

Lehrstuhl für Biologische Chemie
Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen

Protein-Engineering eines Anticalins
mit Bindungsspezifität zur Hexahistidin-Sequenz

Dipl.-Ing. Zala Lazar

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. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra

2. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch

Die Dissertation wurde am 10.05.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 30.09.2007 angenommen.

Allen, die an mich geglaubt haben

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline	1
1.2 Das Bilin-Bindungsprotein aus <i>Pieris brassicae</i>	4
1.3 Anticaline: künstliche Lipocaline mit neuartigen Ligandenspezifitäten	6
1.4 Selektionsmethoden: <i>Phage Display</i> und <i>Filter Sandwich Colony Screening Assay</i>	10
1.5 Das His ₆ -Affinitätsanhängsel in der biowissenschaftlichen Forschung	13
1.6 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Biologisches Material	19
2.1.2 Plasmide	19
2.1.3 Oligodesoxynukleotide	20
2.1.4 Proteine bzw. Enzyme und Peptide	21
2.1.5 Chemikalien	21
2.1.6 Standards und Kits	25
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Sonstiges Material	28
2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	30
2.2 Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen	36
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	36
2.2.2.1 Transformation nach der CaCl ₂ -Methode	36
2.2.2.2 Transformation mittels Elektroporation	37
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	38
2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	38
2.2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA	39
2.2.4 Gelelektrophorese von DNA	40
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	41

2.2.5	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	41
2.2.5.1	5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	41
2.2.5.2	Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel	42
2.2.5.3	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	42
2.2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.5.5	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	45
2.2.5.6	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	45
2.2.5.7	Ligierung von DNA-Fragmenten	46
2.3	<i>Phage Display</i>	47
2.3.1	Propagation von Helferphagen	47
2.3.2	Produktion von Phagemidbibliotheken	48
2.3.3	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	49
2.3.4	Amplifizierung von Phagemiden	49
2.3.5	Titerbestimmung von Phagemidlösungen	50
2.3.6	<i>Filter Sandwich Colony Screening Assay</i>	51
2.4	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	52
2.4.1	Gentechnische Herstellung von G9-Cystatin	53
2.4.2	Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten im Schüttelkolben	54
2.4.3	Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten im Laborfermenter	54
2.5	Proteinchemische Methoden	56
2.5.1	Chromatographische Verfahren	56
2.5.1.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose	56
2.5.1.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie	57
2.5.1.3	Gelpermeations-Chromatographie	58
2.5.1.4	Anionenaustausch-Chromatographie	58
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
2.5.3	Konzentrierung von Proteinen	60
2.5.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	61
2.5.5	Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen	61
2.5.6	N-terminale Proteinsequenzierung	62
2.5.7	Chemische Quervernetzung	62
2.6	Immunochemische Methoden	63
2.6.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	63
2.6.2	<i>Western Blotting</i>	66

2.7 Biophysikalische Methoden	67
2.7.1 Massenspektrometrie	67
2.7.2 Fluoreszenztitration	68
2.7.3 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)	70
2.8 Enzymkinetische Methoden	71
2.9 Computerprogramme und Datenbanken	72
3 Ergebnisse	73
3.1 Charakterisierung von His ₆ -tag bindenden BBP-Varianten	73
3.1.1 Bakterielle Produktion der BBP-Variante His1ΔC* in JM83	74
3.1.2 Versuche zur Abtrennung des mit His1ΔC* assoziierten Skp	76
3.1.3 Bakterielle Produktion der BBP-Variante His1ΔC* in MC4100Δskp	77
3.1.4 Gentechnische Herstellung von G9-Cystatin-His ₆	78
3.1.5 Gentechnische Herstellung von Wildtyp-BBP-His ₆	79
3.1.6 Bestimmung der Affinität von His1ΔC* für G9-Cystatin-His ₆ mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)	81
3.2 <i>In vitro</i> Affinitätsmaturierung der BBP-Variante His1ΔC*	83
3.2.1 Randomisierung des dritten und vierten Schleifensegments von His1ΔC*	83
3.2.2 Affinitätsanreicherung von BBP-Varianten gegenüber G9-Cystatin-His ₆ mittels <i>Phage Display</i>	86
3.2.3 Identifizierung von BBP-Varianten mittels <i>Filter Sandwich Colony</i> <i>Screening Assay</i>	89
3.2.4 Sequenzanalyse der selektierten Varianten	92
3.2.5 Produktion der His1ΔC*-Varianten in <i>E. coli</i> und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA	94
3.2.6 Einsatz von His1ΔC* und His1ΔC*-16 zur Detektion von His ₆ -Gruppen auf dem <i>Western Blot</i>	98
3.3 Affinitätsmaturierung mittels <i>Error Prone PCR</i>	100
3.3.1 Zufallsmutagenese EPI	101
3.3.2 Zufallsmutagenese EPII	101
3.3.2.1 Selektion von BBP-Varianten mittels <i>Filter Sandwich Colony</i> <i>Screening Assay</i> und Sequenzanalyse der selektierten Varianten	102
3.3.2.2 Produktion der selektierten BBP-Varianten in <i>E. coli</i> und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA	106

3.3.3	Zufallsmutagenese EPIII	108
3.3.3.1	Selektion von BBP-Varianten mittels <i>Filter Sandwich Colony Screening Assay</i> und Sequenzanalyse der selektierten Varianten	109
3.3.3.2	Produktion der BBP-Varianten in <i>E. coli</i> und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA	113
3.4	Eliminierung der Disulfidbrücken in der BBP-Variante EPII.44	114
3.4.1	Entfernung der Disulfidbrücke C42-C170 (Variante EPII.44CC)	115
3.4.2	Entfernung der beiden Disulfidbrücken C42-C170 und C8-C115 (Variante EPII.44C4)	117
3.4.3	Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von EPII.44C4	120
3.4.4	Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften von EPII.44C4 mittels ELISA und <i>Western Blot</i>	122
3.4.5	Untersuchung der Liganden-Affinität von EPII.44C4 mittels Fluoreszenztitration	124
3.5	Herstellung eines Fusionsproteins aus einer BBP-Variante und der TEM1 β -Lactamase	126
3.5.1	Gentechnische Produktion des Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	127
3.5.2	Funktionelle Analyse des Fusionsproteins und Anwendung im ELISA	128
3.5.3	Einsatz des Fusionsproteins zum direkten Nachweis von His ₆ -Gruppen auf dem <i>Western Blot</i> unter Verwendung eines neuartigen Substrates	129
4	Diskussion	133
4.1	Komplexbildung zwischen Anticalinen, Ni ^{II} und His ₆ -tag	133
4.2	Charakterisierung der Bindungseigenschaften von His ₆ -tag bindenden Anticalinen	136
4.3	<i>In vitro</i> Affinitätsmaturierung von His1 Δ C*	138
4.4	Produktion von His ₆ -tag bindenden Anticalinen in <i>E. coli</i>	141
4.5	Dimerisierungsverhalten His ₆ -tag bindenden Anticalinen	144
5	Zusammenfassung	147
6	Abkürzungsverzeichnis	149
7	Literatur	151

1 Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline

Lipocaline sind eine Familie kleiner sekretorischer Proteine von 160 bis 180 Aminosäuren mit Gemeinsamkeiten in biologischer Funktion sowie in Primär- und Tertiärstruktur (Pervais & Brew, 1985; Flower, 1996). Der Name leitet sich von ihrer Fähigkeit zur Bindung niedermolekularer hydrophober Moleküle in einer kelchförmigen Bindungstasche ab (gr.: *lipos* = Fett, *calyx* = Kelch; Pervais & Brew, 1987). Am häufigsten vertreten sind die Lipocaline in Vertebraten und Arthropoden. Sie sind jedoch auch in anderen Eukaryonten wie Pflanzen bekannt (Frenette Charron *et al.*, 2002). Einige Vertreter findet man sogar in den Prokaryonten (Bishop, 2000; David *et al.*, 2003), was auf eine sehr alte, in einem frühen Stadium der Evolution entstandene Strukturfamilie hindeutet.

Aus der Fähigkeit der Lipocaline zur Bindung und zum Transport kleiner Liganden ergibt sich deren Bandbreite an physiologischen Funktionen. Das Retinol-Bindungsprotein (RBP; Newcomer & Ong, 2000) beispielsweise ist verantwortlich für den Transport von Retinol (Vitamin A) im Plasma von höheren Vertebraten. Das Bilin-Bindungsprotein (BBP; Kayser, 1985) und des Insecticyanin (INS; Riley *et al.*, 1984) aus Insekten sowie das α -Crustacyanin aus dem Hummer *Homarus gammarus* (CR; Chayen *et al.*, 2003) dienen zur Speicherung von Pigmenten. Das letztere, ein 16-meres Protein, bindet das Carotinoid Astaxantin und ist dadurch für die charakteristische Blaufärbung der Hummerschale verantwortlich (Cianci *et al.*, 2002).

Odorant-Bindungsproteine (OBPs; Tegoni *et al.*, 2000; Briand *et al.*, 2002) – eine weitere Untergruppe der Lipocalinfamilie – sind an der olfaktorischen Wahrnehmung in Vertebraten beteiligt. MUPs (Major urinary proteins) von Ratte und Maus sowie das Aphrodisin aus dem Hamster *Cricetus cricetus* spielen eine Rolle im Pheromontransport in Vertebraten. Sie werden geschlechtsspezifisch exprimiert, wobei ihre Synthese der hormonellen Regulation unterliegt (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000). Prostaglandin-D₂-Synthase (PGD₂; Nagata *et al.*, 1991; Urade & Hayaishi, 2000) – eine auch als β -Trace bekannte Komponente der Cerebrospinalflüssigkeit – ist beteiligt an der enzymatischen Synthese der Prostaglandine im Gehirn. Zwei weitere enzymatisch aktive Lipocaline sind die in Pflanzen vorkommende Violaxanthin Deepoxidase und die Zeaxanthin-Epoxidase (Hieber *et al.*, 2000). Mehrere Lipocaline, wie das α_1 -Microglobulin (A₁M; Åkerström *et al.*, 2000), das Complement-Protein C8 γ (c8 γ ; Schreck *et al.*, 2000), das Neutrophilgelatinase assoziierte Protein NGAL (Kjeldsen *et al.*, 2000; Goetz *et al.*, 2002) und humanes Tränenlipocalin (Tlc; Redl, 2000; Fluckinger *et al.*, 2004) sind in der Regulation der Immunantwort involviert. Probasin (PB; Matuo *et al.*, 1984) hingegen erfüllt Aufgaben bei Zellregulationsprozessen. Auch einige

wichtige tierische Allergene, wie das von Katzen ausgeschiedene Fel d 4, gehören der Familie der Lipocaline an (Mäntyjärvi *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004).

Ein weiteres Charakteristikum einiger Lipocaline ist die Wechselwirkung mit löslichen und membranständigen Makromolekülen sowie Metallionen. RBP liegt im Plasma mit Retinol und Transthyretin in Form eines ternären Komplexes vor, der nach Abgabe des Retinols dissoziiert (Monaco *et al.*, 2000). Das Apolipoprotein D (ApoD; Rassart *et al.*, 2000) befindet sich im Plasma als eine Komponente des HDL (*High Density Lipoprotein*). Kovalente Komplexe sind auch für α_1 -Microglobulin und IgA (Berggard *et al.*, 1997) sowie für hNGAL und Typ IV Collagenase bekannt (Kjeldsen *et al.*, 1993). Für einige Lipocaline, wie RBP, α_1 -Microglobulin und Tränenlipocalin, konnten Zelloberflächenrezeptoren identifiziert werden (Flower, 2000; Wojnar *et al.*, 2001). Das bakterielle Lipocalin YodA (David *et al.*, 2003) und das humane Tränenlipocalin (Breustedt *et al.*, 2004) verfügen unter anderem über die Fähigkeit zur Metallkomplexierung.

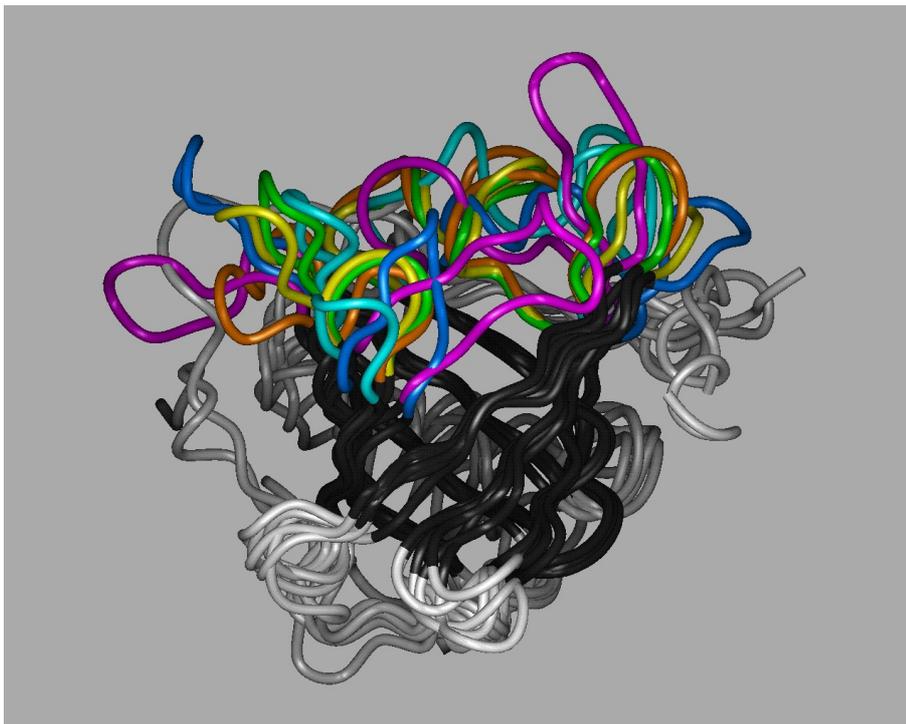


Abbildung 1: Überlagerung der Kristallstrukturen von sechs charakteristischen Lipocalinen. Dargestellt ist der Verlauf der C_α -Atome der Polypeptidkette. Das β -Barrel ist schwarz, die restliche Proteinstruktur hellgrau dargestellt. Die vier Peptidschleifen, die die molekulare Oberfläche der Liganden-Bindungstasche ausbilden, sind farblich hervorgehoben: Bilin-Bindungsprotein (PDB-Eintrag: 1bbp) blau, β -Lactoglobulin (1beb) orange, Lipocalin-Allergen Bos d 2 (1bj7) grün, epididymales Retinsäure-Bindungsprotein (1epa) hellblau, Major Urinary Protein (1mup) gelb und Retinol-Bindungsprotein (1rbp) lila. Die Graphik wurde mithilfe der Software Insight II (Biosym/MSI) erstellt (mit freundlicher Genehmigung von A. Skerra).

In der *Protein Data Bank* (PDB) sind bis dato 164 Raumstrukturen von natürlichen und engineerter Lipocalinen – teilweise mit Liganden – abgelegt. Deren hohe strukturelle Homologie wird anhand der Überlagerung einer Auswahl mehrerer bekannter Lipocalinstrukturen ersichtlich (Abbildung 1). Das konservierte Faltungsmotiv besteht aus einem zentralen, symmetrischen β -Faltblatt aus acht antiparallelen, sich gleichsinnig in einer +1-Topologie um eine zentrale Achse windenden β -Strängen (A-H). Es bildet als Supersekundärstruktur ein sogenanntes β -Barrel mit einem elliptischen Querschnitt. An einem Ende ist die konische Struktur durch kurze Schleifensegmente und die dichte Packung von Aminosäureseitenketten verschlossen. Die entgegengesetzte Seite des β -Barrels dagegen ist zum Lösungsmittel hin offen. Sie bildet eine kelchförmige Bindungstasche, die durch die paarweise Verknüpfung der acht β -Stränge über insgesamt vier ausgedehnte Peptidschleifen entsteht. Die molekulare Oberfläche dieser Bindungstasche wird durch die beschriebenen Peptidschleifen sowie durch angrenzende Bereiche innerhalb der Faltblattstruktur gebildet. Aus der Variation der Form und Größe der Kavität und der Schleifenregion ergibt sich das vielseitige Bindungsverhalten der Lipocaline für Liganden mit unterschiedlicher Größe, Gestalt und chemischen Charakter. Zusätzlich besitzen die Lipocaline eine C-terminale α -Helix, gefolgt von einem gestreckten Peptidsegment (Strang I). Diese ist jedoch in ihrer Länge und Position nicht konserviert.

Einige Mitglieder der Lipocalinfamilie weisen Besonderheiten in ihrer Tertiärstruktur auf. Das Nitrophorin 1 – ein Transportprotein für Stickstoffmonoxid (NO) – besitzt z.B. zwei zusätzliche α -Helices (Weichsel *et al.*, 1999; Montfort *et al.*, 2000). Das bovine Odorant-Bindungsprotein bildet ein verschränktes Dimer, bei dem die α -Helix der ersten Proteindomäne ein Strukturelement der jeweils zweiten Proteindomäne darstellt (Bianchet *et al.*, 1996). Das Tränenlipocalin besitzt eine auffällig weite und tiefe Kavität mit einer verzweigten Ausbuchtung am Boden (Breustedt *et al.*, 2004). Eine funktionelle Besonderheit zeigen Histamin-Bindungsproteine bestimmter Zecken, die zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen für Histamin an den beiden gegenüberliegenden Enden der β -Barrel-Struktur ausbilden (Paesen *et al.*, 2000).

Obwohl die Tertiärstruktur aller Lipocaline sehr ähnlich ist, besitzen die Proteine in ihrer Primärstruktur nur eine geringe Sequenzhomologie, die teilweise unter 10 % liegen kann (Cowan *et al.*, 1990). Die Zuordnung zur Proteinfamilie der Lipocaline lässt sich daher besser anhand kurzer charakteristischer Aminosäuresequenzmotive mit überdurchschnittlicher Ähnlichkeit treffen (Flower, 1996). Diese strukturell konservierten Regionen umfassen die 3_{10} -Helix und den β -Faltblattstrang A des N-terminalen Segmentes, die Faltblattstränge F und G, einschließlich der verbindenden Peptidschleife L6, sowie den Faltblattstrang H mit dem sich anschließenden Peptidbereich (Abbildung 2). Die erste Region beinhaltet eine für alle Lipocaline charakteristische konservierte Gly-Xaa-Trp Aminosäuresequenz. Die meisten

Lipocaline besitzen alle drei Sequenzmotive und werden als *Kernel Lipocalins* bezeichnet. Zu den bekanntesten gehören das RBP, das β -Lactoglobulin (Blg; Sawyer & Kontopidis, 2000), das Insecticyanin, das BBP, das MUP, das NGAL und auch das ApoD (Nasreen *et al.*, 2006). Die *Outlier Lipocalins* weisen dagegen meist nur eines oder zwei der genannten Sequenzmotive auf und lassen sich in mehrere Untergruppen aufteilen: die OBPs, die Von-Ebner's-Gland-Proteine (van't Hof *et al.*, 1997), die Nitrophorine und die Histamin-Bindungsproteine der Zecken.

Die Lipocaline bilden zusammen mit den Fettsäure-Bindungsproteinen (FABP; Banaszak *et al.*, 1994), den Avidinen (Green, 1990), einer Gruppe von Metalloprotease-Inhibitoren (MPI; Baumann *et al.*, 1995) sowie dem Triabin die Proteinsuperfamilie der Calycine (Flower *et al.*, 2000). Ähnlich den Lipocalinen sind die Avidine und FABPs in der Lage, kleine bzw. hydrophobe Liganden zu komplexieren. Die MPIs und das Triabin besitzen dagegen inhibitorische Wirkung auf bestimmte Proteasen und zeigen damit eine funktionelle Gemeinsamkeit zum Tränenlipocalin (Breustedt *et al.*, 2005). Alle Calycine weisen eine β -Barrel Struktur auf. Während die FABPs eine zehnrängige diskontinuierliche β -Faltblatt-Struktur besitzen, zeigen die Avidine ein achtsträngiges β -Barrel mit einem runderen Querschnitt als bei den Lipocalinen. Eine Besonderheit stellt das Triabin dar, bei dem zwei β -Faltblattstränge im β -Barrel eine im Vergleich zu den Lipocalinen invertierte Orientierung zeigen (Fuentes-Prior *et al.*, 1997).

1.2 Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae*

Das Bilin-Bindungsprotein (BBP; Abbildung 2) aus dem Schmetterling *Pieris brassicae* (Großer Kohlweißling) war eines der ersten Lipocaline mit bekannter Kristallstruktur (Huber *et al.*, 1987b). Durch Komplexierung des blau-grünen Chromophors Biliverdin IX_γ (Abbildung 3; Rüdiger *et al.*, 1968; Kayser, 1984) erhält das Holoprotein seine Färbung und ist zusammen mit gelben Carotinoiden für die blau-grüne Pigmentierung der Schmetterlings-larven und -puppen verantwortlich.

Die Aminosäuresequenz des BBP wurde 1988 von Suter *et al.* durch Edman-Abbau mit zwei Isoformen (BBP I und BBP II) bestimmt. Diese unterscheiden sich in der jeweiligen N-terminalen Aminosäure: die vorherrschende Form BBP I beginnt mit der Aminosäure Asparagin, die seltenere Isoform BBP II beginnt mit einem Aspartat-Rest. Durch Klonierung der cDNA konnte 1994 die Aminosäuresequenz des BBP I bestätigt werden (Schmidt & Skerra, 1994) – allerdings mit einem zusätzlichen C-terminalen Asparaginrest (Asp174). Für die Isoform BBP II konnte keine cDNA identifiziert werden. Vermutlich entsteht diese seltenere Isoform des Bilin-Bindungsproteins durch posttranslationale Deamidierung des

N-terminalen Asparagin-Restes aus BBP I. Somit besitzt das mature BBP eine Länge von 174 Aminosäuren und eine Molmasse von 19,8 kDa.

Beide Isoformen des Proteins wurden kristallisiert und ihre dreidimensionale Raumstruktur durch Röntgendiffraktometrie bestimmt (Huber *et al.*, 1987a, b). In Lösung bildet die Isoform BBP I Dimere aus, während das BBP II als Monomer vorliegt. Die Struktur beider Formen ist, abgesehen von den Unterschieden am N-Terminus, identisch und zeigt die für die Lipocaline typische β -Barrel-Proteinarchitektur. Das BBP verfügt über zwei intramolekulare Disulfidbindungen. Diese verbinden das β -Barrel des Proteins einerseits mit dem N-Terminus und andererseits mit einem Peptidsegment, das sich an die C-terminale α -Helix anschließt.

Die Bindungstasche des BBP ist vergleichsweise flach und ausgedehnt. Im Holoprotein wird das gebundene Biliverdin IX γ fast vollständig darin eingeschlossen. Lediglich die geladenen Carboxylatgruppen der beiden Propionyl-Seitenketten des Chromophors bleiben dem Lösungsmittel ausgesetzt. Durch die Komplexierung wird das chemisch labile π -Elektronensystem des Biliverdin IX γ vor Oxidation geschützt. Zudem wird hierdurch eine rechtshändige Helizität des an sich achiralen Chromophors induziert, was zu einer starken optischen Aktivität des gebundenen Liganden führt (Scheer & Kayser, 1988; Schneider *et al.*, 1988).

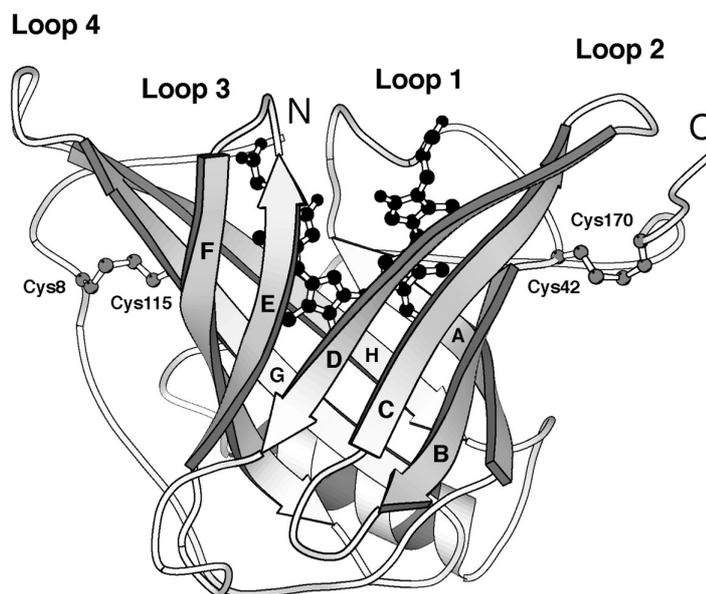


Abbildung 2: Kristallstruktur des Bilin-Bindungsproteins aus *Pieris brassicae*. Das Rückgrat des Proteins ist mit dem Verlauf der C_{α} -Atome dargestellt. Zu sehen sind die acht antiparallelen β -Faltblattstränge (A-H), die als Supersekundärstruktur das β -Barrel ausbilden. N und C bezeichnen die entsprechenden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

Das Biliverdin IX γ ist ein offenkettiges Tetrapyrrol und gehört zur Verbindungsklasse der Bilin-Pigmente, die in Insekten weit verbreitet sind und durch oxidative Ringspaltung von Porphyrinen (Kikuchi & Yoshida, 1980) entstehen. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen treten sie hauptsächlich in Form von Protein/Bilin-Komplexen auf. Bekannte Proteingruppen dieser Komplexe sind Phycobiliproteine und Phytochrome, die an der Photosynthese der Cyanobakterien bzw. der Regulation des pflanzlichen Stoffwechsels beteiligt sind.

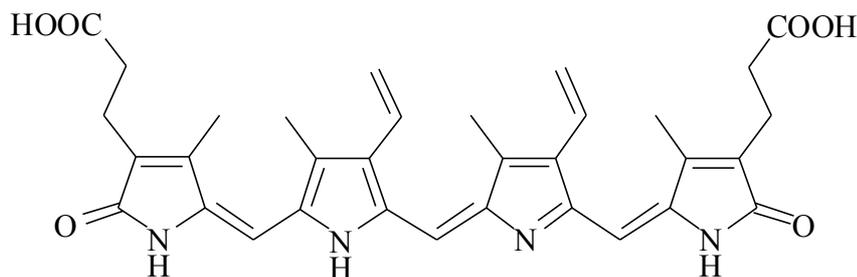


Abbildung 3: Strukturformel von Biliverdin IX γ , dem natürlichen Liganden des Bilin-Bindungsproteins.

Die genaue physiologische Funktion des BBP ist noch nicht vollständig geklärt. Das stark vom Entwicklungsstadium des Schmetterlings abhängige Expressionsniveau des BBP-Gens weist darauf hin, dass die Hauptfunktion des Komplexes – neben der Färbung der Raupen – in der Photoprotektion des erwachsenen Falters liegt (Kayser, 1984; Schmidt & Skerra, 1994). Dabei ist das BBP entweder direkt an der Photoprotektion beteiligt oder es stellt lediglich eine stabile Speicherform für Biliverdin IX γ dar, welches als effektiver Quencher für Singulett-Sauerstoff fungiert und somit den oxidativen Stress für das Insekt vermindern kann (McDonagh, 1979). Eine Rolle des BBP bei der Photorezeption (Vuillaume & Dattée, 1980) ist unwahrscheinlich, da die Genaktivität solcher Rezeptoren nicht in der für das BBP beobachteten Weise variieren sollte (Schmidt & Skerra, 1994).

1.3 Anticaline: künstliche Lipocaline mit neuartigen Ligandenspezifitäten

Die molekulare Erkennung ist eine spezifische Wechselwirkung zwischen molekularen Spezies. In der belebten Natur stellen dabei Proteine, die hoch differenzierte Oberflächen besitzen, die wichtigsten Funktionseinheiten dar. Ein typisches Beispiel liefert das Immunsystem höherer Vertebraten. Antikörper (Immunglobuline) – ein Produkt der humoralen Immunantwort – sind in der Lage, nahezu jedes Antigen zu komplexieren. Aufgrund dieser Eigenschaft finden die Antikörper sowie deren F_{ab}- und F_v-Fragmente Anwendung in der biochemischen Analytik, der medizinischen Diagnostik und Therapie

sowie in biotechnologischen und chemischen Prozessen (z.B. in der Bioseparation und chemischen Katalyse).

Der breite Einsatz von Antikörpern als universelle Bindungsproteine wurde durch die Hybridomtechnik (Köhler & Milstein, 1975) eingeleitet und durch die Entwicklung von Methoden zur gentechnischen Produktion von funktionellen Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* (Skerra & Plückthun, 1988; Skerra, 1993) erheblich vorangetrieben. Durch *Protein Engineering* von Antikörpern können deren Affinität und Spezifität in der Weise verändert werden, dass Bindungsmoleküle mit völlig neuen Eigenschaften entstehen. Derzeit sind zweierlei rekombinante Antikörper-Bibliotheken verfügbar: einerseits auf Basis humaner *Complementary-Determining Regions* (CDRs; Söderlind *et al.*, 2000) und andererseits auf Basis synthetischer humaner Konsensus-Sequenzen (Knappik *et al.*, 2000). Die Komplexitäten dieser Antikörper-Bibliotheken sind mit jener der humanen Antikörpervielfalt vergleichbar (Skerra, 2003). Daraus können mittels geeigneter Selektionsverfahren Antikörper mit gewünschten Bindungseigenschaften isoliert werden (McCafferty *et al.*, 1990; Skerra *et al.*, 1991a; Hanes *et al.*, 1998; Hoogenboom & Chames, 2000).

Die praktische Anwendung der Immunglobuline bringt allerdings auch gewisse Nachteile mit sich. Da ein Antikörper Heterotetramer und deren F_{ab} -Fragmente Heterodimere zweier verschiedener Polypeptidketten darstellen, erfordert ihre gentechnische Produktion eine komplizierte, parallele Klonierung und Expression zweier Strukturgene (Skerra, 1993). Dazu besteht die Antigen-Bindungsstelle aus insgesamt sechs hypervariablen Regionen, was deren konzertierte Manipulation zur Herstellung entsprechender genetischer Bibliotheken erschwert. Bei den therapeutischen Anwendungen ist die Gewebepenetration durch die beträchtliche Größe sowohl der Antikörper als auch ihrer Fragmente oft eingeschränkt (Chester & Hawkins, 1995). Sogar die kleinste antigenbindende Immunglobulin-Einheit – das F_v -Fragment – besteht noch aus ca. 250 Aminosäuren. Die proteinchemische Stabilität dieser Fragmente ist außerdem aufgrund der nicht kovalenten Assoziation von V_H - und V_L -Domäne begrenzt. Dieses Problem wurde durch die Einführung eines flexiblen Peptid-Linkers zwischen den beiden Domänen beseitigt (Bird & Walker, 1991). So generierte *Single Chain* F_v -Fragmente (scF_v) zeigen jedoch in der Praxis eine verminderte Proteinstabilität, ein eingeschränktes Faltungsvermögen und oft sogar eine verschlechterte Bindungsaffinität. Dies ist die Folge der Verbindung des Peptid-Linkers mit dem N-Terminus einer der variablen Domänen, der in der unmittelbaren räumlichen Nähe zur Antigen-Bindungsstelle liegt.

Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden neue Protein-Gerüststrukturen herangezogen, die sich zur Herstellung künstlicher Bindungsproteine verwenden lassen. Diese sogenannten *Protein-Scaffolds* sollten ein robustes Gerüst mit hoch variablen Oberflächenstrukturen bieten, so dass unter Einsatz kombinatorischer Techniken völlig neue Bindungsaktivitäten entwickelt

werden können, ohne dabei die Proteinfaltung zu beeinträchtigen. Weitere Anforderungen, die dabei gestellt werden, sind geringe Größe, monomerer Aufbau, einfache genetische Manipulation und funktionelle Expression in Mikroorganismen, Möglichkeit der Produktion funktioneller Fusionsproteine und möglichst niedriger Grad an posttranslationaler Modifikation. Für die therapeutische Anwendung sind aber auch biologische Kriterien wie Immunogenität, Gewebepenetration und Serumhalbwertszeiten der Wirkstoffe von immenser Bedeutung (Skerra, 2003; Nygren & Skerra, 2004). Zur Generierung solch artifizieller Rezeptorproteine wurden unterschiedliche Strategien wie das *Engineering* von kurzen kontinuierlichen Regionen eines einzigen Schleifensegmentes (z.B. Knottine; Baggio *et al.*, 2002), von nicht-kontinuierlichen Regionen basierend auf Sekundärstrukturelementen der β -Stränge oder α -Helices (z.B. Affibodies; Sandström *et al.*, 2003) oder von nicht-kontinuierlichen hypervariablen Schleifenregionen (FN3-Domänen; Xu *et al.*, 2002) entwickelt.

Einer dieser *Scaffolds*, der die oben angeführten Voraussetzungen erfüllt, tritt bei den Lipocalinen auf (Skerra, 2000). Die Vertreter dieser Proteinfamilie bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und sind mit einer molekularen Masse von nur ca. 20 kDa deutlich kleiner als Immunglobuline oder deren Fragmente. Sie besitzen eine hoch konservierte β -*Barrel*-Struktur, an deren offenem Ende vier Peptidschleifen eine Liganden-Bindungstasche ausbilden. Die Peptidschleifen der einzelnen Lipocaline unterscheiden sich erheblich in ihrer Länge, Aminosäure-Zusammensetzung und Konformation. Dieser den Antikörpern ähnliche strukturelle Aufbau war die Grundlage zur Generierung von künstlichen Bindungsproteinen auf Basis der Lipocalinarchitektur – den sogenannten „Anticalinen“ (Skerra, 2001).

Als Modellprotein wurde das BBP mit seiner vergleichsweise großen und flachen Bindungstasche ausgewählt (Schmidt, 1995). Dabei wurden Aminosäuren, die in direktem Kontakt zum natürlichen Liganden des BBP stehen, aber für die Stabilität der Proteinstruktur vermutlich nicht relevant sind (Schmidt, 1995), einer gerichteten konzertierten Zufallsmutagenese unterworfen (Beste, 1998). Die ausgewählten Positionen sollten sowohl kleine als auch große Aminosäure-Substitutionen tolerieren.

Insgesamt wurden folgende 16 Aminosäuren, die sich über die vier Peptidschleifen am offenen Ende des β -*Barrels* sowie über angrenzende Bereiche erstrecken, ausgewählt: Asn34, Val36, Glu37, Asn58, His60, Ile69, Leu88, Tyr90, Val93, Asn97, Tyr114, Lys116, Gln125, Phe127 und Trp129. Dabei wurden alle 20 Aminosäuren-Substitutionen zugelassen. Im Falle von Ser35 und Lys95, die dem Lösungsmittel ausgesetzt sind, wurden apolare Substitutionen nicht erlaubt. Das eingesetzte Wildtyp-BBP (wt BBP) und alle BBP-Varianten besitzen zusätzlich noch die Aminosäure-Substitutionen Asn1 \rightarrow Asp der monomeren BBP II Isoform (siehe Abschnitt 1.2), zwei durch die Einführung der Schnittstellen für die Restriktions-

endonuklease *Bst*XI bedingte Mutationen (Asn21→Gln und Lys135→Met) sowie einen Austausch Lys87→Ser, mit dem eine Protease-Erkennungssequenz im murenen BBP eliminiert wurde (Beste, 1998).

Aus dieser BBP-Bibliothek konnten künstliche Bindungsproteine mit Affinität zu dem Modell-Liganden Fluorescein mittels *Phage Display* selektiert werden (Beste *et al.*, 1999). Das dabei erhaltene Anticalin FluA besitzt eine hohe Affinität zu Fluorescein ($K_D = 35,2$ nM) und kann die Fluoreszenzemission dieser Verbindung fast vollständig quenchen. Weiterhin wurden aus derselben Bibliothek auch BBP-Varianten mit Spezifität für den Steroid-Liganden Digoxigenin gewonnen (Schlehuber, 2001). Durch erneute eingeschränkte Zufallsmutagenese konnte die Affinität dieser Varianten weiter erhöht werden (Schlehuber & Skerra, 2002). Zudem wurden BBP-Varianten, die unsymmetrisch substituierte Phthalatester – eine Gruppe weit verbreiteter Umweltschadstoffe – erkennen, isoliert (Mercader & Skerra, 2002).

Durch ihre Fähigkeit zur spezifischen Bindung von kleinen Liganden eignen sich die Anticaline hervorragend als Detektionsreagenzien in der Bioanalytik. Zu diesem Zweck wurden funktionelle Fusionsproteine aus Anticalinen und Alkalischer Phosphatase konstruiert und deren Anwendung in ELISA und Western Blots erfolgreich demonstriert (Schlehuber *et al.*, 2000). Außerdem wurden zum Zweck der orientierten Immobilisierung der Anticaline auf mit humanem Serumalbumin beschichteten Kunststoffoberflächen oder Filtermembranen Fusionsproteine mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) des Protein G aus *Streptococcus* G148 produziert. Zur Konstruktion bispezifischer Bindungsproteine wurden auch „Duocaline“ als genetische Fusion zweier unterschiedlicher Anticaline hergestellt (Schlehuber *et al.*, 2001).

Die Möglichkeit der Komplexierung größerer Moleküle, wie z.B. Proteine, wurde ebenfalls untersucht, und es wurden z.B. BBP-Varianten mit hoher Affinität gegen ein F_{ab} -Fragment selektiert (van Empel & Skerra, in Vorbereitung). Um eine geringe immunogene Wirkung der Anticaline in der medizinischen Therapie zu gewährleisten, wurde das Konzept der Selektion künstlicher Rezeptorproteine auf das humane Lipocalingerüst des Apolipoproteins D übertragen und ApoD-Varianten mit Affinität zu Hämoglobin selektiert (Vogt & Skerra, 2004).

