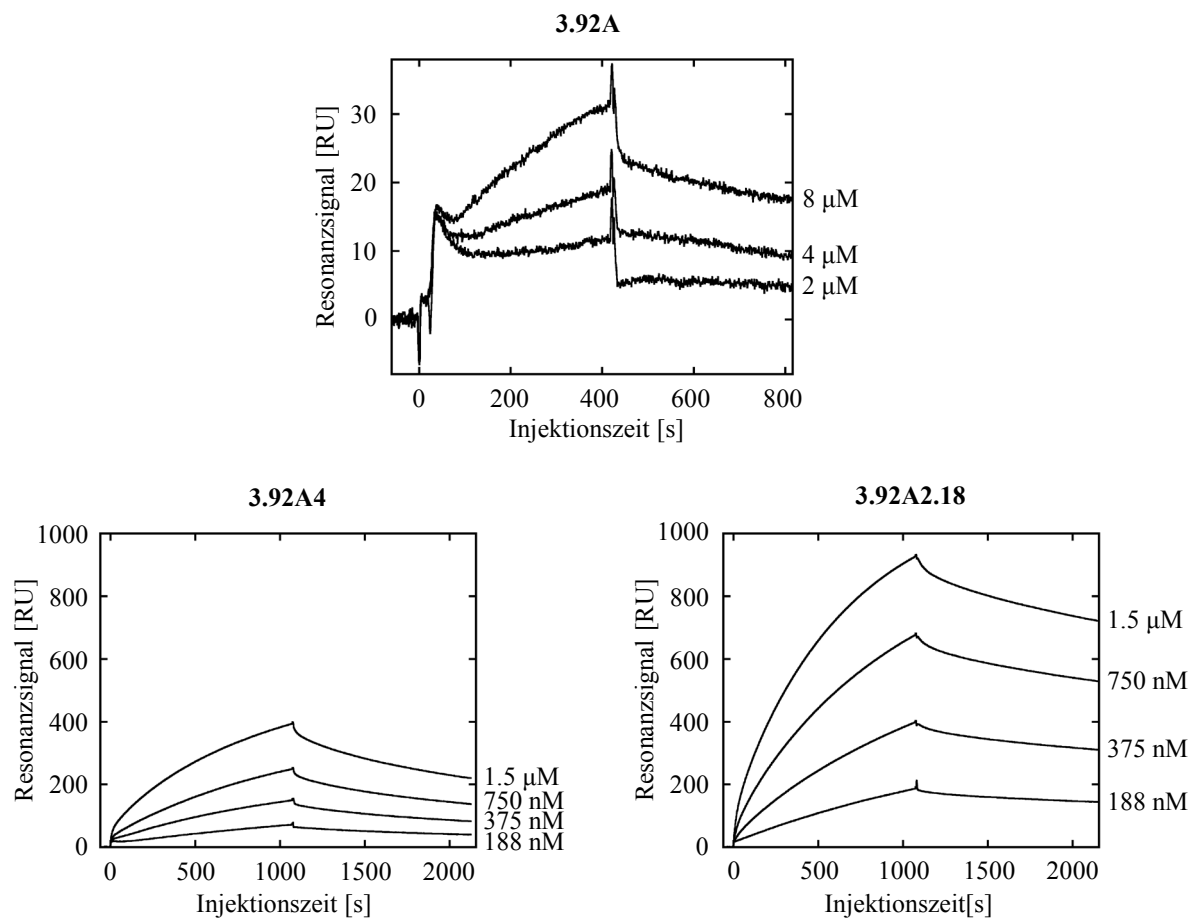


Abbildung 28: Zeitabhängige Analyse der Bindung zwischen den Anticalinen 3.92A, 3.92A4 bzw. 3.92A2.18 und DC-SIGN durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Dazu erfolgte die kovalente Immobilisierung von 870 RU DC-SIGN CRD $_{strepII}$ durch Aminkopplung an die Carboxymethyloberfläche eines CM-5 *Sensorchips*. 35 μ l der Proteinlösung im Fall 3.92A oder 90 μ l im Fall von 3.92A4 und 3.92A2.18 in PBS, 1 mM EDTA, 0,005 % Tween 20 wurden bei einer Flussrate von 5 μ l/min eingeleitet. Die Dissoziation der Anticaline wurde für 420 s im Fall von 3.92A bzw. für 1080 s im Fall von 3.92A4 und 3.92A2.18 aufgenommen. Bei den gezeigten Sensorgrammen erfolgte eine Korrektur des Signals mit dem aus dem Kontrollkanal. Folgende Dissoziationskonstanten wurden ermittelt: 5,83 μ M für 3.92A, 580 nM für 3.92A4 und 148 nM für 3.92A2.18.

Im Fall des monomeren Anticalins 3.92A zeigte sich eine recht schwache, aber spezifische Bindung an DC-SIGN. Im Kontrollkanal wurde keine nennenswerte Zunahme des Resonanzsignals aufgezeichnet (Daten nicht gezeigt). Sowohl Assoziation ($k_a = 101 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als auch Dissoziation ($k_d = 5,89 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) verlief ausgesprochen langsam. Aus k_a und k_d wurde eine Dissoziationskonstante von 5,83 μ M und eine Halbwertszeit der Dissoziation von 19,6 min berechnet. Für das maturierte Anticalin 3.92A4 wurde $k_a = 767 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_d = 4,45 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Gegenüber 3.92A gelang demnach vor allem eine Verbesserung der Assoziationsrate. Die Dissoziationskonstante betrug 580 nM, die Halbwertszeit der Dissoziation 25,8 min. Demgegenüber wies das Anticalin 3.92A2.18, das wie das Anticalin 3.92A4 ausgehend von 3.92A durch Mutagenese erhalten wurde, eine weitere Verbesserung der Assoziations- und Dissoziationsrate auf ($k_a = 1,11 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_d = 1,65 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

Die aus den kinetischen Parametern resultierende Dissoziationskonstante betrug 148 nM, die Halbwertszeit 69,7 min.

3.5.4 Analyse der Bindung zwischen den Anticalinen und DC-SIGN in Lösung mittels Fluoreszenz-Anisotropiespektroskopie

Durch die ungerichtete Immobilisierung von DC-SIGN bei den ELISA- und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie-Untersuchungen, kann es zu Nebeneffekten kommen. Beispielsweise kann ein Aviditätseffekt auftreten durch den die apparente Bindungsaffinität zwischen den Anticalinen und DC-SIGN erhöht wird. Aus diesem Grund wurde noch eine weitere Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstante angewandt, bei der eine Immobilisierung des Zielproteins nicht notwendig ist, die Fluoreszenz-Anisotropiespektroskopie.

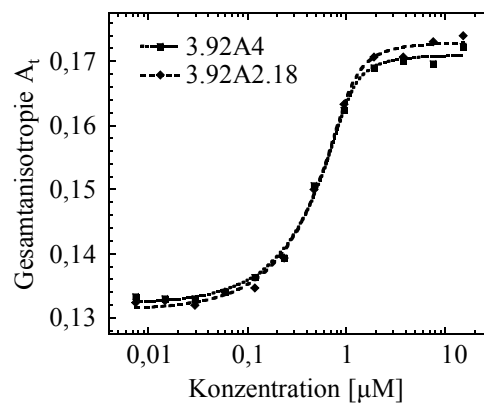


Abbildung 29: Fluoreszenz-Anisotropiemessung zur Bestimmung der Affinität zwischen 3.92A4 sowie 3.92A2.18 und DC-SIGN in Lösung. Mischungen mit zunehmender Konzentration der Anticaline und 1 µM Fluorescein-markierter DC-SIGN CRD_{strepII} wurden hergestellt. Nach der Inkubation dieser Proben für mindestens 2 h erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenz-Anisotropie in einem Perkin Elmer LS50B Fluoreszenzspektrometer mit Polarisationsfiltern unter folgenden Bedingungen: Anregungswellenlänge, 495 nm; Emissionswellenlänge, 520 nm; Temperatur, 25 °C. Die Anpassung der Messpunkte erfolgte durch nicht-lineare Regression gemäß Gleichung 30. Die dabei erhaltenen Dissoziationskonstanten betragen 48 ± 17 nM für 3.92A4 und 59 ± 17 nM für 3.92A2.18.

Zur Untersuchung der Affinität zwischen den Anticalinen 3.92A, 3.92A4 sowie 3.92A2.18 und DC-SIGN wurde Fluorescein-markiertes DC-SIGN CRD_{strepII} hergestellt. Die Anisotropie dieser Fluorescein-markierten Probe wurde in Abwesenheit und Anwesenheit der Anticaline vermessen. Da die Anisotropie abhängig von der Geschwindigkeit der Eigenrotation und damit von der Gesamtgröße des fluoreszierenden Moleküls ist, ändert sich die gemessene Anisotropie bei der Komplexbildung zwischen dem Anticalin und der Fluorescein-markierten DC-SIGN CRD_{strepII} (Park & Raines, 2004). Die Anisotropieänderung wurde in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Anticalins bestimmt,

so dass durch Anpassung der Messpunkte an Gleichung 30 die Dissoziationskonstante bestimmt werden konnte (Abbildung 29).

Für die Bindung von 3.92A4 und 3.92A2.18 an die Fluorescein-markierte DC-SIGN CRD*strepII* wurde eine Sättigungskurve im Bereich von 0 bis etwa 15 μM Anticalin aufgenommen. Die aus diesen Kurven abgeleiteten Dissoziationskonstanten betragen $48 \pm 17 \text{ nM}$ für 3.92A4 sowie $59 \pm 17 \text{ nM}$ für 3.92A2.18. Zur Bindung von 3.92A an die Fluorescein-markierte DC-SIGN CRD*strepII* konnte in diesem Konzentrationsbereich keine vollständige Sättigungskurve aufgenommen werden (Daten nicht gezeigt).

3.6 Physikochemische und strukturelle Untersuchungen der Anticaline

3.6.1 Untersuchung der Sekundärstruktur der Anticaline

Bei der Mutagenese und Selektion der DC-SIGN-bindenden Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 wurden 17, 20 bzw. 21 Aminosäurereste gegenüber Tlc' ausgetauscht. Um eine qualitative Aussage über die durch den Austausch der Aminosäurereste verursachten strukturellen Änderungen treffen zu können, wurden CD-Spektren dieser Proteine aufgenommen.

In dem untersuchten Wellenlängenbereich zwischen 190 und 250 nm sind die CD-Spektren von Proteinen vorwiegend durch deren Sekundärstruktur bestimmt (Greenfield, 2007). Das CD-Spektrum von Tlc' entspricht dem eines Proteins mit β -Faltblattstruktur, das des monomeren Anticalins 3.92A unterscheidet sich davon praktisch nicht (Abbildung 30 A). Im Fall der CD-Spektren der dimeren Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 ist das Minimum der molaren Elliptizität bei 206 nm im Vergleich zu Tlc' und 3.92A verringert. Insgesamt zeigten die CD-spektroskopischen Untersuchungen aber, dass bei den hier untersuchten Tlc'-Varianten grundsätzlich eine β -Faltblattstruktur und damit wahrscheinlich die β -Barrel-Gerüststruktur erhalten geblieben ist.

3.6.2 Thermische Stabilität der Anticaline

Neben der Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen lässt sich mit Hilfe von CD-Spektroskopie auch die thermodynamische Faltungsstabilität untersuchen (Schmid, 1989). Dazu wurde die Änderung des Sekundärstrukturgehalts der Anticaline durch Bestimmung der molaren Elliptizität bei 214 nm über einen Temperaturbereich von 25 °C bis 95 °C gemessen (Abbildung 30 B). Die erhaltenen Denaturierungskurven wurden nach der Methode von Cohen und Pielak ausgewertet (Cohen & Pielak, 1994). Für die Ausgangsvariante Tlc' wurde eine Schmelztemperatur von 72,5 °C bestimmt, die Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 zeigten im Vergleich zu Tlc' erniedrigte Schmelztemperaturen von 47,2 °C, 53,6 °C und 54,2 °C.

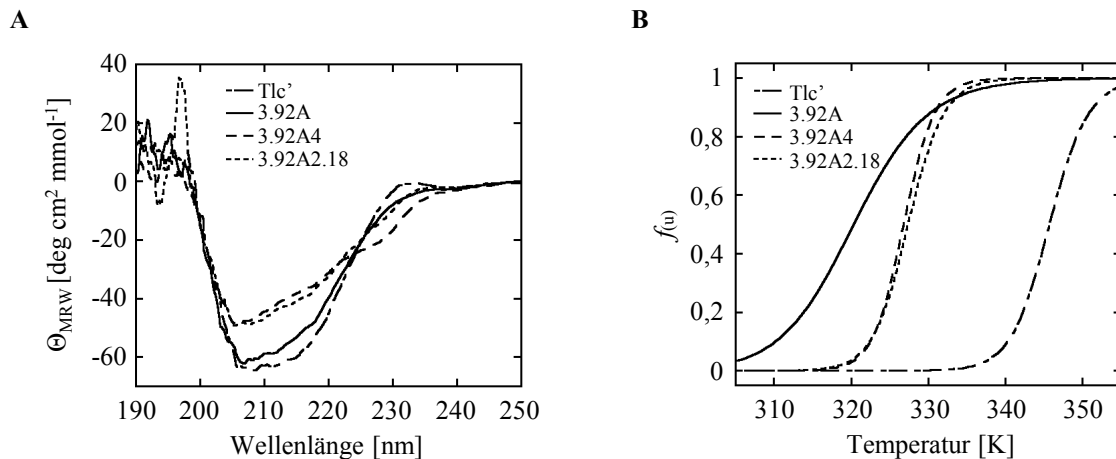


Abbildung 30: CD-Spektren und Denaturierungskurven von Tlc' sowie den daraus hervorgehenden Anticalinen 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18. A) Die Analyse der Sekundärstruktur der Anticaline erfolgte durch Messung der CD-Spektren von 190 bis 250 nm bei 25 °C in einer Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke mit Hilfe eines Jasco J-810 Spektropolarimeters. Die Konzentration der Anticaline betrug 30 μM in 20 mM KH_2PO_4 , 50 mM KH_2SO_4 pH 7,5. Die experimentell ermittelte Elliptizität Θ wurde zum Vergleich der Einzelspektren in die molare Elliptizität pro Aminosäure Θ_{MRW} umgerechnet. B) Zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m der Anticaline wurde eine thermische Denaturierungsanalyse durchgeführt. Dazu wurde die Elliptizität der Anticaline bei 214 nm über einen Temperaturbereich von 25 bis 85 °C verfolgt. Die Konzentration der Anticaline betrug 30 μM in 20 mM KH_2PO_4 , 50 mM KH_2SO_4 pH 7,5. Um die Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen Tlc'-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung 13 unter Verwendung der aus der nicht-linearen Regression nach Gleichung 18 gewonnen Parameter b_N , b_U , m_N und m_U auf den Anteil an ungefaltetem Protein $f(u)$ skaliert. Die normierten Entfaltungskurven wurden anschließend nach Gleichung 19 angepasst. Für die Ausgangsvariante Tlc' wurde eine Schmelztemperatur von 72,5 °C bestimmt. Die Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 wiesen im Vergleich zu Tlc' erniedrigte Schmelztemperaturen von 47,2 °C, 53,6 °C und 54,2 °C auf.