Unlängst wurden Kristallstrukturen von Anticalinen im Komplex mit deren Liganden gelöst (Korndörfer *et al.*, 2003a; Korndörfer *et al.*, 2003b). Fluorescein und Digoxigenin binden beide tief in der Bindungstasche des BBP. Die durch die Randomisierung eingeführten Aminosäureseitenketten sind vorwiegend polar, was die oft prognostizierte Einschränkung der Lipocaline zur Bindung lipophiler Substanzen – wie aus dem Namen ersichtlich – widerlegt. Während das Grundgerüst der Lipocaline, bestehend aus dem β -Barrel mit der charakteristischen α -Helix, bei beiden Anticalinen unverändert blieb, erfuhren die vier Peptidschleifen der Bindungstasche im Vergleich zum BBP ausgeprägte Veränderungen in ihrer Rückgratkonformation. Die offensichtlich hohe Stabilität des β -Barrel-Gerüsts und die

große Flexibilität der Schleifenregion bestätigen, dass die Wahl der Lipocaline als Protein-*Scaffolds* richtig war. Beim Vergleich zweier Digoxigenin bindender Proteine – des Anticalin DigA16 und des Antikörpers 26-10 – wurde sogar eine Form der „konvergenten *in vitro* Evolution“ beobachtet (Korndörfer *et al.*, 2003b). Der Ligand wurde zwar in zwei unterschiedlichen Orientierungen von den beiden Proteinen gebunden, es traten jedoch jeweils drei aromatische Seitenketten auf, die in überraschend ähnlicher räumlicher Orientierung zum Liganden stehen. Das zeigt, dass ähnliche strukturelle Lösungsansätze der Anticaline und Immunglobuline zur Bindung von Zielmolekülen möglich sind und unterstützt die Annahme, dass die Lipocalinarchitektur sich zur Generierung künstlicher Bindungsproteine besonders eignet.

1.4 Selektionsmethoden: *Phage Display* und *Filter Sandwich Colony Screening Assay*

Um große Proteinbibliotheken auf Varianten mit vorgegebenen Eigenschaften zu durchsuchen, wird ein leistungsfähiges Selektionssystem benötigt. Es sollte die physikalische Kopplung von Phänotyp und Genotyp der einzelnen Protein-Varianten ermöglichen, um diese nach einer Selektion auf einfache Weise zu identifizieren. Diese Vorgaben erfüllen verschiedene Verfahren.

Beim Phagemid-Präsentationssystem oder *Phage Display* (Smith & Petrenko, 1997; Rodi & Makowski, 1999; Barbas *et al.*, 2001; Kretzschmar & von Rüden, 2002) werden Fremdproteine auf der Oberfläche von Phagenpartikeln präsentiert, die im Inneren die genetische Information für das Protein tragen. In den gebräuchlichsten *in vitro* Selektionssystemen wird ein Komplex aus zellfrei synthetisiertem Protein mit der codierenden RNA zur Selektion verwendet (Lipovsek & Plückthun, 2004): bei dem *Ribosome Display* wird ein nichtkovalenter Komplex aus dem Protein, der mRNA und dem Ribosom gebildet (Mattheakis *et al.*, 1994; Matsuura & Plückthun, 2003), während bei dem *mRNA-Display* ein kovalent durch ein kleines Adaptormolekül – meist Puromycin – verknüpfter mRNA-Protein-Komplex entsteht (Takahashi *et al.*, 2003). Es wurden auch einige erfolgreiche Selektionssysteme mit DNA-gekoppelten Proteinen entwickelt (Schatz *et al.*, 1996; Yonezawa *et al.*, 2003; Odegrip *et al.*, 2004). In einem *Cell Surface Display* ist die pro- oder eukaryontische Zelle Träger der genetischen Information für eine Proteinvariante, die zugleich auf ihrer Oberfläche präsentiert wird (Lee *et al.*, 2003; Kondo & Ueda, 2004; Wernerus & Stahl, 2004). Von all diesen Systemen hat allerdings das *Phage Display* aufgrund seiner soliden und gut etablierten Technik die weiteste Verbreitung gefunden.

Die Grundlagen der *Phage Display*-Methode wurden von Smith (1985) durch Präsentation von Proteinfragmenten auf der Oberfläche filamentöser Phagen der fd/M13-Familie entwickelt (Model & Russel, 1988). Die Proteinfragmente wurden dazu mit dem Amino-terminus des *Minor Capsid Protein* pIII filamentöser Phagen gentechnisch fusioniert. Dieses 406 Aminosäurereste lange intakte Phagenhüllprotein mit bekannter Kristallstruktur, wird strukturell in drei Domänen unterteilt, die über glycinreiche *Linker* untereinander verknüpft sind (Stengele *et al.*, 1990; Lubkowski *et al.*, 1998; Holliger *et al.*, 1999; Lubkowski *et al.*, 1999). Die aus 66 Aminosäureresten bestehende N-terminale Domäne und die darauffolgende mittlere Domäne (Reste 86 bis 216), sind für die Infektiosität der Phagenpartikel durch die Anheftung an die F-Pili des Wirtsbakteriums verantwortlich (Deng *et al.*, 1999). Die C-terminale Domäne des pIII (Reste 257 bis 406) bewirkt die Verankerung des Proteins in der Phagenhülle.

Parmley und Smith (1988) konnten später zeigen, dass auf diese Weise modifizierte Phagenpartikel – sogenannte Phagemide – durch Adsorption an das immobilisierte Zielmolekül von nativen Phagen abgetrennt werden können. Durch Infektion der Bakterienzellen und erneuter Produktion von Phagemiden können die selektierten Phagemide amplifiziert und in einem wiederholten Selektionszyklus angereichert werden.

In der Folgezeit entwickelte sich das Verfahren zu einem wichtigen Werkzeug des *Protein Engineering* für die Selektion von bindungsaktiven Peptiden (Szardenings, 2003; Ladner *et al.*, 2004), Antikörperfragmenten mit definierten Bindungseigenschaften (McCafferty *et al.*, 1990; Hoogenboom *et al.*, 1998; Pini & Bracci, 2000) und anderen Rezeptorproteinen (Koide *et al.*, 1998; Sandström *et al.*, 2003). Die Methode wurde auch zur Untersuchung der Proteinfaltung und Stabilität (Jung *et al.*, 1999; Kotz *et al.*, 2004), zur Identifizierung von Allergenen (Riemer *et al.*, 2004; Rhyner *et al.*, 2004) und Rezeptoren (Wojnar *et al.*, 2001), zur Veränderung der katalytischen Eigenschaften von Enzymen (Pedersen *et al.*, 1998; Fernandez-Garcio *et al.*, 2003) und zur Generierung von katalytischen Antikörpern angewendet (Fujii *et al.*, 1998; Fernandez-Garcio *et al.*, 2003).

Zur Präsentation auf dem Phagen werden die Strukturgene der Proteinvarianten heute meist auf einem sogenannten Phasmidvektor kloniert (Hoogenboom *et al.*, 1991; Wells & Lowman, 1992; Kay *et al.*, 1996), der für das entsprechende Fusionsprotein mit pIII codiert und die intergenische Region des Phagen fl enthält (Lowman & Wells, 1991). F-Pili tragende *E. coli*-Zellen, die mit den Phasmiden transformiert worden sind, können anschließend mit einem Helferphagen unter gleichzeitiger Induktion der Genexpression des Fusionsproteins infiziert werden. Das führt zur Verpackung einzelsträngiger Phasmid-DNA in Phagemide. Dabei wird durch eine geeignete Genregulation bei etwa 10 % der Phagemide eine der insgesamt fünf

Kopien des pIII durch ein Fusionsprotein ersetzt, was eine monovalente Präsentation des Fremdproteins ermöglicht (Lowman *et al.*, 1991).

Zur Selektion der BBP-Zufallsbibliothek in dieser Arbeit wurde der Phasmidvektor pBBP24 (Abbildung 4; Beste *et al.*, 1999) eingesetzt, der eine funktionelle Präsentation der BBP-Varianten auf der Oberfläche filamentöser Phagemide des Typs M13 erlaubt. Dieser Vektor codiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators für ein Fusionsprotein aus bakterieller *OmpA*-Signalsequenz, dem BBP, dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel und dem C-terminalen Fragment des Phagenhüllproteins ($\Delta\Delta$ pIII, Aminosäuren 217 bis 406; Beste, 1998). Zwischen den codierenden Sequenzen für das *Strep*-tag II und das verkürzte Phagenhüllprotein ist ein *Amber*-Stoppcodon inseriert. In einem *supE* *Amber*-Suppressorstamm wie *E. coli* XL1-Blue wird die Translationstermination an diesem Stoppcodon zu ca. 10 % durch den Einbau eines Glutamin-Restes in die wachsende Polypeptidkette umgangen (Miller, 1992). Dadurch wird die Menge des produzierten BBP- $\Delta\Delta$ pIII-Fusionsproteins und der daraus folgende toxische Effekt des C-terminalen pIII-Fragments auf *E. coli* Zellen verringert (Beste, 1998). Innerhalb des BBP-Strukturgens sind auf Aminosäurepositionen 42 und 43 benachbarte *Ochre*- und *Opal*-Stoppcodons inseriert, die das Wildtyp-BBP-Gen inaktivieren.

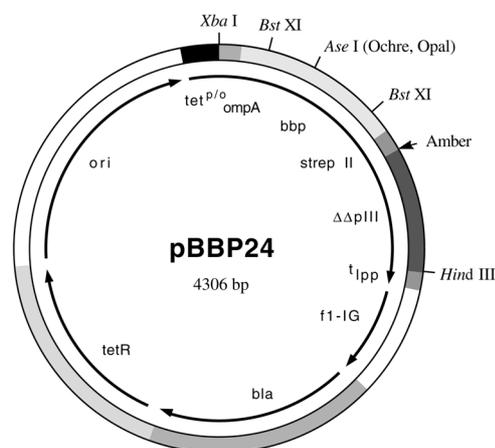


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Phasmidvektors pBBP24. Der Vektor codiert unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet*^{p/o}) für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, dem Wildtyp-BBP, dem *Strep*-tag II und einem N-terminal verkürzten Fragment des Phagenhüllproteins pIII ($\Delta\Delta$ pIII, Aminosäuren 217 bis 406). Die Abkürzungen *t_{lpp}*, *f1-IG*, *bla*, *tetR* und *ori* bezeichnen den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, die intergenische Region des Bakteriophagen f1, das β -Lactamasegen, das Strukturgen des Tetracyclin-Repressors sowie den Replikationsursprung. *Bst*XI, *Hind*III und *Xba*I bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen; *Amber* steht für das entsprechende Stoppcodon zwischen den Genabschnitten für BBP-*Strep*-tag II und $\Delta\Delta$ pIII; die Position der *Ochre* und *Opal* Stoppcodons ist durch die *Ase*I-Restriktionsschnittstelle gekennzeichnet.

Die individuellen Bindungseigenschaften der durch *Phage Display* selektierten Protein-Varianten können anschließend in einem geeigneten Verfahren analysiert werden (Clackson *et al.*, 1991). Dazu eignet sich die Methode des *Filter Sandwich Colony Screening Assays* – Kolonie-Filterstapel-Tests (Skerra *et al.*, 1991a; Pini *et al.*, 2002). Sie ermöglicht im Gegensatz zur Hochdurchsatztechnologie eine kostengünstige Untersuchung mehrerer Tausend Varianten. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Protein-Varianten von auf einer Membran kultivierten *E. coli*-Kolonien sekretiert und auf der Oberfläche einer zweiten, darunter liegenden Membran zielgerichtet immobilisiert. Dazu werden die Protein-Varianten als Fusionsproteine mit der bakteriellen Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998), die eine Affinität zum humanen Serum-Albumin (HSA) besitzt, produziert und die untere Membran mit HSA beschichtet. Die Liganden-Bindungseigenschaften der immobilisierten Fusionsproteine können anschließend durch ein chromogenes Nachweisverfahren ermittelt werden. Dazu kann die Membran mit einem markierten oder mit einem reporterenzymgekoppelten Liganden inkubiert werden. Die Zuordnung einzelner Signale auf der Membran zu den entsprechenden Kolonien ermöglicht schließlich die Isolierung von Varianten mit definierter Bindungsaffinität.

Die Selektionsverfahren des *Phage Display* und *Filter Sandwich Colony Screening Assays* wurden unter anderem erfolgreich angewendet, um Anticaline auf Grundlage des BBP mit Affinität zu Digoxigenin zu isolieren (Schlehuber *et al.*, 2000).

1.5 Das His₆-Affinitätsanhängsel in der biowissenschaftlichen Forschung

Affinitätsanhängsel oder „tags“ werden in der modernen Biotechnologie zur Reinigung, Isolierung und zum Nachweis von rekombinanten Proteinen angewendet. Sie werden als genetische Fusion mit der DNA-Sequenz des entsprechenden Proteins kloniert und produziert. Verschiedene Peptide, Domänen oder auch komplette Proteine können auf diese Weise an das jeweilige Protein von Interesse gekoppelt werden (Tabelle 1; Hearn & Acosta, 2001; Terpe, 2003). Sie ermöglichen die affinitätschromatographische Reinigung der Fusionsproteine, ihre Detektion und Quantifizierung in Immunoassays (*Western Blot* und ELISA) sowie qualitative und quantitative Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen (Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie – SPR). Dabei üben sie idealerweise keinen Effekt auf die Tertiärstruktur und die biologische Aktivität ihres Fusionspartners aus, können ggf. proteolytisch entfernt werden und sind für verschiedenste Proteine anwendbar.

Affinitäts-anhängsel	Größe/ Sequenz	Ligand/ Matrix	Affinität (K_D) [M]	Zitat
GST	26 kDa	Glutathion	---	Smith & Johnson, 1988
ZZ-Domäne vom Protein A	7 kDa	Ig-F _c	---	Nilsson <i>et al.</i> , 1987
ABD	46 Aminosäuren	HSA	---	König & Skerra, 1998
CBP	26 Aminosäuren	Calmodulin	$1 \cdot 10^{-9}$	Neri <i>et al.</i> , 1995
MBP	40 kDa	Amylose	---	di Guan <i>et al.</i> , 1988
His ₆ -tag	H ₆	Ni ²⁺ -NTA, Zn ²⁺ -IDA, Co ²⁺ -CMA	hoch	Hochuli <i>et al.</i> , 1988
Poly-Arg	R ₅₋₆	SP-Sephadex	---	Smith <i>et al.</i> , 1984
<i>Strep</i> -tag	AWRHPQFGG	Streptavidin	$3,7 \cdot 10^{-5}$	Schmidt <i>et al.</i> , 1996
<i>Strep</i> -tag II	WSHPQFEK	Streptactin	$1,37 \cdot 10^{-6}$	Voss & Skerra, 1997
SBP	38 Aminosäuren	Streptavidin	$2,5 \cdot 10^{-9}$	Keefe <i>et al.</i> , 2001
S-tag	KETAAAKFERQHMS	RNase A S-Fragment	$1 \cdot 10^{-7}$	Connely <i>et al.</i> , 1990
FLAG	DYKDDDDK	mAb1	$4 \cdot 10^{-7}$	Einhauser & Jungbauer, 2001
FLAG II	DYKD	mAb1	---	Knappik & Plückthun, 1994
c-myc	EQKLISEEDL	9E10 F _{ab}	$8 \cdot 10^{-8}$	Schiweck <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 1: Ausgewählte, häufig verwendete Affinitätsanhängsel (Hearn & Acosta, 2001; Terpe, 2003). Abkürzungen: ABD, Albumin-Bindungsdomäne; CBP, Calmodulin-Bindungspeptid; GST, Glutathion-S-Transferase; HSA, humanes Serum Albumin; mAb, monoklonaler Antikörper; MBP, Maltose-Bindungsprotein.

Große Affinitätsanhängsel (z.B. GST, SPA, MBD, ABD; Tabelle 1) – sogenannte Proteintags – sind von kleinen globulären Proteinen mit bestimmten Bindungseigenschaften abgeleitet. Sie können als Pseudo-Chaperone zu einer effizienteren Faltung (Nygren *et al.*, 1994) oder zur Stabilität und Löslichkeit ihres Fusionspartners beitragen (Tucker & Grisshammer, 1996). Zur medizinischen Anwendung des nativen Proteins müssen diese Affinitätsanhängsel jedoch wegen ihrer möglichen immunogenen Wirkung entfernt werden. Daher werden bevorzugt

kurze Affinitätsanhängsel (Strep II-, FLAG-, His₆-, c-myc-tag; Tabelle 1) – sogenannte Peptidtags – mit einer Größe von weniger als 25 Aminosäuren angewendet. Im Gegensatz zu den Proteintags müssen sie nicht unbedingt entfernt werden, da sie die biologische Aktivität ihrer Fusionspartner in der Regel nicht beeinträchtigen.

Man unterscheidet zwischen hochaffinen und niedrigaffinen Affinitätsanhängseln. Als niedrigaffin bezeichnet man Affinitätsanhängsel mit einer Dissoziationskonstante zwischen 10^{-5} und 10^{-7} M. Diese werden zur Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie unter milden Elutionsbedingungen bevorzugt. Ein Beispiel dafür ist das *Strep*-tag II/Streptavidin System (Skerra & Schmidt, 2000). Die Dissoziationskonstante von hochaffinen Affinitätsanhängseln liegt dagegen unter 10^{-8} M und macht sie für Reinigungszwecke weniger geeignet, da der stabile Komplex aus Affinitätsanhängsel und Affinitätsmatrix meist nur unter extremen Bedingungen zur Dissoziation gebracht werden kann, was in der Regel zur Denaturierung des Fusionspartners führt. Allerdings eignen sich diese Anhängsel gut zum immunchemischen Nachweis (z.B. c-myc-tag; Hilpert *et al.*, 2001) sowie für Anwendungen in der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (z.B. His₆-tag; Nieba *et al.*, 1997).

Das His₆-tag ist das meistverwendete Peptid-Affinitätsanhängsel aus durchschnittlich sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten. Es wird am N- oder C-Terminus des Fusionspartners zur Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975; Hochuli *et al.*, 1988; Zachariou M., 2004) angefügt. Der Reinigungseffekt basiert auf der Interaktion zwischen dem His₆-tag und einem an einer Matrix mit kovalent gebundenen Chelatbildnern (NTA, IDA, TALON) immobilisierten Übergangsmetallion (Ni²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ oder Co²⁺). Diese fungieren als schwache Lewis-Säuren und gehen Koordinationsbindungen mit den Stickstoff-Elektronendonorguppen des Histidin-Imidazolringes ein. Dabei können zwei Histidinreste in einer Entfernung von $\sim 5\text{-}6$ Å oder $\sim 3,5$ Å (im Falle einer regulären α -helikalen bzw. β -Faltblatt-Struktur des His₆-tags) zugleich den immobilisierten Liganden koordinieren (Chao *et al.*, 1998; Hearn & Acosta, 2001). Die gebräuchlichsten sechs aufeinanderfolgenden Histidinreste erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei davon in der richtigen Anordnung befinden. Die Elution des Fusionsproteins von der IMAC-Affinitätsmatrix kann kompetitiv mit Imidazol oder durch Erniedrigung des pH-Wertes durchgeführt werden.

Hochuli *et al.* führte 1988 IMAC als Methode zur Reinigung von mit His₆-tag fusionierten rekombinanten Proteinen ein. Bald danach wurde sie erfolgreich für scFv-Fragmente angepasst (Skerra *et al.*, 1991). Die Reinigung von Antikörper-Fragmenten, die aus zwei Polypeptidketten bestehen, erwies sich jedoch als schwieriger. F_v-Fragmente konnten gereinigt werden, wenn beide variablen Domänen mit His₆-tag fusioniert waren. Hohe NaCl-Konzentrationen im Chromatographiepuffer, die eine unspezifische Bindung der Proteine zur

Affinitätsmatrix verhindern, führten jedoch zur Dissoziation der beiden Ketten. Die nicht-kovalente Assoziation beider Ketten konnte durch den Austausch von NaCl mit Betain als einem neutralen Elektrolyten stabilisiert werden (Essen & Skerra, 1993). Bei den F_{ab}-Fragmenten ist die Assoziation der schweren und der leichten Kette durch die Anwesenheit von konstanten Domänen und einer diese verbindenden Disulfidbrücke stabiler, daher war nur ein Affinitätsanhängsel notwendig. Dieses wurde am C-Terminus der schweren Kette angefügt, um die Ausbildung von Bence-Jones-Dimeren der leichten Ketten zu unterbinden (Skerra 1994). Heutzutage ist IMAC als Reinigungsmethode in der Proteinproduktion weit verbreitet und erfreut sich hoher Beliebtheit, da die verwendeten Affinitätsmatrizen kostengünstig und robust sind und hohe Ladungskapazitäten aufweisen.

Zur Detektion des His-tags werden unkonjugierte oder mit Reporterenzymen konjugierte, monoklonale Antikörper sowie Ni-NTA Konjugate verwendet (Tabelle 2; Müller *et al.*, 1998). Die Affinität der ersten entwickelten Antikörper mAb 13/45/31 (Zentgraf *et al.*, 1995) sowie mAb His-1 (Pogge v. Strandmann *et al.*, 1995) wurde im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht quantifiziert.

Firma	Produktname	Klasse	Ligand	Affinität (K _D) [M]
Qiagen	PentaHis	IgG1	C- und N-terminales His ₅	5•10 ⁻⁸ - 1•10 ⁻⁹
Qiagen	TetraHis	IgG1	C- und N-terminales His ₄	1•10 ⁻⁸ - 5•10 ⁻⁸
Novagen	anti-His ₆	IgG1	C- und N-terminales His ₆	5•10 ⁻⁸ - 1•10 ⁻⁹
Invitrogen	mAb 3D5	IgG2b	C-terminales His ₆	3,4•10 ⁻⁷
Roche	mAb BMG-His1	IgG1	C- und N-terminales His ₆	---
Qiagen	Ni-NTA AP	---	His ₆	---

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Anti-His-tag-Antikörper sowie ein Ni-NTA Konjugat mit Alkalischer Phosphatase (Charakteristika nach Angaben der Hersteller).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch *Protein Engineering* ein Anticalin mit metallionenabhängiger Bindungsaffinität zum His₆-tag konstruiert werden. Der Ausgangspunkt dafür war die BBP-Variante His1ΔC* (Weichel, 1997), die aus einer in der Arbeitsgruppe zuvor hergestellten BBP-Bibliothek mit einer theoretischen Komplexität von 3,7•10⁸ unabhängigen Lipocalin-Varianten (Beste *et al.*, 1999) bereits isoliert worden war. Die Bindungseigenschaften dieses Proteins sollten durch Anwendung verschiedener Methoden der Affinitätsmaturierung, der *Phage Display*-Technik und des *Filter Sandwich Colony Screening*

Assays weiter verbessert werden. Die selektierten BBP-Varianten sollten in *E. coli* produziert und hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Zusätzlich sollte die praktische Einsetzbarkeit eines solchen Anticalins als Reagenz in der biochemischen Analytik untersucht werden.

Als Vehikel für das His₆-tag wurden das wt-BBP (Schlehuber, 2001) sowie das G9-Cystatin (Essen, 1995), welche an ihren C-Termini ein His₆-Affinitätsanhängsel tragen, gewählt (wt-BBP-His₆, G9-Cystatin-His₆). Das native Cystatin aus Hühnereiweiß ist ein Proteaseinhibitor mit 116 Aminosäureresten und bekannter Kristallstruktur (Bode *et al.*, 1988). Bei dem G9-Cystatin handelt es sich um die Δ (Ser1-Leu8), Ile29, Leu89-Variante (Schmidt & Skerra, 1994; Auerswald *et al.*, 1989).

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

E. coli-K12-Stämme:

CJ236i	<i>dut</i> , <i>ung</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> [F': <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987), von Prof. A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i>), φ80, <i>lacZ</i> ΔM15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von Prof. A. Skerra, TU München
KS272	F ⁻ , Δ <i>lac</i> -X74, <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^r), Δ <i>phoA</i> (Pvu II) (Meerman & Georgiou, 1994), von Prof. A. Skerra, TU München
MC4100Δskp	F ⁻ , <i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>prsL150</i> , <i>relA1</i> , <i>deoC1</i> , <i>rbsR</i> , <i>fthD5301</i> , <i>fruA25</i> , <i>lambda</i> ⁻ , (Schäfer <i>et al.</i> , 1999), von M. Müller, Universität Freiburg
TG1-F ⁻	<i>supE</i> , <i>hsd</i> Δ5, <i>thi</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), (Gibson, 1984), von Prof. A. Skerra, TU München
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 [F': <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15, Tn10(Tet ^r)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987), von Prof. A. Skerra, TU München

Bakteriophagen:

VCS-M13 Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg

2.1.2 Plasmide

pBBP21	(Beste <i>et al.</i> , 1999), von A. Skerra, TU München
pBBP22	(Schlehuber <i>et al.</i> , 2000), von G. Haug, TU München
pBBP24	(Schlehuber <i>et al.</i> , 2000), von G. Haug, TU München
pBBP25	(Schlehuber, 2001), von I. Theobald, TU München
pBBP34	von S. Schlehuber, TU München
pBBP41	von I. Theobald, TU München
pCysStrepII	(Schmidt & Skerra, 1994b), von A. Skerra, TU München
pLOE5	(Essen, 1995), von A. Skerra, TU München
pTUM4	von M. Schlapschy, TU München

2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide zur Herstellung der Zufallsbibliotheken

GB-1: 5'- CTT CGA CTG GTC CCA GTA CCA TGG TAA ATG GTG GGA-3'
GB-2: 5'- CAC CAG TAA GGA CCA TGC TTC TGG AGA GCA CCC AGAC -3'
GB-4: 5'- TCT GGA GAG CAC CCA GAC MNN GTC SNN GTG TCC CTT CTT
GTC CTC GTC GTA SNN GCA MNN GTA TCC GAT GAT GTA GTT -3'
GB-11: 5'- CCA AGA TTG GAA AGA TCT ACC ACA GCN NSA CTN NKG
GAG GTN NSA CCV VSG AGN NKG TAT TCA ACG TAC TCT CC -3'
FS-18: 5'- AGA TCT TTC CAA TCT TGG AGT CAC CAA CTG GGT AGG CGG
TAC CTT C -3'

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

GB-7: 5'- GAC GGT GCC TGT CCC GA -3'
GB-8: 5'- GAC TAC TGG GGA GCC GA -3'

Oligodesoxynukleotide für die ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

ZL-3: 5'- TGT TGA CCT TGC TAG CGG CTT CAG AG -3'
ZL-6: 5'- CAG CCC ATC CGG ACT CTC CGT GC -3'
ZL-8: 5'- GGC TTG ACT TCG GGG CTA GCA CCG TCG TGG -3'
ZL-9: 5'- CCT CGT CGT ACA CGG ACA TAT ATC CGA TGA TG -3'

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

2.1.4 Proteine bzw. Enzyme und Peptide

Abz-His ₆	Peptide Speciality Laboratories GmbH, Heidelberg
Anti-Digoxigenin-F _{ab} -Alkalische- Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Benzonase [®]	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
ExtrAvidin [®] -Alkalische-Phosphatase- Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Myoglobin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas (89 Units/mg)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase- Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
Taq DNA-Polymerase (5 Units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (3 Units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase (1 Units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase (6 Weiss Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase (3 Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase (5 Units/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase (10 Units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Chemikalien

Acetonitril	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
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	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
D-Biotinoyl- ϵ -aminocaprinsäure-N- hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
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
Calciumchlorid, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
ChemiBLOCKER™	Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-Deoxy-P-nucleosid-5'-triphosphat (dPTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen IBA GmbH, Goettingen
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -amino- caprinsäure-N-hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Disuccinimidylsuberat (DSS)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Eisen(III)Chlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure, p.a.	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Essigsäure, technisch	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethylacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES), Pufferan [®] ; für die Gewebezucht	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol GmbH, Hamburg
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin A, Monosulfat (Kan)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kobaltchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupferchlorid, Hexahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Kupfersulfat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Vitalia GmbH, Sauerlach
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Manganchlorid, Tetrahydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	E. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (Heavy White Oil; für die PCR)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Nickelsulfat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Nitrocefin [3-(2,4-Dinitrostyryl)-(6R,7R)- 7-(2-thienylacetoamido)-ceph-3-em- 4-carboxylsäure, E-Isomer]	Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego, CA, USA
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'- triphosphat (8-oxo-dGTP)	TriLink BioTechnologies Inc., San Diego, CA, USA
P-20 Surfactant	BIACORE, Uppsala, Schweden
Phenol, 99 %, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ponceau S	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trichloressigsäure (TCA)	E. Merck KGaA, Darmstadt
7 β -(2-Thienylacetamido)-3-(indolylthioly)- 3-cephem-4-carbonsäure (TIC)	synthetisiert von Dr. R. Medina
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zinkacetat Dihydrat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.6 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

λ BstEII-Verdau	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard, <i>Low Range</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Prestained</i> Protein Marker, <i>Broad Range</i>	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Page Ruler <i>Prestained</i> Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Kits zur DNA-Isolierung:

JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit PeqLab	Biotechnologie GmbH, Erlangen
Qiagen Plasmid Kit Midi	Qiagen GmbH, Hilden
Pellet Paint® Co-Precipitant	Novagen, Madison, USA

Kits zur DNA-Sequenzierung:

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
-----------------------------------------------------------	--------------------------------------------------

2.1.7 Geräte

ABI-PRISM® 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Autoklav Varioklav® Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
BIACORE-X System	BIACORE, Uppsala, Schweden
Brutschränke:	
BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Friocell	Medcenter Einrichtungen GmbH
CM5-Sensorchips	BIACORE, Uppsala, Schweden
Drehtisch zum Ausplattieren	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg

Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Durchflussdetektoren:	
2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Elektroblot-Apparatur	Eigenbau
Elektrophoresekammern:	Eigenbau
G42	Biometra, Göttingen
Hoefler HE33	Amersham Biosciences, San Francisco, USA
Elektroporator MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fermenter:	
10 l-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluss-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach
Fraktionssammler:	
Redi Frac	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Gradi Frac	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
17000 Minirac	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geldokumentationssystem	LTF-Labortechnik, Wasserburg
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
Dynamax® SD-300 (Pumpe)	Rainin, Woburn, MA, USA
Dynamax® UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
ÄKTA™ Purifier System	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA™ Explorer System	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Metallblockthermostat:

Techne Dri-Block DB-2A

Thermodux GmbH, Wertheim

Netzgeräte:

Power Pack 25

Biometra, Göttingen

Power Pack P30

Biometra, Göttingen

500/500

Renner GmbH, Dannstadt

PCR-Geräte:

UNO-Thermoblock

Biometra, Göttingen

Mastercycler gradient

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Peristaltische Pumpe P1

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

pH-Meter:

CG810

Schott-Geräte GmbH, Hofheim

pH 526

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
GmbH, Weilheim

Pipettierhilfen:

Pipetus akku

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

accu-jet®

Brand GmbH & Co., Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000

Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld

Multipette 4780

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Polaroid-Kamera MP4

Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA

Rollenmischer IDL TRM-V

Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen

Schreiber:

REC 112

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

SE 120 ABB

Goerz AG, Wien, Österreich

BD40

Kipp & Zonen, Delft, Niederlande

Schüttelgeräte:

Typ 3012 und 3017

Gesellschaft für Labortechnik mbH,
Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25

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

Modell TR-125/ITE-K

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Multitron II

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Thermoshake THO 5

C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn

Spektrometer:

ELISA-Photometer Spectra Max 250

Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

Lumineszenz Spektrometer LS 50 B

Perkin-Elmer GmbH, Langen

UV/Vis-Spektralphotometer:

Ultrospec 2000

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Ultrospec 3000

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Speed-Vac-Konzentrator

UniEquip, Martinsried

Univapo UVC 150H

UV-Transilluminator TI3

Biometra, Göttingen

Vortex-Genie 2

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

Waagen:

Micro m3p

Sartorius GmbH, Göttingen

PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000

W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

PAG Oerlikon Precisa 125 A

W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt

Wasserbäder:

Haake F6/C25

Thermo Haake, Karlsruhe

Thermo Haake DC30/K20

Thermo Haake, Karlsruhe

Julabo UC/5B

Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Zentrifugen:

Sigma 4K10 und 4K15

Sigma GmbH, Osterode

Sorvall RC 3B Plus mit Rotor

Kendro Laboratory Products GmbH, München

H-6000A/HBB-6

Sorvall RC 5B, RC 5C Plus und

Kendro Laboratory Products GmbH, München

Evolution RC mit Rotoren

SS-34, SLA-1500 und SLA-3000

Eppendorf 5415 C und 5415 R

Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.8 Sonstiges Material

Chromatographie-Säulen:

zum Befüllen

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Poros HQ 1,7 ml

PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden

Resource Q 1 ml

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Superdex 75 HR 10/30

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

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

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Elektroporationsküvetten (0,2 cm)

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	
Glasplatten für die SDS-PAGE	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Amicon® Ultra 4, MWCO: 5 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Amicon® Ultra 4, MWCO: 10 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Amicon® Ultra 4, MWCO: 30 kDa	Millipore GmbH, Eschborn
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 und 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon™-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrodialysiereinheiten (10 kDa MWCO)	Perbio Science GmbH, Bonn
Slide-A-Lyser Mini Dialysis Units	
Mikrotiter-Platten:	
Falcon Micro Test III Flexible	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
Assay-Plates	
Nunc-Immuno®-Sticks	Nunc GmbH, Wiesbaden
PD-10-Säulen	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen:	
blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Säulenmaterialien:	
Chelating Sepharose Fast Flow	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Sterilfilter:	
Filtropur S 0,45 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex® HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Zellschaber 3010, Costar Corporation	Diagonal GmbH & Co. KG
Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren	Nalgene Company, New York, USA
SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	

2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

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

Antibiotika-Lösungen:

Ampicillin (Amp):	100 mg/ml in H ₂ O	(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)

Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert.

Induktionslösung:

Anhydrotetracyclin (aTc):	2 mg/ml in DMF
	5 mg/ml in DMF
IPTG:	1 M in H ₂ O

GYT-Medium

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

Im Dampfautoklaven sterilisieren.

LB Medium

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

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

SOC-Medium

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

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren. Danach Zugabe von 10 ml/l einer 1 M $MgCl_2$, 1 M $MgSO_4$ sowie 20 ml/l 20 % (w/v) Glucose-Lösung (alle sterilfiltriert).

2xYT-Medium

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

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

Lösungen für die Fermentation:A) Mineralsalzlösung:

31 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	5,51 g/l
19 mM KH_2PO_4	2,58 g/l
25 mM NH_4Cl	1,33 g/l
5 mM Na_3 -Citrat $\cdot 2 H_2O$	0,47 g/l

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

B) Glucoselösungen:

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

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

C) $FeCl_3$ -Stammlösung:

35,0 g/l $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)

D) MgSO₄-Stammlösung:

1 M MgSO₄ (separat autoklavieren)

E) Thiamin-Stammlösung:

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

F) Zn-Acetat-Stammlösung:

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

G) Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

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

H) Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v) NH₃ zur pH-Regulierung

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

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

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol (mit Wasser gesättigt)

Kristallines Phenol ≥ 99 % wird bei 65°C im Wasserbad geschmolzen, mit ½ Volumen Wasser gemischt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform

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

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 SDS-PAGE:5x Auftragspuffer

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

Fling & Gregerson Laufpuffer

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

Färbelösung

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

Entfärbelösung

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v

Aufbewahrungslösung

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v

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

Sonstige Puffer:SA-Puffer

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

Periplasma-Aufschlusspuffer

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

AP-Puffer

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

CP-Puffer

NaH ₂ PO ₄	40 mM
NaCl	1 M
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.	

AX1-L-Puffer

Tris/HCl pH 9,0	25 mM
-----------------	-------

AX1-E-Puffer

Tris/HCl pH 9,0	25 mM
NaCl	1 M

AX2-L-Puffer

NaPi pH 5,5	20 mM
-------------	-------

AX2-E-Puffer

NaPi pH 5,5	20 mM
NaCl	1 M

GF-Puffer

NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	150 mM
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen.	

TAE-Puffer

Triethanolamin/HCl	0,2 M
NaCl	0,5 M
Mit HCl auf pH 8,5 einstellen.	

PBS

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

(pH 7,4; stellt sich ein)

PBS/T 0,1 (0,5)

PBS mit 0,1 (0,5) % (v/v) Tween 20

TBS

KCl	2,6 mM
NaCl	137 mM
Tris/HCl pH 7,4	25 mM

TBS/T 0,1 (0,5)

TBS mit 0,1 (0,5) % (v/v) Tween 20

Ponceau S-Lösung

Ponceau S	0,1 % w/v
Essigsäure	5 % v/v

Benzonase-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

Natriumacetatlösung

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

TE-Puffer

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

TE/10-Puffer

TE, 1:10 mit Wasser verdünnt

RNase-Lösung

Tris/HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	15 mM
RNase A	10 mg/ml

Zur Inaktivierung von DNasen 20 min in siedendem Wasser erhitzen und bei -20°C aufbewahren.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli* Stämmen

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

Flüssigkulturen wurden, falls nicht anders angegeben, in LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Für 4 ml Kulturen wurden dabei 13-ml-Kulturröhrchen verwendet, größere Kulturen wurden in Erlenmeyer-Kolben mit dem 2,5-fachen Gefäßvolumen kultiviert. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Die Bestimmung der Zelldichten erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm (OD_{550}) in einer 1-ml-Küvette mithilfe eines Ultrospec-3000-Spektralphotometers. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension im Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen (Herstellung sogenannter Glycerin-Kulturen) wurden 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur mit 1 ml hitzesterilisierten 87 % (v/v) Glycerin vermischt und bei -20°C aufbewahrt.

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

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli*-Zellen zuvor in eine transformationskompetente Form überführt werden. Zwei verschiedene Methoden wurden zu diesem Zweck eingesetzt: die $CaCl_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) und die Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Die klassische $CaCl_2$ -Methode liefert je nach *E. coli*-Stamm bis zu 10^7 Transformanden pro μ g Plasmid-DNA. Eine bessere Transformationseffizienz von bis zu 10^{10} Transformanden pro μ g Plasmid-DNA lässt sich mit der Elektroporation erreichen.

2.2.2.1 Transformation nach der $CaCl_2$ -Methode

50 ml LB-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes inokuliert und bei 200 rpm und 37°C bis zu einer OD_{550} von 0,5 kultiviert. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Kunststoff-Röhrchen überführt und die

Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4°C, 10 min). Das Zellsediment wurde in 40 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert, die Suspension wie beschrieben zentrifugiert, das erhaltene Zellsediment in 20 ml 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots à 200 µl bei -80°C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4°C abgekühlt.