3.6.3 Reinigung des Komplexes aus 3.92A2.18 und der DC-SIGN CRD

Die gemessenen CD-Spektren der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 im Vergleich zur Ausgangsmutante Tlc' deutete darauf hin, dass die β -Barrel Gerüststruktur dieser Anticaline erhalten geblieben ist. Allerdings wurden, wie schon in Abschnitt 3.6.1 erwähnt, bei 3.92A, 3.92A4 bzw. 3.92A2.18 17, 20 bzw. 21 Aminosäurereste der Ausgangsmutante Tlc' im Bereich der Schleifenregionen ausgetauscht. Daher sollte es in diesen Regionen zu strukturellen Änderungen gekommen sein. Im Hinblick auf die Dimerisierungstendenz der Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 und die Bindung dieser Anticaline an DC-SIGN erschienen diese strukturellen Änderungen von großem Interesse. Aus diesem Grund sollte der Komplex aus 3.92A2.18 und der DC-SIGN CRD für Kristallisationsexperimente bereitgestellt werden.

Dazu wurden die DC-SIGN CRD $strepII$ und das Anticalin 3.92A2.18 $strepII$ separat in *E. coli* produziert. Die durch Streptavidin-Chromatographie gereinigten Proteine wurden im Verhältnis 1,2 zu 2 gemischt und der Komplex nach Inkubation über Nacht durch Größenausschlusschromatographie gereinigt (Abbildung 31). Mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde gezeigt, dass im ersten *Peak* der Komplex aus DC-

SIGN CRD*strepII* und 3.92A2.18*strepII* eluierte. Die Bandenintensität der DC-SIGN CRD*strepII* im Vergleich zum Anticalin 3.92A2.18*strepII* legte die Vermutung nahe, dass die DC-SIGN CRD und das Anticalin im Verhältnis 1 zu 2 aneinander binden. Im zweiten *Peak* eluierte überschüssiges DC-SIGN CRD*strepII*. Für den Komplex aus DC-SIGN CRD*strepII* und dem Anticalin 3.92A4*strepII* wurde ein analoges Ergebnis erzielt (Daten nicht gezeigt). Der Komplex aus DC-SIGN CRD*strepII* und dem ursprünglichen Anticalin 3.92A*strepII* war bei der Größenausschlusschromatographie nicht stabil, so dass keine Aussage über dessen molekulare Zusammensetzung getroffen werden konnte.

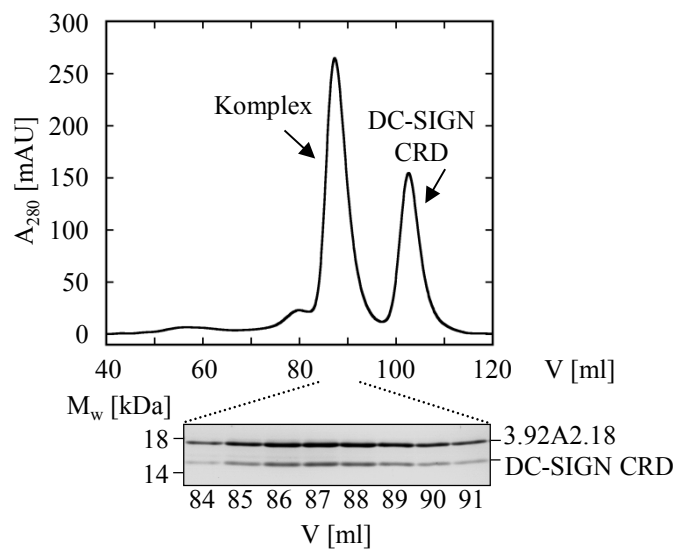


Abbildung 31: Reinigung des Komplexes aus dem Anticalin 3.92A2.18*strepII* und der DC-SIGN CRD*strepII* durch Größenausschlusschromatographie. Zur Komplexbildung wurde durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigtes DC-SIGN CRD*strepII* und 3.92A2.18*strepII* im Verhältnis 1,2 zu 2 inkubiert. Nach anschließender Einengung des Volumens mit Hilfe eines Amicon-Ultra15-Konzentrators wurde das Gemisch auf eine mit 10 mM Tris, pH 7,5, 115 mM NaCl, 1 mM EDTA äquilibrierte S200 Superdex (16/60) Säule geladen. Gezeigt ist das Elutionsprofil des Säulenlaufs. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte durch SDS-PAGE.

4 Diskussion

4.1 Periplasmatische Produktion der DC-SIGN CRD in *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Anticaline auf der Basis des humanen Tränenlipocalins Tlc mit Bindungsaktivität für das im Zusammenhang mit HIV-Prävention relevante Zielprotein DC-SIGN entwickelt. Für die Selektion eines Anticalins, das die Bindung zwischen DC-SIGN und HIV stört bzw. im Idealfall blockiert, wurde zunächst die DC-SIGN CRD mit einem C-terminalem *Strep*-tag II als Zielprotein produziert. Aus folgenden Gründen erschien es sinnvoll, lediglich die DC-SIGN CRD, nicht etwa die DC-SIGN ECD oder das gesamte Protein, als Target für die Selektion zu verwenden: Die CRD ist diejenige Domäne, die für die Bindung der Glykanstruktur von gp120 verantwortlich ist. Wären mehrere Domänen oder gar das gesamte Protein gewählt worden, so wäre die Wahrscheinlichkeit gestiegen, Anticaline zu selektieren, welche irrelevante Epitope erkennen und die Bindung zwischen DC-SIGN und HIV nicht kompetieren.

Die Herstellung der DC-SIGN CRD in *E. coli* durch Rückfaltung aus Einschlusskörper war zuvor beschrieben (Mitchell *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode für die Herstellung der DC-SIGN CRD entwickelt. Dabei kam das universale Expressionsplasmid pASK75*strep*II zum Einsatz (Skerra, 1994a). Bei diesem Plasmid wird die bakterielle Expression durch das Tetracyclin-Promotor/Operatorsystem *tet*^{p/o} in Verbindung mit dem Tetracyclinrepressor tetR gesteuert (Skerra, 1994b). Der Vorteil dieses Systems ist die nahezu vollständige Repression des Promotors vor der Induktion der Genexpression durch Anhydrotetracyclin, so dass mögliche toxische Effekte ausgelöst durch das rekombinante Protein während der Wachstumsphase der Bakterien ausgeschlossen sind. Ein N-terminales OmpA-Signalpeptid führt zur Sekretion der DC-SIGN CRD in das Periplasma. Dabei wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgeschnitten (Movva *et al.*, 1980). Die Sekretion der DC-SIGN CRD in den periplasmatischen Raum von *E. coli* bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich: Das oxidative Milieu erlaubt die Ausbildung der drei Disulfidbrücken der DC-SIGN CRD und somit deren korrekte Faltung (Skerra & Pluckthun, 1988). Des Weiteren ist die Proteaseaktivität im Periplasma weit niedriger als im Cytoplasma (Talmadge & Gilbert, 1982). Für die Reinigung der DC-SIGN CRD ergibt sich zudem der Vorteil, dass die äußere Membran von *E. coli* unter geeigneten Bedingungen unabhängig von der inneren Membran permeabilisiert werden kann, so dass die Separation des gesamten Cytoplasmas zusammen mit der Zellwand und –membranen in Form der Spläroplasten durch einfache Zentrifugation möglich ist. Dadurch verringert sich die Zahl der von der DC-SIGN CRD abzutrennenden Proteine dramatisch (Skerra & Schmidt, 2000).

Neben dem Expressionsvektor pASK75*strep*II wurde das Helferplasmid pTUM4 eingesetzt (Schlapschy *et al.*, 2006). pTUM4 kodiert für die periplasmatischen Faltungshelfer DsbA,

DsbC, FkpA und SurA. Bei DsbA handelt es sich um eine Dithiol-Oxidase (Bardwell *et al.*, 1991), bei DsbC um eine Disulfidisomerase (Missiakas *et al.*, 1994; Shevchik *et al.*, 1994) und bei SurA (Rouvière *et al.*, 1996) und FkpA (Horne & Young, 1995) um Peptidylprolylisomerasen mit dezidiertem Chaperonaktivität. Anhand von zwei Beispielproteinen konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von pTUM4 eine effizientere Ausbildung von Disulfidbrücken bzw. eine Erhöhung der Ausbeute an löslichem, rekombinanten Protein möglich ist (Schlapschy *et al.*, 2006). Auch toxische Effekte des rekombinanten Proteins auf die Wirtsbakterien, bis hin zur Zellyse, können mit pTUM4 vermindert werden.

Durch den Einsatz von pASK75*strepII* und pTUM4 konnte 1,1 mg lösliches DC-SIGN CRD*strepII* pro Liter Kultur erhalten werden. Das rekombinante Protein musste aus dem Periplasmaextrakt der Zellen lediglich durch Streptavidin-Chromatographie gereinigt werden. Bei der erhaltenen Präparation der DC-SIGN CRD handelte es sich um funktionelles, monomeres Protein in hoher Reinheit. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Produktion der DC-SIGN CRD in löslicher Form durch Sekretion ins Periplasma von *E. coli* möglich ist. Bislang wurde die DC-SIGN CRD durch den aufwendigen Prozess der Rückfaltung aus Einschlusskörpern gewonnen.

Im Gegensatz dazu gelang die periplasmatische Produktion der vollständigen extrazellulären Domäne von DC-SIGN einschließlich der *neck repeats* – der DC-SIGN ECD – bei einer analogen Vorgehensweise nicht im zufriedenstellenden Ausmaß (Kaufer, 2005). Lediglich eine kleine Menge des überexprimierten Proteins konnte aus der periplasmatischen Fraktion gereinigt werden, allerdings ausschließlich wenn die periplasmatische Fraktionierung durch den Abbau der Peptidoglykanschicht mit Hilfe von Lysozym ergänzt wurde. Der Großteil des überexprimierten Proteins lag in Form von Einschlusskörpern im Cytoplasma vor.

Für die Sekretion von bakteriellen Proteinen ins Periplasma sind grundsätzlich drei verschiedene Mechanismen bekannt (Choi & Lee, 2004; Cross *et al.*, 2009; Fekkes & Driessen, 1999). Bei der Verwendung der OmpA-Signalsequenz erfolgt die Sekretion ins Periplasma posttranslational über das Sec-Translocon (Fekkes & Driessen, 1999). Um die Ausbildung von cytoplasmatischen Einschlusskörpern zu umgehen, erschien es sinnvoll, auch eine Sekretion über den sogenannten *Signal recognition pathway*, bei dem die Sekretion cotranslational erfolgt (Valent, 2001), zu versuchen. Zu diesem Zweck wurde die OmpA- gegen die *DsbA*-Signalsequenz (Schierle *et al.*, 2003) ersetzt. In diesem Fall konnte jedoch aus unbekanntem Gründen keine Überexpression des rekombinanten Proteins detektiert werden (Kaufer, 2005).

Aus mehreren Domänen aufgebaute, eukaryontische Proteine wie die DC-SIGN ECD können häufig im bakteriellen Organismus nicht in korrekt gefalteter Form produziert werden, da sich

die bakterielle und eukaryontische Synthese- und Faltungsmaschinerie in einigen Punkten voneinander unterscheiden (Hartl & Hayer-Hartl, 2009; Netzer & Hartl, 1997). Das eukaryontische System zeichnet sich im Vergleich zum bakteriellen durch eine langsamere Translationsgeschwindigkeit aus, die Faltung einzelner Domänen erfolgt in der Regel schrittweise während dem Translationsprozess (Siller *et al.*). So wird die Ausbildung nicht-nativer Kontakte zwischen den einzelnen Untereinheiten und daraus resultierende Aggregation umgangen (Netzer & Hartl, 1997). Ferner tragen eukaryontische Chaperone in vielen Fällen zur korrekten Faltung bei (Hartl & Hayer-Hartl, 2009).

Im Fall von Typ II Membranproteinen wie DC-SIGN erfolgt die Insertion in die Membran und die Faltung cotranslational im wässrigen Milieu des Tunnels, der von Proteinen des Ribosom-Translocon-Komplexes gebildet wird, und im endoplasmatischen Reticulum (Devaraneni *et al.*, 2011). Zum Teil wird die korrekte Faltung durch Glykosylierung begünstigt (Helenius & Aebi, 2001). Für DC-SIGN ist beispielsweise bekannt, dass eine fehlende N-Glykosylierung an Position 80 zur Reduktion der Oberflächenexpression führt (Pohlmann *et al.*, 2001b). Des Weiteren ist davon auszugehen, dass die Tetramerisierung der Untereinheiten im Membran-gebundenen Zustand erfolgt.

4.2 Vorteile des humanen Tränenlipocalins als Gerüstprotein für die Herstellung eines DC-SIGN-bindenden Anticalins

Für die Entwicklung von DC-SIGN-bindenden Anticalinen wurde das humane Tlc als Gerüstprotein gewählt. Tlc besitzt gegenüber anderen Lipocalinen wichtige Vorteile.

Vergleichende Untersuchungen an Hapten- und Protein-bindenden Antikörpern zeigten, dass die Bindungsregion eines Hapten-bindenden Antikörpers meist tief, während die eines Protein-bindenden Antikörpers vielfach flach ist (Lee *et al.*, 2006; MacCallum *et al.*, 1996). Haptene wechselwirken mit den Aminosäuren der β -Stränge, die den Boden der Bindungstasche an der Kontaktfläche zwischen V_L und V_H bilden. Der CRD L1 *Loop* von Hapten-bindenden Antikörpern ist häufig lang und der CRD H3 *Loop* befindet sich in der offenen Konformation. Die Kontakte zum Antigen werden bei Protein-bindenden Antikörpern vor allem über die apikalen Regionen der hypervariablen Schleifen gebildet, da der CRD H3 *Loop* in diesem Fall häufig die Bindungstasche blockiert.

In diesem Zusammenhang zeigt gerade das Tlc die strukturellen Voraussetzungen für die Entwicklung von Protein-bindenden Anticalinen. Die Bindungsregion von Tlc ist gegenüber der von anderen Anticalinen durch sehr lange Peptidschleifen und eine hohe konformelle Flexibilität der Peptidschleifen, einiger Stränge des β -Barrels und einzelner Aminosäuren in der Bindungstasche gekennzeichnet (Breustedt *et al.*, 2009; Breustedt *et al.*, 2005; Breustedt *et al.*, 2006). Im Vergleich dazu sind die Bindungsregionen anderer Lipocaline wie C8 γ und NGAL zwar ausgedehnt, jedoch mit kürzeren Peptidschleifen und einer offeneren

Bindungstasche ausgestattet (Goetz *et al.*, 2000; Ortlund *et al.*, 2002). Die Bindungstasche von RBP ist klein und eng (Newcomer *et al.*, 1984); zudem ist dessen relativ hohe Anzahl von drei Disulfidbindungen nicht besonders günstig für eine effiziente Faltung (Muller & Skerra, 1993) bzw. Protein-Engineering-Experimente.

Neben den strukturellen Vorteilen sind für Tlc auch wichtige biochemische und biophysikalische Voraussetzungen für eine potentielle Anwendung als Therapeutikum gegeben. Tlc lässt sich als Cystein-freie Variante sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma von *E. coli* als lösliches Protein produzieren (Cirl, 2004; Winkler, 2005). Gerade mit der cytoplasmatischen Strategie sollte sich auch eine großtechnische Produktion von Anticalinen auf der Basis von Tlc realisieren lassen. Ferner erwies sich Tlc mit einer Schmelztemperatur von 91 °C als überaus stabiles Protein (Sabine Rauth, unveröffentlicht). Diese Eigenschaft ist bei der Entwicklung von DC-SIGN-bindenden Anticalinen, die HIV-Neuinfektionen verhindern sollen, von besonderem Interesse. Die Gefahr einer Infektion ist durch die weite Verbreitung von HIV vor allem in Ländern der dritten Welt gegeben, wo eine gute Lagerbeständigkeit auch in Abwesenheit einer Kühlkette eine große Rolle spielt.

Auch die Tatsache, dass Tlc von Schleimhäuten sekretiert wird, vor allem im Bereich des Auges (Bonavida *et al.*, 1969), erscheint als Vorteil. DC-SIGN-bindende Anticaline sollen als Mikrobizid in Form von beispielsweise Cremes oder Gelen insbesondere die genitalen Schleimhäute vor einer HIV-Infektion schützen. Es ist anzunehmen, dass sich Anticaline, die auf der Basis von Tlc entwickelt wurden, in einer solchen quasi physiologischen Umgebung als stabil erweisen.

4.3 Selektion DC-SIGN-bindender Anticaline

4.3.1 Phage Display Selektion

Aus einer auf der Grundlage des humanen Tlc hergestellten Bibliothek, bei der 18 ausgewählte Aminosäurepositionen in den Schleifenregionen randomisiert waren, konnten im Rahmen dieser Arbeit die DC-SIGN-bindenden Tlc'-Varianten 3.92 und 3.149 mit Hilfe der *Phage Display* Technologie (Barbas *et al.*, 2001) selektiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass für die erfolgreiche Isolierung dieser Varianten die Puffer- und Elutionsbedingungen bei der Selektion eine entscheidende Rolle spielten. Drei Selektionsversuche unter verschiedenen Bedingungen wurden durchgeführt, wobei letztendlich die Wahl eines EDTA-haltigen Puffers (PBS, 1 mM EDTA) in Kombination mit einer denaturierenden Elution durch 100 mM Glycin pH 2,2 zur Isolierung der Varianten 3.92 und 3.149 führte.

Aufgrund der Calcium-abhängigen Saccharidbindeaktivität der DC-SIGN CRD bestand im Prinzip die Möglichkeit, gebundene Phagemide kompetitiv und zielgerichtet mit einem Saccharid zu eluieren. Diese Vorgehensweise erschien als sinnvoll, da auf diese Weise

selektiv nur an das Zielprotein gebundene Phagemide freigesetzt werden sollten, nicht aber solche, die beispielsweise an die Oberfläche der paramagnetischen Partikel adsorbiert haben. Zum anderen sollten insbesondere bevorzugt solche Phagemide abgelöst werden, die mit der Saccharidbinderegion der DC-SIGN CRD und damit dem gewünschten Epitop interagieren.

In diesem Fall konnten allerdings bei Selektion in einem Calcium-haltigen Puffer in Kombination mit Elution durch Maltose keine Anticaline, die spezifisch an DC-SIGN binden, angereichert werden. Calciumionen sind dafür bekannt, dass sie unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln können, was im Fall einer *Phage Display* Selektion einen störenden Einfluss auf die spezifische Anreicherung der Phagemide haben kann. Des Weiteren wurde vermutet, dass zuckerartige Verunreinigungen, beispielsweise in der zum Blockieren der paramagnetischen Partikel eingesetzten BSA-Fraktion oder in der Phagemidpräparation selbst enthalten waren. Die DC-SIGN CRD bindet Calcium-abhängig eine Reihe von Zuckerstrukturen (Mitchell *et al.*, 2001), so dass solche Verunreinigungen schon vor der eigentlichen Elution aufgrund kompetitiver Bindungseffekte zu einem Verlust der gewünschten Anticaline führen könnten. Durch die Verwendung von EDTA-haltigem Puffer für die Selektion konnten solche störenden Effekte ausgeschlossen werden, eine kompetitive Elution war unter diesen Bedingungen allerdings nicht mehr möglich.

4.3.2 Kolonie-Filterstapeltest

Für die erfolgreiche Isolierung der DC-SIGN-bindenden Tlc'-Varianten 3.92 und 3.149 spielte neben den Puffer- und Elutionsbedingungen bei der *Phage Display* Selektion ebenfalls die sorgfältige Analyse der angereicherten Varianten mit dem Kolonie-Filterstapeltest (Skerra *et al.*, 1991a) eine entscheidende Rolle. Bei der Selektion von Proteinvarianten aus einer Zufallsbibliothek durch *Phage Display* kommt es gewöhnlich nicht zur Anreicherung von nur einer oder wenigen Varianten. Die nach einigen Anreicherungszyklen erhaltene Subpopulation der Zufallsbibliothek kann abhängig von der Größe der Bibliothek und den Selektionsbedingungen noch eine Vielzahl von Varianten enthalten. In der Regel zeichnen sich nicht alle diese Varianten durch die gewünschten Eigenschaften aus. Beispielsweise kann es auch zur Anreicherung von Varianten kommen, die unspezifische Bindungseigenschaften zeigen oder die an die zur Immobilisierung des Zielproteins eingesetzten paramagnetischen Partikel binden. Aus diesem Grund müssen oft hunderte oder tausende Varianten aus der selektierten Population weiter analysiert werden. Der im Rahmen dieser Arbeit angewandte Kolonie-Filterstapeltest ist dafür eine geeignete Methode, da dieser Test eine zeitgleiche Analyse von 500 bis 1000 Varianten ermöglicht, ohne die Notwendigkeit, die einzelnen Varianten separat in Flüssigkultur zu produzieren (Schlehuber *et al.*, 2000; Skerra *et al.*, 1991a).

Beim Kolonie-Filterstapel-Test werden eine Vielzahl von Varianten von auf einer Membran wachsenden *E. coli* Kolonien produziert und gerichtet auf einer darunterliegenden zweiten Membran immobilisiert (Schlehuber *et al.*, 2000). So können zentrale Eigenschaften der Varianten wie zum Beispiel Bindungsaktivität oder -spezifität untersucht werden. Kolonien, die Varianten mit den gewünschten Eigenschaften produzieren, können identifiziert werden, so dass Zugang zu der genetischen Information der Varianten besteht. Auf diese Weise wurden je etwa 1000 der durch die *Phage Display* Selektionen angereicherten Tlc'-Varianten hinsichtlich ihrer Bindungsaktivität gegenüber der DC-SIGN CRD untersucht. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Vorgehensweise, die den Ausschluss von falsch-positiven Signalen beim Kolonie-Filterstapeltest ermöglicht.

Dies wurde notwendig, da zahlreiche Varianten, die zunächst aufgrund ihres Bindungssignals beim Kolonie-Filterstapeltest ausgewählt wurden, im anschließenden ELISA keine Bindungsaktivität gegenüber DC-SIGN zeigten. Daher wurde in einem kompetitiven Ansatz untersucht, ob sich im Kolonie-Filterstapeltest die digoxigenierte DC-SIGN CRD $_{strepII}$ durch einen Überschuss an unmarkierter DC-SIGN CRD $_{strepII}$ aus der Bindung an die Tlc'-Varianten verdrängen lässt. Diese Eigenschaft zeigte sich erstaunlicherweise bei nur elf der 91 untersuchten Varianten.

In einem zweiten Schritt wurden weitere Eigenschaften dieser elf Varianten erneut in einem Kolonie-Filterstapel-Experiment untersucht. Dabei wurde die Bindungsaktivität der Varianten gegenüber der DC-SIGN CRD mit verschiedenen Affinitätsanhängseln (*Strep*-tag II und His₆-tag) und in verschiedenen Puffersystemen (PBS, 1 mM EDTA und 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 115 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) getestet. Des Weiteren wurde die Kreuzreaktivität dieser Varianten mit anderen Proteinen (Ovalbumin und Langerin CRD $_{strepII}$) untersucht. Nach dieser differenzierten Analyse der durch *Phage Display* Selektion angereicherten Varianten mit dem Kolonie-Filterstapeltest konnten vier Varianten mit den gewünschten Bindungseigenschaften – darunter die Varianten 3.92 und 3.149 – aus etwa 3000 untersuchten Klonen selektiert werden. Die Bindungsaktivität dieser Varianten gegenüber der DC-SIGN CRD konnte im ELISA-Experiment bestätigt werden.

Wie oben erwähnt, konnte im ELISA keine Bindung der nach einem ersten Kolonie-Filterstapel-Test zunächst ausgewählten Varianten gegenüber DC-SIGN nachgewiesen werden. Sieben der acht untersuchten Varianten wiesen die Konsensussequenz Trp- (*Loop 3*) ...-His-Pro-Gln (*Loop 4*) auf. Da diese Sequenz dem zentralen Teil des an Streptavidin bindenden *Strep*-tag II (Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) (Voss & Skerra, 1997) entspricht, wurde im ELISA Experiment exemplarisch die Bindung der Tlc'-Variante 3.65 an Streptavidin untersucht. In der Tat konnte eine solche Bindungsaktivität von 3.65 gegenüber Streptavidin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurden bei der *Phage*

Display Selektion neben DC-SIGN-bindenden Varianten auch Streptavidin-bindende Varianten angereichert. Dennoch gelang es durch die gründlichere Analyse mit dem Kolonie-Filterstapeltest, die DC-SIGN-bindenden Varianten 3.92 und 3.149 zu isolieren.

4.4 Verbesserung der DC-SIGN-Bindung durch *in vitro* Affinitäts-maturierung

Das Anticalin 3.92A zeigte im ELISA eine Dissoziationskonstante von 712 ± 44 nM für die Bindung an DC-SIGN CRD. Für ein medizinisch einsetzbares Anticalin ist diese Bindung noch zu schwach. Allerdings kann generell durch *in vitro* Maturierung die Affinität von Proteinvarianten zu einem Zielprotein verbessert werden (Neylon, 2004). Dies gelang beispielsweise bei dem Anticalin DigA, für das eine Dissoziationskonstante von 295 ± 37 nM für die Bindung an Digoxigenin bestimmt worden war. Das maturierte Anticalin DigA16 besitzt dem gegenüber eine etwa zehnmal höhere Affinität mit einer Dissoziationskonstante von $30,2 \pm 3,6$ nM (Schlehuber *et al.*, 2000).

Zwei verschiedene Strategien zur Affinitätsmaturierung von 3.92A wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt. Zum einen wurde eine *Error Prone* PCR durchgeführt, um Mutationen an Zufallspositionen im Sequenzbereich des gesamten β -Barrels einschließlich *Loop 1* bis *Loop 4* einzuführen. Zum anderen wurden ausgewählte Aminosäurepositionen gezielt in *Loop 2* randomisiert. Bei der Herstellung einer Zufallsbibliothek durch *Error Prone* PCR werden über den Sequenzabschnitt zwischen den beiden *Primern* Mutationen zufällig gestreut. Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass Aminosäurepositionen, die nicht in die ursprüngliche Randomisierungsstrategie einbezogen waren, die aber durchaus einen Effekt auf die Bindung des Targets haben können, ebenfalls mutagenisiert werden. Allerdings sind aufgrund des genetischen Codes durch solche Punktmutationen nicht alle Aminosäureaustausche zugänglich. Weiterhin können von der Zufallsmutagenese auch Aminosäurepositionen betroffen sein, die eine wichtige Rolle für die Stabilität der Gerüststruktur spielen. Aus diesem Grund ist der Anteil an funktionellen Varianten in einer Bibliothek, die durch *Error Prone* PCR hergestellt wurde, reduziert (Übersicht in Shivange *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2007).

Bei der Sequenzanalyse ausgewählter 3.92A-Varianten, die aus der *Error Prone* PCR Bibliothek angereichert wurden, stellte sich heraus, dass die Mehrheit der Zufallsmutationen im Bereich der Peptidschleifen von 3.92A lokalisiert waren, so dass diese für die Bindung der Anticaline an DC-SIGN offenbar eine Rolle spielten. Bei den Mutationen, die im Bereich der Gerüststruktur gefunden wurden, handelte es sich hauptsächlich um konservative Austausche. Die anschließende biochemische bzw. funktionelle Analyse der Varianten zeigte, dass eine Erhöhung der Affinität gegenüber DC-SIGN mit Di- und Oligomerisierung einherging. Für die Variante 3.92A4 wurde gezeigt, dass die Bindung an die monomere DC-SIGN CRD

vermutlich als Tlc-Dimer erfolgt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Dimerisierung, an der wohl die Peptidschleifen beteiligt sind, eine größere komplementäre Oberfläche zur DC-SIGN CRD ausgebildet wird und dadurch die Affinität gegenüber der monomeren Ausgangsvariante 3.92A erhöht ist.