Für die Transformation wurden 200 µl der Zellsuspension mit 0,5 bis 5 µl DNA-Lösung (ca. 5 ng Plasmid-DNA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min auf 37°C erhitzt, mit 2 ml LB-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. 100 µl bis 2 ml des Ansatzes wurden in Abhängigkeit von der Anzahl erwarteter Transformanden auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.2 Transformation mittels Elektroporation

Die Präparation elektrokompenter Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue erfolgte gemäß den optimierten Vorschriften von Tung & Chow (1995) sowie Hengen (1996). 1 l LB-Medium wurde mit 20 ml einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in LB/Tet angeimpft und die Kultur bei 26°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis abgekühlt und anschließend sedimentiert (SLA-3000, 5000 rpm, 4°C, 10 min). Nach vollständigem Abziehen des Überstandes wurden die Zellen zweimal in je 500 ml sterilen, eiskalten 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und wie oben sedimentiert. Das Sediment wurde in insgesamt 600 µl vorgekühltem GYT-Medium resuspendiert, in Portionen à 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Präparation elektrokompenter Zellen des *E. coli*-Stammes TG1-F⁻ wurden die Volumina aus der oben angeführten Vorschrift halbiert.

Für die Elektroporation wurde das MicroPulser-Gerät mit den entsprechenden Küvetten (Elektrodenabstand 0,2 cm) verwendet. Die Elektroporation erfolgte im Kühlraum bei 4°C (mit vorgekühlten Lösungen und Geräten) wie im Folgenden beschrieben.

Bibliotheken auf Grundlage des Phasmidvektors pBBP24:

Für die Transformation elektrokompenter XL1-Blue mit BBP-Bibliotheken auf der Grundlage des Vektors pBBP24 wurden jeweils ca. 6 pmol (ca. 17,3 µg) ligierte und durch Fällung entsalzte (siehe Abschnitt 2.2.5.6) DNA eingesetzt. Je 10 µl der DNA-Lösung in

dd H₂O (ca. 1,4 µg) wurden auf Eis in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 100 µl der frisch aufgetauten elektrokompetenten Zellen vermischt. Nach einminütiger Inkubation und Anlegen eines Pulses von 12,5 kV/cm für 6 ms wurden die Zellen mit insgesamt 2 ml SOC-Medium aus den Küvetten gespült und in 13-ml-Kunststoff-Kulturröhrchen für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. (Zur Bestimmung der Transformationseffizienz bzw. der Größe der Bibliothek wurden je 100 µl entnommen und in Verdünnungstufen auf LB/Amp-Platten ausplattiert.) Anschließend wurden sie mit 2xYT/Amp-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben zu einem Endvolumen von 1 l versetzt und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert. Danach wurden 150 ml der Zellkultur zur Isolierung der Plasmid-DNA der Bibliothek im Midiformat mittels Qiagen Plasmid Kit Midi entnommen und weitere 200 ml für die Herstellung von Glycerin-Kulturen (siehe Abschnitt 2.2.1) verwendet. 100 ml der Kultur wurden mit Helferphagen infiziert und die Phagemidproduktion induziert (siehe Abschnitt 2.3.2).

Bibliotheken auf Grundlage der Plasmide pBBP22 und pBBP41:

Für die Transformation elektrokompetenter TG1-F⁻ Zellen mit BBP-Bibliotheken auf der Grundlage der Vektoren pBBP22 und pBBP41 wurden 40 µl der Zellen mit ca. 85 ng (in 5 µl dd H₂O) ligierter und durch Fällung entsalzter (siehe Abschnitt 2.2.5.6) DNA elektroporiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurden 50 - 150 µl der Zellsuspension für den *Filter Sandwich Colony Screening Assay* verwendet.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA durch niedrige Ionenstärke.

Analytischer Maßstab:

Für die Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neu-konstruktion von Plasmiden, der ortsgerichteten Mutagenese oder durch die Infektion von *E. coli* mit Phagemiden erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab isoliert. Die DNA wurde dabei aus einer stationären 4 ml-Übernachtskultur mittels eines Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Genomed (JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit) nach Herstellerangaben präpariert.

Typischerweise wurden Ausbeuten von 10 bis 20 µg Plasmid-DNA, gelöst in 50 µl TE/10-Puffer, erhalten. Bis zu ihrer Verwendung wurde die DNA bei 4°C gelagert.

Präparativer Maßstab:

Um größere DNA-Mengen für den präparativen Restriktionsverdau oder die Konservierung der BBP-Zufallsbibliotheken zu gewinnen, wurde Plasmid-DNA im „Midi“ Maßstab isoliert. Hierzu wurde die DNA gemäß Herstellerangaben mithilfe des Qiagen Plasmid Kits Midi aus einer stationären 50 ml-Kultur isoliert. Die Ausbeuten betragen ca. 100 µg Plasmid-DNA, gelöst in 100 µl dd H₂O. Die DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Mutagenese nach Kunkel (1987) benötigte zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden mit der intergenischen Region des Phagen *φ1* (sog. Phasmide; vgl. Abschnitt 1.4) präpariert. Als Wirt fungierte dabei der *E. coli*-Stamm CJ236i, dessen chromosomale Mutationen *dut*⁻ und *ung*⁻ einen partiellen Einbau von Desoxyuridin statt Desoxythymidin in die DNA bewirken (vgl. Abschnitt 2.2.5.2). CJ236i trägt ein F'-Plasmid und kann daher die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen des Typs M13 notwendigen Sex-Pili ausbilden. Nach Infektion der mit dem entsprechenden Phasmid transformierten Zellen mit VCS-M13 Helferphagen wurde die Phasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemide verpackt und sezerniert. Anschließend konnte die ssDNA aus den Phagemiden isoliert werden (Geisselsoder *et al.*, 1987; Vieira & Messing, 1987). Die dabei als Verunreinigung mitgewonnene ssDNA des Helferphagen (< 5 %) störte bei der Mutagenese nicht.

4 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Kolonie des mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes CJ236i inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden 50 ml LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,26 inkubiert (Zelldichte ≈ 1,6 x 10⁸ Zellen/ml). Von dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit VCS-M13 Helferphagen entsprechend einer *Multiplicity of Infection* (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 ml LB/Amp/Kan-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

Zur Ernte der Phagemide wurden die Zellen abzentrifugiert (SS-34, 10000 rpm, 4°C, 10 min), der klare Überstand mit den Phagemid-Partikeln in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 10 µl einer 10 mg/ml RNase-Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Phagemide durch Zugabe von 1/4 Volumen frischen 3,5 M Ammoniumacetat,

20 % (w/v) PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert (SS-34, 12000 rpm, 4°C, 15 min) und schließlich in 200 µl Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA) aufgenommen. Nach der Überführung in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch abschließende Zentrifugation (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C, 2 min) entfernt. Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde die Phagemidlösung zweimal mit 200 µl Phenol und je einmal mit 200 µl Phenol/Chloroform und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (vgl. Abschnitt 2.2.5.6). Anschließend wurden alle erhaltenen organischen Phasen zur Erhöhung der Ausbeute in der angegebenen Reihenfolge mit 100 µl TE-Puffer rückextrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 µl) und die ssDNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 7,8 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina Ethanol für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C, 30 min), das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 µl TE/10-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

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

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989). Sie wurde sowohl zur analytischen Restriktionsanalyse bzw. Mengenabschätzung von Plasmiden als auch zur präparativen Isolierung von Reaktionsprodukten aus der PCR oder von DNA-Fragmenten nach dem Restriktionsverdau eingesetzt.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden 1 % (w/v) Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer in der Siedehitze gelöst und nach Zugabe von 1/10000 Volumen einer Ethidiumbromidlösung (1 % (w/v) in Wasser) in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Einsetzen der Geltaschenformer und dem Erkalten des Gels wurde dieses in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt. Das Gel (ca. 10,5 x 7,5 x 0,5 cm; Länge x Breite x Höhe) wurde mit 10 µl DNA-Lösung pro Gelspur unter Zusatz von 1/10 Volumen 10-fach Auftragspuffer für Agarosegele beladen und die Elektrophorese bei

einer konstanten Spannung von 90 V für 50 min durchgeführt. Durch Bestrahlen mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312 nm wurden die DNA-Fragmente anhand der Interkalation des Ethidiumbromids sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu reinigen, wurden präparative Gele mit 1 % (w/v) *Low Melting Point*-Agarose in TAE-Puffer, der ebenso als Laufpuffer diente, verwendet. Die hierbei breiteren Geltaschen wurden mit bis zu 80 µl der DNA-Lösung, der 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer zugegeben waren, beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V für bis zu 90 min. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Fragmente zur Vermeidung von Strahlenschäden mit UV-Licht (312 nm) geringer Intensität sichtbar gemacht und die Gelstücke, welche die gewünschten DNA-Fragmente enthielten, ausgeschnitten.

Die DNA wurde mithilfe des JETsorb Gel Extraction Kits nach Vorschrift des Herstellers aus den Gelstücken isoliert und in 20 µl TE/10-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend in der Regel mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der DNA-Größenstandards abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese ermöglicht die 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden die kovalente Verknüpfung mit dem freien 3'-Ende eines bei der Polymerase-Reaktion *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges durch die T4 DNA-Ligase (Abschnitt 2.2.5.2).

Dazu wurden 200 pmol des gereinigten Oligodesoxynukleotides zusammen mit 3 µl 10xT4-Polynukleotidkinase-Puffer (700 mM Tris/HCl (pH 7,6), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1,2 µl 10 mM ATP und 0,5 µl (5 u) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Polynukleotidkinase durch eine Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert. Der nicht direkt für die ortsgerichtete Mutagenese benötigte Anteil des phosphorylierten Oligodesoxynukleotides wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 Ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel

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

Die Selektion gegen den nicht mutierten parentalen Strang ist aufgrund seiner Herkunft aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i und dem damit verbundenen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin (vgl. Abschnitt 2.2.3.2) möglich. Bei der Transformation eines ung⁺-Stammes mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch zelleigene Reparaturenzyme partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang codierten Mutationen selektiert.

Für die Hybridisierung wurden ca. 200 ng ssDNA (Abschnitt 2.2.3.2) mit 1 µl 10-fach Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂) und 0,5 µl (3,3 pmol) des phosphorylierten Oligodesoxynukleotides (Abschnitt 2.2.5.1) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 80°C erhitzt, im Verlauf von 3 bis 4 h auf RT abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Zur Neusynthese des zweiten DNA-Stranges wurden 1 µl 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 0,5 µl (1,5 u) T4 DNA-Polymerase (NEB) und 1 µl (3 u) T4 DNA-Ligase (Promega) zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37°C inkubiert. 5 µl dieser Lösung wurden im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer verdünnt, 5 µl davon für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen (Abschnitt 2.2.2.1) verwendet, und die verbleibenden 45 µl der Lösung bei -20°C gelagert. Die restlichen 8 µl des unverdünnten Reaktionsansatzes wurden zur Kontrolle der Reaktion durch analytische Agarose-Gel-elektrophorese (Abschnitt 2.2.4.1) verwendet.

2.2.5.3 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung von doppelsträngiger zirkulärer Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985). Sie wurde mithilfe des Sequenzierautomaten ABI-PRISM[®] 310 durchgeführt.

Bei diesem Verfahren wurde der ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit eingesetzt. Dieser enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (AmpliTaq®; Tabor und Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die neusynthetisierte DNA-Kette während der Polymerasereaktion statistisch abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden im Sequenzierautomaten mittels Kapillar- Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6™, Applied Biosystems) aufgetrennt und ihre Fluoreszenzgruppen am Ende der Laufstrecke durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera bei vier verschiedenen Wellenlängen detektiert und als digitales Signal an einen Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis 3.3) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

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 mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und 25 PCR-Zyklen wie folgt unterworfen: 95°C, 30 s; 50°C, 30 s; 60°C, 4 min. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA und 30 µl Ethanol p.a. für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugieren präzipitiert (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C, 30 min), mit 125 µl 70 % (v/v) Ethanol p.a. gewaschen, zum Trocknen stehen gelassen und in 14 µl des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Die Sequenzanalyse wurde schließlich mithilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM® 310 Data Collection) gestartet.

2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) wurde unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase (Bloch, 1991) für die konzertierte Mutagenese mehrerer Aminosäurepositionen zur Herstellung von BBP-Zufallsbibliotheken und zur Einführung von Zufallsmutationen (*Error Prone PCR*) eingesetzt. Die dafür als *Primer* eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Die Verwendung von *Primern*, die an definierten Positionen Mischungen verschiedener Nukleotide aufwiesen, erlaubte die Generierung neuer, von der Matrizen-DNA abweichender Zufallssequenzen.

Standard PCR-Ansatz:

Zur Herstellung der PCR-Produkte A und B der His1ΔC*-Bibliotheken (Abschnitt 3.2.1) wurde die PCR in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit ca. 10 ng Plasmid-DNA als Matrize, jeweils 10 nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP (4 µl dNTP-Mix: je 2,5 mM an den einzelnen dNTPs), 25 pmol der beiden *Primer* und 5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 9,0), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine und 1 % Triton X-100) durchgeführt. Die Lösung wurde mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet, im Thermocycler für 2 min auf 94°C temperiert und 0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 u/µl) zugegeben (*Hot Start*). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Thermo-Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C für 1 min; 2. Hybridisierung der Primer bei 60°C für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72°C für 1,5 min (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 25-mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min auf 60°C erhitzt. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Assembly PCR:

Assembly PCR wurde zur Herstellung der His1ΔC*-Bibliotheken in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Dazu wurden je 50 ng der PCR-Produkte A und B als Matrize (Abschnitt 3.2.1) und je 50 pmol der flankierenden *Primer* eingesetzt. Die anderen Komponenten wurden in den gleichen Konzentrationen wie in einem Standard-PCR-Ansatz zugesetzt. Die Amplifizierungsreaktion erfolgte in 15 Zyklen mithilfe der *Taq*-Polymerase bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde mit dem E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Error Prone PCR:

Um statistisch verteilt Mutationen in die Gene verschiedener BBP Varianten einzuführen, wurde eine fehlererzeugende PCR nach dem Protokoll von Zaccolo *et al.* (1996) durchgeführt. Dazu wurden Nukleotidanaloga 2'-Deoxy-P-nucleosid-5'-tri-phosphat (dPTP) und 8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxo-dGTP) zusätzlich zu den standard Desoxynukleotiden eingesetzt. In einem Ansatz von 20 µl Gesamtvolumen wurden 5-10 fmol Plasmid-DNA als Matrize sowie je 10 pmol der beiden Oligodesoxynukleotide GB1 und GB2 als *Primer* (Abschnitt 3.3.1) mit 2 µl 10x *Taq*-Puffer, 1,6 µl 25 mM MgCl₂, 4 µl dNTP-Mix und Nukleotidanaloga mit einer Endkonzentration von 100 bis 500 µM im Ansatz versetzt. Nach Zugabe von 5 u *Taq*-DNA-Polymerase (MBI) wurden 10 Zyklen (unter *Hot Start* Bedingungen; Hybridisierungstemperatur 55°C) mit einer 5-minütigen Polymerase-Reaktion ohne der Vervollständigung der Syntheseprodukte durchgeführt. Anschließend wurden 5 µl der *Error Prone* PCR-Reaktion als Matrize in einer Amplifizierungs-PCR zur Entfernung von

dPTP und 8-oxo-dGTP aus der DNA verwendet. Diese Reaktion wurde unter Ausschluss der Nukleotidanaloga und Verwendung von 20 Thermo-Zyklen des Standard PCR Ansatzes mit der *Taq*-DNA-Polymerase unter sonst gleichen Bedingungen wie die *Error Prone* PCR-Reaktion durchgeführt. Das gewünschte Reaktionsprodukt wurde durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

2.2.5.5 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Präparation von DNA-Fragmenten sowie für Restriktionsanalysen wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte bei einer Temperatur und einem Puffersystem, wie vom Hersteller empfohlen. Im Falle einer Spaltung mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen bei derselben Temperatur wurde jener Puffer verwendet, in welchem beide Enzyme die maximale Aktivität aufwiesen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration, durchgeführt.

Analytische Restriktionsspaltungen wurden mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 10 µl unter Verwendung von 5 u der Restriktionsendonukleasen für 60 min bei geeigneter Temperatur durchgeführt. Eine Restriktionsspaltung im präparativen Maßstab wurde typischerweise in einem Reaktionsvolumen von 50-100 µl mit 2-10 µg Plasmid-DNA und 10-60 u des Restriktionsenzym für 1-2 h durchgeführt. Gereinigte PCR-Fragmente wurden auf analoge Weise, jedoch mit bis zu 60 u pro µg DNA gespalten. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mithilfe der präparativen Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

2.2.5.6 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Zur Entfernung von verbliebenen Exonucleasen bei einer Plasmid-DNA Präparation (Abschnitt 2.2.3), wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt. Die Ligierungsansätze der BBP-Zufallsbibliotheken wurden mit dem Pellet Paint® Co-Precipitant Kit gefällt.

Phenol/Chloroform-Extraktion:

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen mit Wasser auf 400 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (Eppendorf

5415 C, 14000 rpm, RT, 4 min). Die obere, wässrige Phase wurde mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation abgetrennt.

Ethanol-Fällung:

Für die anschließende Ethanol-Fällung wurde die wässrige Phase mit dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem Ethanol (p.a.) gemischt und für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Das nach der Zentrifugation (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µl eiskalten 70 % (v/v) Ethanol (p.a.) gewaschen, bei RT getrocknet, in 20 bis 100 µl TE/10-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt.

Pellet Paint® Co-Precipitant Fällung:

Für die Herstellung von BBP-Zufallsbibliotheken mußte der Ligierungsansatz des PCR-Fragments mit dem Vektorfragment vor der Elektroporation entsalzt werden. Hierzu wurde der Ligierungsansatz mit dem Pellet Paint® Co-Precipitant Kit von Novagen gemäß den Herstellerangaben gefällt, in dd H₂O aufgenommen und anschließend für die Elektroporation (Abschnitt 2.2.2.2) verwendet.

2.2.5.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

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

Für einen Standard-Ligierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 2 µl 10-fach T4 DNA-Ligase-Puffer (300 mM Tris/HCl (pH 7,8), 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP; Promega), 1 u T4 DNA-Ligase und jeweils ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend zur Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet (Abschnitt 2.2.2.1).

Für die Herstellung der BBP-Zufallsbibliotheken des dritten und vierten Segmentes der BBP-Variante His1ΔC* (Abschnitt 3.2.1) wurden das Vektor-Fragment und das PCR-Fragment, welches den der Zufallsmutagenese unterworfenen Teil des BBP-Gens enthielt, in äquimolarem Verhältnis eingesetzt. Die Ligierung erfolgte unter Zusatz von 1/10 Volumen T4 DNA-Ligase 10-fach Puffer (500 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 0,5 mg/ml BSA; New England Biolabs) bei einer DNA-Konzentration von 25 ng/µl und einer T4 DNA-Ligase-Konzentration von 0,2 Weiss Units/µl (New England Biolabs). Der Ansatz wurde für mindestens 24 h bei 16°C im Wasserbad inkubiert, durch

Fällung (vgl. Abschnitt 2.2.5.6) entsalzt und zur Transformation des *E. coli*-Stammes XL1-Blue mittels Elektroporation verwendet (Abschnitt 2.2.2.2).

2.3 Phage Display

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von dem Phasmidvektor pBBP24 produziert, der die für die Replikation und Verpackung als einzelsträngige Phasmid-DNA erforderliche intergenische Region des filamentösen Phagen f1 trägt. Weiterhin codiert der Vektor für ein Fusionsprotein aus der OmpA-Signalsequenz, der BBP-Variante, dem *Strep*-tag II und einem C-terminalen Segment des Phagenhüllproteins pIII (Aminosäuren 217-406; $\Delta\Delta$ pIII) unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operator Systems.

2.3.1 Propagation von Helferphagen

50 ml 2xYT/Tet-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in 2xYT/Tet angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,3$ inkubiert. Von dieser Kultur wurden 10 ml abgenommen und in einen auf 37°C vorgewärmten, sterilen 50 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Zellen wurden mit $2 \cdot 10^{10}$ pfu VCS-M13 Helferphagen (Stratagene, 10^{11} pfu/ml), entsprechend einer moi von 10, infiziert und für 30 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur mit Kanamycin auf eine Endkonzentration von 25 µg/ml eingestellt und für weitere 8 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Abtötung der Bakterien wurde die Kultur anschließend im Wasserbad für 10 min auf 65°C erhitzt, auf Eis abgekühlt, in einen hitzesterilisierten Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (SS-34, 12000g, 4°C, 15 min). Der Überstand mit den Phagen wurde nach der Sterilfiltration ($\emptyset = 45$ µm) bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Zur Titerbestimmung der produzierten Helferphagen wurden zwei Verdünnungsreihen in 2xYT-Medium bis zu einer maximalen Verdünnung von 10^{-10} vorbereitet. Danach wurden 50 ml 2xYT/Tet-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären *E. coli* XL1-Blue-Kultur in 2xYT/Tet angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD_{550} von 0,5 inkubiert. 3 ml 2xYT-Weichagars wurden verflüssigt, in ein 13-ml-Kunststoff-Kulturröhrchen überführt und im Wasserbad auf 48°C temperiert. Jeweils 100 µl der exponentiell wachsenden XL1-Blue-Kultur sowie 100 µl der Helferphagenlösung in den Verdünnungsstufen 10^{-8} , $5 \cdot 10^{-9}$, 10^{-9} und 10^{-10} wurden zu dem Weichagar gegeben, vorsichtig vermischt und zügig auf bei 37°C vortemperierte 2xYT/Tet-Agarplatten gleichmäßig verteilt. Nach Erstarren des Weichagars (ca. 20 min) bei RT wurden die Platten für 8 h bei 37°C und vor dem Auszählen noch bis zu

12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Titer der erhaltenen Helferphagenlösung lag bei $3,3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml.

2.3.2 Produktion von Phagemidbibliotheken

E. coli XL1-Blue Zellen wurden mit einer Bibliothek von Phasmidvektoren, die für BBP-Varianten mit randomisierten Bereichen codieren, mittels Elektroporation transformiert. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen und Induktion der Genexpression des BBP-pIII-Fusionsproteins wurden Phagemide generiert, welche die BBP-Varianten auf ihrer Oberfläche präsentierten.

Nach der Elektroporation (Abschnitt 2.2.2.2) wurde der Ansatz bis zu einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ bei 37°C kultiviert. Von dieser Kultur wurden 100 ml in einen sterilen 300 ml Erlenmeyerkolben überführt, mit $3,2 \cdot 10^{11}$ pfu VCS-M13 Helferphagen ($moi = 10$) infiziert und für 30 min bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurde Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von $70 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt, die Kultur für 10 min bei 26°C und 160 rpm geschüttelt und die Synthese des BBP-pIII-Fusionsproteins durch Zugabe von Anhydrotetracyclin bis zu einer Endkonzentration von $25 \mu\text{g/l}$ für 7 h bei 26°C und 160 rpm induziert.

Zur Isolierung der Phagemide wurde die Kultur auf vier sterile SS-34 Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (SS-34, 10000 rpm, 4°C , 15 min). Der Überstand wurde sterilfiltriert ($\emptyset = 45 \mu\text{m}$) und die enthaltenen Phagemide durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühlten und sterilen 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl über Nacht bei 4°C gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation sedimentiert (SS-34, 12000 rpm, 4°C , 20 min), der Überstand wurde abgezogen, und das Präzipitat in je 1 ml sterilen, vorgekühlten TBS gelöst. Nach Überführung in vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße und 45 min Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C , 5 min). Die Überstände wurden jeweils in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen vorgekühlten und sterilen 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für 45 min auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Phagemide abzentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C , 20 min) und nach vollständiger Entfernung des Überstandes in je 250 μl sterilfiltrierten, vorgekühlten TBS gelöst. Die Lösungen wurden nochmals für 30 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C , 5 min). Die so hergestellte Phagemidlösung wurde direkt für die Affinitätsanreicherung eingesetzt.

2.3.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

Zur Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide aus den BBP-Zufallsbibliotheken wurden Nunc-Immuno[®]-Sticks verwendet (Abschnitt 3.2.2). Die Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem um 45° vertikal geneigten Rollenmischer, um eine Benetzung des Innengewindes der Polypropylen-Röhrchen zu vermeiden. Bei allen Inkubations- und Waschschritten wurde der Flügelstift jeweils in ein neues Röhrchen mit der entsprechenden vorgelegten Lösung eingeschraubt.

Der Flügelstift wurde zunächst über Nacht mit 800 µl 100 µg/ml G9-Cystatin-His₆ in TBS/E beschichtet. Unbelegte Bindungsstellen auf der Oberfläche wurden dann durch Inkubation mit 1,2 ml sterilfiltrierter Lösung von 2 % (w/v) BSA in TBS/T 0,1 für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde der Flügelstift dreimal mit jeweils 1,2 ml TBS/T 0,1 und einmal mit 1,2 ml 100 µM NiSO₄-Lösung in TBS/T 0,1 kurz gewaschen. Zur Adsorption von Phagemiden wurde der Flügelstift in einer Mischung aus 250 µl der frischen Phagemidlösung (zwischen 1•10¹¹ und 2•10¹² cfu/ml; Abschnitt 2.3.2) und 500 µl Lösung von 2 % (w/v) BSA und 100 µM NiSO₄ in TBS/T 0,1 für 1 h bei RT inkubiert. Um Phagemide zu entfernen, die nicht gebunden waren, wurde insgesamt achtmal mit jeweils 950 µl TBS/T 0,1/100 µM NiSO₄ für 2 min gewaschen. Adsorbierte Phagemide wurden schließlich durch Inkubation des Flügelstiftes für 10 min in 950 µl einer 0,1 M Glycin/HCl-Lösung (pH 2,2) eluiert und die erhaltene Phagemid-Lösung anschließend sofort mit 160 µl 0,5 M Tris-Lösung neutralisiert.

Im Anschluss wurden die Phagemidtitel ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion bestimmt (Abschnitt 2.3.5). Die während des Elutionsschrittes erhaltenen Phagemide wurden noch am selben Tag zur Amplifizierung eingesetzt (Abschnitt 2.3.4).

2.3.4 Amplifizierung von Phagemiden

Die bei der Affinitätsanreicherung durch Elution gewonnenen Phagemide wurden amplifiziert, um sie einem erneuten Selektionszyklus zuzuführen.

Dazu wurde eine stationäre Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in 4 ml LB/Tet-Medium, die bei 30°C und 200 rpm inkubiert worden war, abzentrifugiert (Eppendorf 5415 C, 5000 rpm, RT, 2 min) und zweimal mit je 2 ml 2xYT-Medium gewaschen, um das Tetracyclin aus dem Medium zu entfernen. Mit ca. 300 µl der so erhaltenen Zellsuspension wurden 50 ml 2xYT-Medium angeimpft, so dass die resultierende OD₅₅₀ bei 0,05 lag, und bei 37°C und 140 rpm bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 geschüttelt.

Von dieser Kultur wurden 4 ml abgenommen und zu den Phagemiden der Elutionsfraktion (1055 µl), die kurz zuvor auf 37°C temperiert worden waren, zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C und 140 rpm wurden die Zellen sedimentiert (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4°C, 2 min) und nach Abziehen des Überstandes in 600 µl 2xYT-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquote zu je 200 µl auf vier LB/Amp-Agarplatten (Ø = 14 cm) gleichmäßig verteilt und anschließend für 14 bis 16 h bei 32°C inkubiert.

Zur erneuten Produktion von Phagemiden wurde der Zellrasen vorsichtig mithilfe eines Zellschabers unter Zugabe von insgesamt 50 ml 2xYT/Amp-Medium abgeschabt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zur vollständigen Resuspendierung für 30 min bei 37°C und 200 rpm in einem sterilen 100 ml Erlenmeyer-Kolben geschüttelt. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden 50 ml 2xYT/Amp Medium mit ca. 300 µl der Zellsuspension zu einer OD₅₅₀ von 0,05 bis 0,08 inokuliert und bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 inkubiert. Die Infektion mit Helferphagen und das weitere Vorgehen zur Produktion und Aufarbeitung der Phagemide erfolgten wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Zur Konservierung der genetischen Information der eluierten Phagemide wurde mit der erhaltenen Zellsuspension einerseits eine Glycerinkultur (Abschnitt 2.2.1) hergestellt, andererseits wurde sie zur Herstellung einer Plasmid-Midipräparation (Abschnitt 2.2.3.1) eingesetzt.

2.3.5 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

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

Zu diesem Zweck wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem TBS bis zu einer maximalen Verdünnungsstufe von 10⁻¹⁰ hergestellt. Jeweils 10 µl Phagemidverdünnung wurden im 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, kurz im Heizblock auf 37°C erwärmt und mit 90 µl einer exponentiell wachsenden Zellkultur, die auch zur Amplifizierung eluierter Phagemide benutzt wurde (Abschnitt 2.3.4), vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und 140 rpm wurden die Infektionsansätze auf Eis gestellt und die gesamte Suspension von 100 µl auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit TBS hergestellt. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurde der Phagemidtiter durch Auszählen der Klone bestimmt.

2.3.6 Filter Sandwich Colony Screening Assay

Nach der Affinitätsanreicherung wurde zur Identifizierung bindungsaktiver BBP-Varianten ein *Filter Sandwich Colony Screening Assay* (Skerra *et al.*, 1991a; Schlehuber *et al.*, 2000) durchgeführt. Dazu wurden die selektierten Mutanten des BBP als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996) und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) produziert. Diese diente zur funktionellen Immobilisierung der Varianten auf einer mit humanem Serum-Albumin (HSA) beschichteten Oberfläche (König & Skerra, 1998).

Zur Herstellung dieser Fusionsproteine wurde die Genkassette mit *Bst*XI herausgeschnitten und auf den Vektor pBBP22 subkloniert. Der Ligierungsansatz wurde zur Transformation von CaCl₂-kompetenten *E. coli* TG1-F⁻-Zellen (Abschnitt 2.2.2.1) verwendet. Im Falle der durch fehlererzeugende PCR generierten Mutanten wurden die PCR- und die Vektorfragmente von pBBP22 bzw. pBBP41 mittels *Bst*XI-Schnittstellen isoliert, ligiert und elektrokompetente *E. coli* TG1-F⁻-Zellen (Abschnitt 2.2.2.2) mit dem Ligierungsansatz transformiert. 100 bis 150 µl der transformierten Zellsuspension wurde vorsichtig auf einer hydrophilen Membran (GVWP; 0,22 µm Porengröße), die auf einer LB/Amp-Agarplatte platziert wurde, ausplattiert. Nach einer Inkubation von 7 h bei 37°C hatten sich Kolonien von ca. 0,5 mm Größe gebildet.

In der Zwischenzeit wurde eine hydrophobe Membran (Immobilon P; 0,45 µm Porengröße) nacheinander für je 5 min bei RT in Methanol, Wasser und sterilfiltrierten TBS geschwenkt. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in 10 ml einer Lösung von 10 mg/ml HSA in TBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit dem gleichen Volumen 3 % (w/v) BSA in TBS/T 0,5 für 2 h bei RT abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 5 min mit sterilem TBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt wurden, geschwenkt. Danach wurde sie auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, der zusätzlich 200 µg/l Anhydrotetracyclin enthielt, gelegt.

Die hydrophile, mit Kolonien bewachsene Membran wurde vorsichtig auf die mit HSA beschichtete Membran aufgelegt und die Position der beiden Membranen zueinander durch Durchstechen mit einer feinen Nadel gekennzeichnet. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22°C für 16 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen BBP-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der ABD und dem HSA auf der unteren Membran immobilisiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die obere Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Platte transferiert und bei 4°C konserviert.

Die hydrophobe untere Membran wurde von der Platte abgehoben, dreimal für 10 min mit je 25 ml TBS/T 0,1 gewaschen und anschließend für 1 h in 10 ml einer Lösung mit 10 µg/ml Digoxigenin oder Biotin markierten Zielproteinen (G9-Cystatin-His₆, Wildtyp BBP-His₆ und G9-Cystatin-*Strep* II) und 100 µM NiSO₄ in TBS/T 0,1 inkubiert.

Zur Herstellung der Biotin-Konjugate wurden die entsprechenden rekombinanten Proteine zunächst mittels Gelfiltration (PD-10) gegen PBS umgepuffert. Die erhaltenen 3,5 ml Proteinlösung wurden unter Rühren bei RT langsam mit einem zehnfachen molaren Überschuss von D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester in DMSO versetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden die überschüssigen Reagenzien mittels Gelfiltration (PD-10) abgetrennt und dabei gleichzeitig der Puffer gegen TBS ausgetauscht. Die Herstellung der Digoxigenin-Konjugate wurde auf dieselbe Weise unter Anwendung von einem zweifachen molaren Überschuss von Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (DIG-NHS) in DMSO durchgeführt.

Um durch die BBP-Varianten gebundenes Biotin- oder Digoxigenin-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach jeweils dreimaligem Waschen für 5 min mit 25 ml TBS/T 0,1 und PBS/T 0,1 für 1 h mit 10 ml eines ExtrAvidin®-Alkalische-Phosphatase-Konjugates (1:10000 in PBS/T 0,1 verdünnt) oder eines Anti-Digoxigenin F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugates (1:1000 in PBS/T 0,1 verdünnt) inkubiert. Danach wurde die Membran für jeweils 5 min zweimal mit 25 ml PBS/T 0,1 gewaschen, zweimal mit dem gleichen Volumen PBS und schließlich kurz in AP-Puffer geschwenkt. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl BCIP-Lösung (50 µg/ml in DMF) und 5 µl NBT-Lösung (75 µg/ml in 70 % (v/v) DMF) zugesetzt waren, inkubiert, bis deutliche Farbsignale an den Positionen einiger Kolonien zu erkennen waren. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt und die Membran getrocknet. Kolonien, die starke Farbsignale auf der hydrophoben Membran hervorriefen, wurden ausgewählt, kultiviert und ihre Plasmid-DNA isoliert und analysiert.

2.4 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Produktion von Proteinen in *E. coli* wurden Expressionsvektoren verwendet, die für eine Fusion des maturen Proteins mit der bakteriellen Signalsequenz des *E. coli*-eingenen äußeren Membranproteins A (*OmpA*) codieren. Diese Signalsequenz ist für die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum, in dem sich die Disulfidbrücken ausbilden können, verantwortlich (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression kann das rekombinante Protein aus diesem Zellkompartiment in prozessierter und gefalteter Form isoliert werden. Dabei wird die äußere

Membran von *E. coli* durch die Komplexierung zweiwertiger Ionen mit EDTA unter hypertonischen Bedingungen – eingestellt durch eine hohe Konzentration an Saccharose – destabilisiert, wodurch die löslichen periplasmatischen Proteine von den Sphäroplasten mit den darin enthaltenen cytoplasmatischen Proteinen abgetrennt werden. Der ganze Vorgang wird durch Zugabe von Lysozym unter Abbau des Peptidoglycans gefördert.

2.4.1 Gentechnische Herstellung von G9-Cystatin

Zur Produktion von rekombinantem G9-Cystatin im *E. coli* Stamm JM83 wurde das Expressionsplasmid pLOE5 für das Fusionsprotein mit dem His₆-tag und das Plasmid pCys-*Strep* II für das Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II verwendet.

50 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 l LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 22°C und 200 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch regelmäßige Probenentnahme zur Messung der optischen Dichte verfolgt. Bei OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG (1 M in ddH₂O) zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Induktionsdauer betrug für das Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II 3 h und für dasjenige mit dem His₆-tag 14 h.

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und abzentrifugiert (SLA-3000, 5000 rpm, 4°C, 15 min). Der Medienüberstand wurde durch Abpipettieren vollständig entfernt, das Sediment in insgesamt 1/100 des Kulturvolumens (20 ml) eiskalten Periplasma-Aufschlusspuffer resuspendiert und 100 µl Lysozymbelösung (10 mg/ml im Periplasma-Aufschlusspuffer) zugesetzt. Für den Periplasmaaufschluss der G9-Cystatin-His₆ produzierenden Zellen wurden wegen der hohen Zelldichte 45 ml des Periplasma-Aufschlusspuffers, dem 15 mg Lysozym zugesetzt waren, verwendet. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4°C, 15 min sowie SS-34, 15000 rpm, 4°C, 15 min). Der klare periplasmatische Extrakt wurde über Nacht gegen das 100-fache Volumen des bei der darauffolgenden Affinitätschromatographie verwendeten Puffers dialysiert (Abschnitt 2.5.1.1 bis 2.5.1.2).

Für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE wurde auch ein Gesamtzellextrakt der Kultur als Probe entnommen. 1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Eppendorf 5415 C, 14000 rpm, 4°C, 3 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonalösung (12,5 U/ml in Benzonalpuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE

wurden die Zellen unter vorsichtigem Mischen lysiert. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation auf Eis wurde die Nukleinsäure durch die Benzonase hydrolysiert. Danach wurde der Gesamtzellaufschluss bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C eingefroren.

2.4.2 Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten im Schüttelkolben

Zur Produktion rekombinanter BBP-Varianten oder Fusionsproteine in *E. coli* wurden die Expressionsplasmide pBBP21, pBBP25 und pBBP34 verwendet.

2 l LB-Selektivmedium wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur eines entsprechend transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft und bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{550} = 0,5$ im Schüttler bei 22°C und 200 rpm kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (2 mg/ml in DMF) zu einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/l}$ induziert. Die Induktionsdauer betrug abhängig vom Protein 2,5 bis 3 h. Die Zellernte wurde nach oben angeführter Vorschrift unter Zugabe von 20 ml eiskalten Periplasma-Aufschlusspuffer und 100 μl Lysozymlösung (10 mg/ml in Periplasma-Aufschlusspuffer) durchgeführt.

Die gentechnische Produktion der BBP-Varianten im *E. coli*-Stamm MC4100 Δskp wurde bei 30°C durchgeführt. Die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{550} = 0,8 - 1,0$.

2.4.3 Gentechnische Herstellung von BBP-Varianten im Laborfermenter

Größere Mengen eines rekombinanten Proteins wurden in einem von Schiweck & Skerra (1995) etablierten diskontinuierlichen Fermentationsverfahren in *E. coli* produziert.

Die Bakterienzellen wurden dazu im 10 l-Maßstab in einem synthetischen Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen über den gesamten Verlauf der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde dabei *E. coli* K12 Stamm KS272 eingesetzt.

Für die Vorvorkultur wurden 2 ml LB-Selektivmedium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 10 - 12 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 360 ml Mineralsalzlösung, der 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO_4 , 400 μl Antibiotika-Stammlösung und 400 μl Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur

angeimpft und für ca. 24 h bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug $OD_{550} = 1,3$. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben mit der Mineralsalzlösung entsprechend verdünnt.

Der 10 l Fermenter wurde mit 7 l Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetprüher befestigt. Vor dem Animpfen der Fermenterkultur wurde auf 30°C temperiert und über einen Trichter folgende sterile Lösungen zugegeben: 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M $MgSO_4$, je 8 ml entsprechende Antibiotika- und Thiamin-Hydrochlorid-Stammlösung, je 4 ml $FeCl_3$ - und $Zn(OAc)_2$ -Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung und 200 µl 30%-ige Antifoam A-Lösung. Die Belüftung fand zu Beginn mit Druckluft statt, woraufhin 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. später 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 angeimpft und für 2 h bei 30°C inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 25°C erniedrigt und erneut 600 µl Antifoam A-Lösung zugegeben. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde eine 50 % (w/v) Glucoselösung nach folgendem Protokoll zugegeben:

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

Weiterhin wurden der Kultur bei $OD_{550} = 13$ nochmals je 4 ml $FeCl_3$ - und $Zn(OAc)_2$ -Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 20$ durch Zugabe von 0,5 mg Anhydrotetracyclin/l Kultur (Stammlösung 5 mg/ml in DMF) induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, 20 min) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden mithilfe eines Spatels in ein kaltes 1000 ml-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer für 10 min auf einem Magnetprüher (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2 ml $l^{-1} OD^{-1}$. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (Stammlösung 500 mM EDTA pH 8,0) und 250 µg Lysozym/ml (Stammlösung 20 mg/ml in Aufschlusspuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis inkubiert, um einen vollständigen Periplasma-

aufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (SLA1500, 15000 rpm, 4°C, 20 min) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (SLA1500, 15000 rpm, 4°C, 40 min) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt und anschließend aufgeteilt gegen 20 l Chromatographiepuffer dialysiert. Die im Periplasmaextrakt noch enthaltenen Schwebstoffe wurden durch erneute Zentrifugation (SS34, 15000 rpm, 4°C, 30 min) und Sterilfiltrieren abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Affinitätschromatographie eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Chromatographische Verfahren

Zur Isolierung von Proteinen aus der periplasmatischen Zellfraktion von *E. coli* mithilfe von Affinitätspeptiden wurde, im Falle der Proteine die das *Strep*-tag trugen, die Streptavidin-Affinitätschromatographie (Skerra & Schmidt, 2000) und für die Proteine mit dem His₆-Anhängsel die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*; Porath *et al.*, 1975) verwendet. Zur Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der rekombinanten Proteine und deren Feinreinigung wurde zudem die Gelpermeations-Chromatographie verwendet.

2.5.1.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Rekombinante Proteine, die das Affinitätsanhängsel *Strep*-tag II (Schmidt *et al.*, 1996) trugen, wurden durch Affinitätschromatographie mit kovalent an Sepharose gekoppeltem Streptavidin gereinigt. Dabei wurde das rekombinante Protein über das *Strep*-tag reversibel an das Streptavidin der Säulenmatrix gebunden, während Proteine ohne Affinitätsanhängsel die Säule passierten und durch Waschen entfernt wurden. Das auf der Säule immobilisierte rekombinante Protein wurde in einem weiteren Schritt unter sehr milden Bedingungen kompetitiv mit D-Desthiobiotin eluiert. Die Chromatographie wurde durch Verfolgung der Proteinkonzentration mittels eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert.

Die verwendeten Streptavidin-Chromatographiesäulen wurden üblicherweise mit 5 mg Streptavidin-Mutante 1 (Voss und Skerra, 1997) pro ml Gelmaterial gekoppelt. Die Säule wurde mithilfe einer peristaltischen Pumpe mit einer konstanten Flussrate von 10 Säulenvolumina pro Stunde betrieben und zunächst mit SA-Puffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie äquilibriert. Anschließend wurde der gegen SA-Puffer dialysierte und sterilfiltrierte

(0,45 μm) periplasmatische Proteinextrakt auf die Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Pro ml Säulenvolumen wurden 10 ml Periplasmaextrakt aufgereinigt. Nach dem Waschen mit SA-Puffer bis die Absorption des Durchlaufs annähernd den Ausgangswert erreicht hatte, wurde das über das *Strep*-tag an die Säule gebundene rekombinante Protein mit einer 2,5 mM Lösung von D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mithilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die Elutionsfraktionen wurden auf ihren Gehalt an rekombinantes Protein und dessen Reinheit durch SDS-PAGE analysiert. Die geeigneten Fraktionen wurden vereinigt, zur Entfernung des D-Desthiobiotins gegen einen geeigneten Puffer dialysiert, sterilfiltriert (0,45 μm) und dann bei 4°C gelagert.

Zur Regenerierung der Säule wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer bis zur intensiven Orangefärbung des Säulenmaterials verdrängt. Das HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt.

2.5.1.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem von Cystein- oder Histidin-Seitenketten, zu Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1991b). Die Immobilisierung der Übergangsmetallionen erfolgt durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert sind. In dieser Arbeit wurde *Chelating Sepharose Fast Flow*, eine Chromatographie-Matrix mit Iminodiessigsäure-Gruppen (IDA) als Chelatbildner eingesetzt. Als Übergangsmetallion wurde Zn^{2+} verwendet. Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente das C-terminale His₆-tag.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde die Sepharose zunächst bei einer konstanten Flussrate von 10 Säulenvolumina pro Stunde mit Wasser gespült und anschließend mit 10-fachem Säulenvolumen einer 10 mM ZnSO_4 -Lösung beladen. Nicht gebundene Zn^{2+} -Ionen wurden durch erneutes Waschen mit 10 ml Wasser entfernt und die Säule wurde mit CP-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der dialysierte und sterilfiltrierte (0,45 μm) Periplasmaextrakt (jeweils 10 ml pro ml Säulenvolumen) aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit CP-Puffer gespült. Das gebundene Protein wurde durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 80 ml Volumen von 0 bis 300 mM Imidazol in CP-Puffer bei einer zur Hälfte reduzierten Flussrate eluiert. Das gereinigte Protein wurde durch

SDS-PAGE analysiert, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und bei 4°C gelagert.

Die Säule wurde anschließend durch Spülen mit 15 ml Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und 10 ml Wasser von den Metallionen befreit.

2.5.1.3 Gelpermeations-Chromatographie

Die Gelpermeations-Chromatographie ermöglicht eine Auftrennung verschiedener Moleküle nach ihrer Größe und Form. Sie wurde zur Auftrennung und Reinigung heterogener Proteinproben im Anschluss an die Affinitätschromatographie sowie zur Untersuchung von deren Oligomerisierungsstatus (Abschnitt 3.4.3) verwendet.

Hierzu wurde eine analytische Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule mit einem Säulenbettvolumen von 24 ml und einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa verwendet. Alle verwendeten Chromatographie-Puffer wurden zuvor sterilfiltriert (0,45 µm) und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast. Die Chromatographie wurde bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min mit einem Äkta™ Purifier- sowie Dynamax SD-300 HPLC-System betrieben. Die Probe wurde über eine Probenschleife von 500 µl Volumen auf die Säule appliziert. Der Verlauf der Chromatographie und die Retentionszeiten wurden anhand der Absorption des Eluats bei 280 nm beobachtet. Die Säule wurde zuvor mit Proteinen bekannter Molekularmasse kalibriert.

2.5.1.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Die Anionenaustausch-Chromatographie ermöglicht eine Auftrennung verschiedener Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI). Das Prinzip dieser Trennung beruht auf dem Austausch von Ionen, die elektrostatisch an eine chemisch inerte, unlösliche Säulenmatrix gebunden sind, mit den Ionen der das rekombinante Protein enthaltenden Lösung, die auf die Säule aufgetragen wird.

Zur Abtrennung der BBP-Variante His1ΔC* von dem nativen SKP in der Proteinpräparation wurde aufgrund eines sehr basischen pI-Wertes von SKP (9,52) eine Anionenaustauschsäule (Poros HQ, 1,7 ml CV) gewählt. Die Matrix dieser Säule besteht aus quervernetzten Polystyrol-Divinylbenzol-Partikeln die mit positiv geladenem quartäreren Polyethylenimin als funktioneller Oberflächengruppe gekoppelt sind. Die Chromatographie wurde mit dem Laufpuffer AX1-L (25 mM Tris/HCl) bei pH 9,0 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen bindete die BBP-Variante gut an die Oberflächengruppen der Säule, wohingegen positiv

geladenes SKP mangels Interaktion im Durchlauf erschien. Um das gewünschte Protein in reiner Form zu eluieren, wurde ein linearer Gradient mit 20 Säulenvolumina des Elutionspuffers AX1-E (25 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 9,0) angelegt.

Zur Reinigung der BBP-Variante EPII.44C4 wurde aufgrund ihres sehr sauren pI-Wertes von 4,60 die Anionenaustauschsäule Resource Q (1 ml CV) gewählt. Die Poly-Styrol-Divinylbenzol Matrix dieser Säule ist mit quartäreren Ammoniumionen als funktionellen Oberflächengruppen belegt. Die Chromatographie wurde mit dem Laufpuffer AX2-L (20 mM NaPi) bei pH 5,5 durchgeführt. Um das gewünschte Protein scharf getrennt von anderen gebundenen Proteinen zu eluieren, wurde ein linearer Konzentrationsgradient mit 40 Säulenvolumina des Elutionspuffers AX2-E (20 mM NaPi, 1 M NaCl, pH 5,5) verwendet.

Die aufzureinigenden Proteinproben wurden mittels einer 5 ml Schleife aufgetragen und anschließend die nicht gebundenen Proteine mit 5 Säulenvolumina des entsprechenden Laufpuffers ausgewaschen. Die Chromatographie wurde mit einer Flussrate von 4 ml pro min betrieben und der Verlauf anhand der Absorption bei 280 nm beobachtet. Über einen Fraktionssammler wurden Fraktionen gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit untersucht.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Molmasse wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt (Laemmli, 1970). Dabei kam das Hochsalz-Puffersystem von Fling & Gregerson (1986) zur Anwendung, mit dem eine erhöhte Auflösung erreicht wird. Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht.

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm. Zur Erzeugung eines Paares von 15 %igen SDS-Gelen wurden folgende Lösungen verwendet:

Trenngel:

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

Sammelgel:

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

Zur Herstellung der Gele wurden zwei sorgfältig gesäuberte Glasplatten (10 cm x 8 cm) mit Abstandhaltern mittels Metallklammern zusammengeheftet und die entstandene Gelkammer mit einer Silikondichtung abgedichtet. Danach wurden 4,5 ml polymerisierende Trenngel-Lösung zwischen die Glasplatten gefüllt und mit 1 ml Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach Beendigung der Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Wasser abgegossen, polymerisierende Sammelgel-Lösung eingefüllt und der Taschenformer eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Metallklammern und der Taschenformer sowie die Silikondichtung vorsichtig entfernt, das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt und mit Fling & Gregerson-Laufpuffer befüllt.

Proteinproben, deren Volumen weniger als 20 μ l betrug, wurden jeweils mit den entsprechenden Pufferlösungen auf 20 μ l aufgefüllt, mit 5 μ l 5x Auftragspuffer für SDS-PAGE versetzt, gemischt und zur Denaturierung für 5 min im Metallblockthermostat auf 95°C erhitzt. Nach anschließender Inkubation auf Eis wurden die Proteinlösungen kurz zentrifugiert und mithilfe einer 50 μ l-Glasspritze in die Probentaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer maximalen Spannung von 120 V und einer maximalen Stromstärke von 30 mA durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker gerade aus dem Gel herausgelaufen war (ca. 2 h). Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das Gel für 30 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend zur Entfärbung des Hintergrundes mittels Entfärbelösung sichtbar gemacht. Das Gel wurde in Aufbewahrungslösung bei 4°C gelagert und schließlich zur Konservierung im Gelrockner getrocknet.

2.5.3 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente wurden konzentrierte Proteinlösungen benötigt. Dazu wurde das gereinigte Protein zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (Amicon®) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (5, 10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4°C, 3.000 g) auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation abgetrennt (Eppendorf 5415 C, 4°C, 20 min, 14.000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen wurde auch der Proteingehalt des Durchlaufs der Konzentratoreinheit UV-spektrometrisch untersucht.

2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von gereinigten Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm – unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des für die vorherige Dialyse verwendeten Puffers – mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

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

Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden jeweils mithilfe des Computerprogramms „Peptidesort“ aus dem GCG-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) errechnet (siehe Tabelle 3). Sie werden dabei näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin der vollständig entfalteten Polypeptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989).

Protein	ε_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]
G9-Cystatin-His ₆	13757
G9-Cystatin- <i>Strep</i> II	17900
wt BBP-His ₆	49050
wt BBP- <i>Strep</i> II	54860
wt BBP-bla	82680
His1 Δ C*	57990
His1 Δ C*-bla	85810
His1 Δ C*-16	57870
EPII.44	56590
EPII.44C4	56470

Tabelle 3: Molare Extinktionskoeffizienten verschiedener in dieser Arbeit verwendeter rekombinanter Proteine nach Abspaltung der Signalsequenz bei 280 nm.

2.5.5 Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Um besonders niedrig konzentrierte Proteinlösungen auf einem SDS-PAGE Gel durch Färbung mit Coomassie Brilliantblau sichtbar zu machen, wurde mit den Proben vor dem Auftragen auf das Gel eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinlösung mit dem gleichen Volumen einer 20 % (w/v) TCA Lösung versetzt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das gefällte Protein präzipitiert (Eppendorf, 4°C, 15 min, 14.000 rpm) und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Präzipitat durch Zugabe von 300 μ l eiskalten Aceton gewaschen (Eppendorf, 4°C, 5 min,

14.000 rpm), der Überstand entfernt und das Protein in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde anschließend mit 5 µl 5x Auftragspuffer für SDS-PAGE versetzt, für 5 min im Metallblockthermostat auf 95°C erhitzt und gelelektrophoretisch analysiert (Abschnitt 2.5.2).

2.5.6 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Identifizierung von charakteristischen Verunreinigungen in bestimmten Proteinpräparationen, die durch Streptavidin-Affinitätschromatographie erhalten wurden, wurde eine N-terminale Edman-Sequenzierung vorgenommen. Dazu wurden 5 bis 15 µg des Proteins in einer SDS-PAGE unter Verwendung eines glycinfreien Laufpuffers (100 mM Tris, 100 mM Borsäure, 0,1 % SDS, pH 8,3) aufgetrennt. Alle anderen zur Elektrophorese verwendeten Puffer entsprachen den üblicherweise für die SDS-PAGE (Abschnitt 2.5.2) benutzten Lösungen. Nach dem Elektrotransfer (siehe Abschnitt 2.6.2) auf eine Immobilon-P-Membran unter Verwendung des genannten Borat-Elektrophoresepuffers unter Zusatz von 20 % (v/v) Methanol als Transferpuffer wurde die Membran für 5 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend bis zum Verblässen des Hintergrundes mit Entfärbelösung behandelt. Die Membran wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen, dann getrocknet und die angefärbte Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten. Die eigentliche Sequenzierung wurde von Dr. P. Köhler von der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Garching mithilfe eines Protein-Sequencer Typ Procise 492 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

2.5.7 Chemische Quervernetzung

Chemische Quervernetzung (*Crosslinking*) von Proteinen durch DSS (Disuccinimidylsuberat) nach Hill *et al.* (1979) ist eine Methode zur Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von Proteinen. DSS bildet mit den Aminogruppen von Lysinseitenketten stabile Amidverbindungen und verknüpft in Komplexen befindliche Proteinmoleküle auf diese Weise kovalent. Die chemische Quervernetzung wurde nach der Vorschrift von T. Tudyka (Tudyka, 1998) durchgeführt.

Dazu wurde die zu untersuchende Proteinlösung zunächst mittels Gelfiltration (PD-10) gegen TEA-Puffer (0,5 M NaCl, 0,2 M Triethanolamin/HCl pH 8,5) äquilibriert. 100 µl der so erhaltenen Proteinlösung mit einer Konzentration von 300 µg/ml wurden mit 5 µl einer frischen 1 mg/ml DSS-Lösung in wasserfreiem DMF vermischt und unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde auf einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert.

2.6 Immunchemische Methoden

2.6.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bindungsaktivität von BBP-Varianten bzw. deren Fusionsproteinen mit der β -Lactamase gegenüber ihrem Antigen wurde mithilfe von ELISA Experimenten nachgewiesen. Dazu wurde das Antigen an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und nach Inkubation mit BBP-Varianten bzw. deren Fusionsproteinen dessen Bindung durch chromogene Enzymreaktion detektiert. Die rekombinanten BBP-Varianten bzw. deren Fusionsproteine wurden vor der Verwendung im ELISA durch Affinitätschromatographie gereinigt und einmal gegen TBS dialysiert.

Enzymatisches Detektionsverfahren mithilfe der Alkalischen Phosphatase:

Die Bindung unterschiedlicher BBP-Varianten an das His₆-tag (präsentiert an verschiedenen rekombinanten Proteinen) wurde anhand des C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels der BBP-Varianten detektiert (Schmidt & Skerra, 1993; Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000). Alle Inkubationsschritte wurden bei 25°C durchgeführt. Zur chromogenen Nachweisreaktion diente die enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu p-Nitrophenolat. Diese Reaktion wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA Photometer Spectra-Max 250 quantifiziert.

Zur Durchführung des Assays wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 50 μ l einer Lösung von 10 bzw. 100 μ g/ml des His₆-tag Trägerproteins (G9-Cystatin-His₆, BBP-His₆ bzw. IN1-His₆) in TBS befüllt und für 2 h inkubiert. Danach wurde die Antigenlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Unbelegte Bindungsstellen wurden nach dreimaligem Waschen mit TBS/T 0,1 durch einstündige Inkubation der Vertiefungen mit 200 μ l 3 % (w/v) BSA in TBS/T 0,5 abgesättigt. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit TBS/T 0,1 gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 100 μ l einer 100 nM Lösung der gereinigten BBP-Variante in TBS/T 0,1 in Gegenwart von 100 μ M NiSO₄ bzw. 1 mM EDTA pipettiert. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 μ l TBS/T 0,1 in Gegenwart von 100 μ M NiSO₄ bzw. 1 mM EDTA vorgelegt. Ausgehend von der Proteinlösung der ersten Vertiefung wurden jeweils 50 μ l der Proteinlösung entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nach 1 h Inkubation wurde erneut dreimal mit TBS/T 0,1 gewaschen und 50 μ l einer 1:1000-Verdünnung von Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in TBS/T 0,1 in die Vertiefungen gegeben. Es wurde für 1 h inkubiert, die Lösung entfernt und jeweils zweimal mit TBS/T 0,1, TBS und PBS gewaschen. Der Nachweis gebundener BBP-Varianten erfolgte nach Zugabe von 100 μ l einer Lösung von 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer.

Die Platte wurde in das auf 25°C temperierte Photometer eingesetzt, und nach 5 minütiger Äquilibration wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min aufgezeichnet.

Zum Vergleich der Abhängigkeit der Bindung der BBP-Varianten zum His₆-tag von der Art des Übergangsmetallions wurde die Inkubation in Anwesenheit von Ni²⁺, Zn²⁺ bzw. Cu²⁺ durchgeführt.

Alternativ dazu wurde die Bindung der BBP-Varianten zu G9-Cystatin mit unterschiedlichen Affinitätsanhängseln untersucht. Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 50 µl einer Lösung von 10 µg/ml des G9-Cystatin-His₆ bzw. G9-Cystatin-*Strep* II in TBS befüllt und wie oben angeführt behandelt. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden Digoxigenin markierte BBP-Varianten (Abschnitt 2.3.6) verwendet und deren Bindung durch eine Inkubation mit 50 µl 1:2500-Verdünnung von Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in TBS/T 0,1 detektiert.

Enzymatisches Detektionsverfahren mithilfe der β-Lactamase:

Zum direkten Nachweis von Fusionsproteinen aus BBP-Varianten und der β-Lactamase diente die enzymkatalysierte chromogene Umsetzung von 3-(2,4-Dinitrostyryl)-(6R,7R)-7-(2-thienylacetamido)-ceph-3-em-4-carboxysäure, E-Isomer (Nitrocefim; O'Callaghan *et al.*, 1972; Abbildung 5).

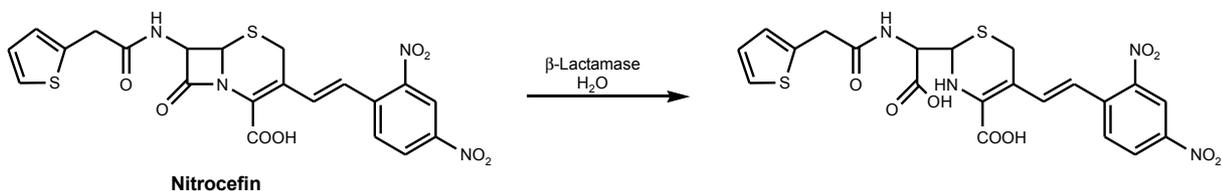


Abbildung 5: Reaktionsgleichung der β-Lactamase katalysierten Hydrolyse von Nitrocefim

Zunächst wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 50 µl einer Lösung von 10 µg/ml G9-Cystatin-His₆ in TBS befüllt und für 2 h inkubiert. Unbelegte Bindungsstellen wurden nach dreimaligem Waschen mit TBS/T 0,1 durch einstündige Inkubation der Vertiefungen mit 200 µl 3 % (w/v) BSA in TBS/T 0,5 abgesättigt. Gleichzeitig wurden zuvor nichtbelegte Vertiefungen mit derselben Lösung inkubiert und dienten innerhalb des Versuches als Negativkontrolle. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit TBS/T 0,1 gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden jeweils in die erste Vertiefung einer Reihe 100 µl einer 500 nM Lösung des gereinigten His1ΔC*/β-Lactamase-Fusionsproteins in TBS/T 0,1 in Gegenwart von 100 µM NiSO₄ pipettiert. Die Verdünnungsreihe des Fusionsproteins wurde wie oben beschrieben hergestellt. Nach 1 h Inkubation wurde die Lösung entfernt und

jeweils zweimal mit TBS/T 0,1, TBS und PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl einer Lösung von 50 µg/ml Nitrocefin in PBS, 0,5 % (v/v) DMSO in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde in das auf 25°C temperierte Photometer eingesetzt, und die Zunahme der Absorption bei 486 nm für 5 min aufgezeichnet.

Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten mittels ELISA:

Im thermodynamischen Gleichgewicht einer Reaktion gilt:



Dabei ist die Dissoziationskonstante K_D definiert als:

$$K_D = \frac{[P] \cdot [L]}{[P \cdot L]} \quad (3)$$

mit $[P]$ als Konzentration des unkomplexierten Proteins, $[L]$ als Konzentration des unkomplexierten Liganden und $[P \cdot L]$ als Konzentration des Protein•Ligand-Komplexes.

Ersetzt man – anhand der Bilanzgleichungen für die bimolekulare Komplexbildung – die Konzentrationen $[P] = [P]_t - [P \cdot L]$ und $[L] = [L]_t - [P \cdot L]$ mit $[P]_t$ als Gesamtkonzentration des eingesetzten Proteins und $[L]_t$ als Gesamtkonzentration des Liganden bei dem jeweiligen Titrationsschritt, ergibt sich:

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

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

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

Dabei entspricht $[P]_t$ der eingesetzten bekannten Konzentration der BBP-Variante bzw. des Fusionsproteins in der jeweiligen Vertiefung der Mikrotiterplatte. $[P \cdot L]$ wird indirekt anhand der katalytischen Aktivität des für die gemessene Umsetzung verwendeten Enzymkonjugats quantifiziert. Als anzupassende Parameter bei der Variation von $[P]_t$ verbleiben somit die Gesamtkonzentration des immobilisierten Liganden $[L]_t$ sowie die gesuchte Dissoziationskonstante K_D .

Auf diese Weise wurden durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderungen $\Delta A/\Delta t$ [$10^{-3}/\text{min}$] = mOD/min gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe und Anpassung der erhaltenen Kurve mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ gemäß Gleichung (5) die Parameter K_D sowie $[L]_t$ bestimmt (Voss & Skerra, 1997).

2.6.2 Western Blotting

Zur Demonstration der Bindungsaffinität verschiedener BBP-Varianten bzw. deren Fusionsproteine sowie zum immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch wurde die Methode des *Western Blot* verwendet. Das Proteingemisch wird zunächst mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein schließlich in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben durchgeführt und das Trenngel anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol-haltigem Fling & Gregerson Laufpuffer) geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, auf eine Nitrocellulose-Membran. Für den Elektrotransfer wurden 4 Blatt Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathode der Elektroblot-Apparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 4 Blatt getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anoden wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm²) betrieben. Die Nitrocellulose-Membran wurde entnommen und dreimal für jeweils 15 min in 10 ml TBS/T 0,1 geschwenkt. Danach wurde die Membran für 1 h mit 10 ml einer 1:1000 Verdünnung des jeweiligen Nachweisreagenzes in TBS/T 0,1 unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend jeweils zweimal für 5 min mit TBS/T 0,1, PBS/T 0,1 und PBS gewaschen. Im Fall der Proteine mit *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel diente als Nachweisreagenz ein Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, während im Fall des His₆ Affinitätsanhängsels ein Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet wurde. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von NBT und BCIP (Abschnitt 2.3.6) gestartet und nach Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch mehrfaches Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Membran wurde abschließend zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

Enzymatischer Bindungsnachweis mithilfe der Alkalischen Phosphatase:

Nach dem Elektotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die Membran durch eine Inkubation mit 3 % (w/v) Magermilchpulver in TBS/T 0,5 für 1 h abgesättigt, dreimal mit je 10 ml TBS/T 0,1 gewaschen und für 15 min in 10 ml 1 mM NiSO₄ in TBS/T 0,1 geschwenkt. Anschließend wurde mit 10 ml einer 100 nM Lösung Digoxigenin-markierter (Abschnitt 2.3.6) BBP-Variante EPII.44C4 in TBS/T 0,1 in Gegenwart von 1 mM NiSO₄ für 1 h inkubiert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 15 min in 10 ml TBS/T 0,1 geschwenkt. Zum Nachweis des gebundenen Proteins wurden die Digoxigenin-Gruppen mit 10 ml einer 1:1000 Verdünnung von Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in TBS/

T 0,1 inkubiert und anschließend jeweils zweimal für 5 min mit TBS/T 0,1, PBS/T 0,1 und PBS gewaschen. Die Anfärbung erfolgte wie unter Abschnitt 2.3.6 beschrieben.

Enzymatischer Bindungsnachweis mithilfe der β -Lactamase:

Nach dem Elektotransfer auf eine Immobilom-P Membran wurde die Membran durch Inkubation für 1 h mit 3 % (w/v) BSA in TBS/T 0,5 abgesättigt, dreimal mit 10 ml TBS/T 0,1 gewaschen und anschließend für 1 h mit 10 ml einer 300 nM Lösung von His1 Δ C*/ β -Lactamase-Fusionsproteins in TBS/T 0,1 in Gegenwart von 1 mM NiSO₄ inkubiert. Danach wurde die Membran jeweils dreimal für 5 min mit TBS/T 0,1 und mit TBS gewaschen. Die Anfärbung erfolgte durch Zugabe von 5 ml einer Lösung mit 0,5 mM NBT und 1 mM TIC (7 β -(2-Thienylacetamido)-3-(indolylthioly)-3-cephem-4-carboxylsäure; Abbildung 6; freundlicherweise von Dr. R. Medina synthetisiert) in TBS pH 8,0 8 % (v/v) DMF.

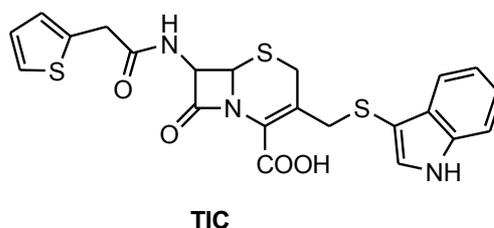


Abbildung 6: Die Strukturformel von TIC (7 β -(2-Thienylacetamido)-3-(indolylthioly)-3-cephem-4-carboxylsäure)

2.7 Biophysikalische Methoden

2.7.1 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Molmasse verschiedener Proteine wurde die TOF (*Time of Flight*) Massenspektrometrie mit zwei unterschiedlichen Ionisierungsmethoden angewendet. Dabei erfolgt die Trennung der Ionen nach der Beschleunigung in einem elektrischen Feld anhand der unterschiedlichen Laufzeiten entsprechend dem jeweiligen Molmasse/Ladungs-Verhältnis (m/z).

Das MALDI-TOF-Verfahren (*Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation – TOF*; Zenobi & Knochenmuss, 1998) dient der zerstörungsfreien Überführung von Proteinmolekülen in die Gasphase nach Kokristallisation mit einer lichtabsorbierenden sublimierbaren Matrix, in diesem Fall α -Cyano-4-hydroxymizsäure mit einem Absorptionsmaximum bei 337 nm. Durch gepulstes Einstrahlen von Licht eines N₂-Lasers mit einer Wellenlänge von 337 nm kommt es zu einer thermisch induzierten Sublimation der Matrixmoleküle, wobei auch die Proteinmoleküle freigesetzt und schließlich im Spektrometer aufgetrennt werden können. Die

massenspektrometrische Untersuchungen wurden von Dr. F. J. Winkler, Lehrstuhl für Biologische Chemie TU München, mithilfe eines Massenspektrometers des Typs Biflex III (Brucker Instruments, Leipzig) durchgeführt.

Beim ESI-TOF-Verfahren (*Electrospray-Ionisation – TOF*; Cole, 1997) wird eine verdünnte Probenlösung in ein elektrisches Feld schonend versprüht und ionisiert. Dabei entstehen sehr kleine geladene Lösungsmitteltröpfchen, aus denen nach Verdampfen des Lösungsmittels ionisierte Proteinmoleküle schließlich in das Massenspektrometer geleitet werden. Diese Untersuchungen wurden von Dr. H. Stalz, Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere TU München, an einem Q-ToF Ultima Gerät (Waters Corporation, Eschborn) durchgeführt.

Für die Messungen wurden 100 µl einer 0,1 mg/ml Proteinlösung in Mikrodialysiereinheiten (10 kDa MWCO) dreimal im Verhältnis 1:100 gegen Wasser dialysiert. Die Masse der Proteine wurde anhand der m/z-Skala als Signal für das einfach positiv geladene Molekül bestimmt.

2.7.2 Fluoreszenztitration

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D von Komplexen aus der BBP-Variante EPII. 44C4 und einem Hexahistidinpeptid wurden Fluoreszenztitrationen mit dem synthetischen Abz-His₆-Peptid durchgeführt. Dabei wurde die Abnahme der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins bei der Komplexbildung mit dem Peptid-Liganden (*Quenching*) gemessen. Als Resonanz-Energie-Akzeptor fungierte die 2-Aminobenzoylgruppe (Abz), die an den N-Terminus des Hexahistidinpeptids gekoppelt war. Die Messungen erfolgten mit einem Fluoreszenzphotometer des Typs LS 50 B (Perkin Elmer) bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm.

Durchführung:

Die Proteinlösungen wurden dreimal gegen TBS Puffer dialysiert und sterilfiltriert (0,45 µm), bevor die Konzentration eingestellt wurde. Zur Messung wurden 2 ml einer 1 µM Proteinlösung in TBS in Gegenwart oder Abwesenheit von NiSO₄ in einer Quarzküvette (1 cm²) mit Rührfisch vorgelegt und im Probenhalter des Photometers auf 25°C temperiert. Anschließend wurden insgesamt bis zu 40 µl einer 1 mM Lösung des Abz-His₆-Peptids in TBS in Schritten von 1 µl bis 4 µl zupipettiert. Die dabei stattfindende Verdünnung der Proteinlösung um insgesamt maximal 2 % blieb bei der nachfolgenden Auswertung der Daten unberücksichtigt. Nach jedem Titrationsschritt wurde zur Gleichgewichtseinstellung für 1 min unter Rühren im Dunkeln inkubiert und das Fluoreszenzsignal anschließend als Mittelwert über 10 s gemessen.

Nach der Subtraktion des Fluoreszenzwertes für den Puffer wurden die Signale auf einen Anfangswert von 100 % normiert.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten:

Im Verlauf der Fluoreszenztitration lässt sich die Komplexbildung aus Protein (P) und Ligand (L) durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (siehe Abschnitt 2.6.1). Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich gemäß Gleichung (4). Daraus ergibt sich durch Auflösen nach den entsprechenden Konzentrationsvariablen $[P \cdot L]$, $[P]$ und $[L]$:

$$[P \cdot L] = \frac{[P]_t + [L]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad (6)$$

$$[P] = \frac{[P]_t - [L]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad (7)$$

$$[L] = \frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad (8)$$

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

$$F = f_P [P] + f_L [L] + f_{PL} [P \cdot L] \quad (9)$$

Dabei stehen f_P , f_L und f_{PL} für die jeweiligen molaren Fluoreszenzkoeffizienten. Nach Einsetzen der Gleichungen 6–8 in Gleichung 9 ergibt sich:

$$[F] = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([L]_t - [P]_t - K_D) \frac{f_L}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P + f_L - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad (10)$$

Da der Ligand unter den gegebenen Messbedingungen keine Eigenfluoreszenz aufwies, wurde Gleichung 10 mit $f_L = 0$ vereinfacht zu:

$$[F] = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad (11)$$

Die korrigierten Fluoreszenzwerte eines Titrationsexperimentes wurden gegen die Gesamtkonzentration $[L]_t$ des zugegebenen Liganden aufgetragen. Die Anpassung der Kurve erfolgte gemäß Gleichung (11) durch nicht-lineare Regression mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ unter Anpassung von f_P , f_{PL} und K_D .

2.7.3 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Zur Quantifizierung der Bindungsaffinität der BBP-Variante His1 Δ C* gegenüber dem His₆-tag präsentiert am rekombinanten G9-Cystatin wurde die Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz in einem BIACORE X System in Verbindung mit dem CM-5 *Sensorchip* verwendet. Über die Carboxyl-Gruppen der Carboxydextran-Matrix wurde das gentechnisch hergestellte G9-Cystatin-His₆ mittels Amin-Kopplung kovalent an der *Sensorchip*-Oberfläche immobilisiert, und seine Interaktion mit der BBP-Variante His1 Δ C* – in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt – wurde daraufhin in Echtzeit gemessen. Das mit einem Rechner und der *BIAcoreX Control Software* (Version 2.1) gesteuerte System gestattet den kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch anwählbare Kanäle über die *Sensorchip*-Oberfläche, so dass entweder Laufpuffer aus einem Reservoir oder die zu untersuchenden Lösungen über die Probenschleife geleitet werden können.

Kovalente Immobilisierung von G9-Cystatin-His₆ auf der *Sensorchip*-Oberfläche:

Für die effiziente kovalente Beladung ist eine Anreicherung des Proteins durch ionische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Carboxydextran-Oberfläche des CM5-*Sensorchips* essentiell (*Preconcentration Effect*). Deshalb wurde das G9-Cystatin-His₆ mit einem pI von 7,0 für die Immobilisierung in einem 10 mM MES Puffer pH 6,0 appliziert, bei dessen pH-Wert das Protein positiv geladen vorliegt. Die Aktivierung der Carboxydextran-Oberfläche erfolgte durch Derivatisierung mit 35 μ l einer 1:1 Mischung von 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid), wodurch N-Hydroxysuccinimidester auf der *Sensorchip*-Oberfläche generiert werden. Daraufhin wurden 35 μ l einer 100 μ g/ml Lösung des zu immobilisierenden Proteins auf Kanal Nr. 1 appliziert, wobei die kovalente Immobilisierung durch Ausbildung von Amidbindungen zwischen den freien Aminogruppen seiner Lysin-Seitenketten und den Carboxygruppen der *Sensorchip*-Oberfläche erfolgte. Nach Absättigung verbliebener NHS-Estergruppen durch Injektion von 35 μ l 1 M Ethanolamin war die *Chip*-Oberfläche für Bindungsanalysen bereit. Kanal 2 diente zur Kontrolle und blieb unbehandelt.

Durchführung von Messungen der Bindungsaffinität:

Alle Messungen wurden bei 25°C und einem kontinuierlichen Pufferfluss von 5 μ l/min durchgeführt. Als Laufpuffer und zur Lösung der verwendeten Proteine wurde sterilfiltrierter und entgaster TBS/P-Puffer (TBS mit 0.005 % Detergenz P-20) benutzt. Für eine Interaktionsanalyse wurde eine Reihe an Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von His1 Δ C* in TBS/P mit 100 μ M NiSO₄ vermessen. Dazu wurden 80 μ l der Proteinlösung in die in Reihe geschalteten Kanäle injiziert und danach durch kontinuierlichen Pufferfluss für 10 Minuten nachgewaschen. Durch eine 5 s Puls-Injektion von 50 mM NaOH wurde die Oberfläche des

Sensorchips regeneriert und für die nächste Messung vorbereitet. Zur Bestimmung der Abhängigkeit des Bindungsverhaltens zwischen His₆-tag und His1ΔC* von der Ni²⁺-Konzentration wurden jeweils 80 μl 500 nM Lösung von His1ΔC* mit unterschiedlichen NiSO₄-Konzentrationen injiziert.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten:

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die Messkurven einer Gleichgewichtsanalyse unterzogen. Dabei wurde das gemessene Bindungssignal (in *Resonance Units*, RU) des Kanals 1 um das Hintergrund-Signal des unbelegten Kontrollkanals 2 mithilfe der *BIA-evaluation Software* (Version 3.0) korrigiert. Die maximalen Resonanzsignale für die Gleichgewichtsphase jeder Messkurve wurden bestimmt und anschließend gegen die eingesetzte Konzentration des Proteins bzw. der Ni²⁺ Ionen aufgetragen. Die erhaltenen Punkte wurden durch nicht-lineare Regression unter Verwendung von Gleichung (5) angepasst (Voss & Skerra, 1997) und die Dissoziationskonstante (K_D) ermittelt.