Die Randomisierung ausgewählter Aminosäurepositionen von *Loop 2* hat im Gegensatz zur *Error Prone PCR* den Vorteil, dass einerseits Aminosäurepositionen, die für die Stabilität der Gerüststruktur des Anticalins verantwortlich sind, nicht von der Mutagenese betroffen sind. Andererseits ist es bei einer Anzahl von bis zu sechs randomisierten Aminosäurepositionen im Rahmen einer Phagemidbibliothek technisch möglich, den Sequenzraum von etwa $1 \cdot 10^9$ 3.92A Varianten zu umfassen. Dabei ist die vollständige Randomisierung der kodierten Aminosäuren an den ausgewählten Sequenzpositionen gewährleistet.

Die biochemische Untersuchung der angereicherten 3.92A-Varianten mit Mutationen in *Loop 2* ergab, dass diese Varianten ebenfalls Dimere ausbilden. Die dimeren Fraktion aller analysierten 3.92A-Varianten zeichnete sich durch eine deutlich erhöhte Affinität zu DC-SIGN aus. Für die 3.92A2.18-Variante konnte - wie auch für das oben erwähnte Anticalin 3.92A4 - durch analytische Grössenausschlusschromatographie gezeigt werden, dass die Bindung an monomeres DC-SIGN vermutlich als Dimer erfolgt.

Somit führten zwei verschiedene Strategien zur Affinitätsmaturierung des monomeren Anticalins 3.92A zur Anreicherung dimerer Varianten, allerdings mit deutlich verbesserter Affinität gegenüber DC-SIGN. Im ELISA wurde für das Anticalin 3.92A4 eine Dissoziationskonstante von 75 ± 7 nM bestimmt, für das Anticalin 3.92A2.18 zu $11,6 \pm 4,7$ nM. Damit gelang eine Steigerung der Affinität um den Faktor 9 bzw. 67 im Vergleich zu der Ausgangsvariante.

4.5 Dimerisierungstendenz der isolierten Anticaline

Beim *Phage Display* ist die Selektion von Varianten mit Dimerisierungstendenz im Fall von *sc* (*single chain*) Fv-Fragmenten als Gerüstprotein ein bekanntes Phänomen (Griffiths *et al.*, 1993; Schier *et al.*, 1996). In diesem Fall kann eine Dimerisierung der präsentierten scFv-Fragmente durch Assoziation der V_H bzw. V_L Domäne einer Kette mit der V_L bzw. V_H Domäne einer zweiten Kette erfolgen. Solche Homodimere haben zwei Bindungsstellen für das Target, so dass beim *Phage Display* ein Selektionsvorteil durch den Aviditätseffekt möglich ist.

Generell werden beim *Phage Display* die zu präsentierenden Peptide oder Proteine mit den Phagenhüllproteinen pIII oder mitunter auch pVIII fusioniert. Eine Phagenhülle besteht hauptsächlich aus pVIII, während nur etwa fünf Kopien von pIII an den Spitzen des Partikels eingebaut werden. Eine Fusion dem pVIII-Protein oder allen fünf Kopien des pIII-Proteins ist

vor allem dann sinnvoll, wenn das zu präsentierende Peptid oder Protein in einer möglichst hohen Kopienzahl auf der Oberfläche der Phagemide präsentiert werden soll. Dies kann von Vorteil sein, wenn eine schwache Bindung zwischen dem zu selektierenden Peptid oder Protein erwartet wird und diese durch den Aviditätseffekt verstärkt werden soll (Barbas *et al.*, 2001; Griffiths *et al.*, 1993; O'Connell *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das pIII - genauer das $\Delta\Delta\text{pIII}$ - als Fusionspartner bei der Herstellung der Phagemidbibliothek gewählt. In diesem Fall besteht die Möglichkeit durch Koexpression des unfusionierten pIII-Wildtyps die Produktion des Fusionsproteins so zu regulieren, dass nur eine Kopie der ungefähr fünf pIII-Proteine ein Fusionsprotein darstellt (Bass *et al.*, 1990). In diesem Fall spricht man von monovalentem *Phage Display*. Dadurch sollte eine potentielle Di- oder Oligomerisierung der Varianten auf der Phagemidoberfläche weitgehend verhindert werden können.

Allerdings ist bekannt, dass es auch im Fall vom monovalentem *Phage Display* zur Anreicherung von beispielsweise dimeren scFv Fragmenten kommen kann (Schier *et al.*, 1996). Mögliche Ursachen dafür sind zum einen, dass neben den ca. 10 % der Phagemide, die eine Kopie des Fusionsproteins präsentieren, aus statistischen Gründen auch ca. 1 % zwei Kopien aufweisen (Barbas *et al.*, 2001). Bei dieser Fraktion ist also eine Homodimerisierung der präsentierten scFv- oder Tlc'-Varianten möglich. Zum anderen gelang die moderate Produktion der scFv- bzw. Tlc'-Fusionsproteine mit Hilfe eines *Amber*-Stoppkodons zwischen dem kodierendem Abschnitt für diese Proteine und pIII. In einem *supE Amber*-Suppressorstamm - wie dem für die Selektionen in dieser Arbeit verwendeten Stamm XL1-Blue - wird der Translationsstopp in etwa 10 % der Fälle durch den Einbau eines Glutamins umgangen (Miller, 1992). Folglich wird die Produktion des Vollängen-Fusionsproteins durch das *Amber*-Stoppkodon um ca. 90 % verringert, allerdings wird bei dieser Verfahrensweise als Nebenprodukt auch die freie Tlc'-Variante translatiert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass sich bei der Synthese der Phagemide im Periplasma der *E. coli* Zellen Dimere mit der freien Tlc'-Variante bilden (Schier *et al.*, 1996).

Für die Anreicherung von bindungsaktiven Proteinen aus einer Phagemidbibliothek sind verschiedene Strategien bekannt. Das Zielprotein muss dabei immobilisiert werden, damit gebundene von ungebundenen Phagemiden separiert werden können. Dazu kann das Target an das Material einer Chromatographiesäule gekoppelt werden, an der Kunststoffoberfläche von Mikrotiterplatten (Barbas *et al.*, 1992) oder Flügelstiften (Marks *et al.*, 1991) adsorbiert oder mittels funktioneller Gruppe wie Biotin an paramagnetische Partikel (Hawkins *et al.*, 1992) gebunden werden. Die Verwendung von paramagnetischen Partikeln hat den Vorteil, dass die Bindung der Phagemide an das funktionalisierte Zielprotein zunächst in Lösung erfolgen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Vorgehensweise gewählt, da in einer vergleichenden Analyse gezeigt wurde, dass unter diesen Bedingungen

Selektionsvorteile durch den Aviditätseffekt eingeschränkt werden können. Dabei wurden scFv-Fragment präsentierende Phagemide einer Selektion einerseits mit immobilisiertem Zielprotein, andererseits in Lösung ausgesetzt. Im ersten Fall wurden spontan dimerisierende, im zweiten Fall höher affine, monomere Varianten angereichert (Schier *et al.*, 1996).

Eine gewisse Di- und Oligomerisierungstendenz des als Gerüstprotein verwendeten Tlc ist übrigens bereits in der Literatur beschrieben. Zwei unabhängige Untersuchungen zeigten, dass Tlc isoliert aus der Tränenflüssigkeit bei der Größenausschlusschromatographie als Dimer auftritt (Glasgow *et al.*, 1999; Redl *et al.*, 1992). Rekombinantes Tlc mit einem His₆-Tag oder *Strep*-tag II wurde jedoch als monomeres Protein gereinigt (Breustedt *et al.*, 2005; Cirl, 2004). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte dagegen, dass sowohl natives als auch rekombinantes Tlc in der Regel ein monomeres Protein darstellt. Dimerisierung konnte nur für die delipidierten apo-Formen nachgewiesen werden (Gasymov *et al.*, 2007).

Die Ausbildung von stabilen Homodimeren ist auch für andere Vertreter der Lipocalinfamilie bekannt (Übersicht in Hoedemaeker *et al.*, 2002). Dazu gehören das Bilin-Bindeprotein aus *Pieris brassicae* (BBP; Huber *et al.*, 1987a; Huber *et al.*, 1987b), das bovine Odorant-Bindeprotein (OBP; Bianchet *et al.*, 1996; Tegoni *et al.*, 1996), das *Major horse allergen* Equ c1 (Lascombe *et al.*, 2000), das bovine und porcine β -Lactoglobulin (BLG; Hoedemaeker *et al.*, 2002) wie auch Trichosurin aus *Trichosurus vulpecula* (Watson *et al.*, 2007). Diese dimeren Lipocaline weisen unterschiedliche Ausrichtungen der einzelnen Proteindomänen zueinander und damit verschiedene Kontaktflächen auf. Eine Konservierung des Dimerisierungsmechanismus innerhalb der Lipocalinfamilie liegt somit nicht vor.

Von BBP wurden zwei Isoformen isoliert (Suter *et al.*, 1988). Dabei handelt es sich bei dem selteneren BBP II um ein Monomer, wohingegen BBP I ein Dimer bildet. BBP I und BBP II unterscheiden sich lediglich durch die N-terminale Aminosäure. Das monomere BBP II beginnt mit einem Aspartat, welches durch Deamidierung entsteht, das dimere BBP I dagegen mit dem ursprünglich kodierten Asparagin. Die Dimerisierung von BBP I kommt durch die Wechselwirkung der Aminosäuren 1 bis 4 beider Peptidketten zustande (Huber *et al.*, 1987a; Huber *et al.*, 1987b).

Die Dimerisierung des bovinen OBP beruht auf einem speziellen *Domain Swapping* Mechanismus (Bianchet *et al.*, 1996; Tegoni *et al.*, 1996). Dabei kreuzen sich die Polypeptidketten der zwei Proteinuntereinheiten zwischen den Aminosäuren 122 und 123. Der anschließende C-Terminus - eine α -Helix, ein β -Strang und der dazwischen liegende *Loop* (Aminosäuren 124 bis 150) - wechselwirkt mit dem β -*Barrel* der jeweils anderen Proteinuntereinheit. Das porcine OBP ist im Gegensatz zum bovinen OBP ein monomeres Protein (Spinelli *et al.*, 1998). Ein Vergleich beider Proteine zeigte, dass einerseits ein Glycinrest an Position 121, andererseits eine intramolekulare Disulfidbrücke, die den C-

Terminus mit dem β -Barrel verbindet, einem *Domain Swapping* beim porcinen OBP entgegenwirken (Ramoni *et al.*, 2008; Ramoni *et al.*, 2002).

Auch das bovine und das porcine BLG liegt als Homodimer vor. Beim bovinen BLG bilden die C-terminalen I-Stränge beider Proteindomänen ein β -Faltblatt. Das Dimer wird zusätzlich durch Kontakt der AB-Loops stabilisiert. Im Gegensatz dazu kommt die Dimerisierung des porcinen BLG durch *Swapping* der Aminosäuren 1 bis 12 zustande (Hoedemaeker *et al.*, 2002).

Beim dimeren *Major horse allergen* Equ c1 wechselwirken die β -Stränge F, G und H beider Proteindomänen miteinander. Dabei kommen die antiparallel zueinander ausgerichteten α -Helices der Proteindomänen auf einer Seite des Dimers zum Liegen. Die Eingänge der beiden Bindungstaschen befinden sich auf gegenüberliegenden Seiten (Lascombe *et al.*, 2000).

Auch bei Trichosurin aus *Trichosurus vulpecula* interagieren die Seitenketten der β -Stränge F, G und H. Im Gegensatz zum *Major horse allergen* Equ c1 sind die Proteindomänen allerdings so zueinander ausgerichtet, dass sich die α -Helices auf zwei gegenüberliegenden Seiten des Dimers befinden. Die Eingänge zu den Bindungstaschen liegen deshalb auf einer Seite (Watson *et al.*, 2007).

Bei der Ausgangsmutante für die ursprüngliche Zufallsbibliothek Tlc' handelt es sich um ein monomeres Protein. Des weiteren bietet das monovalente *Phage Display* in Verbindung mit einer Selektionsstrategie, bei der die Bindung der von den Phagemiden präsentierten Varianten an das Zielprotein in Lösung erfolgt, keinen ausgeprägten Selektionsvorteil für dimer oder oligomerisierte Proteinvarianten. Aus diesem Grund ist es verwunderlich, dass die isolierten Tlc'-Varianten zum Großteil eine starke Dimerisierungstendenz aufweisen. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Bindung zwischen der DC-SIGN CRD und den Anticalinen 3.92A4 und 3.92A2.18 vermutlich im Verhältnis 1 zu 2 erfolgt. In diesem Fall könnte die Dimerisierung der Anticaline zu der Ausbildung einer größeren Kontaktfläche zu DC-SIGN und damit zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität geführt haben.

Bei dem zunächst isolierten Anticalin 3.92 handelte es sich um ein kovalentes Dimer mit einer Disulfidbrücke, welche die Loops 1 beider Proteindomänen miteinander verbindet. Durch Mutagenese des Cysteinrests an Position 30 zu Serin konnte die Dimerisierung des resultierenden Anticalins 3.92A nahezu aufgehoben werden. Die nach den Affinitätsmaturierungen erhaltenen 3.92A-Varianten 3.92A4 und 3.92A2.18 erwiesen sich dagegen wiederum als dimere Anticaline. Eine Analyse von 3.92A4 und 3.92A2.18 konnte Aufschluss über die Regionen geben, die für die Dimerisierung dieser Anticaline von Bedeutung sind. Für 3.92A4 wurde gezeigt, dass die Dimerisierung über Kontakte der Loops 1, 3 und 4 mit der zweiten Untereinheit erfolgt. Bei 3.92A2.18 wurden im Vergleich zum

hauptsächlich monomeren 3.92A ausschließlich Aminosäurereste in *Loop 2* mutagenisiert. Folglich spielen die Aminosäurereste dieser Peptidschleife eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung dieser Variante.

Neben den Mutationen der Aminosäurereste in den *Loops* 1 bis 4 weisen 3.92 und die von 3.92 ausgehend entwickelten Anticaline im Vergleich zur Ausgangsmutante Tlc' die Mutationen P38L zu Beginn des β -Strangs B und Y100N im β -Strang G auf. Diese Mutationen im Gerüstbereich könnten die monomere Form der Anticaline destabilisieren und so eine Dimerbildung begünstigen. Auch die Mutationen, die die Ausgangsvariante Tlc' im Vergleich zum Wildtyp Tlc aufweist, könnten in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. So ist der C-Terminus des nativen Tlc durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten C61 und C153 mit dem β -Barrel verbunden. Bei Tlc' und den von dieser Tlc-Mutante ausgehend entwickelten Anticalinen ist diese Disulfidbrücke nicht vorhanden und damit der C-Terminus flexibler. Des Weiteren wurden bei Tlc' die Mutationen P111R und W114K eingeführt. Genauere Aufschlüsse über die räumliche Anordnung der einzelnen Untereinheiten im Dimer und die Rolle der Mutationen für die Dimerisierung könnte eine Kristallstruktur liefern.