2.8 Enzymkinetische Methoden

Die Bestimmung der kinetischen Parameter für die β-Lactamase als Fusionsprotein mit einer BBP-Variante erfolgte nach dem Formalismus von Michaelis und Menten (1913). Dabei wurde die Umsatzrate für das Substrat Nitrocefin (O'Callaghan *et al.*, 1972) durch Messung der enzymatischen Anfangsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt.

Die Messungen wurden bei 25°C mithilfe eines SpectraMAX 250 Instruments in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen durchgeführt. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 105 μl bei einer konstanten Endkonzentration des Fusionsproteins von 10 nM mit 0,1 M NaPi, pH 7,0 als Reaktionspuffer. Die verwendeten Substrat-Endkonzentrationen betragen zwischen 20 und 300 μM ausgehend von einer frischen 1 mM Stammlösung (1 mM Nitrocefin in 100 mM NaPi pH 7,0, 0,5% (v/v) DMSO), die entsprechend verdünnt wurde. Die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Nitrocefin (Abbildung 5) erfolgte durch Messung der Absorptionsänderung bei 486 nm über 1 min, wobei die Absorption alle 10 Sekunden gemessen wurde.

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeit innerhalb einer Messreihe wurden gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration $[S]$ aufgetragen und die K_M - und v_{max} -Werte unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (12) mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ durch nicht-lineare Regression bestimmt.

$$v = v_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (12)$$

Hierbei bezeichnet v = die stationäre Anfangsgeschwindigkeit, v_{max} = die maximale stationäre Anfangsgeschwindigkeit (bei Substratsättigung) = $k_{cat}[E]_t$, K_M = die Michaelis-Menten Konstante, k_{cat} = die Wechselzahl und $[E]_t$ = die Gesamt-Enzymkonzentration.

2.9 Computerprogramme und Datenbanken

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 GCG-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt.

Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mithilfe des Programms Insight II (Version 95.0.3, Biosym Technologies) an einer Indigo 2-Workstation der Firma Silicon Graphics durchgeführt. Alternativ wurden unter OSX / Windows XP die Visualisierungsprogramme PyMOL™ Molecular Graphics System, Version 0.95 (Warren L. DeLano, „The PyMol Molecular Graphics System“, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA; <http://www.pymol.org>) und Swiss-PdbViewer Version 3.7 (Glaxo Smith Kline; <http://www.expasy.org/spdbv/>) eingesetzt.

Die grafische Auswertung von Messwerten erfolgte mithilfe des Programms „Kaleidagraph“ (Abelbeck). Gele aus der SDS-PAGE Analyse und *Western Blots* wurden mithilfe eines Scanners und des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen sowie ggf. deren Analyse 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/
Metalloprotein Database	http://metallo.scripps.edu/

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von His₆-tag bindenden BBP-Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein für praktische Zwecke einsetzbares Anticalin mit metallionenabhängiger Bindungsaffinität zu einem His₆-tag hergestellt bzw. optimiert werden. Der Ausgangspunkt hierfür bildete die BBP-Variante His1ΔC* (Weichel, 1997), die aus einer BBP-Zufallsbibliothek mit einer Komplexität von $3,7 \cdot 10^8$ Varianten (Beste *et al.*, 1999) mittels *Phage Display* und *Filter Sandwich Colony Screening Assay* bereits isoliert worden war. Als Ligand diente dabei G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von $100 \mu\text{M Ni}^{2+}$.

Die selektierte BBP-Variante wurde ursprünglich als His1 bezeichnet und unterschied sich in allen 16 randomisierten Aminosäurepositionen von dem Wildtyp-BBP (Abbildung 7). Außerdem trug sie einen weiteren zufälligen Aminosäureaustausch (Thr104→Pro) außerhalb der randomisierten Regionen. Um eine verbesserte Produktion und korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken dieser Variante im *E. coli supE*⁻ Stamm JM83 zu gewährleisten, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.2.5.2) in der Peptidschleifenregion 1 das *Amber*-Stoppcodon an Position 34 gegen ein Glutaminocodon sowie ein Cysteincodon an Position 36 gegen eines für Serin ausgetauscht. Die durch diese Mutationen erhaltene Mutante wurde His1ΔC* benannt.

20	30	40	50	
TrpSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProAsnSerValGluLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerAsn				
TGGTCC <u>CA</u> GTACCA <u>TG</u> CTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCCACTCAGTTGAGAAGTACGGAAAGTCCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGCCAAGAGTGTCAAAGTTTCGAAC				
.....NNKNMNNNNNNK.....NNS				
.....TAGGCGTGCTGG.....TCG				
.....AmbAlaCysTrp.....Ser				
.....CAGGCGTCCTGG.....TCG				
.....GlnAlaSerTrp.....Ser				
60	70	80	90	
TyrHisValIleHisGlyLysGluTyrPheIleGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerLeuThrTyrGlyGlyValThrLysGluAsnVal				
TACCACGTAATCCACGGCAAGGAATACTTTATTGAAGGAAGTGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAGAGACTACCACAGCCTGACTTACGGAGGTGTCCACCAAGGAGACGTA				
...NNM.....NNS... <u>GTACC</u>NNS...NNK.....NNS...VVS...NNK...				
...TTT.....TTC...T...C.....CAG...TTG...GGC...CGG...GGG...				
...Phe.....Phe.....Gln...Leu...Gly...Arg...Gly...Gly...				
...TTT.....TTC...T...C.....CAG...TTG...GGC...CGG...GGG...				
...Phe.....Phe.....Gln...Leu...Gly...Arg...Gly...				
100	110	120	130	
PheAsnValLeuSerThrAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrTyrCysLysTyrAspGluAspLysLysGlyHisGlnAspPheValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThr				
TTCACGCTACTCTCCACTGACAAACAAGAACTACATCATCGGATACTACTGCAATACGACGAGGACAGAAGGACACCAAGACTTCGTCTGGGTCTCTCCAGAAGCATGGTCCCTTAC				
.....NNM...NNS.....NNS...NNM.....				
.....C.....ATG...GTG.....AAG...GAT.....				
.....Pro.....Met...Val.....Lys...Asp.....				
.....C.....ATG...GTG.....AAG...GAT.....				
.....Pro.....Met...Val.....Lys...Asp.....				

Abbildung 7: DNA- und Aminosäuresequenz der BBP-Varianten His1 und His1ΔC* im Vergleich zum Wildtyp-BBP. Gezeigt ist der Bereich der Aminosäurepositionen 19 bis 138, der die gesamte durch die beiden *Bst*XI-Schnittstellen (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankierte Genkassette umfasst. Die degenerierten Codons für die gerichtete Zufallsmutagenese sowie die betroffenen Aminosäurepositionen sind rot eingezeichnet. Die Aminosäurepositionen der vier Schleifenregionen sind unterstrichen (gemäß Skerra, 2000). Aminosäuresubstitutionen, die die Variante His1ΔC* von der Variante His1 unterscheiden, sind blau eingezeichnet. In den Gensequenzen der BBP-Varianten sind nur diejenigen Basen und Aminosäuren angegeben, die sich von der Sequenz des Wildtyp-BBP unterscheiden. Die geänderte Sequenz im Bereich der Codon-Positionen 71/72 (unterstrichen) ist auf die Einführung einer *Kpn*I-Erkennungssequenz zu analytischen Zwecken im Verlauf der PCR-Mutagenese zurückzuführen (Beste, 1998). Die Nomenklatur der Zufallscodons folgt der NC-IUB (1985).

3.1.1 Bakterielle Produktion der BBP-Variante His1ΔC* in JM83

Die bakterielle Produktion der BBP-Variante His1ΔC* wurde mit dem Expressionsplasmid pBBP21 (Abbildung 8; Beste, 1998) durchgeführt. Dieses codiert für das Fusionsprotein des BBP-Strukturgens mit der bakteriellen *Outer Membrane Protein A (OmpA)*-Signalsequenz am N-Terminus und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus. Durch die bakterielle *OmpA*-Signalsequenz wird die Translokation des N-terminalen Segments des Fusionsproteins über die innere Membran der Bakterienzelle in das Periplasma vermittelt (Movva *et al.*, 1980), wo sich die intramolekularen Disulfidbrücken des Proteins unter den oxidierenden Bedingungen dieses Zellkompartiments ausbilden können. Dabei wird das Signalpeptid abgespalten, so dass das mature rekombinante Protein über das am C-Terminus fusionierte Affinitätsanhängsel aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert werden kann. Zusätzlich trägt der Vektor das Strukturgen für die *E. coli*-eigene Disulfidisomerase DsbC einschließlich deren ribosomaler Bindungsstelle (Zapun *et al.*, 1995), was zu einer Erhöhung des Anteils an korrekt gefaltetem rekombinanten Protein beitragen kann (Schmidt *et al.*, 1998). Die aufeinanderfolgenden Strukturgene von BBP und *dsbC* bilden dabei ein künstliches dicistronisches Operon unter der Transkriptionskontrolle des stringent regulierten Tetracyclin-Promotor/Operators (Skerra, 1994).

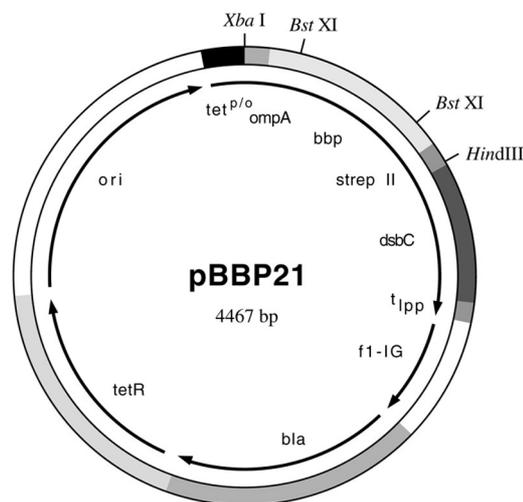


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pBBP21. Das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, dem BBP und dem *Strep*-tag II steht unter der Kontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet*^{p/o}). Alle anderen Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 4. *BstXI*, *HindIII* und *XbaI* bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. Der Leserahmen wird zur Steigerung der Ausbeute des korrekt gefalteten Proteins von der Gensequenz für die Protein-Disulfidisomerase *DsbC* einschließlich deren ribosomaler Bindungsstelle gefolgt und die Disulfidisomerase auf diese Weise überexprimiert.

Die bakterielle Produktion von His1 Δ C* wurde im *E. coli* Stamm JM83 wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Induktionsdauer betrug 3 Stunden. Danach wurde das Protein mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (Abschnitt 2.5.1.1; Schmidt *et al.*, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) gereinigt.

Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung durch SDS-PAGE zeigte, dass die BBP-Variante His1 Δ C* zusammen mit einem kontaminierenden kleineren Protein mit einer apparenten Größe von 16 kDa aus dem bakteriellen Periplasma isoliert wurde (Abbildung 9).

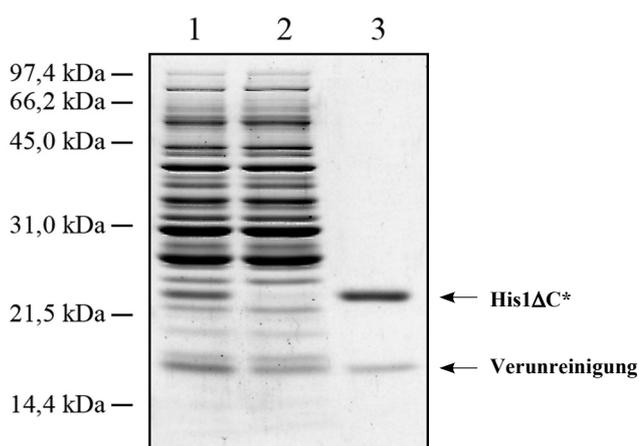


Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung der rekombinanten BBP-Variante His1 Δ C* aus dem Periplasma von *E. coli*. Auf ein 15 %iges SDS Polyacrylamidgel wurde unter reduzierenden Bedingungen die periplasmatische Proteinfraction (1), der Durchlauf (2) sowie das Eluat der Streptavidin-Affinitätschromatographie (3) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Zur Identifizierung dieses kleineren Proteins wurde die His1 Δ C*-Proteinpräparation nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie mittels N-terminaler Sequenzierung und massenspektrometrischer Analyse untersucht. Die daraus ermittelte Aminosäuresequenz der ersten 10 Aminosäurereste und anschließende Datenbankrecherche lieferten als Ergebnis das *Seventeen Kilodalton Protein* (Skp) aus *E. coli* K12. Die Molmasse wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu 15692,41 Da ermittelt, was in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretisch berechneten Molmasse von 15691,7 Da für das mature Protein steht. Das trimere periplasmatische Chaperon Skp (Holck & Kleppe, 1988; Korndörfer *et al.*, 2004; Schlapschy *et al.*, 2004) ist am Transport von äußeren Membranproteinen (*Omps*: *Outer Membrane Proteins*; Schäfer *et al.*, 1999; Bulieris *et al.*, 2003) durch das Periplasma beteiligt, indem es diese dort vermutlich durch Komplexierung vor Aggregation schützt. Es interagiert mit verschiedenen *Omps*, die alle eine β -Barrel Topologie mit variierender Anzahl an β -Strängen besitzen.

3.1.2 Versuche zur Abtrennung des mit His1 Δ C* assoziierten Skp

Um die BBP-Variante His1 Δ C* in reiner Form zu erhalten, wurde mittels chromatographischer Methoden versucht, das Skp abzutrennen. Da allerdings Skp mit der BBP-Variante zusammen aus dem Periplasma von *E. coli* isoliert wurde, konnte angenommen werden, dass beide Proteine teilweise miteinander assoziiert sind.

Gelfiltrationsexperimente unter Verwendung verschiedener Puffer lieferten nicht den gewünschten Trenneffekt (Abschnitt 2.5.1.3; Daten nicht gezeigt). Während unter standardisierten Pufferbedingungen für die Größenausschlusschromatographie (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7.5) kein Trenneffekt zu beobachten war, wurde durch Erhöhung der Ionenstärke (50 mM NaH₂PO₄, 1 M NaCl pH 7.5) lediglich eine partielle Trennung der beiden Proteine erreicht. Gelfiltrationsversuche unter leicht denaturierenden Bedingungen (50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7.5, 1 M Harnstoff) führten zu keiner Auftrennung der beiden Proteine, was auf eine relativ stabile Interaktion hindeutet.

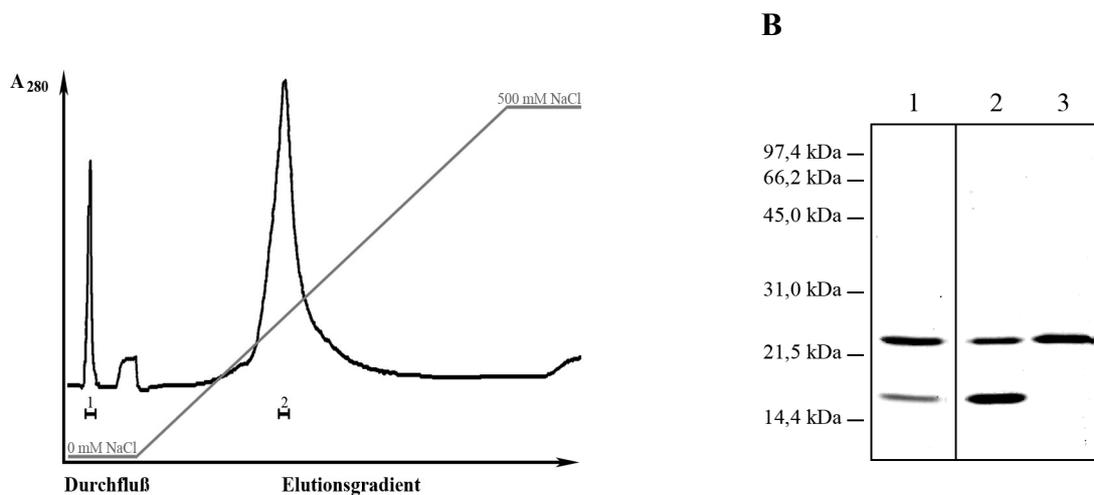


Abbildung 10: Anionenaustausch-Chromatographie der rekombinanten BBP-Variante His1 Δ C*. **(A)** Das aus der Streptavidin-Affinitätschromatographie erhaltene Eluat wurde gegen den Puffer AX1-L dialysiert und für die Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt. Die ansteigende Natriumchlorid-Konzentration im Elutionsgradienten von 0 bis 500 mM ist eingezeichnet. Die Fraktionen 1 und 2 wurden zwecks Aufkonzentrierung mit TCA gefällt (Abschnitt 2.5.4). **(B)** Auf ein 15 %iges SDS Polyacrylamidgel wurde unter reduzierenden Bedingungen eine Probe des Eluates der Streptavidin-Affinitätschromatographie (1), des nicht an die Anionenaustauscher-Matrix gebundenen Proteins (2) und der Eluatfraktion bei 200 mM NaCl (3) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Aufgrund der unterschiedlichen kalkulatorischen isoelektrischen Punkte von Skp ($pI = 9,52$) und His1 ΔC^* ($pI = 6,24$) wurde die Anionenaustausch-Chromatographie als weitere Trennmethode verwendet. Diese wurde wie im Abschnitt 2.5.1.4 beschrieben unter Verwendung einer Poros HQ-Säule und einem Puffer mit $pH = 9,0$ durchgeführt. Wie erwartet wurde das unter diesen Bedingungen positiv geladene Skp von den Oberflächengruppen der Säulenmatrix nicht zurückgehalten und fand sich mit einem Teil von His1 ΔC^* im Durchlauf wieder. Zur Elution des gebundenen Proteins wurde ein linearer Salzgradient von 0 bis 1 M NaCl angelegt. Dabei wurde die BBP-Variante bei einer NaCl-Konzentration von ca. 200 mM in homogener Form von der Säule eluiert (Abbildung 10).

3.1.3 Bakterielle Produktion von His1 ΔC^* in MC4100 Δskp

Um die Ausbeute der His1 ΔC^* -Produktion durch weitere Reinigungsschritte nicht unnötig zu schmälern, wurde eine alternative Möglichkeit der Herstellung durch Anwendung des *E. coli* Skp-Deletionsstammes MC4100 Δskp untersucht (Schäfer *et al.*, 1999). Dabei mussten die Expressionsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Zeitpunkt der Induktion erst optimiert werden. Die höchste Ausbeute von 75 $\mu g/l$ Kulturmedium (bei einer OD_{550} der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von 1,9) wurde durch Zugabe von 200 $\mu g/l$ Anhydrotetracyclin bei $OD_{550} = 0,8$ und einer Kultivierungstemperatur von 30 °C erzielt (Tabelle 4). Nach dreistündiger Induktion wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben geerntet und die periplasmatische Proteinfraktion isoliert. Daraus wurde das sekretierte Protein mittels Strepavidin-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 11). Die kontaminierende Proteinbande bei 16 kDa trat hierbei erwartungsgemäß nicht mehr auf.

Expressions-Temperatur [°C]	Induktion bei OD_{550}	Ausbeute [$\mu g/l$ Kulturmedium]
22	0,5	25
22	0,8	50
30	0,5	50
30	0,8	75

Tabelle 4: Optimierung der Expression von His1 ΔC^* in *E. coli* Stamm MC4100 Δskp . Die transformierten Zellen wurden bei der angegebenen Temperatur kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Proteinproduktion mit aTc für 3 Stunden induziert. Danach wurde die periplasmatische Zellfraktion isoliert, das Protein mittels Strepavidin-Affinitätschromatographie gereinigt und die Ausbeute anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt.

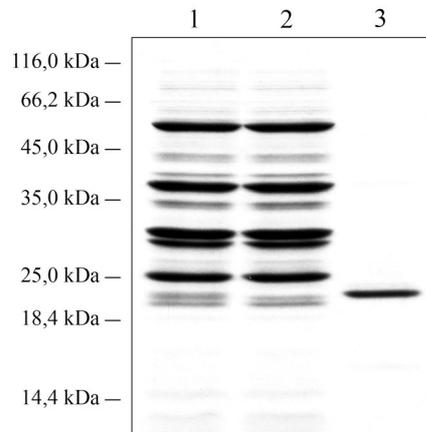


Abbildung 11: Produktion der BBP-Variante His1 Δ C* im *E. coli* Stamm MC4100 Δ skp. Auf ein 15 %iges SDS Polyacrylamidgel wurden unter reduzierenden Bedingungen die periplasmatische Proteinfraction (1), der Durchlauf (2) sowie das Eluat der Streptavidin-Affinitätschromatographie (3) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

3.1.4 Gentechnische Herstellung von G9-Cystatin-His₆

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der BBP-Variante His1 Δ C* zum His₆-tag wurde das G9-Cystatin, welches am C-Terminus ein Histidinhexamer trägt, gewählt (G9-Cystatin-His₆) und in *E. coli* JM83 produziert. Für die periplasmatische Produktion des Proteins wurde ein Derivat des universellen Expressionsvektors pASK40 (Skerra *et al.*, 1991b), nämlich das Plasmid pLOE5 (Abbildung 12A) verwendet. Dieses codiert unter der Transkriptionskontrolle des *lac*-Promotors für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, der mit Gly9 (G9) beginnenden verkürzten Variante des nativen Cystatins und einem Hexahistidinpeptid (Auerswald *et al.*, 1989; Essen, 1995).

Die funktionelle Produktion in *E. coli* JM83 (Abschnitt 2.4.1) und anschließende Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975; Abschnitt 2.5.1.2) waren für dieses Protein bereits etabliert (Essen, 1995). Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{550} = 0,5$) wurde mit 1 mM IPTG für 16 Stunden induziert, ohne dass erkennbare Zellyse eintrat. G9-Cystatin-His₆ wurde in reiner Form und mit typischen Ausbeuten von 3,5 mg/l Kulturmedium nach der IMAC erhalten (Abbildung 12B-C).

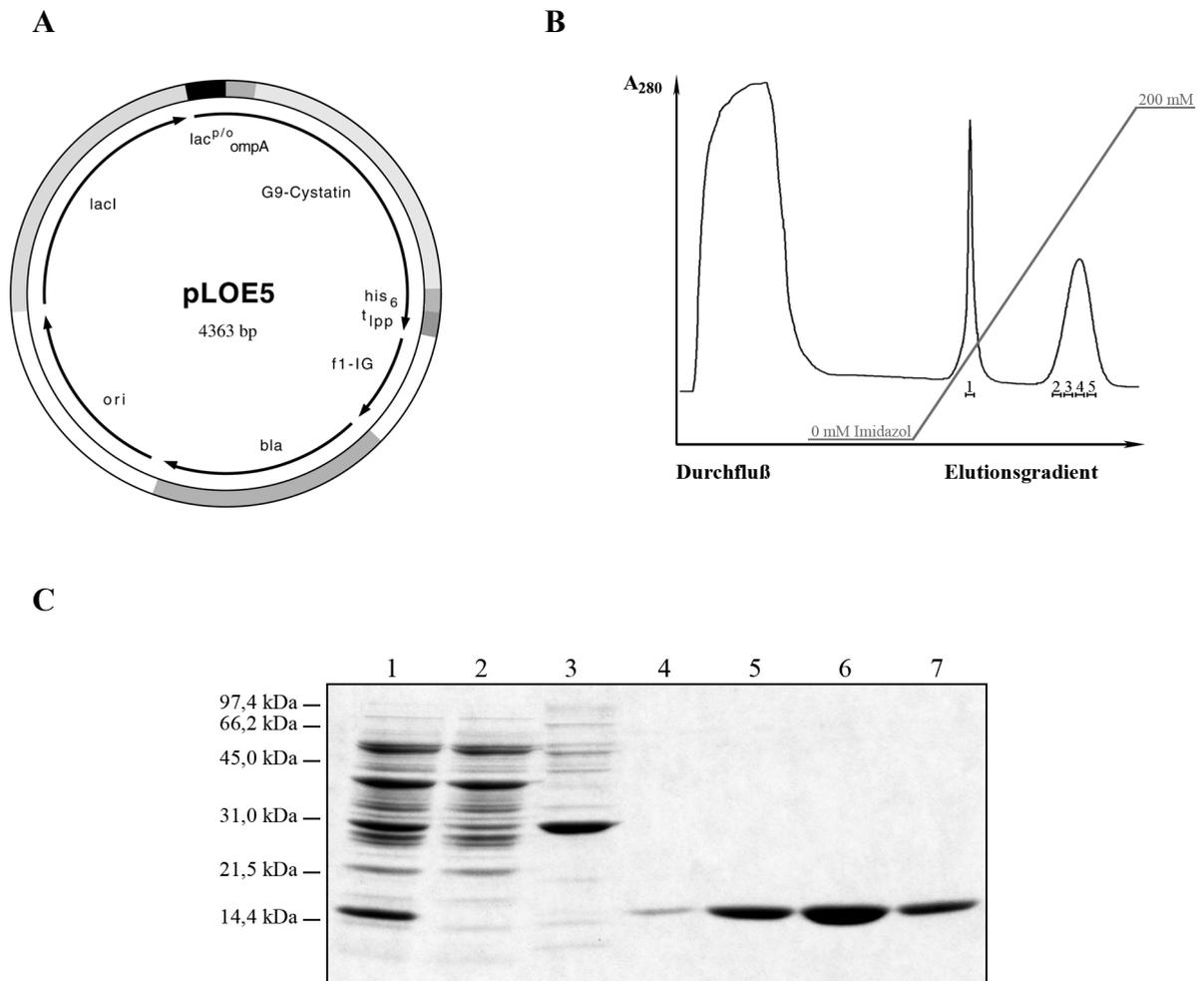


Abbildung 12: Produktion von G9-Cystatin-His₆ in *E. coli* JM83/pLOE5. **(A)** Schematische Darstellung des Expressionsplasmides pLOE5. Das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, G9-Cystatin und dem His₆-tag steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors/Operators (*lac*^{P/O}). Die Abkürzungen: *lacI*, *lac*-Repressorgen; Erklärung der restlichen genetischen Elemente vgl. Abbildung 4. **(B)** Elutionsprofil der Reinigung von G9-Cystatin-His₆ an Zn/IDA-Sepharose aus dem Periplasmaextrakt von *E. coli* JM83/pLOE5 mittels IMAC. Die ansteigende Imidazolkonzentration im Elutionsgradienten von 0 bis 200 mM ist eingezeichnet. Das Elutionsmaximum für G9-Cystatin-His₆ lag bei ca. 150 mM Imidazol. **(C)** Analyse der IMAC-Fractionen aus **(B)** durch SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl des periplasmatischen Proteinextraktes (1), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (2) sowie die Elutionsfraktionen von schwach an die Säule gebundenem Wirtsp Protein (3) und schließlich das mit Imidazol eluierte rekombinante Protein (4-7).

3.1.5 Gentechnische Herstellung von Wildtyp-BBP-His₆

Um zu beurteilen, ob BBP-Varianten mit dem His₆-tag oder mit dessen Träger interagieren, wurde in einigen Versuchen Wildtyp-BBP-His₆-tag eingesetzt.

Zur bakteriellen Produktion von Wildtyp-BBP-His₆ wurde das Expressionsplasmid pBBP25 (Abbildung 13A; Schlehuber, 2001), das unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-

Promotor/Operators für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, Wildtyp-BBP und dem His₆-Anhängsel codiert, verwendet.

Die periplasmatische Produktion von BBP-His₆ wurde in *E. coli* JM83 durchgeführt (Abschnitt 2.4.2). Bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₅₀ = 0,5) wurde mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin für 3 Stunden induziert. Anschließend wurde das Protein mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie im Einschrittverfahren gereinigt (Abschnitt 2.5.1.2). Dabei wurde das BBP-His₆ durch Anlegen eines linearen Imidazol-Gradienten bei ca. 150 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Analyse der eluierten Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte, dass hierbei reines Protein erhalten wurde. Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten auf dem SDS-Polyacrylamidgel keine Verunreinigungen durch Disulfidomere des BBP-His₆ nachgewiesen werden, obwohl die Proteinproduktion mit diesem Plasmid im Gegensatz zu pBBP21 ohne Überexpression der Proteindisulfidomerase *DsbC* erfolgte (Abbildung 13B). Die Ausbeute betrug 375 µg/l Kulturmedium.

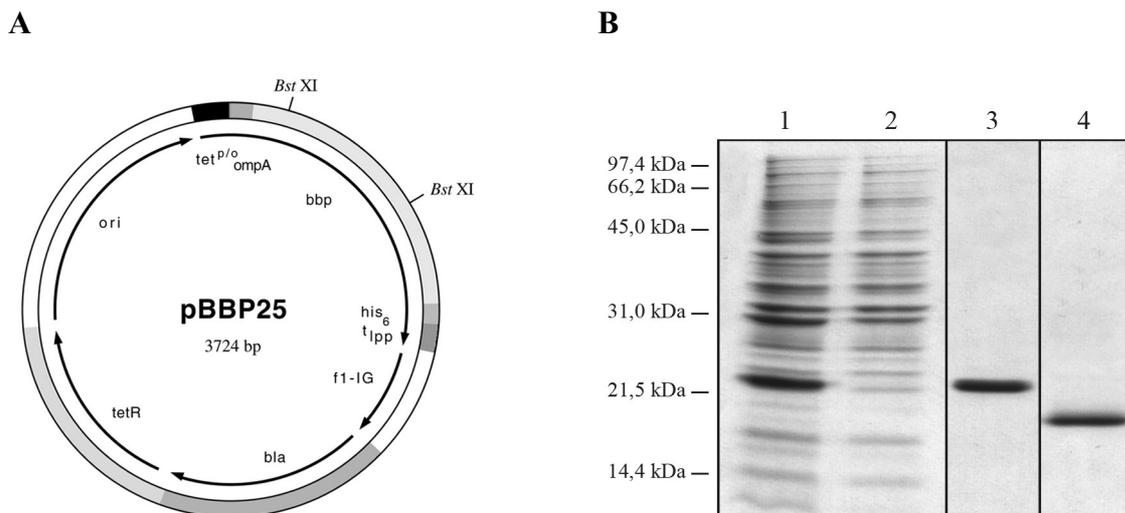


Abbildung 13: Produktion von Wildtyp BBP-His₆ in *E. coli* JM83/pBBP25. **(A)** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pBBP25. Das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, BBP und dem His₆-tag steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotors/Operators (*tet^{p/o}*). Die Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 4. **(B)** SDS-PAGE Analyse der Proteinreinigung mittels IMAC. Auf ein 15%iges SDS-Gel wurden jeweils 20 µl des periplasmatischen Proteinextraktes (1), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (2) sowie der vereinigten Elutionsfraktionen (3: unter reduzierenden Bedingungen, 4: unter nicht reduzierenden Bedingungen) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

3.1.6 Bestimmung der Affinität von His1ΔC* für G9-Cystatin-His₆ mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für den ternären Komplex aus G9-Cystatin-His₆, Ni²⁺ und His1ΔC* erfolgte unter Anwendung der Oberflächen-Plasmonresonanzspektroskopie, mit der Bindungsereignisse mit hoher Empfindlichkeit und *in situ* detektiert werden können (Huber *et al.*, 1999). Dabei wurde durch Carboxydiimidkopplung G9-Cystatin-His₆ über die primären Amingruppen der Lysinseitenketten an die Carboxymethyldextran-Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* (O'Shannessy *et al.*, 1992) kovalent immobilisiert.

Die Bindungsexperimente wurden durch Injektion einer Konzentrationsreihe von His1ΔC* in Gegenwart von 100 μM NiSO₄ (entsprechend der in den Selektionsexperimenten verwendeten Ni²⁺-Konzentration) durchgeführt. Die konzentrationsabhängige Komplexbildung zwischen den Bindungspartnern konnte in Form eines Anstiegs des Resonanzsignals bis zum Ende der Injektionsphase beobachtet werden (Abbildung 14). Auf dem Referenzkanal wurde dagegen kein nennenswertes Bindungssignal an die *Sensorchip*-Oberfläche gemessen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurden die Messkurven unter Verwendung der Gleichgewichtsanalyse ausgewertet (Neri *et al.*, 1996). Da bei diesen Experimenten keine Gleichgewichtsphase erreicht wurde, wurden in erster Näherung die maximalen Bindungssignale einer Messkurve bei verschiedenen Analyt-Konzentrationen bestimmt, um den Hintergrundwert des Referenzkanals korrigiert und gegen die jeweilige Konzentration des Analyten aufgetragen. Die Komplex-Dissoziationskonstante K_D wurde mittels nichtlinearer Regression bestimmt (Abschnitt 2.7.3; Abbildung 14B). Für die Bindung zwischen His1ΔC* und G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von 100 μM NiSO₄ ergab sich somit ein K_D Wert von 2,2 ± 0,5 μM.

Im Weiteren wurde die Abhängigkeit der Komplexbildung von der NiSO₄-Konzentration untersucht. Dazu wurden Bindungsexperimente mit einer 500 nM Proteinlösung von His1ΔC* mit variierender NiSO₄-Konzentration durchgeführt (Abbildung 14C) und erneut mittels Gleichgewichtsanalyse ausgewertet. Dabei wurde ein steiler Anstieg der Komplexbildung bis zu einer NiSO₄-Konzentration von 50 μM beobachtet, welcher sich bei einer Konzentration von 1 mM langsam einem Plateauwert annäherte (Abbildung 14D).

Die Ergebnisse der Oberflächen-Plasmonresonanzspektroskopie zeigten, dass die BBP-Variante His1ΔC* eine Ni²⁺-vermittelte Bindungsaffinität zu Histidinhexameren im niedrigen mikromolaren Bereich besitzt, welche allerdings von der Ni²⁺-Konzentration abhängig ist.

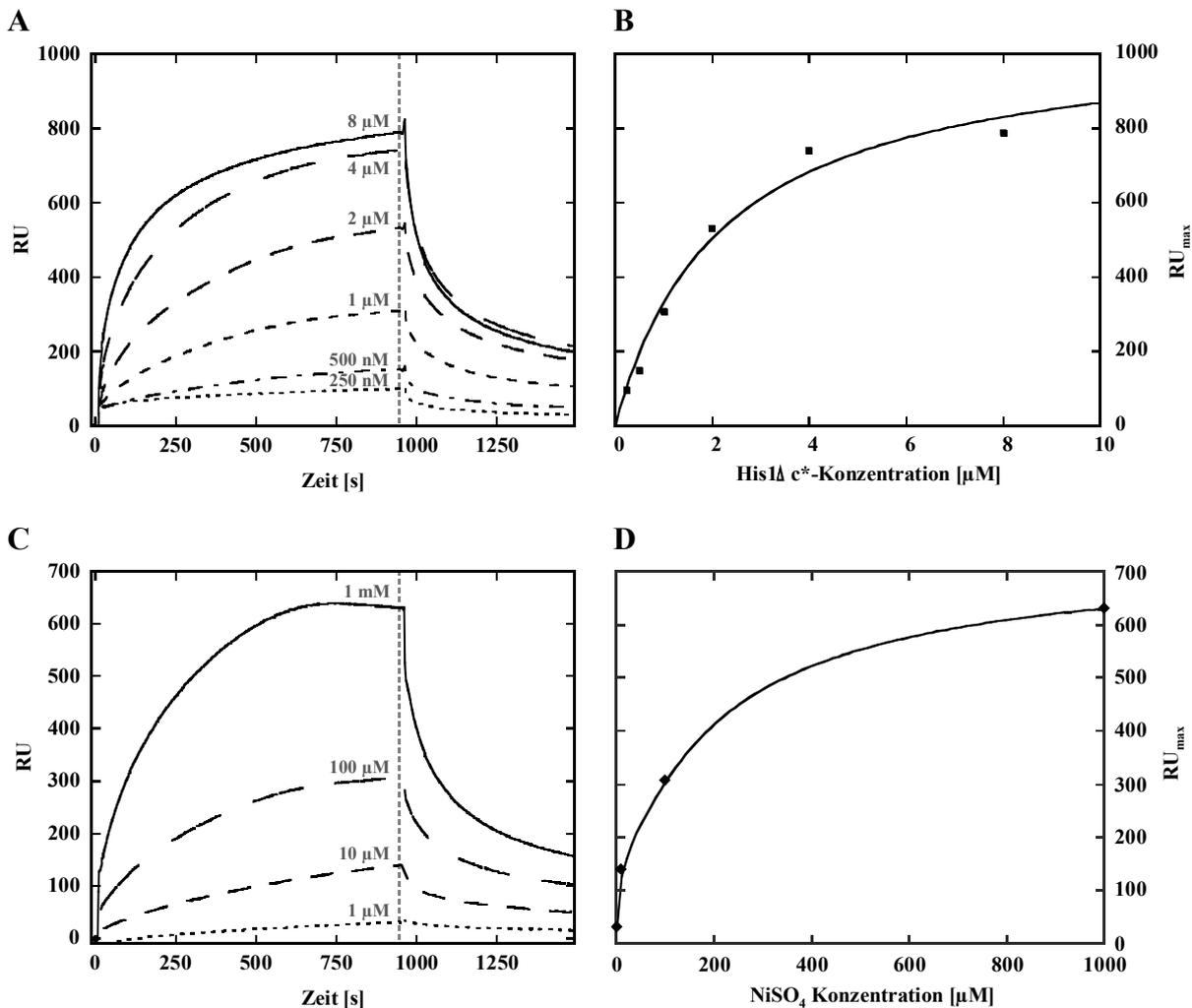


Abbildung 14: Quantitative Analyse der durch Ni^{2+} -Ionen vermittelten Affinität zwischen His1 Δ C* und Hexahistidinpeptid, präsentiert an G9-Cystatin, durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Auf der Carboxymethyldextran-Oberfläche des Flusskanals 1 wurde G9-Cystatin-His₆ (2600 RU) mittels Amin-Kopplung wie unter Abschnitt 2.7.3 beschrieben kovalent immobilisiert. Der Flusskanal 2 diente als Referenz. **(A)** Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe von His1 Δ C*. Jeweils 80 μl einer 0,25, 0,5, 1, 2, 4 bzw. 8 μM Lösung von His1 Δ C* in TBS/P mit 100 μM NiSO_4 wurden bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die beiden in Reihe geschalteten Flusskanäle des *Sensorchips* appliziert. Die Bindungssignale im Messkanal wurden um die Signale im Referenzkanal korrigiert und hier in einem Diagramm überlagert dargestellt. Die senkrechte gestrichelte Linie am Ende der Injektionsphase kennzeichnet die maximalen Resonanzsignale. **(B)** Ermittlung der Dissoziationskonstante K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) gegen die entsprechende Analytkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (5) ergab einen K_D -Wert von $2.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$. **(C)** Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe von NiSO_4 . Jeweils 80 μl einer 1, 10, 100 bzw. 1000 μM Lösung von NiSO_4 in TBS/P mit 500 nM His1 Δ C* wurden bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die beiden in Reihe geschalteten Flusskanäle des *Sensorchips* appliziert. Weitere Angaben wie unter A. **(D)** Veranschaulichung der Ni^{2+} -Abhängigkeit der Komplexbildung durch Auftragung des maximalen Resonanzsignals (RU_{max}) gegen die entsprechende NiSO_4 -Konzentration. Die Kurve wurde mittels nicht-linearer Regression nach Gleichung (5) angepasst.