4.6 Apparente Dissoziationskonstanten der DC-SIGN/Anticalin-Komplexe im Vergleich

Thermodynamische und zum Teil kinetische Parameter der Bindung von 3.92A sowie der maturierten Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 an DC-SIGN wurden mit Hilfe von ELISA, Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie sowie Fluoreszenz-Anisotropiemessungen bestimmt. Interessanterweise weichen die erhaltenen apparenten Dissoziationskonstanten voneinander ab. Am deutlichsten fällt der Vergleich der Dissoziationskonstanten gemessen mit ELISA bzw. Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie aus. Dabei ist ein Unterschied von etwa einer Größenordnung festzustellen (siehe Tabelle 2).

Methodische Effekte spielen in diesem Zusammenhang eine große Rolle. Beispielsweise können physikalische oder chemische Immobilisierung und Markierung die Integrität und Zugänglichkeit der Bindungsstelle beeinflussen und somit Bindungskinetik und -gleichgewicht verändern (Butler, 2000; Huber *et al.*, 1999). Im ELISA wurde die DC-SIGN CRD an der Oberfläche der Mikrotiterplatte adsorbiert und dabei möglicherweise partiell denaturiert (Butler, 2000). Für Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie-Messungen wurde die Immobilisierung der DC-SIGN CRD an ein flexibles Hydrogel aus Carboxymethyldextran durch ungerichtete Aminkopplung bewerkstelligt (Johnsson *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu befand sich die DC-SIGN CRD bei der Fluoreszenz-Anisotropiemessung in Lösung, wurde allerdings wiederum mittels ungerichteter Aminkopplung mit Fluorescein markiert.

Durch Immobilisierung eines Bindungspartners können, vor allem wenn Oligomerisierung des anderen Bindungspartners auftritt, Aviditätseffekte die apparente Affinität drastisch erhöhen. Sowohl im ELISA als auch bei der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurde DC-SIGN immobilisiert, so dass zum Teil die Situation *in vivo* wiedergespiegelt wurde, wo DC-SIGN als Oberflächenrezeptor in der Membran von dendritischen Zellen verankert ist.

	3.92A	3.92A4	3.92A2.18
ELISA	712±44 nM	75±7 nM	11,6±4,7 nM
Fluoreszenz- Anisotropie- spektroskopie	-	48±17 nM	59±17 nM
Oberflächenplasmon- Resonanz- spektroskopie	5,83 µM	580 nM	148 nM

Tabelle 2: Apparente Dissoziationskonstanten der Komplexbildung zwischen der DC-SIGN CRD und 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 gemessen mit verschiedenen Methoden.

Bei Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie-Messungen können eine Reihe weiterer Effekte einen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Assoziations- und Dissoziationsraten haben (Huber *et al.*, 1999). Beispielsweise kann das negativ geladene, flexible Carboxymethyl-dextran-Gel die Bindung von geladenen Proteinen aufgrund von elektrostatischen Effekten beeinflussen. Beim sogenannten "Parking"-Effekt kann sich die Assoziationsgeschwindigkeit durch sterische Phänomene im Carboxymethyl-dextran-Gel, welche die Zugänglichkeit des Liganden – hier der DC-SIGN CRD - beeinflussen, drastisch verlangsamen. Des Weiteren kann sich die Assoziationsgeschwindigkeit verringern, wenn die Menge an löslichem Analyten – hier der Anticaline - im Carboxymethyl-dextran-Gel zum limitierenden Faktor wird. Eine solche Situation kann durch hohe immobilisierte Ligandenkonzentrationen oder niedrige Flussraten hervorgerufen werden. Bei Analyten mit kleiner kinetischer Dissoziationskonstante wiederum kann wiederholte Bindung die apparente Dissoziationsgeschwindigkeit verringern.

Die genaueren Ursachen für die sich unterscheidenden apparenten Dissoziationskonstanten wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Nichtsdestotrotz konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die maturierten Anticaline mit einer höheren Affinität an DC-SIGN binden als 3.92A. Außerdem ist, auch wenn die gemessenen kinetischen

Assoziationskonstanten möglicherweise durch die technischen Gegebenheiten beeinflusst wurden, von einer auffällig langsamen Assoziation ($1,01 \cdot 10^2 - 1,11 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) auszugehen. Für die Interaktion eines Antigens mit einem Antikörper liegt die Assoziationsgeschwindigkeit typischerweise höher im Bereich zwischen $10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Huber *et al.*, 1999).

4.7 Potential der Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 als Mikrobizide

Die Bindung des HI-Virus an submucosale dendritische Zellen erfolgt unter anderem über das C-Typ Lektin DC-SIGN. Zum einen kommt es dadurch zur sogenannten *cis*-Infektion von immaturren dendritischen Zellen, die ansonsten sehr geringe Mengen der eigentlichen HIV-Rezeptoren CD4, CCR5 und CXCR4 exprimieren. Darüber hinaus wird der HI-Virus auf der Oberfläche der dendritischen Zellen akkumuliert. Die migrierenden dendritischen Zellen transportieren den HI-Virus auf diese Weise in tieferliegende Gewebe, in denen die Konzentration von CD4-positiven T-Zellen hoch ist. Dort kommt es zur sogenannten *trans*-Infektion der T-Zellen (Figdor *et al.*, 2002). Vor allem bei der sexuellen Übertragung von HIV spielt DC-SIGN somit eine entscheidende Rolle.

Im Gegensatz zu DC-SIGN bietet der homologe Rezeptor Langerin Schutz vor HIV-Infektion. Langerin wird von epithelialen Langerhans'schen Zellen produziert. Auf die Bindung des HI-Virus an Langerin folgt die Internalisierung in die Birbeck Granules und interzellulärer Abbau. Wird durch einen Wirkstoff wie zum Beispiel Mannan neben DC-SIGN auch Langerin blockiert, so ist der Abbau des HI-Virus in den genitalen Epithelien gestört (de Witte *et al.*, 2007b). Für die Entwicklung von Wirkstoffen zum Schutz vor HIV-Infektion bedeutet dies, dass eine Spezifität für DC-SIGN erforderlich ist. Diese Eigenschaft erfüllen im Prinzip die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 - im Gegensatz zu dem Wirkstoff Mannan, der allgemein C-Typ Lektine und damit DC-SIGN sowie Langerin blockiert.

Wie im Fall von Mannan, das im Makaken-Modell keinen Schutz vor HIV-Infektion bieten konnte (Veazey *et al.*, 2005), sind auch klinische Studien mit eher unspezifisch wirkenden Reagenzien abgebrochen worden, da die Zahl der HIV-Infektionen unter den Probanden entgegen den Erwartungen sogar leicht anstieg (Klasse *et al.*, 2008). Zu diesen Reagenzien gehören das Detergenz Nonoxynol-9 (N9), das einerseits die Virusmembran zerstört, aber auch die schützenden, vaginalen Epithelien angreift (Hillier *et al.*, 2005), und das Polyanion Usherell (Cellulosesulfat), das durch Interaktion mit gp120 die Bindung des HI-Virus an die Zielzellen stört und somit deren Infektion verhindert (van de Wijgert & Shattock, 2007). Aufgrund der Rückschläge mit diesen Reagenzien wurde jüngst der Ruf nach Wirkstoffen mit hoher Spezifität lauter (Klasse *et al.*, 2008).

Die zelluläre HIV-Infektion kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Beispielsweise kann die initiale Bindung und Akkumulierung des HI-Virus auf der Oberfläche der dendritischen Zellen neben DC-SIGN über das Heparansulfat-Proteoglykan Syndecan-3 erfolgen (de Witte *et al.*, 2007a). Dem schließt sich die Übertragung der Viren bzw. die Infektion von immaturren dendritischen Zellen und T-Zellen an. Des Weiteren kann es in den vaginalen Epithelien, der Mucosa und Submucosa zur direkten Infektion von Langerhans'schen Zellen, Makrophagen oder auch T-Zellen kommen (Miller & Shattock, 2003). Aus diesem Grund steht nicht zu erwarten, dass Wirkstoffe, die DC-SIGN blockieren, eine HIV-Infektion vollständig unterbinden können, auch wenn beispielsweise DC-SIGN-spezifische Antikörper die Bindung des HI-Virus an DC-SIGN-exprimierende Zellen und die *trans*-Infektion von T-Zellen verhinderten (Baribaud *et al.*, 2002). DC-SIGN-blockierende Wirkstoffe wie die Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 könnten allerdings die Wahrscheinlichkeit einer HIV-Infektion reduzieren, was zumindest auf epidemiologischer Ebene günstige Auswirkungen haben könnte. Das Potential dieser Anticaline liegt in der Kombination mit Wirkstoffen, die weitere HIV-Rezeptoren wie beispielsweise CD4, CCR5 und CXCR4 blockieren, so dass insgesamt eine effiziente Infektion unterbunden wird.

Neben dem HI-Virus bindet DC-SIGN weitere Viren wie das Cytomegalo-Virus (Halary *et al.*, 2002), Hepatitis C (Lozach *et al.*, 2003) oder das Ebola-Virus (Alvarez *et al.*, 2002) über deren glykosylierte Hüllproteine und auch nichtvirale Pathogene wie *Helicobacter pylori* und *Mycobacterium tuberculosis* (Appelmelk *et al.*, 2003) durch Interaktion mit zuckerartigen Oberflächenstrukturen. Die Bindung an DC-SIGN spielt bei der Infektion durch diese Organismen eine wichtige Rolle. Daher sollten die DC-SIGN-bindenden Anticaline 3.92A, 3.92A4 und 3.92A2.18 auch als Ausgangspunkte zur Entwicklung von Wirkstoffen zur Bekämpfung dieser Krankheitserreger in Betracht gezogen werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit dem Ziel späterer therapeutischer Anwendungen ein Anticalin entwickelt werden, das die Bindung des *Human Immunodeficiency-Virus* (HIV) an Immunzellen zu verhindern vermag. Als Zielprotein für das *Engineering* eines solchen Anticalins wurde DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin*) gewählt. Die Anlagerung des HI-Virus an submucosale dendritische Zelle (DCs) ist ein möglicher Zwischenschritt bei der Infektion von T-Zellen, die den eigentlichen HIV-Rezeptor CD4 exprimieren. Im Fall der DCs erfolgt die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an die extrazelluläre *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD) von DC-SIGN. Neben Glykoproteinen wie gp120 bindet die DC-SIGN zahlreiche andere physiologisch relevante Saccharidstrukturen und Glykolipide in Calcium-abhängiger Weise.

Die DC-SIGN CRD wurde als funktionelle Proteindomäne in *E. coli* produziert. Dazu wurde der Vektor pDC1 konstruiert, der die periplasmatische Sekretion der DC-SIGN CRD mit dem *Strep*-tag II als Affinitätsanhängsel in gefalteter Form ermöglicht. Die Reinigung der DC-SIGN CRD *strepII* aus dem bakteriellen Periplasma erfolgte mittels Streptavidin-Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie. Die Funktionalität der rekombinanten DC-SIGN CRD konnte im ELISA bestätigt werden, bei dem die Calcium-abhängige Bindung an *Soy Bean Agglutinin*, das wie gp120 zu den *High Mannose* Typ Glykoproteinen gehört, nachgewiesen wurde.

Anticaline sind künstliche Bindungsproteine, die auf der Grundlage der β -*Barrel* Architektur der Lipocalinfamilie entwickelt werden. Das *Engineering* eines DC-SIGN-bindenden Anticalins begann ausgehend von der Struktur des humanen Tränenlipocalins (Tlc). Aus einer Phagemidbibliothek, bei der insgesamt 18 Aminosäurepositionen in den vier Peptidschleifen von Tlc randomisiert waren, wurden Varianten mit Bindungsaktivität für die DC-SIGN CRD mit Hilfe der *Phage Display*-Methode selektiert. Ein anschließender Kolonie-Filterstapel-Test ermöglichte die Vereinzelung und die parallelisierte Analyse der Bindungseigenschaften der so selektierten Varianten. Zwei der Anticaline mit spezifischer Bindungsaktivität, 3.92 und 3.149, wurden daraufhin in löslicher Form in *E. coli* produziert und untersucht. Durch Austausch je eines Cysteinrests gegen Serin an verschiedenen Positionen in der randomisierten Peptidschleife 1 wurde die zunächst beobachtete Dimerisierung dieser Proteine weitgehend verhindert. Im ELISA wurde gezeigt, dass 3.92 und dessen C30S-Mutante 3.92A spezifisch an DC-SIGN binden und zudem die Interaktion zwischen DC-SIGN und *Soy bean Agglutinin* kompetieren. Das Anticalin 3.149 und dessen C32S-Mutante 3.149A wiesen jedoch keine kompetitive Bindungsaktivität auf.

Die Dissoziationskonstante der Komplexbildung zwischen dem Anticalin 3.92A und der rekombinanten DC-SIGN CRD betrug 712 ± 44 nM im ELISA. Durch Affinitätsmaturierung

konnten nachfolgend 3.92A-Varianten mit verbesserter Affinität zu DC-SIGN selektiert werden. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: erstens, eine Phagemidbibliothek von 3.92A-Varianten durch Zufallsmutagenese der zentralen Genkassette einschließlich der vier variablen Peptidschleifen und zweitens, eine Phagemidbibliothek durch ortsgerichtete Randomisierung von ausgewählten Aminosäurepositionen in Peptidschleife 2. Die aus diesen Bibliotheken hervorgegangenen Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 wiesen im ELISA Dissoziationskonstanten von 75 ± 7 nM bzw. $11,6 \pm 4,7$ nM auf. Damit gelang eine Verbesserung der Affinität um etwa den Faktor 9 bzw. 67. Die Anticaline 3.92A4 und 3.92A2.18 zeigten wiederum Dimerisierungstendenz im Gegensatz zu 3.92, jedoch nicht vermittelt durch freie Cysteinreste.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Anticalin 3.92A2.18 bindet mit einer Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich spezifisch an den HIV-Rezeptor DC-SIGN und kann dessen Interaktion mit einem *High Mannose* Typ Glykoprotein inhibieren. Es ist daher zu erwarten, dass dieses Anticalin auch die Bindung des HI-Virus an dendritische Zellen zu blockieren vermag. Die ausgeprägte Spezifität von 3.92A2.18 für DC-SIGN ist beispielsweise im Vergleich mit Mannan, einem in der Entwicklung befindlichen Wirkstoff, von Vorteil, da Mannan ebenfalls die Interaktion des HI-Virus an den protektiven Saccharidrezeptor Langerin blockiert.

6 Abkürzungen

A	Fluoreszenz-Anisotropie
ABD	Albumin-Bindedomäne
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
Cam	Chloramphenicol
CD	Circular-Dichroismus
cfu	Colony Forming Unit
CDR	Complementary Determining Region
cps	Counts per second
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
E	Extinktion
ECD	Extracellular Domain
f(u)	Anteil des ungefalteten Proteins
Fab	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers aus zwei variablen sowie zwei konstanten Domänen (Fragment antigen binding)
F _c	Konstante Region des Antikörpers (Fragment crystallizing)
F _v	Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers aus zwei variablen Domänen (Fragment variable)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Ig	Immunoglobulin
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
Kan	Kanamycin

k_a	Assoziationsrate
k_d	Dissoziationsrate
K_D	Dissoziationskonstante
moi	Multiplicity of Infection
O.D.	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfu	Plaque Forming Units
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonance Units
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
ssDNA	single stranded DNA
Tlc	humanes Tränenlipocalin
Tlc'	Ausgangsmutante des humanen Tränenlipocalins für die Selektion von Anticalinen
U	Unit
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume
ΔA	Absorptionsänderung
θ_{MRW}	molare Elliptizität pro Aminosäure

7 Literaturverzeichnis

- Akerstrom, B., Logdberg, L., Berggard, T., Osmark, P. & Lindqvist, A. (2000) alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 172-84.
- Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A. L. & Delgado, R. (2002) C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol*, **76**, 6841-4.
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y. (2003) Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol*, **170**, 1635-9.
- Armour, K. L., Clark, M. R., Hadley, A. G. & Williamson, L. M. (1999) Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur J Immunol*, **29**, 2613-24.
- Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev*, **36**, 525-57.
- Barbas, C. F., 3rd, 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**, 4457-61.
- Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001) Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Barbas, C. F., 3rd, Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7978-82.
- Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991) Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, **67**, 581-9.
- Baribaud, F., Pohlmann, S., Leslie, G., Mortari, F. & Doms, R. W. (2002) Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *J Virol*, **76**, 9135-42.
- Bass, S., Greene, R. & Wells, J. A. (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins*, **8**, 309-14.
- Berova, N. & Nakanishi, K. W., R.W., eds. (2000) Circular Dichroism, Principles and Applications. Wiley-VCH, New York.

- Beste, G.** (1998) Evolutes Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β -Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Doktorarbeit, Fachbereich Chemie, 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**, 1898-903.
- Bianchet, M. A., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S. H., Monaco, H. L. & Amzel, L. M.** (1996) The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat Struct Biol*, **3**, 934-9.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. & Pluckthun, A.** (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*, **22**, 575-82.
- Binz, H. K., Amstutz, P. & Pluckthun, A.** (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol*, **23**, 1257-68.
- Birnboim, H. C. & Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bishop, R. E.** (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 73-83.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem*, **136**, 175-9.
- Boder, E. T. & Wittrup, K. D.** (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, **15**, 553-7.
- Bonavida, B., Sapse, A. T. & Sercarz, E. E.** (1969) Specific tear prealbumin: a unique lachrymal protein absent from serum and other secretions. *Nature*, **221**, 375-6.
- Borghouts, C., Kunz, C. & Groner, B.** (2005) Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, **5**, 783-97.
- Bratkovic, T.** (2009) Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 749-767.
- Breustedt, D. A., Chatwell, L. & Skerra, A.** (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **65**, 1118-25.

- Breustedt, D. A., Korndorfer, I. P., Redl, B. & Skerra, A.** (2005) The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem*, **280**, 484-93.
- Breustedt, D. A., Schonfeld, D. L. & Skerra, A.** (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta*, **1764**, 161-73.
- Brumano, M. H., Rogana, E. & Swaisgood, H. E.** (2000) Thermodynamics of unfolding of beta-trypsin at pH 2.8. *Arch Biochem Biophys*, **382**, 57-62.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-378.
- Butler, J. E.** (2000) Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods*, **22**, 4-23.
- Carter, P. J.** (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*, **6**, 343-57.
- Cavaggioni, A., Sorbi, R. T., Keen, J. N., Pappin, D. J. & Findlay, J. B.** (1987) Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and major urinary proteins. *FEBS Lett*, **212**, 225-8.
- Chen, G., Hayhurst, A., Thomas, J. G., Harvey, B. R., Iverson, B. L. & Georgiou, G.** (2001) Isolation of high-affinity ligand-binding proteins by periplasmic expression with cytometric screening (PECS). *Nat Biotechnol*, **19**, 537-42.
- Choi, J. H. & Lee, S. Y.** (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 625-35.
- Christiansen, J. & Rajasekaran, A. K.** (2004) Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther*, **3**, 1493-501.
- Cirl, C.** (2004) Scaffold Engineering am humanen Tränenlipocalin. Diplomarbeit, Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Cohen, D. S. & Pielak, G. J.** (1994) Stability of yeast iso-1-ferricytochrome c as a function of pH and temperature. *Protein Sci*, **3**, 1253-60.
- Colmenares, M., Puig-Kröger, A., Pello, O.M., Corbí, A.L., Rivas, L.** (2002) Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem*, **277**, 36766-9.
- Cross, B. C., Sinning, I., Luirink, J. & High, S.** (2009) Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 255-64.

- Curtis, B. M., Scharnowske, S. & Watson, A. J.** (1992) Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 8356-60.
- Davis, S. J., Ikemizu, S., Evans, E. J., Fugger, L., Bakker, T. R. & van der Merwe, P. A.** (2003) The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol*, **4**, 217-24.
- de Parseval, A., Su, S. V., Elder, J. H. & Lee, B.** (2004) Specific interaction of feline immunodeficiency virus surface glycoprotein with human DC-SIGN. *J Virol*, **78**, 2597-600.
- de Witte, L., Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T. B. & Gallay, P.** (2007a) Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19464-9.
- de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M. A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B.** (2007b) Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med*, **13**, 367-71.
- Devaraneni, P. K., Conti, B., Matsumura, Y., Yang, Z., Johnson, A. E. & Skach, W. R.** (2011) Stepwise insertion and inversion of a type II signal anchor sequence in the ribosome-Sec61 translocon complex. *Cell*, **146**, 134-47.
- Dilley, W. G., Haagensen, D. E., Cox, C. E. & Wells, S. A., Jr.** (1990) Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human breast gross cystic disease fluid. *Breast Cancer Res Treat*, **16**, 253-60.
- Eckert, K. A. & Kunkel, T. A.** (1990) High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3739-44.
- Fattori, B., Castagna, M., Megna, G., Casani, A. & Pelosi, P.** (1998) Immunohistochemical localisation of tear lipocalin in human nasal mucosa. *Rhinology*, **36**, 101-3.
- Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K. & Weis, W. I.** (2001) Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science*, **294**, 2163-6.
- Fekkes, P. & Driessen, A. J.** (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 161-73.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J.** (2002) C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*, **2**, 77-84.

- 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**, 83-8.
- Flower, D. R.** (1994) The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett*, **354**, 7-11.
- Flower, D. R.** (1995) Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J Mol Recognit*, **8**, 185-95.
- Flower, D. R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, **318** (Pt 1), 1-14.
- Flower, D. R., North, A. C. & Sansom, C. E.** (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 9-24.
- Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B. J. & Redl, B.** (2004) Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 3367-72.
- Fournier, T., Medjoubi, N. N. & Porquet, D.** (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 157-71.
- Gasymov, O. K., Abduragimov, A. R., Merschak, P., Redl, B. & Glasgow, B. J.** (2007) Oligomeric state of lipocalin-1 (LCN1) by multiangle laser light scattering and fluorescence anisotropy decay. *Biochim Biophys Acta*, **1774**, 1307-15.
- Gasymov, O. K., Abduragimov, A. R., Yusifov, T. N. & Glasgow, B. J.** (1999) Binding studies of tear lipocalin: the role of the conserved tryptophan in maintaining structure, stability and ligand affinity. *Biochim Biophys Acta*, **1433**, 307-20.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G. & van Kooyk, Y.** (2000a) DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*, **1**, 353-7.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. & Figdor, C. G.** (2000b) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, **100**, 575-85.
- Geller, B., Zhu, H. Y., Cheng, S., Kuhn, A. & Dalbey, R. E.** (1993) Charged residues render pro-OmpA potential dependent for initiation of membrane translocation. *J Biol Chem*, **268**, 9442-7.
- Glasgow, B. J., Abduragimov, A. R., Farahbakhsh, Z. T., Faull, K. F. & Hubbell, W. L.** (1995) Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr Eye Res*, **14**, 363-72.

- Glasgow, B. J., Abduragimov, A. R., Yusifov, T. N., Gasymov, O. K., Horwitz, J., Hubbell, W. L. & Faull, K. F.** (1998) A conserved disulfide motif in human tear lipocalins influences ligand binding. *Biochemistry*, **37**, 2215-25.
- Glasgow, B. J., Marshall, G., Gasymov, O. K., Abduragimov, A. R., Yusifov, T. N. & Knobler, C. M.** (1999) Tear lipocalins: potential lipid scavengers for the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 3100-7.
- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. & Strong, R. K.** (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*, **10**, 1033-43.
- Goetz, D. H., Willie, S. T., Armen, R. S., Bratt, T., Borregaard, N. & Strong, R. K.** (2000) Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry*, **39**, 1935-41.
- Greenfield, N. J.** (2007) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, **1**, 2876-90.
- Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C. & *et al.*** (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J*, **12**, 725-34.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F. & Dechanet-Merville, J.** (2002) Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*, **17**, 653-64.
- Halttunen, M., Kamarainen, M. & Koistinen, H.** (2000) Glycodelin: a reproduction-related lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 149-56.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. & Hamers, R.** (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, **363**, 446-8.
- Hanes, J. & Pluckthun, A.** (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4937-42.
- Harmen, M. M. & De Haard, H. J.** (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*, **77**, 13-22.
- Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M.** (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 574-81.
- Hauptman, P. J. & Kelly, R. A.** (1999) Digitalis. *Circulation*, **99**, 1265-70.

- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G.** (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol*, **226**, 889-96.
- Helenius, A. & Aebi, M.** (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**, 2364-9.
- Hieber, A. D., Bugos, R. C. & Yamamoto, H. Y.** (2000) Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 84-91.
- Hillier, S. L., Moench, T., Shattock, R., Black, R., Reichelderfer, P. & Veronese, F.** (2005) In vitro and in vivo: the story of nonoxynol 9. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **39**, 1-8.
- Ho, M., Nagata, S. & Pastan, I.** (2006) Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9637-42.
- Hochuli, E.** (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr*, **444**, 293-302.
- Hoedemaeker, F. J., Visschers, R. W., Alting, A. C., de Kruif, K. G., Kuil, M. E. & Abrahams, J. P.** (2002) A novel pH-dependent dimerization motif in beta-lactoglobulin from pig (*Sus scrofa*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 480-6.
- Hohlbaum, A. M. & Skerra, A.** (2007) Anticalins: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Rev Clin Immunol*, **3**, 491-501.
- Holla, A. & Skerra, A.** (2011) Comparative analysis reveals selective recognition of glycans by the dendritic cell receptors DC-SIGN and Langerin. *Protein Eng Des Sel*, **24**, 659-69.
- Holliger, P., Riechmann, L. & Williams, R. L.** (1999) Crystal structure of the two N-terminal domains of g3p from filamentous phage fd at 1.9 Å: evidence for conformational lability. *J Mol Biol*, **288**, 649-57.
- Horne, S. M. & Young, K. D.** (1995) *Escherichia coli* and other species of the *Enterobacteriaceae* encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Arch Microbiol*, **163**, 357-65.
- Huber, A., Demartis, S. & Neri, D.** (1999) The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *J Mol Recognit*, **12**, 198-216.
- Huber, R., Schneider, M., Epp, O., Mayr, I., Messerschmidt, A., Pflugrath, J. & Kayser, H.** (1987a) Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*. *J Mol Biol*, **195**, 423-34.

- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Muller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H.** (1987b) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol*, **198**, 499-513.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-8.
- Janeway, C. A. & Travers, P.** (1995) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Johnsson, B., Lofas, S. & Lindquist, G.** (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem*, **198**, 268-77.
- Kanai, M., Raz, A. & Goodman, D. S.** (1968) Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest*, **47**, 2025-44.
- Kaufer, B.** (2005) Herstellung, Charakterisierung und Kristallisation der Kohlenhydrat-Bindedomäne des C-Typ Lektins Langerin. Bachelorarbeit, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Kayser, H.** (1984) De novo synthesis and levels of cytochrome c and a biliprotein during pupal-adult development of a butterfly, *Pieris brassicae*. *Z. Naturforsch.*, **39**, 938-947.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B. & Borregaard, N.** (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 272-83.
- Klasse, P. J., Shattock, R. & Moore, J. P.** (2008) Antiretroviral drug-based microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. *Annu Rev Med*, **59**, 455-71.
- Konig, 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.
- Korndorfer, I. P., Schlehuber, S. & Skerra, A.** (2003) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J Mol Biol*, **330**, 385-96.
- Lacazette, E., Gachon, A. M. & Pitiot, G.** (2000) A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet*, **9**, 289-301.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.