3.2 *In vitro* Affinitätsmaturierung der BBP-Variante His1ΔC*

Die ermittelte Dissoziationskonstante für die durch Ni²⁺ vermittelte Bindung von His1ΔC* zum His₆-tag liegt im mikromolaren Bereich. Damit ist diese BBP-Variante den kommerziell erhältlichen Anti-His-tag Antikörpern (Tabelle 2) unterlegen. Daher wurden Versuche unternommen, um die Affinität von His1ΔC* durch *in vitro* Affinitätsmaturierung (Hawkins *et al.*, 1992; Hoogenboom, 1997) zu verbessern. Hierzu wurden beschränkte Zufallsbibliotheken hergestellt, bei denen nur jeweils eine der Schleifenregionen – im Kontext der anderen drei – randomisiert wurde.

Die Analyse aller aus der ursprünglichen Bibliothek gegen das His₆-tag selektierten BBP-Varianten (Weichel, 1997) zeigte in der Schleifenregion 1 Aminosäureaustausche durch überwiegend hydrophile Aminosäuren mit Ausnahme der Position 37, wo hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren (Trp) aufgetreten waren. An der Position 34 wurden Aminosäuren mit ungeladenen polaren Resten bevorzugt. In der Schleifenregion 2 wurden in allen drei randomisierten Positionen (58, 60, 69) Substitutionen durch hydrophobe Aminosäuren (Leu oder Phe) oder durch das ungeladene Ser gefunden. Die Aminosäuresubstitutionen in den Schleifenregionen 3 und 4 zeigten dagegen kein Muster. Daher wurden zur Affinitätsmaturierung der BBP-Variante His1ΔC* Aminosäurepositionen in diesen beiden Peptidschleifen ausgewählt und in zwei getrennten Bibliotheken randomisiert.

3.2.1 Randomisierung des dritten und vierten Schleifensegments von His1ΔC*

In den Schleifenregionen 3 und 4 wurden zur Mutagenese diejenigen Aminosäurepositionen ausgewählt, die in direktem Kontakt zum natürlichen Liganden des BBP – Biliverdin IX_γ – stehen und bereits für die Herstellung der ursprünglichen BBP-Bibliothek randomisiert worden waren (Beste, 1998). Insgesamt wurden 5 Aminosäuren an den Positionen 88, 90, 93, 95 und 97 im Schleifenbereich 3 bzw. 4 Aminosäuren an Positionen 114, 116, 125 und 127 im Schleifenbereich 4 mutagenisiert. Dabei wurden alle 20 möglichen Aminosäuresubstitutionen zugelassen. Lediglich im Falle von Arg95 in der Peptidschleife 3 wurde die Mutagenese auf Substitutionen durch polare Aminosäuren beschränkt, da diese Aminosäure im BBP dem Lösungsmittel ausgesetzt ist. Weiterhin wurde das Entstehen von Stoppcodons durch Wahl der Zufallscodons NNS, NNK bzw. VVS eingeschränkt. Allein das *Amber*-Stoppcodon (TAG) wurde hierbei toleriert, da der für die Herstellung der Phagemidbibliothek verwendete *supE*-Stamm *E. coli* XL1-Blue dieses Stoppcodon durch den Einbau der Aminosäure Gln supprimiert (Miller, 1992). Durch Beschränkung der dritten (Wobble-)Base jedes Codons auf T oder G (Einbuchstabencode: K) bzw. C oder G (Einbuchstabencode: S) wurden die

Stoppcodons *Ochre* (TAA) und *Opal* (TGA) im mutierten Gen vermieden, ohne dass die Zahl der 20 codierten Aminosäuren eingeschränkt wurde.

Bei einer konzertierten Mutagenese aller neun in den beiden Schleifenbereichen ausgewählten Aminosäure-Reste ergibt sich eine Komplexität der Bibliothek von $2 \cdot 10^{13}$ kombinatorischen Nukleinsäure-Varianten (ca. $3,1 \cdot 10^{11}$ unterschiedliche Proteine). Aufgrund der Limitierungen bei der Transformation im Verlauf der Herstellung einer solchen Phagemid-Bibliothek wurden zwei getrennte Teilbibliotheken vorbereitet, die jeweils nur einer randomisierten Peptidschleife entsprachen. Dadurch wurde die Komplexität auf $1,9 \cdot 10^7$ kombinatorische Nukleinsäure-Varianten (ca. $1,9 \cdot 10^6$ unterschiedliche Proteine) für die Teilbibliothek der Schleifenregion 3 und auf $1,0 \cdot 10^6$ kombinatorische Nukleinsäure-Varianten (ca. $1,6 \cdot 10^5$ unterschiedliche Proteine) für die Teilbibliothek der Schleifenregion 4 reduziert. Vor dem ersten Selektionszyklus wurden die beiden Teilbibliotheken vereinigt.

Zur Herstellung beider Teilbibliotheken wurde eine vereinfachte Methode der bereits etablierten zweistufigen PCR-Strategie (Schmidt, 1995; Beste, 1998), die für die Herstellung der ursprünglichen BBP-Zufallsbibliothek entwickelt wurde, angewendet. Diese basiert auf dem Einsatz von Oligodesoxynukleotiden mit degenerierten Basentriplets an den zu mutierenden Aminosäurepositionen, welche jeweils eine zu mutierende Peptidschleife überspannen (Abbildung 15). In der ersten Stufe der PCR werden mittels eines *Primer*-Paares, darunter ein Oligodesoxynukleotid mit degenerierten Basentriplets, DNA-Fragmente mit einer randomisierten Peptidschleife produziert. Diese werden als Mischung isoliert und in einer zweiten PCR als Matrize eingesetzt. Dabei wird durch den Einsatz zweier flankierenden *Primer* das Genfragment amplifiziert und gleichzeitig am 5'- bzw. 3'-Ende des resultierenden DNA-Fragmentes jeweils eine Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *Bst*XI eingeführt. Diese Schnittstellen dienen der gerichteten Insertion des Genpools in geeignete Vektoren für die Affinitätsanreicherung mittels *Phage Display* (Abschnitt 3.2.2) bzw. für den *Filter Sandwich Colony Screening Assay* (Abschnitt 3.2.3) oder zur Subklonierung der selektierten BBP-Varianten in Vektoren für die lösliche Proteinproduktion in *E. coli* (Abschnitt 3.1.1).

Für die Herstellung der Teilbibliothek der Schleifenregion 3 wurde die codierende DNA von His1 Δ C* auf dem Expressionsplasmid pBBP21 in der ersten Stufe in zwei parallelen PCR-Reaktionen mittels der *Primer*-Paare GB-1 und FS-18 bzw. GB-2 und GB-11 amplifiziert (Abschnitt 2.2.5.4). Der degenerierte *Primer* GB-11, der die zu mutierende Gensequenz überspannte, wies dabei eine Mischung der entsprechenden Basen an den zu randomisierenden Positionen auf (Abbildung 16). Die dabei erhaltenen DNA-Fragmente überlappten teilweise und wurden in der zweiten Stufe der PCR-Reaktion mit den flankierenden *Primern* GB-1 und

GB-2 assembliert. Diese Stufe der PCR diente auch dazu, die entstandenen Hybride mit den Fehlpaarungen an den randomisierten Codons zu „reparieren“.

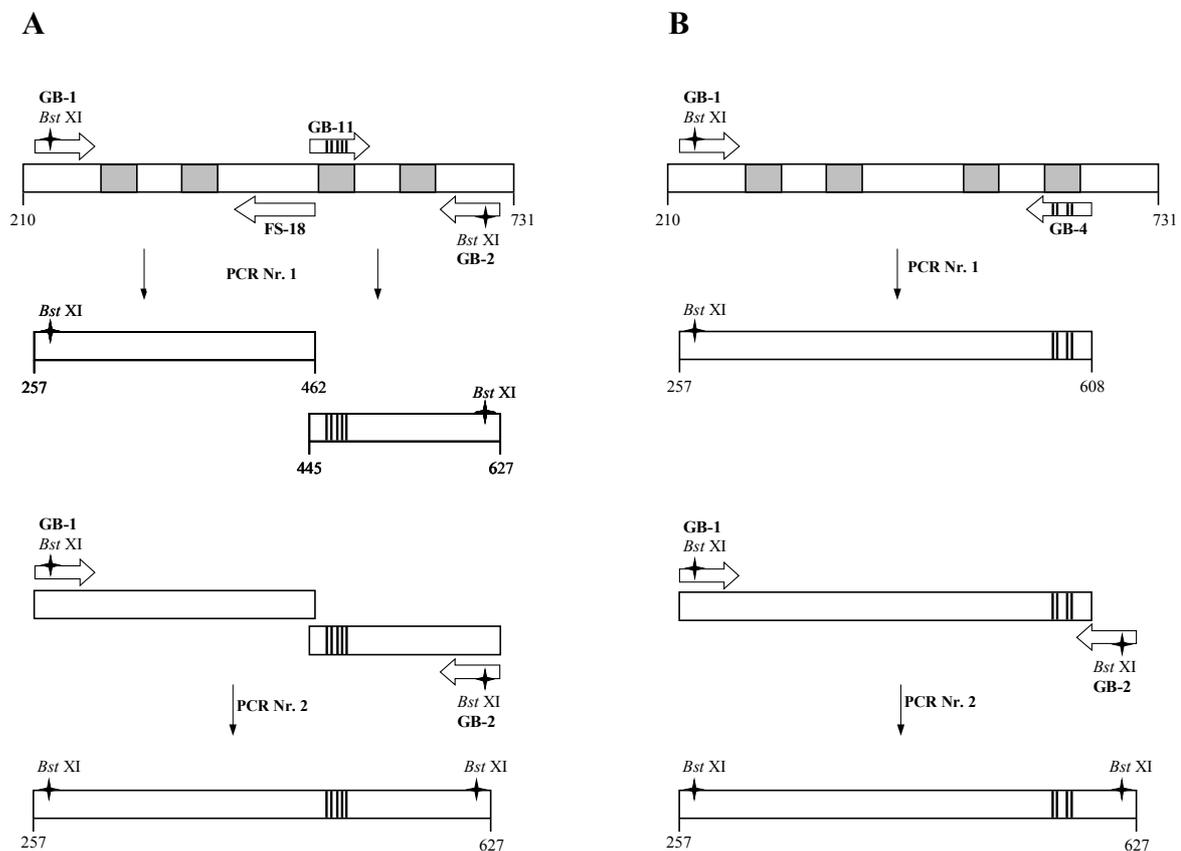


Abbildung 15: Zweistufige PCR-Strategie zur Randomisierung von Aminosäurepositionen in den Schleifenregionen (in grau) des His1ΔC*-Gens. **(A)** Konzertierte Mutagenese von fünf Aminosäurepositionen in der Schleifenregion 3. Im ersten Schritt (PCR Nr. 1) wurden mittels der *Primer*-Paare GB-1/FS-18 und GB-11/GB-2 (randomisierte Bereiche sind als schwarze Balken gezeichnet) unter Verwendung des auf dem Vektor pBBP21 codierten His1ΔC*-Gens als Matrize zwei Fragmente durch PCR separat amplifiziert. Im zweiten Schritt (PCR Nr. 2) wurden die beiden erhaltenen Fragmente gemeinsam als Matrize eingesetzt und das komplette Genfragment mittels des *Primer*-paars GB-1/GB-2 assembliert. Die dadurch gleichzeitig eingeführten, gegenseitig nicht kompatiblen (Typ IIa) *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen dienten zur Insertion der randomisierten His1ΔC*-Genkassette in den Vektor pBBP24 (Abbildung 16). **(B)** Konzertierte Mutagenese von vier Aminosäurepositionen in der Schleifenregion 4. Im ersten Schritt (PCR Nr. 1) wurde mittels des *Primer*-paars GB-1/GB-4 unter Verwendung des auf dem Vektor pBBP21 codierten His1ΔC*-Gens als Matrize ein Fragment durch PCR amplifiziert. Dieses wurde im zweiten Schritt (PCR Nr. 2) als Matrize eingesetzt und mittels des *Primer*-paars GB-1/GB-2 zum kompletten Genfragment assembliert.

Für die Herstellung der Teilbibliothek der Schleifenregion 4 wurde in der ersten Stufe der PCR-Reaktion die codierende Sequenz von His1ΔC* mit dem Oligodesoxynukleotid GB-1 sowie dem degenerierten *Primer* GB-4 amplifiziert. Das erhaltene randomisierte Genfragment wurde in der zweiten Stufe der PCR-Reaktion um den fehlenden Abschnitt mit den *Primern* GB-1 und GB-2 ergänzt.

Schleifenregion $6,6 \cdot 10^7$ unabhängige Transformanden erhalten. Die Größe der beiden Teilbibliotheken reichte aus, um die jeweils theoretisch mögliche Komplexität abzudecken. Ausgehend von diesen zwei Teilbibliotheken wurden anschließend zwei Phagemid-Präparationen (Abschnitt 2.3.2) hergestellt und zwecks Selektion mittels *Phage Display* zu einer Gesamt-Phagemidbibliothek vereinigt.

Zur Präsentation des Targets (His₆) bei der Affinitätsanreicherung von Hexahistidin bindenden BBP-Varianten mittels *Phage Display* (Abbildung 17) wurde das rekombinante G9-Cystatin-His₆ ausgewählt. Dieses hydrophile Protein wird durch seine geringe Größe (ca. 13 kDa) ausgezeichnet. Ein weiterer praktischer Vorteil des rekombinanten G9-Cystatin-His₆ Konstrukts ist dessen Verfügbarkeit, da es sich in großer Menge und hohem Reinheitsgrad in *E. coli* herstellen lässt (Abschnitt 3.1.4).

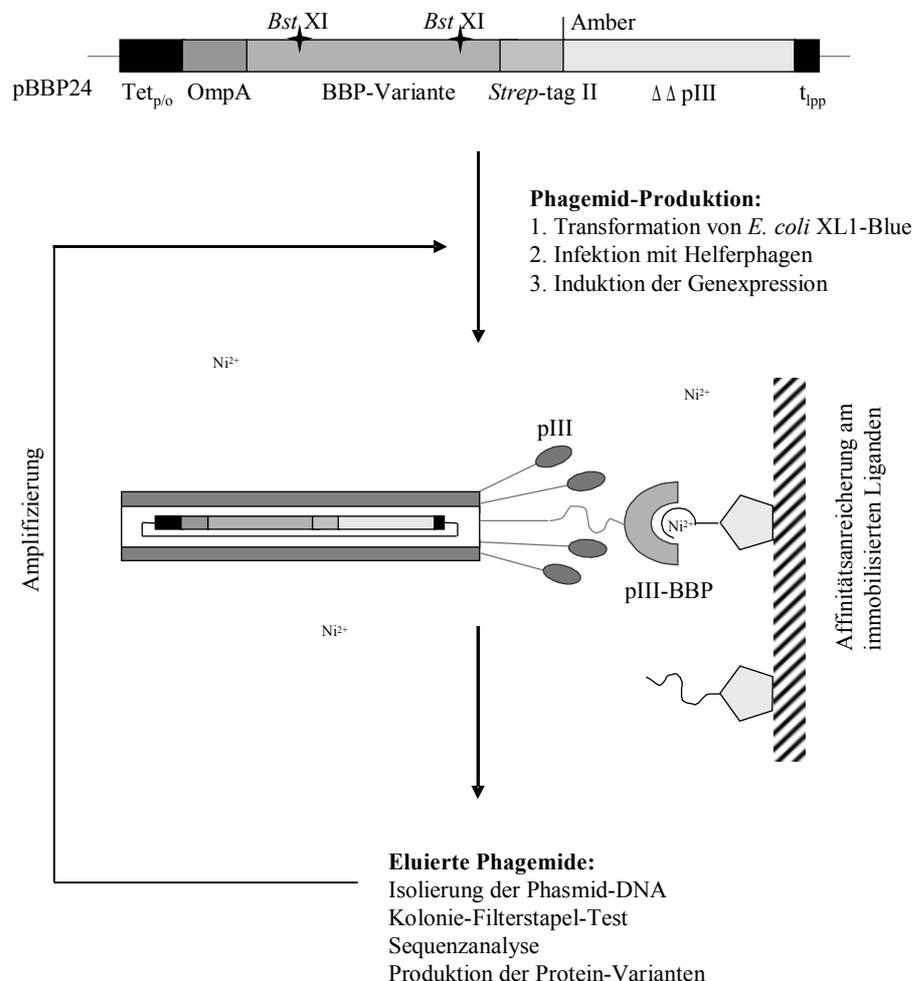


Abbildung 17: Schematische Darstellung des *Phage Display* auf Grundlage des Vektors pBBP24. Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue mit einer Bibliothek von BBP-Varianten und anschließender Infektion mit Helferphagen wird die Genexpression induziert. Die gebildeten Phagemide werden einer Affinitätsanreicherung am immobilisierten Liganden unterworfen. Selektierte Phagemide werden entweder amplifiziert und einem erneuten Anreicherungszyklus zugeführt oder deren Phasmid-DNA wird zum Zwecke der Charakterisierung selektierter Varianten isoliert.

Zur funktionellen Immobilisierung des Liganden an einer Kunststoffoberfläche wurden Nunc-Immuno[®]-Sticks mit einer hohen Protein-Bindungskapazität eingesetzt. Diese wurden durch Inkubation mit einer Lösung von rekombinantem G9-Cystatin-His₆ beschichtet. Der mit dem Liganden beladene Flügelstift wurde mit den Phagemiden ($2,0 \cdot 10^{12}$ cfu) der BBP-Gesamtphagemid-Bibliothek in Gegenwart von $100 \mu\text{M Ni}^{2+}$ inkubiert. Nichtbindende Phagemide und solche mit geringer Bindungsaffinität gegenüber Oligohistidinsequenzen wurden in acht Waschschrritten entfernt. Die gebundenen Phagemide wurden durch Absenken des pH-Wertes auf 2,2 eluiert und nach der Amplifizierung in *E. coli* in dem nächsten Anreicherungszyklus eingesetzt. Insgesamt wurden vier Anreicherungszyklen durchgeführt.

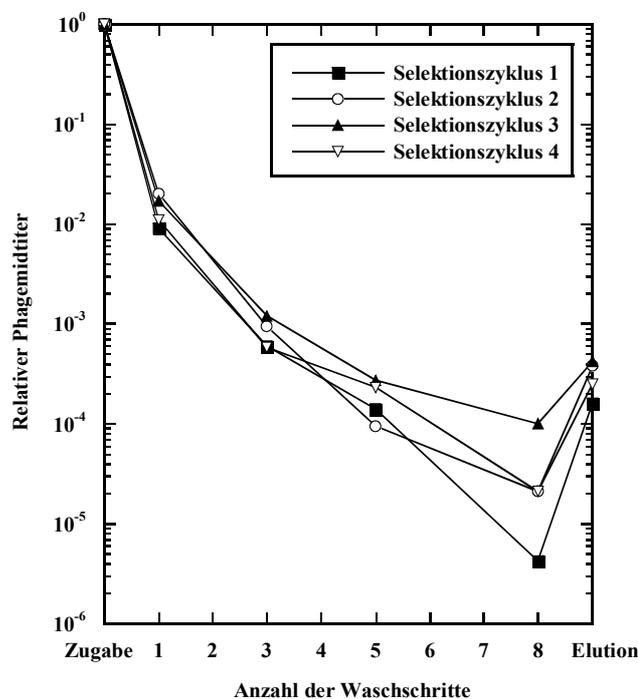


Abbildung 18: Überlagerung der Elutionsprofile aus den Selektionszyklen 1 bis 4 im Verlauf der Anreicherung von BBP-Varianten mit durch Metallionen vermittelter Bindungsaffinität zum His₆-tag präsentiert an G9-Cystatin. Nach Inkubation eines mit G9-Cystatin-His₆ beschichteten Flügelstiftes mit $1 \cdot 10^{11}$ bis $2 \cdot 10^{12}$ Phagemiden in Gegenwart von $100 \mu\text{M NiSO}_4$ für 1 h wurden nicht bindende Phagemide durch wiederholtes Waschen des Flügelstiftes entfernt. Die verbliebenen adsorbierten Phagemide wurden nach acht Waschschrritten durch pH-Absenken eluiert, anschließend amplifiziert und einem erneuten Selektionszyklus zugeführt. Der Phagemidtitler ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion wurde bestimmt und als Anteil der insgesamt im Selektionszyklus eingesetzten Phagemide (relativer Phagemidtitler) halblogarithmisch aufgetragen.

Der relative Phagemidtitler ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion wurde bestimmt und in einem Elutionsprofil graphisch dargestellt (Abbildung 18). Die Elutionsprofile aller vier Selektionszyklen unterschieden sich nur wenig. Bei allen nahm der relative Phagemidtitler der Waschfraktionen vom ersten bis zum achten Waschschrritt ab. Ein

signifikanter Anstieg (um den Faktor 40) des Phagemidtiters der Elutionsfraktion im Vergleich mit der Waschfraktion 8 konnte schon im ersten Selektionszyklus beobachtet werden. In den darauffolgenden Zyklen fiel dieser weniger stark aus. Der relative Phagemidtiters der Elutionsfraktion erhöhte sich im zweiten Zyklus um den Faktor 2,4 und im dritten um den Faktor 1,1 – bezogen auf die Elutionsfraktion der vorangegangenen Selektionsrunde. Dies deutete auf eine Anreicherung hin. Im vierten Zyklus ging der relative Phagemidtiters jedoch leicht zurück. Im dritten und vierten durchgeführten Zyklus wurden 0,42 % bzw. 0,25 % der eingesetzten Phagemide bei der Elution wiedergewonnen.

Phagemide der Elutionsfraktionen des dritten und vierten Selektionszyklus wurden zur Untersuchung der individuellen Liganden-Bindungseigenschaften der jeweils codierten BBP-Varianten mittels *Filter Sandwich Colony Screening Assay* eingesetzt.

3.2.3 Identifizierung von BBP-Varianten mittels *Filter Sandwich Colony Screening Assay*

Zur effizienten parallelen Analyse mehrerer hundert BBP-Varianten auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften wurde im Anschluss an die Phagemidanreicherung das *Colony-Filter-Screening-Verfahren* (Abschnitt 1.4; Skerra *et al.*, 1991a) eingesetzt. Dazu wurde die Plasmid-DNA der Phagemide aus dem Elutionsschritt des dritten und vierten Selektionszyklus jeweils getrennt präpariert. Anschließend wurde der Genpool der angereicherten BBP-Varianten mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI verdaut und mit dem durch analogen Verdau erhaltenen Vektor-Fragment von pBBP22 (Schlehuber, 2001; Abbildung 19) ligiert.

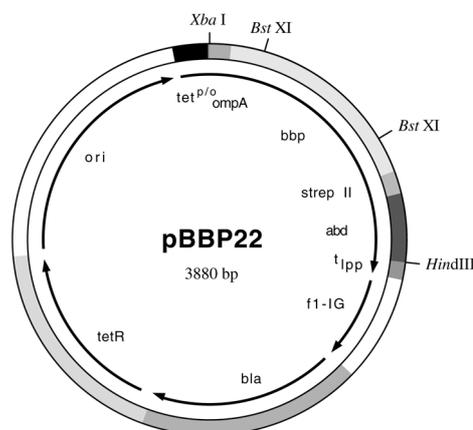


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Vektors pBBP22. Der Vektor codiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P^{(o)}}$) für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, dem Wildtyp-BBP, dem *Strep*-tag II, einem Pro-Ser-Ala-Peptid-*Linker* und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD). Die Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 4. *Xba*I, *Bst*XI, *Nhe*I und *Hind*III bezeichnen die Erkennungsstellen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

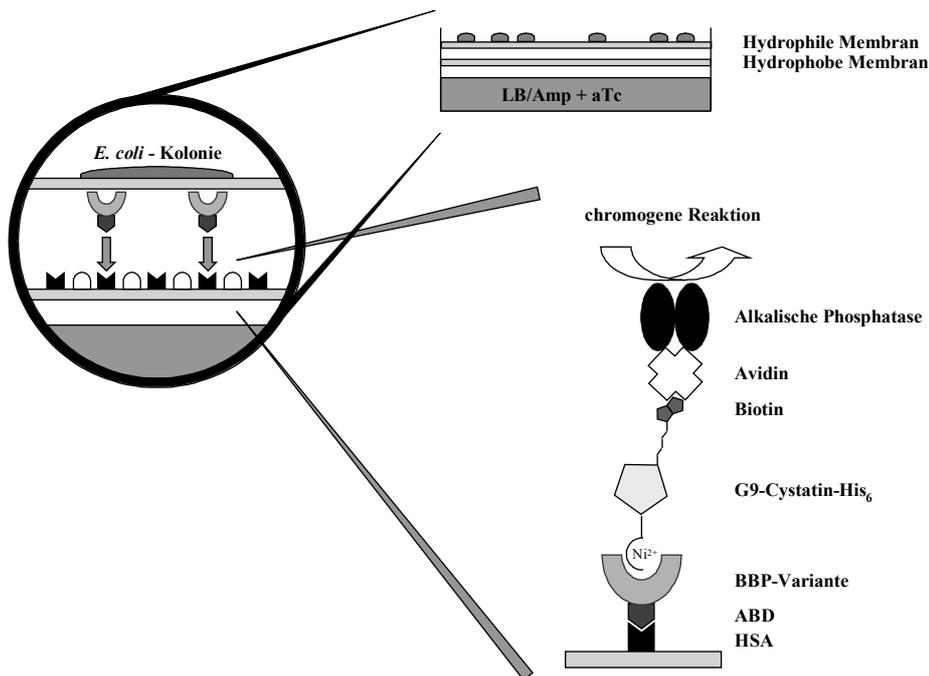


Abbildung 20: Schema des *Filter Sandwich Colony Screening Assay* zur Identifizierung von BBP-Varianten mit durch Metallionen vermittelter Affinität zum His₆-tag präsentiert an G9-Cystatin. Nach der Transformation von *E. coli* TG1-F⁻ mit dem Ligierungsansatz der BBP-Varianten auf dem Vektor pBBP22 wurde die Zellsuspension auf einer hydrophilen Membran auf LB/Amp-Agar bei 37 °C kultiviert, bis die Kolonien eine Größe von ca. 0,5 mm erreicht hatten. Die Membran wurde danach auf eine hydrophobe, zuvor mit HSA beschichtete zweite Membran positioniert, die zur Induktion der Genexpression auf einer LB/Amp-Agarplatte mit Anhydrotetracyclin lag. Während einer sechzehnständigen Induktionsperiode wurde das Fusionsprotein aus der BBP-Variante und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) zunächst mittels der bakteriellen *OmpA*-Signalsequenz in das Periplasma von *E. coli* sekretiert und dabei partiell von den Kolonien freigesetzt. Das Protein diffundierte durch die hydrophile Membran und wurde schließlich durch Komplexbildung zwischen ABD und HSA auf der hydrophoben Membran funktionell immobilisiert. Diese Membran wurde daraufhin entnommen und mit Puffer gespült. Die Liganden-Bindungseigenschaften der immobilisierten BBP-Varianten wurden durch aufeinanderfolgende Inkubation der hydrophoben Membran mit Biotin-markiertem G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von 100 µM NiSO₄ und Avidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, gefolgt durch eine chromogene Nachweisreaktion, detektiert. Die erhaltenen Farbsignale konnten einzelnen Kolonien auf der hydrophilen Membran zugeordnet werden.

Mit den Ligierungsansätzen wurden Zellen des Stammes *E. coli* TG1-F⁻ transformiert und diese direkt auf einer hydrophilen Membran ausplattiert. Dieser *Amber*-Suppressorstamm wurde ausgewählt, damit auch BBP-Varianten mit einem durch die Mutagenese-strategie zugelassenen *Amber*-Stoppcodon (TAG) als funktionelle Fusionsproteine mit der ABD produziert werden können. Das während der Induktionsphase sekretierte Fusionsprotein wurde von den Bakterienkolonien teilweise freigesetzt und auf einer darunterliegenden, zuvor mit HSA beschichteten Membran immobilisiert. Anschließend wurde diese zur Identifizierung von BBP-Varianten mit erwünschten Liganden-Bindungseigenschaften mit 10 µg/ml G9-Cystatin-His₆-Biotin-Konjugat in Gegenwart von 100 µM Ni²⁺ inkubiert. Zum Nachweis des gebundenen Konjugats wurde danach ein weiterer Inkubationsschritt mit Avidin-

Alkalische-Phosphatase-Konjugat durchgeführt. So gebundenes G9-Cystatin-His₆ wurde am Ende durch eine chromogene Reaktion nachgewiesen (Abbildung 20).

Die Phagemide aus dem Elutionsschritt des dritten und vierten Selektionszyklus wurden in zwei getrennten *Filter Sandwich Colony Screening Assays* durchmustert. Die durch die chromogene Reaktion erhaltenen Farbspots auf den hydrophoben Membranen unterschieden sich in der Intensität der Färbung und Morphologie (Abbildung 21A). Die Bakterienkolonien, welche den intensivsten Spots entsprachen, wurden ausgewählt und als His1ΔC*-1 bis His1ΔC*-30 bezeichnet. Insgesamt wurden 7 Kolonien aus dem dritten und 22 aus dem vierten Selektionszyklus identifiziert.

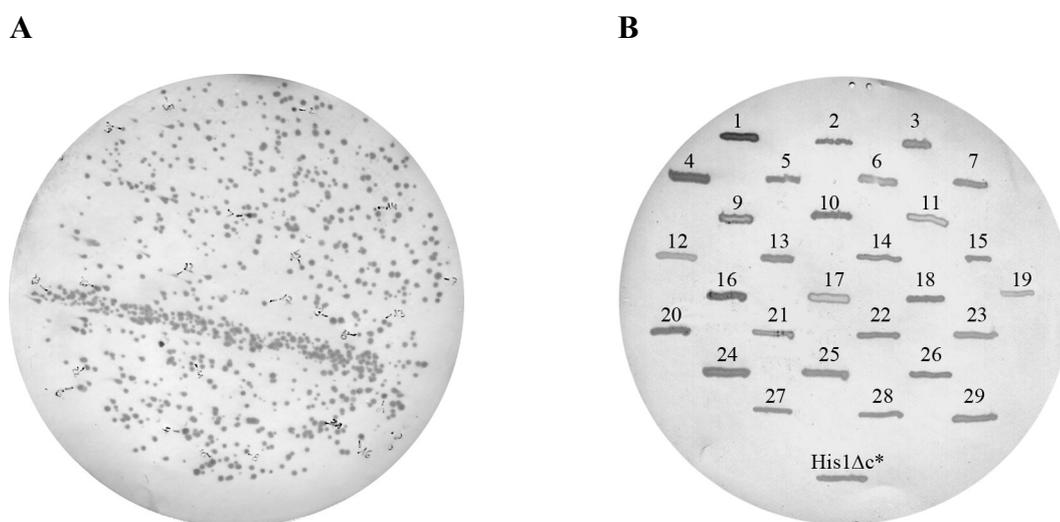


Abbildung 21: Ergebnis des *Filter Sandwich Colony Screening Assay* zur Selektion von BBP-Varianten mit durch Metallionen vermittelter Affinität zu Oligohistidinsequenzen. Phasmid-DNA der Phagemide aus der Elutionsfraktion des dritten bzw. vierten Anreicherungszyklus (Abbildung 18) wurde präpariert und auf dem Vektor pBBP22 subkloniert. Nach der funktionellen Immobilisierung der BBP-Varianten auf einer hydrophoben Membran wurden diese auf ihre individuellen Bindungseigenschaften untersucht. (A) Die Abbildung zeigt die Membran der Elutionsfraktion des vierten Anreicherungszyklus, die nach der Inkubation mit 10 µg/ml G9-Cystatin-His₆-Biotin-Konjugat in Gegenwart von 100 µM Ni²⁺ gefolgt von Avidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat in einer chromogenen Reaktion erhalten wurde. Die Zahlen deuten auf die zur weiteren Analyse selektierten Farbspots. (B) Die Abbildung zeigt die Membran des vergleichenden *Filter Sandwich Colony Screening Assays*, die unter analogen Bedingungen wie in (A), jedoch mit 2 µg/ml G9-Cystatin-His₆-Biotin-Konjugats, erhalten wurde. Die Zahlen oberhalb der Kolonien beziehen sich auf die Zahl nach dem Bindestrich (His1ΔC*-Zahl) in der Bezeichnung der dazugehörigen DNA-Sequenz (Abbildung 19). Kolonien 20, 24-29 kommen aus dem Anreicherungszyklus 3 und Kolonien 1-19, 21-23, 30 aus dem Zyklus 4.

Die Liganden-Bindungseigenschaften der ausgewählten Bakterienkolonien wurden in einem weiteren *Filter Sandwich Colony Screening Assay* miteinander verglichen (Abbildung 21B). Dazu wurden die Kolonien mittels steriler Zahnstocher von der Masterplatte gepickt und auf der Membran abgestreift. Um die Stringenz der Selektion zu erhöhen, wurde die Ligandenkonzentration (d.h. G9-Cystatin-His₆-Biotin-Konjugat) um den Faktor 5 auf 2 µg/ml

herabgesetzt. Zur Kontrolle wurden parallel dazu *Assays* mit Membranen durchgeführt, die in Abwesenheit entweder des Ni^{2+} und oder des G9-Cystatin-His₆-Biotin-Konjugats inkubiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Damit sollten die BBP-Varianten mit einer metallionen-vermittelten Affinität zum His₆-Anhängsel von den anderen unterschieden werden.

Auf der Membran des vergleichenden *Filter Sandwich Colony Screening Assays* (Abbildung 21B), die mit 2 $\mu\text{g/ml}$ und 100 μM NiSO_4 inkubiert wurde, konnten Signale mit unterschiedlicher Morphologie und Intensität beobachtet werden. Diese waren zum größten Teil intensiver als das Signal der ursprünglichen Variante His1 ΔC^* , die als Kontrolle auf der selben Membran analysiert wurde. Auf der Membran, die in Abwesenheit des Ni^{2+} inkubiert wurde, wurden nur sehr schwache Signale gesichtet (Daten nicht gezeigt). Auf der Membran, die nur mit Ni^{2+} inkubiert wurde, wurden keine Signale beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die stärksten Signale wurden bei den Varianten His1 ΔC^* -1, -4, -16 und -24 beobachtet (Abbildung 21B). Insgesamt wurden neun Bakterienkolonien, die die intensivsten Signale auf dieser Membran hervorgerufen haben, ausgewählt, ihre Phasmid-DNA isoliert und analysiert.

3.2.4 Sequenzanalyse der selektierten Varianten

Die DNA-Sequenzierung ergab, dass alle neun analysierten Phasmide für unterschiedliche His1 ΔC^* -Mutanten codieren und aus demjenigen Teil der Phagemid-Gesamtbibliothek stammen, bei dem die Schleifenregion 3 randomisiert war (Abbildung 22).

Bei acht von neun Varianten sind an allen fünf randomisierten Positionen Aminosäureaustausche aufgetreten. Der ungeladene Aminosäurerest Gln an der Position 88 (Leu in BBP) wurde dreimal gegen das negativ geladene Asp oder zweimal gegen das hydrophobe Trp substituiert. Die positiv geladene Aminosäure Arg95 (Lys in BBP) wurde durch eine negativ geladene Aminosäure (dreimal Asp und einmal Glu) ausgetauscht. Die Aminosäuren an Positionen Leu90 (Tyr in BBP) und Gly93 (Val in BBP) wurden bevorzugt durch hydrophobe Aminosäuren – hauptsächlich Trp (viermal auf der Position 90 und fünfmal auf der Position 93) ersetzt (Tabelle 5). So treten bei vier selektierten BBP-Varianten (His1 ΔC^* -4, -24, -25 und -30) je zwei Trp-Reste in der Peptidschleife 3 auf.

Bei allen Varianten wurden weitere Mutationen außerhalb des randomisierten Bereiches gefunden. Diese Basenaustausche können auf statistische Fehler der *Taq*-DNA-Polymerase bei der PCR-Mutagenese oder auf Fehler bei der Replikation der einzelsträngigen Phagemid-DNA zurückgeführt werden. Auffällig ist die Häufigkeit der dabei aufgetretenen Substitutionen von positiv geladenem Lys zu negativ geladenem Glu, die immer an unterschiedlichen Positionen (31, 38, 41, 55, 122) stattgefunden haben, jedoch gehäuft in den

Peptidschleifen 1 und 4. Ein weiterer zusätzlicher Aminosäureaustausch von einem ungeladenen Tyr109 zu einem positiv geladenen His wurde bei der BBP-Variante His1ΔC*-13 im β-Faltblatt G am Boden der Bindungstasche gefunden.

```

20          30          40          50
TrpSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaLysTyrProGlnAlaSerTrpLysTyrGlyLysCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValLysValSerSer His1ΔC*
TGGTCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCAAATACCCACAGGCCTCTGGAAGTACGGAAAGTCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGTCAAAGTTTCGTG 375
.....
.....G..... His1ΔC*-1
.....Cys.....
.....G..... His1ΔC*-4
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-10
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-13
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-16
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-20
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-24
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-25
.....Glu.....
.....G..... His1ΔC*-30

60          70          80          90
TyrPheValIleHisGlyLysGluTyrPhePheGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyLysIleTyrHisSerGlnThrLeuGlyGlyThrArgGluGlyVal His1ΔC*
TACTTTGTAATCCACGGCAAGGAATACTTTTCGAAGGTACCGCCTACCCAGTTGGTGACTCCAAGATTGGAAGATCTACCACAGCCAGACTTTGGGAGGTGGCACCCGGGAGGGGTA 495
.....
.....NNS...NNK...NNS...VVS...NNK...
.....G.C...TCT...T.G...G...TCT... His1ΔC*-1
.....Asp...Trp...Gly...Ser...
.....G...G...T.G...GAC...TAT... His1ΔC*-4
.....Pro...Gly...Trp...Trp...Asp...Tyr...
.....G.C...G...TTG...AAC...CAT... His1ΔC*-10
.....Asp...Trp...Leu...Asn...Pro...
.....T.G...A...TT...GA...T... His1ΔC*-13
.....Trp...Met...Phe...Glu...Trp...
.....G.C...GGT...AC...ACC...AT... His1ΔC*-16
.....Asp...Gly...Thr...Thr...Asp...
.....AT...GT...TTG...GAC...T... His1ΔC*-20
.....Met...Cys...Leu...Asp...Trp...
.....T.G...G.T...T.G...GCC...AAT... His1ΔC*-24
.....Trp...Val...Trp...Ala...Asn...
.....T...ATC...G...T.G...G.C...T... His1ΔC*-25
.....Phe...Ile...Trp...Trp...Gly...Val...
.....C...CC...G...T.G...GAC...TCT... His1ΔC*-30
.....Pro...Pro...Trp...Trp...Asp...Ser...

100          110          120          130
PheAsnValLeuSerProAspAsnLysAsnTyrIleIleGlyTyrMetCysValTyrAspGluAspLysLysGlyHisLysAspAspValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThr His1ΔC*
TTCACCGTACTCTCCCTGACAACAAGAAGTACATCATCGGATACATGTGCGTGTACGACGAGGACAGAAGGGACACAAGGACGATGTCTGGGTGCTCCAGAAGCATGGTCCTTACT 615
.....
.....NNM...NNS...NNS...NNM...
.....
.....
.....C... His1ΔC*-13
.....His...
.....G... His1ΔC*-20
.....Glu...
.....G... His1ΔC*-24
.....G... His1ΔC*-25
.....G... His1ΔC*-30

```

Abbildung 22: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der selektierten His1ΔC*-Varianten im Vergleich mit der Sequenz von His1ΔC*. Gezeigt ist der Bereich der Aminosäurepositionen 19 bis 138, der die gesamte durch die *Bst*XI-Schnittstellen (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankierte Genkassette umfasst. Die degenerierten Codons für die gerichtete Zufallsmutagenese sowie die betroffenen Aminosäurepositionen sind rot gekennzeichnet. Die Aminosäurepositionen der vier Schleifenregionen sind unterstrichen. In den Gensequenzen der BBP-Varianten sind nur diejenigen Basen und Aminosäuren angegeben, die sich von der Sequenz des His1ΔC* unterscheiden. Die Nomenklatur der Zufallscodons wurde gemäß NC-IUB (1985) verwendet. Neu aufgetretene Cys-Reste sind lila eingezeichnet.

Die BBP-Variante His1 Δ C*-16 trägt zwei negativ geladene Asp-Reste in der randomisierten Peptidschleife 3 (auf den Positionen 88 und 97) und eine zusätzliche Lys38→Glu Substitution im Schleifenbereich 1. Bemerkenswert ist die Primärstruktur der gesamten Peptidschleife 3 dieser Mutante: Ser87-Asp88-Thr89-Gly90-Gly91-Gly92-Thr93-Thr94-Thr95-Glu96-Asp97. Sie besteht aus drei negativ geladenen Resten, drei Gly- und vier Thr-Resten.

Zwei der BBP-Varianten trugen zusätzliche Cys-Reste: His1 Δ C*-20 an Position 90 und His1 Δ C*-1 an Position 36. Der letztere ist identisch mit dem Cystein-Rest in der BBP-Variante His1, also der Vorgängerin der Variante His1 Δ C*, die durch Substitution Cys36→Ser generiert wurde. Demzufolge ist bei der Variante His1 Δ C*-1 eine Rückmutation Ser36→Cys erfolgt. Cysteinreste sind im Hinblick auf die eventuelle Entstehung von Disulfidisomeren oder Dimeren unerwünscht. Sie können auch als Lewis-Basen Metallionen koordinieren und so eine unspezifische Bindung hervorrufen.

Varianten	Aminosäurereste im 3. Schleifenbereich					zus. ASS*
	88	90	93	95	97	
wt-BBP	Leu	Tyr	Val	Lys	Asn	
His1 Δ C*	Gln	Leu	Gly	Arg	Gly	
His1 Δ C*-1	Asp	---	Trp	Gly	Ser	Ser 36 Cys
His1 Δ C*-4	Gly	Trp	Trp	Asp	Tyr	Lys 41 Glu
His1 Δ C*-10	Asp	Trp	Leu	Asn	Pro	Lys 31 Glu
His1 Δ C*-13	Trp	Met	Phe	Glu	Trp	Tyr 109 His
His1 Δ C*-16	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Lys 38 Glu
His1 Δ C*-20	Met	Cys	Leu	Asp	Trp	Lys 122 Glu
His1 Δ C*-24	Trp	Val	Trp	Ala	Asn	Lys 55 Glu
His1 Δ C*-25	Ile	Trp	Trp	Gly	Val	Tyr 85 Phe
His1 Δ C*-30	Pro	Trp	Trp	Asp	Ser	Ser 79 Pro

Tabelle 5: Die Aminosauren der selektierten His1 Δ C*-Varianten sowie des Wildtyp-BBP und der BBP-Variante His1 Δ C* an den mutagenisierten Positionen.

*zusätzliche Aminosäuresubstitutionen an nicht randomisierten Positionen.

3.2.5 Produktion der His1 Δ C*-Varianten in *E. coli* und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA

Zur weiteren Charakterisierung wurden fünf Varianten (His1 Δ C*-1, -4, -16, -24 und -30), die die intensivsten Signale im *Filter Sandwich Colony Screening Assay* zeigten (Abbildung 21),

ausgewählt. Zur bakteriellen Produktion der selektierten Varianten wurden die Strukturgene zunächst auf dem Expressionsvektor pBBP21 (Abbildung 8) mittels der beiden *Bst*XI-Schnittstellen subkloniert. Anschließend wurden die Proteine im *E. coli* Stamm JM83 produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt.

Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung durch SDS-PAGE zeigte, dass alle selektierten BBP-Varianten zusammen mit einer 16 kDa grossen Proteinverunreinigung aus dem bakteriellen Periplasma isoliert wurden (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich des Laufverhaltens dieser Verunreinigung auf einem SDS-Gel mit der in *E. coli* JM83 hergestellten Variante His1ΔC* legte nahe, dass es sich dabei – wie im Falle von His1ΔC* – um das Skp handelte. Die eingeführten Aminosäuresubstitutionen in allen analysierten Varianten hatten also keinen Einfluss auf die entsprechende Bindungswechselwirkung.

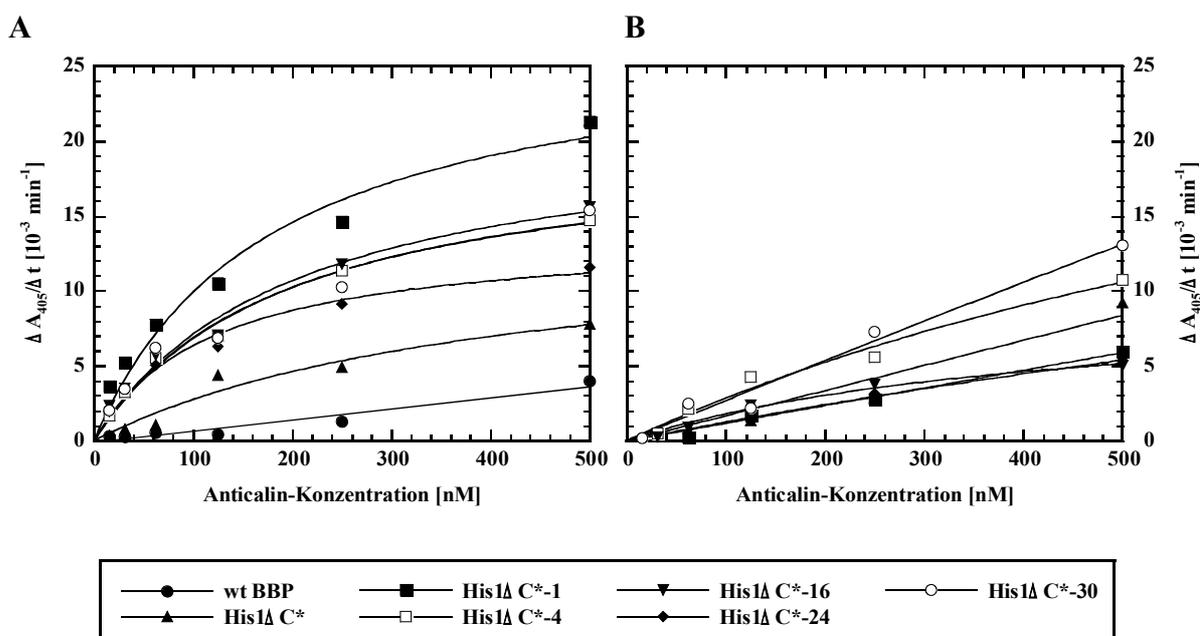


Abbildung 23: ELISA zur Untersuchung der Liganden-Bindungsaktivität der selektierten BBP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BBP und His1ΔC*. **(A)** Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des im *E. coli* Stamm JM83 produzierten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Anticalins in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mithilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Anticalins aufgetragen. Die Anpassung der Messwerte erfolgte mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (5). **(B)** Wie **(A)** jedoch in Abwesenheit von Ni²⁺.

Die BBP-Varianten wurden in einem ELISA auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften untersucht und mit denen von His1 Δ C* sowie mit Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen (Abbildung 23). Dabei wurden bei allen BBP-Varianten konzentrationsabhängige Bindungssignale in Gegenwart von Ni²⁺ beobachtet, wenn die Mikrotiterplatte mit dem rekombinanten G9-Cystatin-His₆ beladen war (Abbildung 23A). In Abwesenheit von Ni²⁺ waren deutlich geringere Aktivitäten messbar (Abbildung 23B). Wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit BSA beschichtet, wurde für keines der Anticaline ein Bindungssignal detektiert (Daten nicht gezeigt). Die höchsten Bindungssignale wurden für die Variante His1 Δ C*-1 gefolgt von His1 Δ C*-4, -16 und -30 erhalten. Für weitere Untersuchungen wurde die BBP-Variante His1 Δ C*-16 ausgewählt, da sie ein hohes Bindungssignal in Anwesenheit von Ni²⁺, jedoch ein geringes in Abwesenheit von Ni²⁺ zeigte, was auf eine durch Metallionen vermittelte Affinität zu Oligohistidinsequenzen hinweist. Die BBP-Variante His1 Δ C*-1 zeigte zwar ein starkes Ni²⁺-abhängiges Bindungsverhalten, was möglicherweise auf einen freien Cysteinrest auf der Position 36 zurückgeführt werden kann. Dieser war jedoch aufgrund der eventuellen Entstehung von Protein-Dimeren unerwünscht. Die BBP-Varianten His1 Δ C*-4 und -30 zeigten dagegen auch in Abwesenheit von Ni²⁺ vergleichsweise hohe Bindungssignale, was auf unspezifische Bindung hindeutet.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die BBP-Variante His1 Δ C*-16 in dem *E. coli* Skp-Deletionsstamm MC4100 Δ skp wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben produziert. Das sekretierte Protein wurde mittels Strepavidin-Affinitätschromatographie effizient und ohne weitere Verunreinigungen aus dem bakteriellen Periplasma isoliert (Abbildung 24). In der SDS-PAGE zeigte es eine zum BBP erhöhte elektrophoretische Mobilität (Abbildung 30). Die Ausbeute lag bei 90 μ g pro Liter Kulturvolumen.

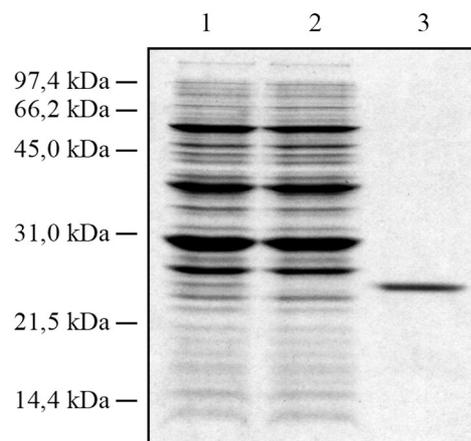


Abbildung 24: Produktion der rekombinanten BBP-Variante His1 Δ C*-16 in *E. coli*. Die periplasmatische Zellfraktion einer für 3 h mit 200 μ g/l aTc induzierten Kultur von *E. coli* MC4100 Δ skp/pBBP21His1 Δ C*-16 (1), der Durchlauf (2) sowie das Eluat der Strepavidin-Affinitätschromatographie (3) wurden auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

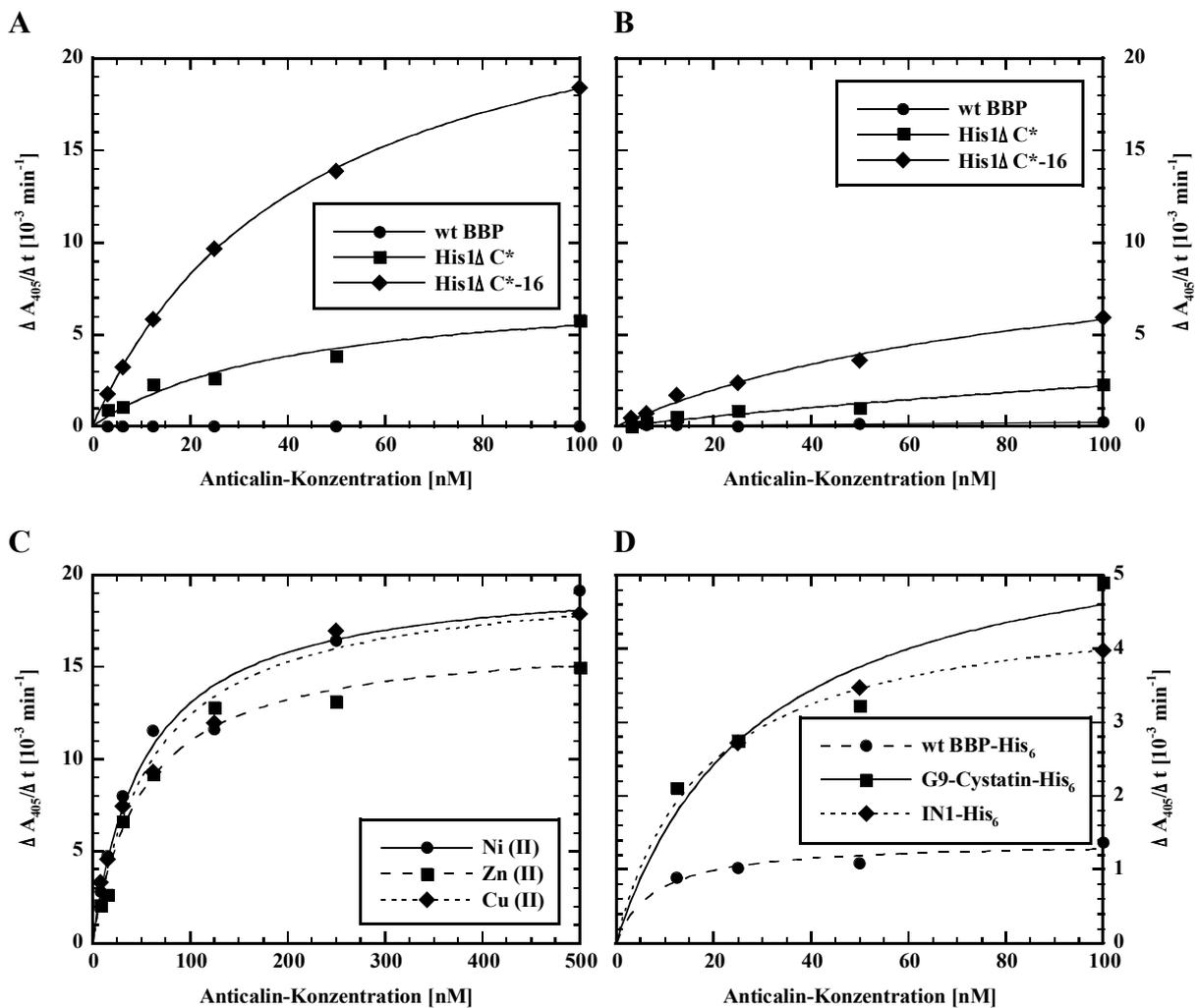


Abbildung 25: ELISA zur Untersuchung der Liganden-Bindungsaktivität der BBP-Varianten His1ΔC* und His1ΔC*-16 im Vergleich zum Wildtyp-BBP. **(A)** Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit 10 μg/ml G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des im *E. coli* Stamm JM83 (für wt-BBP) bzw. MC4100Δskp (für die beiden BBP-Varianten) produzierten und durch Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Anticalins in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mithilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. **(B)** Wie **(A)** jedoch in Abwesenheit von Ni²⁺. **(C)** Wie **(A)** jedoch in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺, Zn²⁺ oder Cu²⁺. Die Verdünnungsreihe wurde mit His1ΔC*-16 erstellt. **(D)** Wie **(A)** jedoch in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 μg/ml G9-Cystatin-His₆, Wildtyp-BBP-His₆ bzw. IN1-His₆ beschichtet. Die Verdünnungsreihe wurde mit His1ΔC*-16 erstellt.

Um zu analysieren, ob sich die BBP-Variante His1ΔC*-16 zum Nachweis von Proteinen mit einem His₆-tag eignet, wurde ihre Liganden-Bindungseigenschaft erneut in einem ELISA-Experiment untersucht und mit His1Δc* sowie mit Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen (Abbildung 25). His1ΔC*-16 zeigte deutlich höhere Bindungssignale als His1ΔC* in Gegenwart von Ni²⁺ (Abbildung 25A). Die in Abwesenheit von Ni²⁺ gemessenen Signale

waren niedriger als jene in Gegenwart von Ni^{2+} . Dies weist auf eine metallionenabhängige Bindung zwischen His ΔC^* -16 und His $_6$ -tag hin (Abbildung 25B). Im Falle des BBP-Wildtyps konnte keinerlei signifikante Bindungsaktivität beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Bindungsaktivität von His ΔC^* -16 in Abhängigkeit von der Art des Übergangsmetallions wurde die Inkubation in Anwesenheit von Ni^{2+} , Zn^{2+} bzw. Cu^{2+} durchgeführt (Abbildung 25C). Dabei wiesen die gemessenen Aktivitäten in Gegenwart von Ni^{2+} und Cu^{2+} keinen Unterschied auf, während für Zn^{2+} geringfügig niedrigere Bindungsaktivitäten sichtbar waren.

Um zu untersuchen, ob die Bindungsaktivität von His ΔC^* -16 zu Oligohistidinsequenzen unabhängig von dem His $_6$ -Trägerprotein ist, wurden ELISAs durchgeführt, bei denen die Mikrotiterplatte mit dem rekombinanten G9-Cystatin-His $_6$, dem rekombinanten F $_{\text{ab}}$ -Fragment des Antikörpers IN1 mit dem His $_6$ -tag an der schweren Kette (Bantlow *et al.*, 1996; präpariert von H. Zander) und rekombinatem Wildtyp-BBP-His $_6$ (Schlehuber, 2001; präpariert wie im Abschnitt 3.1.5 beschrieben) beladen wurde (Abbildung 25D). Wenn hierfür eine Proteinkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet wurde, konnten für IN1-His $_6$ und wt-BBP-His $_6$ im Vergleich zu G9-Cystatin-His $_6$ nur vernachlässigbare Aktivitäten gemessen werden, was möglicherweise mit dem Adsorptionsverhalten des jeweiligen Proteins an die Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatten zusammenhängt. Die Proteinkonzentration wurde daher auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erhöht. Dabei konnten für alle drei His $_6$ -Fusionsproteine Bindungsaktivitäten gemessen werden, jedoch mit unterschiedlichen Maxima der Bindungssignale.

Demzufolge zeigt die selektierte BBP-Variante His ΔC^* -16 eine metallionenabhängige Bindung von Oligohistidinsequenzen, die größtenteils unabhängig von der Art des His $_6$ -Trägerproteins ist und sich zum Nachweis des His $_6$ -tags in einem ELISA eignet.

3.2.6 Einsatz von His ΔC^* und His ΔC^* -16 zur Detektion von His $_6$ -Gruppen auf dem *Western Blot*

Die gereinigten BBP-Varianten His ΔC^* und His ΔC^* -16 wurden in einem *Western Blot*-Experiment eingesetzt. Dazu wurde ein Proteingemisch aus BSA, Ovalbumin sowie zwei rekombinanten Proteinen mit dem C-terminalen His $_6$ -tag, G9-Cystatin-His $_6$ und das F $_{\text{ab}}$ -Fragment HRS3c mit dem His $_6$ -tag an der schweren Kette (Schlapschy, 2004; präpariert von Dr. M. Schlapschy) auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Elektrottransfer auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Einzelne Streifen der Membran mit jeweils denselben Proben wurden mit der jeweiligen BBP-Variante bei unterschiedlichen Ni^{2+} -Konzentrationen inkubiert. Die Anfärbung der gebundenen Proteine erfolgte durch

Inkubation mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat und anschließende chromogene Reaktion (Abbildung 26).

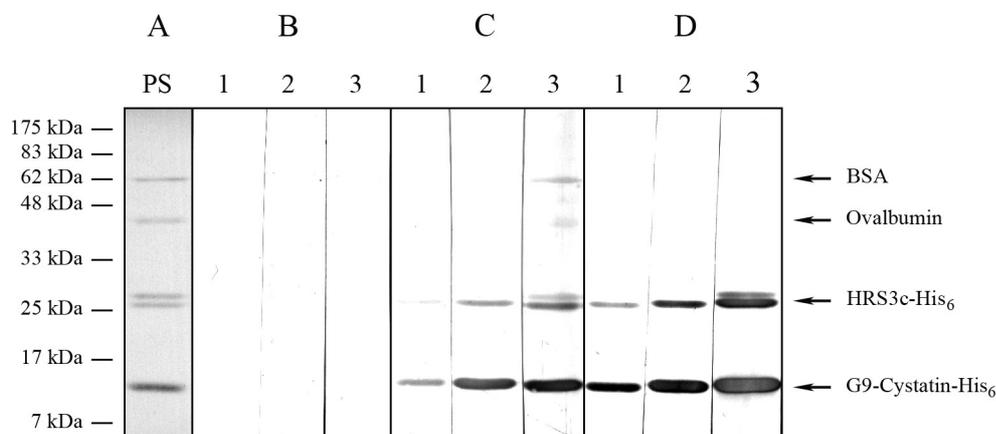


Abbildung 26: Untersuchung der Bindungseigenschaften von BBP-Varianten im *Western Blot*. **(A)** Ein Gemisch aus BSA, Ovalbumin, rekombinatem HRS3c-His₆ F_{ab}-Fragment und rekombinatem G9-Cystatin-His₆ wurde auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese mit Ponceau S-Lösung gefärbt (Spur PS) und in Streifen geschnitten. Die Membran-Streifen wurden mit ChemiBLOCKER abgesättigt und anschließend mit einer Lösung von wt-BBP **(B)**, His1ΔC* **(C)** und His1ΔC*-16 **(D)** jeweils in Abwesenheit von Ni²⁺ (Spur 1), in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ (Spur 2) bzw. von 1 mM Ni²⁺ (Spur 3) inkubiert. Die gebundenen BBP-Varianten wurden anschließend mithilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch chromogene Reaktion von NBT und BCIP nachgewiesen.

Das Experiment ergab, dass die BBP-Variante His1ΔC*-16 ausschließlich an Proteine mit dem His₆-tag bindet (Abbildung 26D). Dabei ist die Bindungsaffinität von der Metallionenkonzentration in der Weise abhängig, dass der His₆-tag in Abwesenheit von Ni²⁺ zwar erkannt wird (Spur 1), das Signal jedoch mit ansteigender Ni²⁺-Konzentration deutlich stärker wird. Bei 1 mM Ni²⁺-Konzentration (Spur 3) wird zusätzlich eine Bande auf der Höhe der leichten Kette des HRS3c-His₆ erkannt. Dabei kann es sich allerdings auch um die unprozessierte Form der schweren Kette mit dem His₆-tag handeln, die auf dieser Höhe läuft und möglicherweise in der Proteinpräparation noch als Verunreinigung vorhanden war. Die Bindungssignale der BBP-Variante His1ΔC* waren im Vergleich zu His1ΔC*-16 im allgemeinen schwächer. His1ΔC* bindet die beiden Proteine, die einen His₆-tag tragen, (d.h. G9-Cystatin-His₆ und HRS3c-His₆) unterschiedlich stark (Abbildung 26C). Auch hier ist wie bei His1ΔC*-16 die Bindungsaffinität abhängig von der Metallionenkonzentration. Bei einer Ni²⁺-Konzentration von 1 mM wurden die Proteine ohne das His₆-tag sehr schwach angefärbt, was auf eine durch die hohe Ni²⁺-Konzentration hervorgerufene unspezifische Bindung

hindeutet (Spur 3). Im Falle des BBP-Wildtyps wurden unter allen getesteten Bedingungen keine Signale beobachtet (Abbildung 26B).

Demnach ist die Bindungsaffinität der BBP-Variante His1 Δ C*-16 zu Oligohistidinsequenzen spezifisch und im Vergleich zu His1 Δ C* erhöht. Um als Nachweisreagenz verwendet zu werden, müsste seine Affinität weiter verbessert werden.

3.3 Affinitätsmaturierung mittels *Error Prone* PCR

Zur weiteren Optimierung der BBP-Variante His1 Δ C*-16 wurde die Methode der fehlererzeugenden (*Error Prone*) PCR gewählt, die auf der Einführung zufälliger Punktmutationen während der Amplifizierung eines Gens beruht.

Die am häufigsten angewendete Strategie der *Error Prone* PCR bedient sich der Erzeugung von Basenfehlpaarungen durch den Einsatz der Nukleotidanaloga dPTP und 8-oxo-dGTP (Abbildung 27; Zaccolo *et al.*, 1996). Die Vorteile dieser beiden Analoga liegen in der hohen Mutageneseeffizienz und Stabilität unter PCR-Bedingungen sowie einer guten Akzeptanz als Substrat der *Taq*-DNA-Polymerase. dPTP (2'-Deoxy-P-nucleosid-5'-triphosphat) bildet stabile Basenpaarungen mit A und G und generiert infolgedessen Transitionen, vorzugsweise A \rightarrow G und T \rightarrow C. 8-oxo-dGTP (8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat) ist eines der wenigen Nukleotidanaloga, welches Transversionen verursacht (Zaccolo *et al.*, 1996). Es geht Basenpaarungen mit A und C ein und verursacht dadurch Transversionen T \rightarrow G und A \rightarrow C.

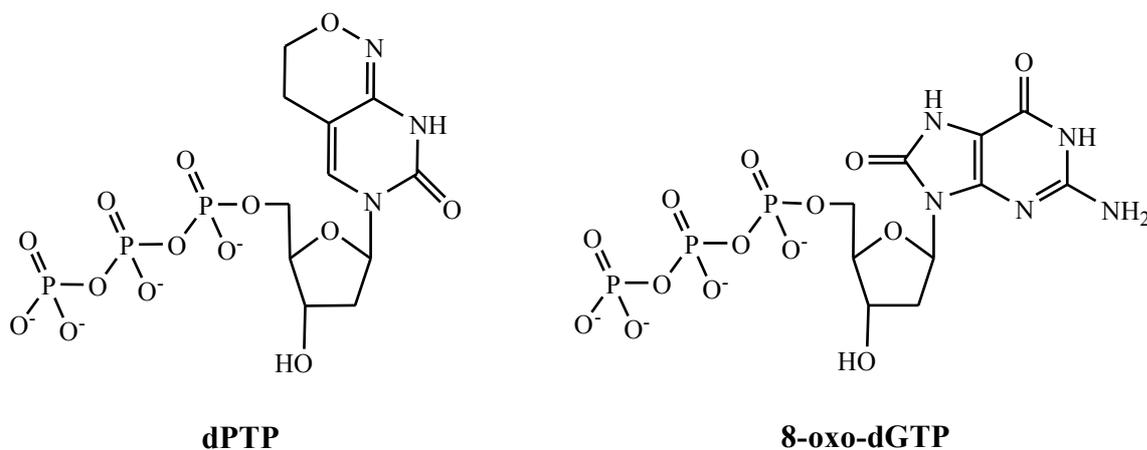


Abbildung 27: Die Strukturformel der bei der *Error Prone* PCR verwendeten Nukleotidanaloga dPTP (2'-Deoxy-P-nucleosid-5'-triphosphat) und 8-oxo-dGTP (8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat).

3.3.1 Zufallsmutagenese EPI

Zufallsmutagenese „EPI“ diente dem Test der Mutagenesevorschrift von Zacco *et al.* (1996). Die Bedingungen wurden so gewählt, dass etwa eine bis fünf Mutationen pro BBP-Genkassette angestrebt wurden (Abschnitt 2.2.5.4). Dazu wurde eine äquimolare Konzentration an dNTPs und den beiden Nukleotidanaloga von je 500 μM eingesetzt. Als Matrize wurde die codierende DNA von His1 ΔC^* auf dem Expressionsplasmid pBBP21 verwendet. Der von den eingesetzten *Primern* GB1 und GB2 eingeschlossene Sequenzbereich der *Bst*XI-Kassette umfasste die Aminosäurepositionen 28 bis 127 und beinhaltete alle vier Schleifenregionen mit den diese verbindenden β -Faltblattsträngen (Abbildung 16).

Die nach der Selektion auf oligohistidinbindende Varianten direkt mittels *Filter Sandwich Colony Screening Assay* isolierten und analysierten Varianten trugen 5 bis 23 Basenaustausche pro BBP-Gen (das ergab 4 bis 20 Aminosäureaustausche) und wiesen keine deutlich verbesserte Affinität zu G9-Cystatin-His₆ auf (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Zufallsmutagenese EPII

Um die Anzahl an Mutationen pro BBP-Gen zu erniedrigen, wurde im Zufallsmutagenese-Experiment „EPII“ die Konzentration der beiden eingesetzten Nukleotidanaloga auf je 250 μM herabgesetzt. Als Matrize wurde die codierende DNA von His1 ΔC^* bzw. His1 ΔC^* -16 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 in getrennten Ansätzen verwendet.

Die erhaltenen PCR-Fragmente der beiden Bibliotheken wurden gereinigt, mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI im präparativen Maßstab gespalten und getrennt mit einem analog verdauten Vektorfragment des Plasmides pBBP22 bzw. pBBP41 ligiert. Der Vektor pBBP41 ist ein Abkömmling von pBBP22 (Abbildung 19) und unterscheidet sich nur durch die Anwesenheit eines *Amber*-Stoppcodons (TAG) anstelle des ersten Codons (CCA) der ABD-Domäne. Er wurde konstruiert, um die selektierten BBP-Varianten in einem nicht-*Amber*-Suppressorstamm ohne Fusion mit der ABD produzieren zu können. Die vier Ligierungsansätze wurden unabhängig voneinander zur Transformation elektrokompetenter *E.coli* TG1-F⁻-Zellen (Abschnitt 2.2.2.2) eingesetzt und anschließend zur Selektion auf oligohistidinbindende Varianten in einem *Filter Sandwich Colony Screening Assay* durchgemustert.

3.3.2.1 Selektion von BBP-Varianten mittels Filter Sandwich Colony Screening Assay und Sequenzanalyse der selektierten Varianten

Zur Präsentation des His₆ Targets im Selektionsexperiment wurde diesmal das mit Digoxigenin markierte rekombinante Wildtyp-BBP (Abschnitt 3.1.5) eingesetzt, um zu gewährleisten, dass keine BBP-Varianten, die bevorzugt mit dem Träger-Protein G9-Cystatin interagieren, selektiert werden.

Zur Erhöhung der Stringenz wurde bei der Entwicklung der hydrophoben Membran eine niedrigere Konzentration (300 nM) des Trägerproteins als in der Affinitätsmaturierung von His1ΔC* (770 nM) eingesetzt. Die Konzentration von Ni²⁺ betrug 100 μM. Von jedem der vier Ligierungsansätze wurden je zwei Membranen vorbereitet und im *Filter Sandwich Colony Screening Assay* analysiert. So wurden insgesamt ca. 10000 Kolonien auf insgesamt 8 Membranen auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften durchgemustert. Bei mehr als 90 % der Kolonien wurden die dazugehörigen sekretierten Varianten angefärbt. Die Signale unterschieden sich in der Morphologie und Intensität. Insgesamt 50 Kolonien von den acht Membranen (bezeichnet als EPII.1 bis EPII.61), die die intensivsten Farbspots hervorgerufen haben, wurden ausgewählt und deren Liganden-Bindungseigenschaften in einem weiteren *Filter Sandwich Colony Screening Assay* miteinander verglichen (Abbildung 28). Dazu wurden zwei identische Membranen vorbereitet und mit Digoxigenin markiertem Wildtyp-BBP-His₆ (Abbildung 28A) bzw. G9-Cystatin-His₆ (Abbildung 28B) in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ inkubiert.

Die Signalintensität der BBP-Variante His1ΔC*-16 war wie erwartet stärker als die Intensität der BBP-Ausgangsvariante His1ΔC*. Zwischen den für dieselbe Mutante (His1ΔC* bzw. His1ΔC*-16) verwendeten unterschiedlichen Vektoren (pBBP22 bzw. pBBP41) gab es keinen merklichen Unterschied in der Signalintensität. Das deutet darauf hin, dass im Falle des Plasmids pBBP41 im *supE Amber*-Suppressorstamm *E. coli* TG1-F⁻ genügend Protein produziert und sekretiert wurde, um das auf der Membran immobilisierte HSA zu sättigen.

Der Großteil der Signale der 50 Kolonien war intensiver als die Signale der beiden ursprünglichen Varianten. Die relativen Intensitäten der Signale der einzelnen Mutanten auf der einen Membran entsprachen den korrespondierenden Signalen auf der anderen Membran. Dies deutete daraufhin, dass die selektierten Varianten unabhängig vom Trägerprotein gegen das His₆-tag gerichtet sind. Die Farbspots der BBP-Variante EPII.44 auf der Membran, die mit G9-Cystatin-His₆-Digoxigenin-Konjugat inkubiert wurde, erscheinen etwas diffuser als diejenigen auf der mit BBP-His₆-Digoxigenin-Konjugat behandelten Membran. Später stellte sich heraus, dass diese Spots von einem Mischklon herrührten, was die Ursache für die unterschiedlichen Signalintensitäten sein kann.

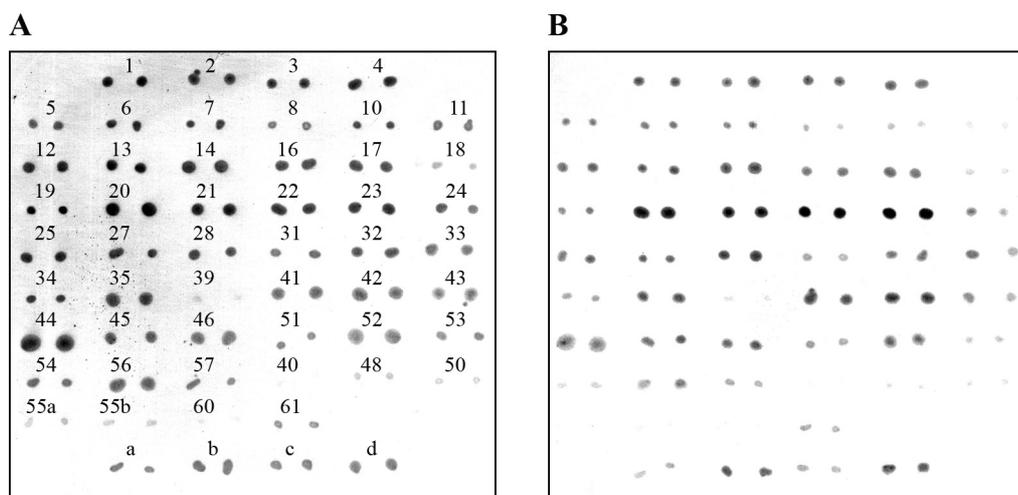


Abbildung 28: Ergebnis des vergleichenden *Filter Sandwich Colony Screening Assay* zur Selektion von BBP-Varianten aus der *Error Prone* Mutagenese EPII. Die selektierten Bakterienkolonien von TG1-F⁻ von insgesamt acht Membranen wurden parallel auf zwei weitere Membranen paarweise aufgetragen und die Biosynthese der codierten BBP-Varianten bei 22 °C induziert. Nach der Inkubation mit Wildtyp BBP-His₆-Digoxigenin-Konjugat (**A**) bzw. G9-Cystatin-His₆-Digoxigenin-Konjugat (**B**) in Gegenwart von Ni²⁺ und anschließender Entwicklung mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurde eine chromogene Reaktion durchgeführt. Die Zahlen oberhalb der Kolonien in (**A**) beziehen sich auf die Zahl nach dem Punkt (EPII.Zahl) in der Bezeichnung der dazugehörigen DNA-Sequenz (Abbildung 29) und gelten analog auch für die rechte Membran (**B**). Zur Kontrolle wurden je zwei verschiedene Vektor-Konstrukte der BBP-Varianten His1ΔC* und His1ΔC*-16 auf jeder Membran mitgeführt: pBBP41-His1ΔC* (a), pBBP41-His1ΔC*-16 (b), pBBP22-His1ΔC* (c) und pBBP22-His1ΔC*-16 (d). Kolonien 1-28 stammen von dem Ligierungsansatz mit dem Vektortyp pBBP41, während Kolonien 31-61 von demjenigen mit dem Vektortyp pBBP22 herrühren.