- Lakowicz, J. R.** (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- Lascombe, M. B., Gregoire, C., Poncet, P., Tavares, G. A., Rosinski-Chupin, I., Rabillon, J., Goubran-Botros, H., Mazie, J. C., David, B. & Alzari, P. M.** (2000) Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem*, **275**, 21572-7.
- Lechner, M., Wojnar, P. & Redl, B.** (2001) Human tear lipocalin acts as an oxidative-stress-induced scavenger of potentially harmful lipid peroxidation products in a cell culture system. *Biochem J*, **356**, 129-35.
- Lee, M., Lloyd, P., Zhang, X., Schallhorn, J. M., Sugimoto, K., Leach, A. G., Sapiro, G. & Houk, K. N.** (2006) Shapes of antibody binding sites: qualitative and quantitative analyses based on a geomorphic classification scheme. *J Org Chem*, **71**, 5082-92.
- Lipovsek, D. & Pluckthun, A.** (2004) In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J Immunol Methods*, **290**, 51-67.
- Logdberg, L. & Wester, L.** (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 284-97.
- Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foung, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F. & Altmeyer, R.** (2003) DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem*, **278**, 20358-66.
- Lumry, R. & Biltonen, R.** (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers*, **4**, 917-44.
- MacCallum, R. M., Martin, A. C. & Thornton, J. M.** (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*, **262**, 732-45.
- 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**, 581-97.
- Michaud, G. A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P. F. & Schweitzer, B. I.** (2003) Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol*, **21**, 1509-12.
- Miller, C. J. & Shattock, R. J.** (2003) Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect*, **5**, 59-67.
- Miller, J. H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Milstein, C.** (2000) With the benefit of hindsight. *Immunol Today*, **21**, 359-64.
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. & Raina, S.** (1994) The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *Embo J*, **13**, 2013-20.
- Mitchell, D. A., Fadden, A. J. & Drickamer, K.** (2001) A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, **276**, 28939-45.
- Movva, N. R., Nakamura, K. & Inouye, M.** (1980) Regulatory region of the gene for the ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3845-9.
- Muller, 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**, 725-32.
- Nagyova, B. & Tiffany, J. M.** (1999) Components responsible for the surface tension of human tears. *Curr Eye Res*, **19**, 4-11.
- Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H. J., Eichinger, A. & Skerra, A.** (2006) Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci*, **15**, 190-9.
- Netzer, W. J. & Hartl, F. U.** (1997) Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature*, **388**, 343-9.
- Newcomer, M. E., Jones, T. A., Aqvist, J., Sundelin, J., Eriksson, U., Rask, L. & Peterson, P. A.** (1984) The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *Embo J*, **3**, 1451-4.
- Newcomer, M. E. & Ong, D. E.** (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 57-64.
- Neylon, C.** (2004) Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1448-59.
- 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.
- Ortlund, E., Parker, C. L., Schreck, S. F., Ginell, S., Minor, W., Sodetz, J. M. & Lebioda, L.** (2002) Crystal structure of human complement protein C8gamma at 1.2 Å resolution reveals a lipocalin fold and a distinct ligand binding site. *Biochemistry*, **41**, 7030-7.

- Park, S. H. & Raines, R. T.** (2004) Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. *Methods Mol Biol*, **261**, 161-6.
- Petrie, K. L. & Joyce, G. F.** (2010) Deep sequencing analysis of mutations resulting from the incorporation of dNTP analogs. *Nucleic Acids Res*, **38**, 8095-104.
- Pevsner, J., Trifiletti, R. R., Strittmatter, S. M. & Snyder, S. H.** (1985) Isolation and characterization of an olfactory receptor protein for odorant pyrazines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 3050-4.
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A. & Rosenberg, S. A.** (2003) Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8372-7.
- Pohlmann, S., Baribaud, F., Lee, B., Leslie, G. J., Sanchez, M. D., Hiebenthal-Millow, K., Munch, J., Kirchhoff, F. & Doms, R. W.** (2001a) DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, **75**, 4664-72.
- Pohlmann, S., Leslie, G. J., Edwards, T. G., Macfarlan, T., Reeves, J. D., Hiebenthal-Millow, K., Kirchhoff, F., Baribaud, F. & Doms, R. W.** (2001b) DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus: virus binding and transfer are dissociable functions. *J Virol*, **75**, 10523-6.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-9.
- Ramoni, R., Spinelli, S., Grolli, S., Conti, V., Merli, E., Cambillau, C. & Tegoni, M.** (2008) Deswapping bovine odorant binding protein. *Biochim Biophys Acta*, **1784**, 651-7.
- Ramoni, R., Vincent, F., Ashcroft, A. E., Accornero, P., Grolli, S., Valencia, C., Tegoni, M. & Cambillau, C.** (2002) Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *Biochem J*, **365**, 739-48.
- Redl, B.** (2000) Human tear lipocalin. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 241-8.
- Redl, B., Holzfeind, P. & Lottspeich, F.** (1992) cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily. *J Biol Chem*, **267**, 20282-7.

- 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**, 4500-4.
- Rouvière, P.E., Gross, C.A.** (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev*, **10**, 3170-82.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sambrook, J. & Russel, D. W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. & Marks, J. D.** (1996) Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol*, **255**, 28-43.
- Schierle, C. F., Berkmen, M., Huber, D., Kumamoto, C., Boyd, D. & Beckwith, J.** (2003) The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J Bacteriol*, **185**, 5706-13.
- Schlaspschy, M.** (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation, Biologische Chemie, Technische Universität München.
- 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**, 385-90.
- Schlehuber, S.** (2001) Evolutes Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Dissertation, Biologische Chemie, 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**, 1105-20.
- 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**, 213-28.
- Schlehuber, S. & Skerra, A.** (2005) Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discov Today*, **10**, 23-33.

- Schmid, F. X.** (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: Protein protein structure, a practical approach. TRL Press, Oxford.
- Schmidt, T. G. & Skerra, A.** (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng*, **6**, 109-22.
- Schmidt, T. G. & Skerra, A.** (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A*, **676**, 337-45.
- 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**, 1528-35.
- Schonfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hulsmeier, M., Brown, N., Kaye, P. M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A. M. & Skerra, A.** (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 8198-203.
- Schreck, S. F., Parker, C., Plumb, M. E. & Sodetz, J. M.** (2000) Human complement protein C8 gamma. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 199-208.
- Shevchik, V. E., Condemine, G. & Robert-Baudouy, J.** (1994) Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *Embo J*, **13**, 2007-12.
- Shivange, A. V., Marienhagen, J., Mundhada, H., Schenk, A. & Schwaneberg, U.** (2009) Advances in generating functional diversity for directed protein evolution. *Curr Opin Chem Biol*, **13**, 19-25.
- Siller, E., DeZwaan, D. C., Anderson, J. F., Freeman, B. C. & Barral, J. M.** Slowing bacterial translation speed enhances eukaryotic protein folding efficiency. *J Mol Biol*, **396**, 1310-8.
- Silverman, J., Liu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., Alba, B. M., Smith, R., Rivas, A., Li, P., Le, H., Whitehorn, E., Moore, K. W., Swimmer, C., Perlroth, V., Vogt, M., Kolkman, J. & Stemmer, W. P.** (2005) Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol*, **23**, 1556-61.
- Skerra, A.** (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3551-4.

- Skerra, A.** (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene*, **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, **151**, 131-5.
- Skerra, A.** (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 337-50.
- Skerra, A.** (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol*, **7**, 683-93.
- 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 J*, **275**, 2677-83.
- Skerra, A., Dreher, M. L. & Winter, G.** (1991a) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal Biochem*, **196**, 151-5.
- Skerra, A. & Nasreen, A.** (2007) Muteins of tear lipocalin with affinity for the T-cell coreceptor CD4. Schutzrecht WO 2007/107563 A2 (27.09.2007), Pr.: US 60/783,991 (20.03.2006).
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Pluckthun, A.** (1991b) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)*, **9**, 273-8.
- Skerra, A. & Pluckthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, **240**, 1038-41.
- Skerra, A. & Pluckthun, A.** (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng*, **4**, 971-9.
- 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.
- Smith, G. P.** (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-7.
- Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Bonicel, J., Cambillau, C. & Tegoni, M.** (1998) The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry*, **37**, 7913-8.

- Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. & Rasched, I.** (1990) Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J Mol Biol*, **212**, 143-9.
- Stumpp, M. T. & Amstutz, P.** (2007) DARPins: a true alternative to antibodies. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **10**, 153-9.
- Su, S. V., Hong, P., Baik, S., Negrete, O. A., Gurney, K. B. & Lee, B.** (2004) DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *J Biol Chem*, **279**, 19122-32.
- Suter, F., Kayser, H. & Zuber, H.** (1988) The complete amino-acid sequence of the bilin-binding protein from *Pieris brassicae* and its similarity to a family of serum transport proteins like the retinol-binding proteins. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **369**, 497-505.
- 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**, 6339-43.
- Talmadge, K. & Gilbert, W.** (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 1830-3.
- Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M.A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D.L. & et al.** (2003) DC-SIGN (CD209) mediates *dengue* virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, **197**, 823-9.
- Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. & Cambillau, C.** (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 229-40.
- Tegoni, M., Ramoni, R., Bignetti, E., Spinelli, S. & Cambillau, C.** (1996) Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat Struct Biol*, **3**, 863-7.
- Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 259-71.
- Urade, Y., Nagata, A., Suzuki, Y., Fujii, Y. & Hayaishi, O.** (1989) Primary structure of rat brain prostaglandin D synthetase deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem*, **264**, 1041-5.
- Valent, Q. A.** (2001) Signal recognition particle mediated protein targeting in *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **79**, 17-31.

- van de Wijert, J. H. & Shattock, R. J.** (2007) Vaginal microbicides: moving ahead after an unexpected setback. *Aids*, **21**, 2369-76.
- van Die, I., van Vliet, S.J., Nyame, A.K., Cummings, R.D., Bank, C.M., Appelmeik, B., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y.** (2003) The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology*, **13**, 471-8.
- van't Hof, W., Blankenvoorde, M. F., Veerman, E. C. & Amerongen, A. V.** (1997) The salivary lipocalin von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem*, **272**, 1837-41.
- Veazey, R.S., Klasse, P.J., Schader, S.M., Hu, Q., Ketas, T.J., Lu, M., Marx, P.A., Dufour, J., Colonno, R.J., Shattock, R.J & et al.** (2005) Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion. *Nature*. **438**, 99-102.
- Vogt, M. & Skerra, A.** (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit*, **14**, 79-86.
- Vogt, M. & Skerra, A.** (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem*, **5**, 191-9.
- 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**, 975-82.
- Watson, R. P., Demmer, J., Baker, E. N. & Arcus, V. L.** (2007) Three-dimensional structure and ligand binding properties of trichosurin, a metatherian lipocalin from the milk whey of the common brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. *Biochem J*, **408**, 29-38.
- Werner, R. G.** (2004) Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals. *J Biotechnol*, **113**, 171-82.
- Winkler, M. S. E.** (2005) Entwicklung einer evolutiven Selektionsstrategie für inhibitorische Anticaline im bakteriellen Cytosol. Diplomarbeit, Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Wojnar, P., Dirnhofer, S., Ladurner, P., Berger, P. & Redl, B.** (2002) Human lipocalin-1, a physiological scavenger of lipophilic compounds, is produced by corticotrophs of the pituitary gland. *J Histochem Cytochem*, **50**, 433-5.

- Wong, T. S., Roccatano, D. & Schwaneberg, U.** (2007) Steering directed protein evolution: strategies to manage combinatorial complexity of mutant libraries. *Environ Microbiol*, **9**, 2645-59.
- Worn, A. & Pluckthun, A.** (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol*, **305**, 989-1010.
- Wu, L., Martin, T. D., Vazeux, R., Unutmaz, D. & KewalRamani, V. N.** (2002) Functional evaluation of DC-SIGN monoclonal antibodies reveals DC-SIGN interactions with ICAM-3 do not promote human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Virol*, **76**, 5905-14.
- Xu, N. & Dahlback, B.** (1999) A novel human apolipoprotein (apoM). *J Biol Chem*, **274**, 31286-90.
- 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**, 103-19.
- Yusifov, T. N., Abduragimov, A. R., Gasymov, O. K. & Glasgow, B. J.** (2000) Endonuclease activity in lipocalins. *Biochem J*, **347 Pt 3**, 815-9.
- 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.

8 Anhang

8.1 Ausschnitt aus den Expressionsplasmiden zur Produktion von rekombinantem DC-SIGN

8.1.1 *pDC1 zur Produktion der DC-SIGN CRDstrepII*

```

                                                    XbaI
                                                    |
TATTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAATGAATAGTTCGACAAAAATCT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ATAAAATGGTGAGGGATAGTCACTATCTCTTTTCACCTTACTTATCAAGCTGTTTTTAGA

TyrPheThrThrProTyrGlnEndEndArgLysValLysEndIleValArgGlnLysSer -
AGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCTATTGCTCCCGTTTTTTACTTTTTCTGTCGATAGCGCTAACGTCACCGTGACCGACCA

ArgEndArgGlyGlnLysMetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGly -
DC-SIGN-for
TTCGCTACCGTAGCGCAGGcccagccctgtccctgggaatggacattcttccaaggaaac
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
AAGCGATGGCATCGCGTCCgggtcgggacagggacccttacctgtaagaaggttcctttg

PheAlaThrValAlaGlnAlaGlnProCysProTrpGluTrpThrPhePheGlnGlyAsn -
tgttacttcatgtctaactcccagcgggaactggcagcactccatcaccgctgcaaagaa
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
acaatgaagtacagattgagggtcgccttgaccgtgctgaggtagtggcggacgtttctt

CysTyrPheMetSerAsnSerGlnArgAsnTrpHisAspSerIleThrAlaCysLysGlu -
EcoO109I   ApaI   BbvCI   PvuII   PstI
|   |   |   |   |   |   |   |
gtgggggcccagctcgtcgtaatcaaaagtgctgaggagcagaacttctacagctgcag
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
cacccccgggtcgagcagcattagttttcacgactcctcgtcttgaaggatgtcgacgtc

ValGlyAlaGlnLeuValValIleLysSerAlaGluGluGlnAsnPheLeuGlnLeuGln -
BsaBI
BglII   |   PmlI
|   |   |
tcttcagaagtaaccgcttcacctggatgggactttcagatctaaatcaggaaggcagc
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
agaaggtcttcattggcgaagtggacctaccctgaaagtctagatttagtccttccgtgc

SerSerArgSerAsnArgPheThrTrpMetGlyLeuSerAspLeuAsnGlnGluGlyThr -

```

```

tggcaatgggtggacggctcacctctgttgcccagcttcaagcagtattggaacagagga
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
accggttaccacctgccgagtggagacaacgggtcgaagttcgtcataacctgtctcct

TrpGlnTrpValAspGlySerProLeuLeuProSerPheLysGlnTyrTrpAsnArgGly -

gagcccaacaacggttggggaggaagactgcgcggaatntagtggaatggctggaacgac
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ctcgggttggtgcaaccctccttctgacgcgcttaaatcaccggttaccgaccttgctg

GluProAsnAsnValGlyGluGluAspCysAlaGluPheSerGlyAsnGlyTrpAsnAsp -

gacaaatgtaatcttgccaaattctggatctgcaaaaagAGCGCTTGGTcTCACCCGCAG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ctgtttacattagaaccggtttaagacctagacgttttttcTCGCGAACCagAGTGGGCGTC
DC-SIGN-rev

AspLysCysAsnLeuAlaLysPheTrpIleCysLysLysSerAlaTrpSerHisProGln -

NspV      HindIII  AflIII  BtrI
|          |        |        |
|          |        |        |
TTCGaaaaaTAATAAGCTTGACGTGTGAAGTGAAAAATGGCGCACATTGTGCGACATTTT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
AAGCtttttATTATTCGAAC TGCACTTCACTTTTTACCGCGTGTAAACACGCTGTAAAA

PheGluLysEndEndAlaEndArgValLysEndLysMetAlaHisIleValArgHisPhe -

```

Abbildung 32: Die kodierende Sequenz des Proteins DC-SIGN CRD $strepII$ auf dem Expressionsplasmid pDC1. Der dargestellte Sequenzbereich des Expressionsplasmids pDC1 zeigt das OmpA-Signalpeptid (blau) gefolgt von der DC-SIGN CRD (rot) und dem *Strep*-Tag II (grün). Die Oligodesoxynukleotide DC-SIGN-for und DC-SIGN-rev (unterstrichen) wurden für die Herstellung von pDC1 verwendet. Bei pDC1 handelt es sich um ein Expressionsplasmid zur löslichen Produktion der DC-SIGN CRD $strepII$ im Periplasma von *E. coli*. Die Kontrolle der Expression erfolgte über das Tetracyclin Promotor/Operatorsystem.

8.1.2 pDC9 zur Produktion der DC-SIGN-ECD $strepII$

```

GGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTC
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
CCTAGAGCTAGGGCGCTTTAATTATGCTGAGTGATATCCCTCTGGTGTGCCAAAGGGAG

AspLeuAspProAlaLysLeuIleArgLeuThrIleGlyArgProGlnArgPheProSer -

NdeI
DC6  |
CCCTCTCATATGGCTATCTACCAGAACCT
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
ATCTTTATTAAAACAAATTGAAATTCTTCTCTATATGTATACcgAtagatggtccttggg

ArgAsnAsnPheValEndLeuEndGluGlyAspIleHisMetAlaIleTyrGlnAsnLeu -

```

SacI
|

GACC

2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
gaccagcttaaagctgcagtgaggctctcagagaaatccaagctgcaggagatcta
ctgggtcgaatttcgacgtcaccactcgagagtctcttttaggttcgacgtcctctagat

ThrGlnLeuLysAlaAlaValGlyGluLeuSerGluLysSerLysLeuGlnGluIleTyr -

2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
ccaggagctgaccagctgaaggctgcagtgaggcttccagagaaatctaagctgca
ggtcctcgactgggtcgacttccgacgtcaccactcgaaggtctcttttagattcgacgt

GlnGluLeuThrGlnLeuLysAlaAlaValGlyGluLeuProGluLysSerLysLeuGln -

2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
ggagatctaccaggagctgaccgggtgaaggctgcagtgaggcttccagagaaatc
cctctagatggtcctcgactgggccgacttccgacgtcaccactcgaaggtctcttttag

GluIleTyrGlnGluLeuThrArgLeuLysAlaAlaValGlyGluLeuProGluLysSer -

2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
taagctgcaggagatctaccaggagctgacctggctgaaggctgcagtgaggcttcc
attcgacgtcctctagatggtcctcgactggaccgacttccgacgtcaccactcgaagg

LysLeuGlnGluIleTyrGlnGluLeuThrTrpLeuLysAlaAlaValGlyGluLeuPro -

2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
agagaaatctaagatgcaggagatctaccaggagctgactcggctgaaggctgcagtgagg
tctcttttagattctacgtcctctagatggtcctcgactgagccgacttccgacgtcacc

GluLysSerLysMetGlnGluIleTyrGlnGluLeuThrArgLeuLysAlaAlaValGly -

2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
tgagcttccagagaaatctaagcagcaggagatctaccaggagctgaccgggtgaaggc
actcgaaggtctcttttagattcgtcgtcctctagatggtcctcgactgggccgacttccg

GluLeuProGluLysSerLysGlnGlnGluIleTyrGlnGluLeuThrArgLeuLysAla -

2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
tgcagtgaggctgcagtgaggcttccagagaaatctaagcagcaggagatctaccaggagctgaccgg
acgtcaccactcgaaggtctcttttagattcgtcgtcctctagatggtcctcgactgggc

AlaValGlyGluLeuProGluLysSerLysGlnGlnGluIleTyrGlnGluLeuThrArg -

2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
gctgaaggctgcagtgaggcttccagagaaatctaagcagcaggagatctaccaggag
cgacttccgacgtcaccactcgaaggtctcttttagattcgtcgtcctctagatggtcct

LeuLysAlaAlaValGlyGluLeuProGluLysSerLysGlnGlnGluIleTyrGlnGlu -

2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
gctgaccagctgaaggctgcagtggaacgctgtgccaccctgtccctgggaatggac
cgactgggtcgacttccgacgtcaccttgcggacacgggtggggacagggacccttacctg

LeuThrGlnLeuLysAlaAlaValGluArgLeuCysHisProCysProTrpGluTrpThr -

```

attctttccaaggaaactgttactttcatgtctaactcccagcggaaactggcagcactccat
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
taagaaggttcctttgacaatgaagtacagattgagggctgccttgaccgtgctgaggtta

PhePheGlnGlyAsnCysTyrPheMetSerAsnSerGlnArgAsnTrpHisAspSerIle -

                                     ApaI                               BbvCI
                                     |                               |
                                     |                               |
caccgcctgcaaagaagtggggcccagctcgctcgtaatcaaaagtgctgaggagcagaa
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
gtggcggacgtttcttcacccccgggtcgagcagcattagttttcacgactcctcgtctt

ThrAlaCysLysGluValGlyAlaGlnLeuValValIleLysSerAlaGluGluGlnAsn -

cttcctacagctgcagctcttcagaagtaaccgcttcacctggatgggactttcagatct
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
gaaggatgtcgacgtcagaaggtcttcattggcgaagtggacctaccctgaaagtctaga

PheLeuGlnLeuGlnSerSerArgSerAsnArgPheThrTrpMetGlyLeuSerAspLeu -

                                     Pml I
                                     |
aaatcaggaaggcacgtggcaatgggtggacggctcacctctgttgccagcttcaagca
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
tttagtccttccgtgcaccgttaccacctgccgagtggagacaacgggtcgaagttcgt

AsnGlnGluGlyThrTrpGlnTrpValAspGlySerProLeuLeuProSerPheLysGln -

gtattggaacagaggagagcccaacaacgttggggaggaagactgcgcggaatttagtgg
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
cataaccttgtctcctctcgggttgttgcaaccctccttctgacgcgccttaaatcacc

TyrTrpAsnArgGlyGluProAsnAsnValGlyGluGluAspCysAlaGluPheSerGly -

                                     PflMI                               Eco47III
                                     |                               |
caatggctggaacgacgacaaatgtaatcttgccaaattctggatctgcaaaaagAGCGC
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
gttaccgaccttgctgctgtttacattagaacggtttaagacctagacgtttttcTCGCG

AsnGlyTrpAsnAspAspLysCysAsnLeuAlaLysPheTrpIleCysLysLysSerAla -

                                     NspV                               HindIII
                                     |                               |
TTGGtcTCACCCGCAGTTCGaaaaaTAATAAGCTTGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
AACCagAGTGGGCGTCAAGCtttttATTATTCGAACTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTT

TrpSerHisProGlnPheGluLysEndEndAlaEndSerGlyCysEndGlnSerProLys -

```

Abbildung 33: Die kodierende Sequenz des Proteins DC-SIGN ECD $strep$ II auf dem Expressionsplasmid pDC9. Gezeigt ist der für die DC-SIGN ECD $strep$ II kodierende Sequenzbereich des Expressionsplasmids pDC9. Die DC-SIGN ECD (rot) wird gefolgt von einem C-terminalem $Strep$ -Tag II (grün). Das Oligodesoxynukleotid DC6 (unterstrichen) wurde für die Herstellung von pDC9 verwendet. Bei pDC9 handelt es sich um ein Expressionsplasmid zur cytoplasmatischen Überproduktion der DC-SIGN ECD $strep$ II in *E. coli*. Die Kontrolle der Expression erfolgte über einen T7-Promotor. Das rekombinante Protein wurde in Form von *Inclusion bodies* erhalten.

8.2 Schematische Darstellung der Expressionsplasmide pTlc26 – 28

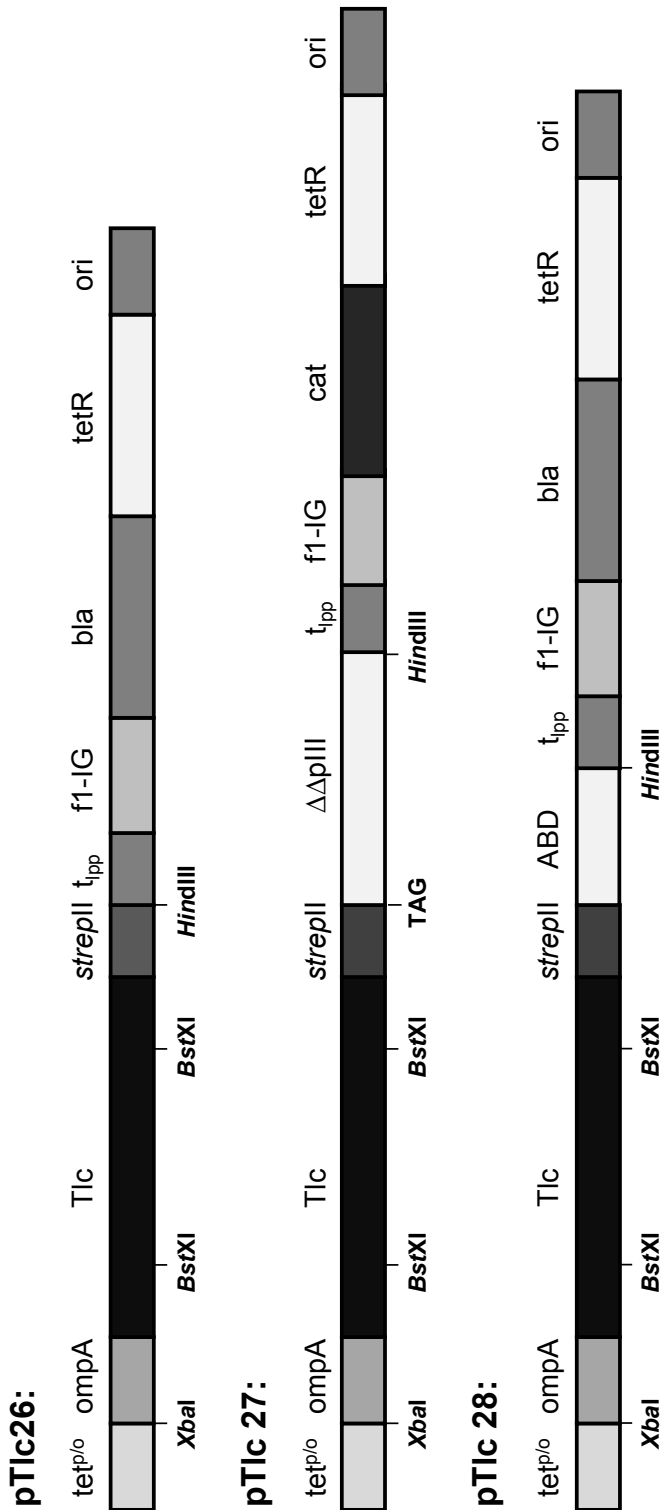


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Vektoren pTlc26, pTlc27 und pTlc28 nach Skerra & Nasreen (2007). Bei pTlc26 handelt es sich um einen Expressionsvektor für die bakterielle Produktion des humanen Tränenlipocalins Tlc mit N-terminaler OmpA-Signalsequenz und C-terminaler *Strep*-tag II. pTlc27 dient zur Präsentation von Tlc auf der Phagemidoberfläche als Fusionsprotein mit dem C-terminalen Fragment des Phagenhüllproteins $\Delta\Delta pIII$. Nach dem *Strep*-tag II ist bei pTlc27 dazu $\Delta\Delta pIII$ kodiert. Mit pTlc28 wird die Produktion von Tlc als Fusion mit der Albumin-Bindedomäne ABD ermöglicht, die sich C-terminal dem *Strep*-tag II anschließt. *XbaI*, *BstXI* und *HindIII* sind die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. $tet^{p/o}$ bezeichnet den Tetracyclin-Promotor/Operator, t_{pp} den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, f1-IG die intergenische Region des Phagen fl, bla das β -Lactamasegen, cat das Chloramphenicol-transferasegen, tetR das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors sowie ori den Replikationsursprung.

Danksagung

Viele Kollegen, Freunde und Verwandte sind am Gelingen dieser Arbeit beteiligt gewesen und natürlich möchte ich mich bei allen von Herzen für die Unterstützung bedanken.

Besonderen Dank möchte ich Prof. Arne Skerra aussprechen. Er war mir immer ein guter Chef und Doktorvater, der sich trotz seiner unzähligen Aufgaben viel Zeit für die Betreuung meiner Arbeit genommen hat. Aus Gesprächen und Diskussionen mit Ihm bin ich fast immer hochmotiviert und mit neuen Ideen und Plänen im Kopf rausgegangen und die Tatsache, dass ich während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe so einiges dazugelernt habe, ist sicherlich zu einem großen Teil sein Verdienst.

Dr. Martin Schlapschy und seinem Team sei gedankt für die hervorragende Labororganisation.

Ich danke auch allen meinen Kollegen vor allem für die technische und wissenschaftliche Unterstützung, die mir zuteil wurde, aber auch die gute Arbeitsatmosphäre im Labor und die vielen netten gemeinsamen Stunden. Ich bin versucht an dieser Stelle alle meine Kollegen namentlich zu erwähnen, da mir niemand einfällt, der mir nicht in der einen oder anderen Form geholfen hätte, aber die Liste wäre einfach zu lang. Ich hoffe aber trotzdem, dass es keinen gibt, der sich nicht angesprochen fühlt.

Erwähnt seien dennoch diejenigen mit denen ich am meisten Zeit verbracht habe. Am engsten zusammengearbeitet habe ich mit Dr. Amber Nasreen (an einem ähnlichen Projekt), Dr. Lorenz Keil und Benedikt Kaufer (an der selben Struktur), Dr. Andreas Eichinger und Josef Danzer (an der selben Komplexstruktur) sowie mit Christian Kirchner und Sabine Rauth (im selben Labor). Es war mir eine Freude! Natürlich danke ich auch dem harten Kern der Mittagessentruppe Lorenz Keil, Dorian Schönfeld, Jan-Peter Mayer und Michael Schneider für anregende wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Gespräche und Margrit Winkler und Lisa Liebl für den einen oder anderen gemeinsam getrunkenen Kaffee.

Ausserdem möchte ich mich herzlich bei der Pieris AG für das Aliquot der Phagemidbibliothek und bei Dr. Martin Schlapschy, Dr. Steffen Schlehuber und Christine Cirl für die Überlassung von Texten für den Material und Methoden Teil dieser Arbeit bedanken.