Die stärksten Signale wurden bei den Varianten EPII.1, 20, 21, 22, 23 und 44 beobachtet. Insgesamt wurden acht Bakterienkolonien, die die intensivsten Signale hervorriefen, ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und analysiert. Die DNA-Sequenzierung der Variante EPII.44 zeigte, dass es sich hierbei um einen Mischklon handelte. Dieser wurde in einem weiteren Filter-Stapel-Test vereinzelt (Daten nicht gezeigt), dessen DNA isoliert und erneut sequenziert.

Die DNA-Sequenzierung ergab, dass alle acht analysierten Varianten unterschiedlich waren und keine Leserahmenverschiebungen sowie auch keine Stoppcodons aufwiesen. Sie enthielten mehrfache Mutationen, die über alle vier Schleifenbereiche und das β -Barrel verteilt waren. Davon waren ca. 21 % stille Mutationen. Insgesamt wurden 3-14 Aminosäureaustausche (Mittelwert: 8,25) pro BBP-Gen gefunden (Tabelle 6). In den selektierten Varianten wurden hauptsächlich Transitionen generiert (Transitionen / Transversionen = 41/1); davon waren 80 % Transitionen von A→G.

BBP-Variante	Anzahl an Mutationen	Transitionen : Transversionen	Aminosäuresubstitutionen		
			still	codierend	Cystein
EPII.1	14	14 : 0	3	11	1+ und 1-
EPII.20	16	16 : 0	2	14	1+
EPII.21	12	11 : 1	4	7	1+
EPII.22	16	15 : 1	3	13	1+
EPII.23	3	3 : 0	0	3	0
EPII.41	6	6 : 0	1	5	0
EPII.42	4	4 : 0	0	4	0
EPII.44	12	12 : 0	2	9	0

Tabelle 6: Basen- und Aminosäuren-Charakteristika der selektierten BBP-Varianten aus der *Error Prone* Mutagenese EPII

Von den selektierten BBP-Varianten wurde eine – die Mutante EPII.1 – durch Mutagenese von His1 Δ C* und die restlichen sieben durch Mutagenese von His1 Δ C*-16 erhalten (Abbildung 29). Von diesen sieben Varianten leiteten sich annähernd gleich viele Klone von den beiden unterschiedlichen Vektoren für die Variante His1 Δ C*-16 ab: EPII.20, EPII.21, EPII.22 und EPII.23 von pBBP41-His1 Δ C*-16 und EPII.41, EPII.42 und EPII.44 von pBBP22-His1 Δ C*-16.

Die prominenteste Art der Aminosäuresubstitution, die an unterschiedlichen Positionen in allen selektierten Varianten aufgetreten ist, war der Austausch des positiv geladenen Lys (AAA oder AAG) durch das negativ geladene Glu (GAA oder GAG) als Folge einer A→G Transition. Diese Substitution trat 2 bis 6-mal in jeder einzelnen BBP-Variante auf. Eine Ausnahme stellt Variante EPII.23 dar, wo dieser Austausch dreimal als einzige aufgetretene Substitution erscheint. Die Lys→Glu Substitution fand gehäuft sowohl am oberen Ende der Bindungstasche in den Peptidschleifen 1 (Position 41), 4 (Positionen 121, 122 und 125) und am oberem Ende des β -Faltblatts A (Position 31) als auch am Boden der Bindungstasche (Positionen 80 und 107) und am unterem Ende des β -Faltblatts E (Position 83) statt. Dieselben Substitutionen an den Positionen 31, 41 und 122 wurden vereinzelt auch in der vorangegangenen *in vitro* Affinitätsmaturierung der BBP-Variante His1 Δ C* (Abschnitt 3.2.4; Abbildung 22) festgestellt. Das deutet darauf hin, dass negativ geladene Aminosäureseitenketten günstig zur Bindung des Liganden beitragen.

Weitere häufige Aminosäuresubstitutionen waren Lys→Arg, Glu→Gly und Asp→Gly, welche alle durch eine A→G Transition entstanden waren.

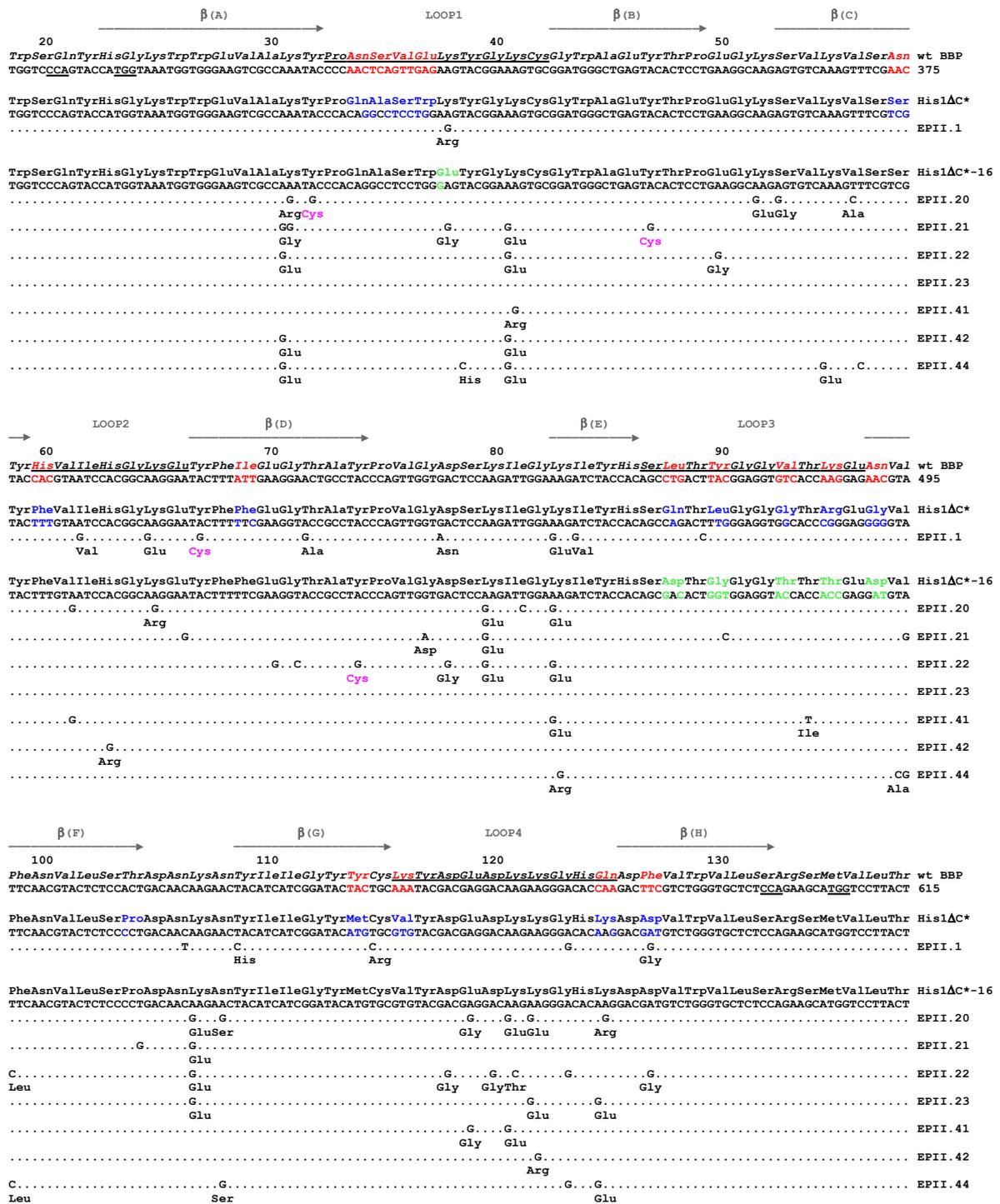


Abbildung 29: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der selektierten BBP-Varianten aus der *Error Prone* Mutagenese EPII im Vergleich zur Sequenz von Wildtyp-BBP, His1ΔC* bzw. His1ΔC*-16. Gezeigt ist der Bereich der Aminosäurepositionen 19 bis 138, der die gesamte durch die *Bst*XI-Schnittstellen (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankierte Genkassette umfasst. Die Aminosäurepositionen der vier Schleifenregionen sind unterstrichen. Die β -Faltblattstränge sind durch graue Pfeile oberhalb der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Die zur Randomisierung ausgewählten Basen und Aminosäurepositionen der ursprünglichen BBP-Bibliothek (Beste, 1999) sind rot, die ausgetauschten Basen und Aminosäurepositionen in His1ΔC* blau und die in His1ΔC*-16 grün gekennzeichnet. In den Gensequenzen der selektierten BBP-Varianten sind nur diejenigen Basen und Aminosäuren angegeben, die sich von der Sequenz von His1ΔC* bzw. His1ΔC*-16 unterscheiden. Neu aufgetretene Cys-Reste sind lila eingezeichnet.

Bei vier BBP-Varianten, die im vergleichenden Kolonie-Filterstapel-Test die intensivsten Signale lieferten, wurden zusätzliche Cys-Reste gefunden: bei EPII.1 an Position 67, bei EPII.20 an Position 32, bei EPII.21 an Position 47 und bei EPII.22 an Position 74. Diese Substitutionen wurden durch eine einfache A→G Transition im Tyr-Codon (TAC) hervorgerufen. Bei EPII.1 wurde zusätzlich dazu das Cys an der Position 115 durch Arg ausgetauscht. Im Fall der Mutanten EPII.1 und EPII.20 lagen all diese Substitutionen am oberen Ende der Bindungstasche.

Die BBP-Variante EPII.44, die die stärksten Signale im Filterstapeltest gezeigt hatte (Abbildung 28), trug insgesamt neun Aminosäuresubstitutionen. Vier davon waren Austausch von Lys zu Glu. Sie sind gehäuft am oberem Ende der Bindungstasche aufgetreten (am Ende des β -Faltblatts A an Position 31, innerhalb der Peptidschleife 1 an Position 41 und am Ende der Peptidschleife 4 an Position 125). Weiterhin wurde auch im β -Faltblattstrang C an Position 55 diese Art von Substitution gefunden. In der Schleifenregion 1 wurde zudem ein ungeladenes Tyr an Position 39 durch einen positiv geladenen His-Rest ersetzt. Bei den vier restlichen Austauschen handelte es sich um konservative Substitutionen (Lys83→Arg am N-Terminus des β -Faltblattstrangs E, Val98→Ala und Phe99→Leu am N-Terminus des β -Faltblattstrangs F, Asn108→Ser am Boden der Bindungstasche).

Für die weitergehende Charakterisierung der Liganden-Bindungseigenschaften wurden von den Varianten, die die stärksten Signale im Vergleichs-Filter-Stapel-Test zeigten, diejenigen ausgewählt, die keine zusätzlichen Cys-Reste enthielten. Dies waren EPII.23 und EPII.44.

3.3.2.2 Produktion der selektierten BBP-Varianten in E. coli und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA

Die His1 Δ C*-16-Variante EPII.44 war auf dem Vektor pBBP22 codiert und konnte damit nur als Fusionsprotein mit der ABD produziert werden. Daher wurden die randomisierten Gensegmente beider ausgewählten Mutanten (EPII.23 und EPII.44) zur bakteriellen Produktion, wie schon in Abschnitt 3.2.5, auf dem Expressionsplasmid pBBP21 subkloniert. Anschließend wurden die Proteine in *E. coli* JM83 wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Während der Induktion neigten die Zellen bei beiden Mutanten zur Lyse. Deshalb wurde das Wachstum der Zellkultur durch Messung der optischen Dichte verfolgt und die Zellernte gegebenenfalls schon 2,5 - 2,75 Stunden nach der Induktion eingeleitet.

Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung durch SDS-PAGE zeigte, dass die Variante EPII.23 zusammen mit unprozessiertem Protein und einer 16 kDa großen Verunreinigung, vermutlich Skp, aus dem bakteriellen Periplasma isoliert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Bei der Variante EPII.44 wurden je nach Grad der Lyse zum Zeitpunkt der Zellernte nur geringe Verunreinigungen nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie beobachtet. Eine prominente Proteinbande, die dem Skp zuzuordnen war, wurde nicht beobachtet. Somit haben die eingeführten Aminosäuresubstitutionen in der His1 Δ C*-16-Variante die Interaktion zwischen dem Skp und der BBP-Variante aufgehoben. Weiterhin zeigte die Variante EPII.44 eine zum BBP etwas erniedrigte und zu der vorangegangenen Mutante His1 Δ C*-16 nahezu identische elektrophoretische Mobilität (Abbildung 30). Darüber hinaus wurde eine Steigerung der Ausbeute auf 150 μ g/l Kulturmedium (bei einer OD₅₅₀ der Expressionskultur zum Zeitpunkt der Ernte von 1,1) erzielt.

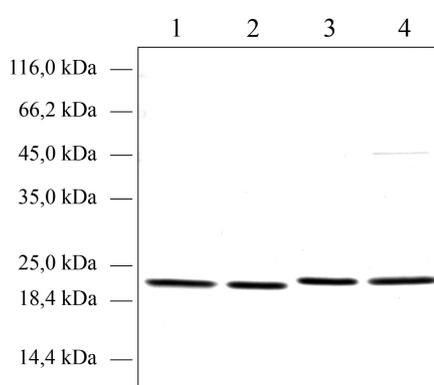


Abbildung 30: Analyse der BBP-Varianten in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden durch Sekretion in das Periplasma von *E. coli* JM83/pBBP21 (für Wildtyp BBP und EPII.44) bzw. MC4100 Δ skp/pBBP21 (für His1 Δ C* und His1 Δ C*-16) produziert und mithilfe des *Strep*-tag II gereinigt. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese reduziert: Wildtyp BBP (1), His1 Δ C* (2), His1 Δ C*-16 (3) und EPII.44 (4). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Beide His1 Δ C*-16-Varianten wurden im ELISA auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften zum His₆-tag analysiert. Dazu wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und anschließend mit einer Verdünnungsreihe der jeweiligen BBP-Variante in Gegenwart von 100 μ M Ni²⁺ inkubiert. Die Variante EPII.44 zeigte dabei deutlich höhere Signale (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren ELISA-Experiment wurde diese mit den ursprünglichen Varianten His1 Δ C* und His1 Δ C*-16 sowie mit Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen (Abbildung 31). In Gegenwart von 100 μ M Ni²⁺ zeigte EPII.44 konzentrationsabhängige Bindungssignale, die etwa doppelt so hoch waren wie diejenigen für die Mutante His1 Δ C*-16 (Abbildung 31A). Die apparente Dissoziationskonstante betrug 14 ± 2 nM. Die in Abwesenheit von Ni²⁺ gemessenen Signale waren deutlich niedriger (Abbildung 31B). Wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit BSA beschichtet, wurden keine Bindungssignale detektiert (Daten nicht gezeigt).

Somit konnte mittels *Error Prone* PCR eine weitere Verbesserung der Bindungsaffinität dieses Anticalins erzielt werden.

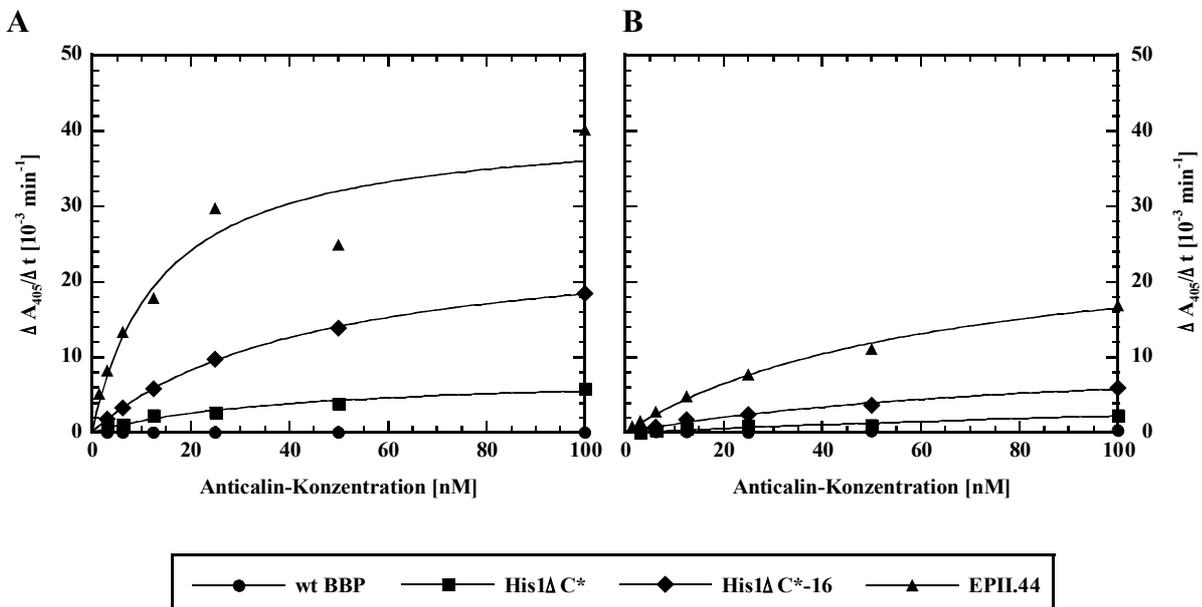


Abbildung 31: ELISA-Experimente zur Untersuchung der Liganden-Bindungsaktivität der selektierten BBP-Variante EPII.44 im Vergleich zum Wildtyp-BBP, His1 Δ C* und His1 Δ C*-16. **(A)** Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des Anticalins in Gegenwart von 100 μM Ni^{2+} appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mithilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. (Die Anpassung der Messwerte erfolgte mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (5).) **(B)** Wie **(A)** jedoch in Abwesenheit von Ni^{2+} .

3.3.3 Zufallsmutagenese EPIII

Um die metallionenabhängige Affinität der Variante EPII.44 noch mehr zu verbessern, wurde eine zweite Affinitätsmaturierung mittels *Error Prone* PCR ausgeführt. Die Mutagenese fand wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben statt. Als Matrize wurde die codierende DNA von EPII.44 auf dem Expressionsplasmid pBBP21 verwendet. Um die Anzahl an Mutationen pro BBP-Gen zu erniedrigen, wurde die Konzentration beider in der ersten PCR-Stufe eingesetzten Nucleotidanaloga von 250 μM auf 100 μM herabgesetzt und betrug somit nur noch 1/5 der eingesetzten dNTP-Konzentrationen. Das erhaltene randomisierte PCR-Fragment wurde auf dem Plasmid pBBP41 subkloniert (Abschnitt 3.3.2) und zur Transformation elektrokompetenter *E.coli* TG1-F⁻-Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die erhaltenen Transformanten zur Selektion auf His₆-bindende EPII.44-Varianten wiederum in einem *Filter Sandwich Colony Screening Assay* analysiert.

3.3.3.1 Selektion von BBP-Varianten mittels Filter Sandwich Colony Screening Assay und Sequenzanalyse der selektierten Varianten

Zur Präsentation des His₆-Affinitätsanhängsels im *Filter Sandwich Colony Screening Assay* wurde erneut das mit Digoxigenin markierte rekombinante Wildtyp-BBP ausgewählt. Die Konzentration dieses Trägerproteins wurde bei der Entwicklung der hydrophoben Membran zur Erhöhung der Stringenz auf 100 nM gegenüber dem ersten Affinitätsmaturierungszyklus mittels *Error Prone PCR* (300 nM) erniedrigt. Die Konzentration von Ni²⁺ betrug unverändert 100 µM.

Insgesamt wurden ca. 3000 Kolonien auf zwei Membranen auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften durchmustert. Dabei traten bei mehr als 90 % der Kolonien Farbsignale auf, wobei sich die individuellen Spots in ihrer Morphologie und Intensität voneinander teilweise unterschieden. Von den zwei Membranen wurden insgesamt 25 Kolonien (bezeichnet als EPIII.501 bis 511 und EPIII.101 bis 116), die zu den intensivsten Signalen führten, ausgewählt und deren Liganden-Bindungseigenschaften in einem weiteren *Filter Sandwich Colony Screening Assay* miteinander verglichen (Abbildung 32).

In diesem Assay wurden sechs identische Membranen vorbereitet und unter verschiedenen Bedingungen entwickelt. Dabei wurde jeweils das G9-Cystatin als Träger des His₆-tags eingesetzt. Zum Vergleich wurden auf jeder Membran auch Kolonien aller drei Generationen der oligohistidinbindenden BBP-Varianten (His1ΔC*, His1ΔC*-16 und EPII.44) aufgetragen.

Die ersten zwei Membranen wurden mit gleichen Konzentrationen an mit Digoxigenin markiertem G9-Cystatin-His₆ (Abbildung 32A) bzw. G9-Cystatin-*Strep* II (Abbildung 32B) in Gegenwart von 100 µM Ni²⁺ inkubiert. Dabei wurde auf der mit G9-Cystatin-*Strep* II inkubierten Membran B für keine der BBP-Varianten ein Bindungssignal detektiert, während auf der mit G9-Cystatin-His₆ inkubierten Membran alle Mutanten sichtbare Spots lieferten. Daraus war zu schließen, dass die Bindungssignale der Varianten von deren Affinität zum His₆-tag und nicht zum Trägerprotein herrührten. Die stärksten Signale, die auch als erste beim Entwickeln der Membran auftraten, lieferten die Varianten EPIII.501 und EPIII.509. Dabei waren die Bakterien-Kolonien, die die Variante EPIII.509 sekretierten, viel kleiner als die der Variante EPIII.501, was auf eine höhere Produktion oder Affinität der Variante EPIII.509 hindeutete. Signale von zwei Varianten (EPIII.103 und EPIII.108) waren schwächer als diejenigen der Matrizen-Variante EPII.44. Da die Signalintensitäten aller getesteten Varianten auf der mit 100 nM digG9-Cyst-His₆ und 100 µM Ni²⁺ inkubierten Membran A einander sehr ähnlich waren, konnte man annehmen, dass die Ligandenkonzentration schon im Sättigungsbereich lag. Daher wurden die weiteren vier Membranen C bis F unter stringenteren Bedingungen in Bezug auf die Konzentration des mit Digoxigenin markierten G9-Cystatin-His₆ sowie der Ni²⁺-Ionen entwickelt.

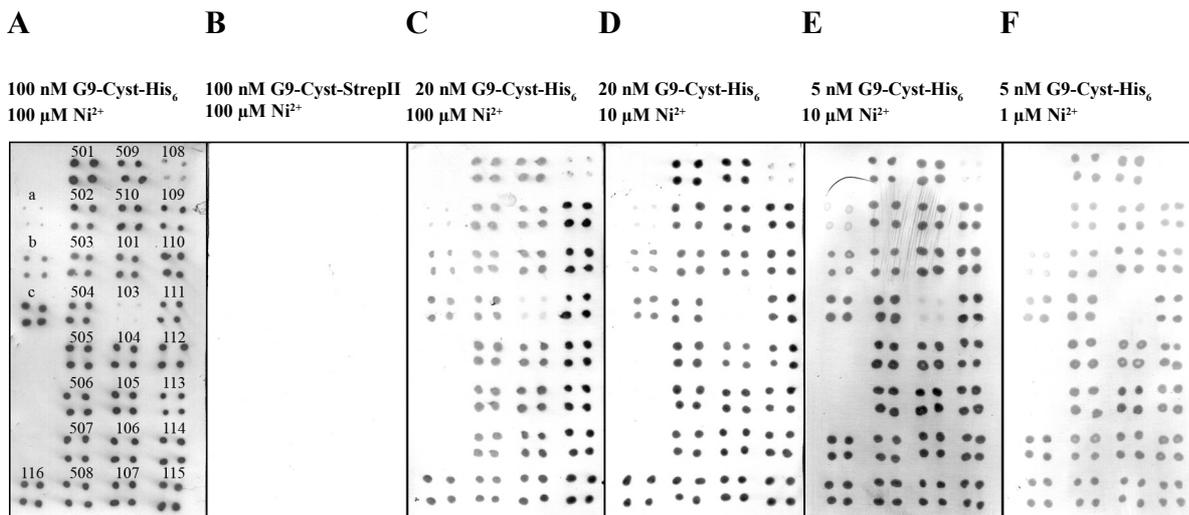


Abbildung 32: Ergebnis des vergleichenden *Filter Sandwich Colony Screening Assay* zur Selektion von BBP-Varianten aus der *Error Prone Mutagenese* EPIII. Die selektierten Bakterienkolonien von TG1-F/pBBP41 von insgesamt zwei Membranen wurden auf sechs weitere Membranen parallel (immer vierfach) aufgetragen und die Biosynthese der codierten BBP-Varianten bei 22 °C induziert. Nach der funktionellen Immobilisierung der BBP-Varianten auf einer hydrophoben Membran wurden diese auf ihre individuellen Bindungseigenschaften untersucht. Nach der Inkubation mit digoxigeniertem G9-Cystatin-His₆ (G9-Cyst-His₆) bzw. digoxigeniertem G9-Cystatin-Strep II (G9-Cyst-Strep II) in Gegenwart von Ni²⁺ und anschließender Inkubation mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurde eine chromogene Reaktion durchgeführt. **(A)** Inkubation mit 100 nM G9-Cyst-His₆ und 100 μM Ni²⁺, **(B)** 100 nM G9-Cyst-Strep II und 100 μM Ni²⁺, **(C)** 20 nM G9-Cyst-His₆ und 100 μM Ni²⁺, **(D)** 20 nM G9-Cyst-His₆ und 10 μM Ni²⁺, **(E)** 5 nM G9-Cyst-His₆ und 10 μM Ni²⁺, **(F)** 5 nM G9-Cyst-His₆ und 1 μM Ni²⁺. Die Zahlen oberhalb der Kolonien in **(A)** beziehen sich auf die Zahl nach dem Punkt (EPIII.Zahl) in der Bezeichnung der dazugehörigen DNA-Sequenz (Abbildung 33) und gelten analog auch für die restlichen fünf Membranen **(B - F)**. Zur Kontrolle wurden die BBP-Varianten His1ΔC* (a), His1ΔC*-16 (b) und EPII.44 (c) mitanalysiert.

Die Membranen C und D wurden mit einer 20 nM Lösung von mit Digoxigenin markiertem G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ für die Membran C (Abbildung 32C) und 10 μM Ni²⁺ für die Membran D (Abbildung 32D) inkubiert. Die intensivsten Signale wurden wiederum für die Varianten EPIII.501 und EPIII.509 beobachtet. Zusätzlich trat der Spot der Variante EPIII.109 besonders stark hervor. Die Membranen E und F wurden mit einer 5 nM Lösung von Digoxigenin markiertem G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von 10 μM Ni²⁺ für die Membran E (Abbildung 32E) und 1 μM Ni²⁺ für die Membran F (Abbildung 32F) inkubiert. Auf diesen beiden Membranen waren die Signale der Variante EPIII.501 etwas schwächer, während die Signale der Varianten EPIII.105 und EPIII.111 im Vergleich zu den vorherigen Membranen verstärkt waren.

Insgesamt wurden acht Bakterienkolonien, die die intensivsten Signale hervorriefen, ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und analysiert (Abbildung 33). Alle acht analysierten Varianten waren funktionell. Sie enthielten mehrfache Mutationen, die sich über das ganze

BBP-Gen erstreckten. Insgesamt wurde wie erwünscht eine geringere Anzahl an Mutationen, generiert. Je BBP-Gen wurden 1 bis 5 Aminosäureaustausche (Mittelwert: 3,75) gefunden (Tabelle 7). Der Anteil an stillen Mutationen war mit ca. 19 % annähernd gleich hoch wie derjenige bei der *Error Prone* Mutagenese EPII. In den selektierten Varianten wurden hauptsächlich Transitionen beobachtet (Transitionen/Transversionen = 18/1), davon waren 64 % Transitionen A→G.

BBP-Variante	Anzahl an Mutationen	Transitionen : Transversionen	Aminosäuresubstitutionen		
			still	codierend	Cystein
EPIII.501	6	5 : 1	1	5	0
EPIII.509	6	6 : 0	1	4	0
EPIII.105	5	4 : 1	1	4	0
EPIII.109	3	3 : 0	0	3	0
EPIII.111	4	4 : 0	1	3	0
EPIII.112	2	2 : 0	1	1	0
EPIII.113	5	5 : 0	0	5	0
EPIII.115	7	7 : 0	2	5	1+ und 1-

Tabelle 7: Basen- und Aminosäure-Substitutionen der selektierten BBP-Varianten aus der *Error Prone* Mutagenese EPIII.

Im Schleifenbereich 4 ist an Position 122 bei fünf von acht selektierten Varianten (EPIII.509, 109, 111, 112 und 113) der Austausch eines positiv geladenen Lys mit dem negativ geladenen Glu als Folge einer einfachen A→G Transition aufgetreten. Die gleiche Substitution war vereinzelt auch in den beiden vorangegangenen Affinitätsmaturierungen bei den Varianten His1ΔC*-20, EPII.20 und EPII.23 aufgetreten. Im Gegensatz zu der Zufallsmutagenese EPII ist diese Art von Aminosäureaustausch nur an Position 122 erfolgt. Bei den Varianten EPIII.509 und EPIII.113 wurde an Position 53 am unteren Ende des β-Faltblattstrangs C das Ser gegen ein Gly ersetzt. Diese Substitution wurde zuvor schon in der Variante EPII.20 beobachtet. Im Fall der Varianten EPIII.501 und EPIII.105 wurde das Glu55 im β-Faltblattstrang C, welches durch den Austausch von Lys in der vorangegangenen Variante EPII.44 generiert worden war, durch Gly ausgetauscht. Eine Substitution von Glu durch Gly wurde auch bei den Varianten EPIII.111 und EPIII.115 in der Peptidschleife 4 an der Position 119 festgestellt. Bei der Variante EPIII.115 wurde an Position 85 ein neuer Cys-Rest eingeführt, während das Cys an der Position 42 durch ein Tyr ersetzt wurde (Abbildung 33).

Die Varianten EPIII.105, 109, 111 und 509, die die stärksten Signale auf verschiedenen Membranen im vergleichenden Filter-Stapel-Test zeigten, wurden zur Charakterisierung der Liganden-Bindungseigenschaften ausgewählt.

20	30	40	50	
TrpSerGlnTyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaGluTyrProGlnAlaSerTrpGluHisGlyGluCysGlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValGluValSerSer				EPII.44
TG GTCCCA GTACCA TGG TAAATGGTGGGAAGTCGCC GA TACCCACAGGCCTCCTGGGAG CACGGAG AGTCCGGATGGGCTGAGTACACTCCTGAAGGCAAGAGTGT CGAAGTCTCGTCG				375
. . . C . C				EPIII.501
AspAla			Gly	
. . . G			G.C	EPIII.509
. Arg			Gly	
.			G	EPIII.105
.			Gly	
.			C	EPIII.109
. Arg				
.				EPIII.111
.				EPIII.112
.			T	EPIII.113
. Ser			G	
.			Gly	
.				EPIII.115
. G Tyr				
60	70	80	90	
TyrPheValIleHisGlyLysGluTyrPhePheGluGlyThrAlaTyrProValGlyAspSerLysIleGlyArgIleTyrHisSerAspThrGlyGlyGlyThrThrGluAspAla				EPII.44
TACTTTGTAAATCCACGGCAAGGAATAC TTTTCGAAGGTACCGCTACCCAGTGGTGACTCCAAGATTGGAA CGATCTACCACAGCGACTGTGGAGGTACCACCACCGAGGAT CGC				495
. G				EPIII.501
. Gly				
.				EPIII.509
. Thr				
. C				EPIII.105
. Leu				
.				EPIII.109
.				EPIII.111
.				EPIII.112
.				EPIII.113
.				EPIII.115
. G Arg			G Cys	
.			T	
.				A
.				Thr
100	110	120	130	
LeuAsnValLeuSerProAspAsnLysSerTyrIleIleGlyTyrMetCysValTyrAspGluAspLysLysGlyHisGluAspAspValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThr				EPII.44
CTCAACGTACTCTCCCTGACAACAAG AGCT ACATCATCGGATACATGTGCGGTACGACGAGGACAAGAAGGG GCACG AGGACGATGCTGGGTCTCT CCG AAGCATGGTCTTACT				615
. G				EPIII.501
. Gly				
.				EPIII.509
. Glu				
.				EPIII.105
. G.A				
. SerIle				EPIII.109
.				EPIII.111
.				EPIII.112
.				EPIII.113
.				EPIII.115
. C Ala				
. C Pro				
.				EPIII.115
.				
.				Gly

Abbildung 33: DNA- und korrespondierende Aminosäure-Sequenz der selektierten BBP-Varianten aus der *Error Prone* Mutagenese EPIII im Vergleich mit der Sequenz von EPII.44. Gezeigt ist der Bereich der Aminosäurepositionen 19 bis 138, der die gesamte durch die *Bst*XI-Schnittstellen (CCAN₆TGG, unterstrichen) flankierte Genkassette umfasst. Die Aminosäurepositionen der vier Schleifenregionen sind unterstrichen. Die in der *Error Prone* Mutagenese EPII randomisierten Basen und Aminosäurepositionen der BBP-Variante EPII.44 sind rot gekennzeichnet. In den Gensequenzen der selektierten BBP-Varianten sind nur diejenigen Basen und Aminosäuren angegeben, die sich von der Sequenz des EPII.44 unterscheiden. Neu aufgetretene Cys-Reste sind lila eingezeichnet.

3.3.3.2 Produktion der BBP-Varianten in *E. coli* und Untersuchung ihrer Bindungseigenschaften im ELISA

Zur bakteriellen Produktion der Anticaline ohne die Albumin-Bindungsdomäne wurden *E. coli* JM83 Zellen mit dem Vektor pBBP41, auf dem die Gensegmente der ausgewählten Varianten codiert waren, transformiert. Anschließend wurden die Proteine wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt.

Die Ausbeuten für die einzelnen Varianten lagen zwischen 270 und 500 μg pro Liter Kulturmedium. Während der Induktion und auch bei der Zellernte neigten die Zellen aller vier Mutanten zur Lyse. Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung durch SDS-PAGE zeigte, dass die Elutionsfraktionen der Streptavidin-Affinitätschromatographie aller Varianten aufgrund mehr oder weniger starker Zellyse durch kleinere und größere Proteine verunreinigt waren. Um dieses Problem zu beheben, wurden die Gensegmente der Varianten in den Vektor pBBP21 subkloniert und die Proteinproduktion erneut in *E. coli* Stamm JM83 durchgeführt. Bei der Zellernte wurde auf den Einsatz von Lysozym verzichtet. Auf diese Weise gewonnene Proteinpräparationen enthielten nur noch geringe Mengen von zwei kleineren Protein-Verunreinigungen.

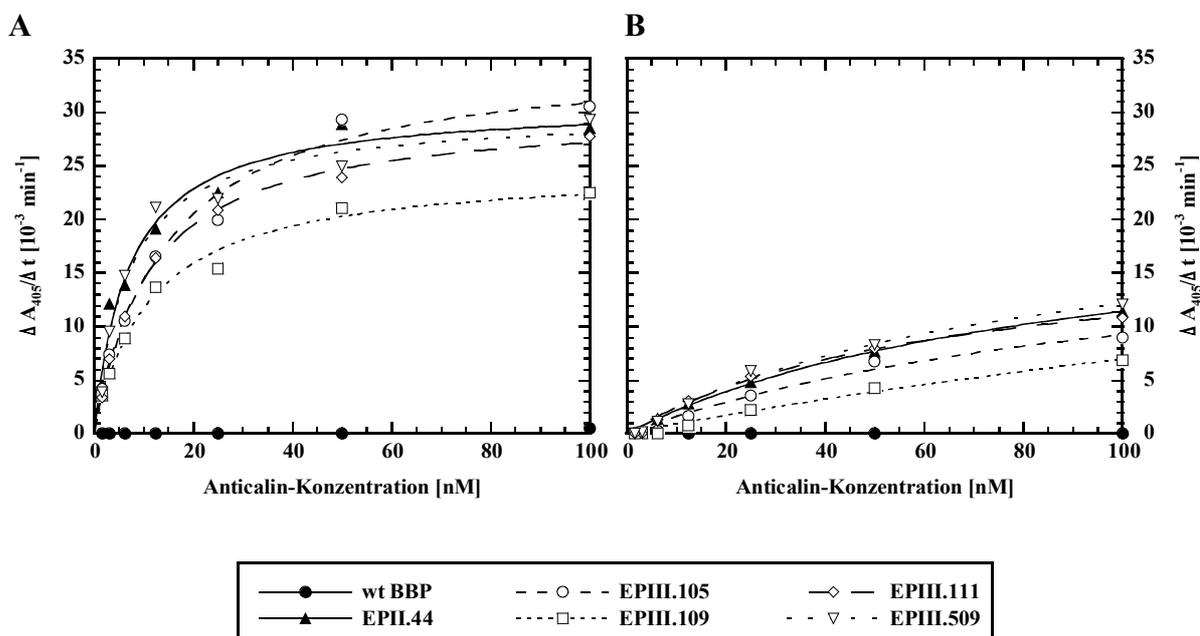


Abbildung 34: ELISA zur Untersuchung der Liganden-Bindungsaktivität der selektierten BBP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp-BBP und EPII.44. (A) Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des Anticalins in Gegenwart von $100 \mu\text{M Ni}^{2+}$ appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mithilfe des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsels mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. (B) Wie (A) jedoch in Abwesenheit von Ni^{2+} .

Alle vier EPII.44-Varianten wurden in einem ELISA-Experiment auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften zum His₆-tag analysiert und mit EPII.44 sowie Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen (Abbildung 34).

In Gegenwart von Ni²⁺ zeigten alle Varianten konzentrationsabhängige Bindungssignale, die jedoch gleich hoch waren wie diejenigen für die Mutante EPII.44 (Abbildung 34A). Die in Abwesenheit von Ni²⁺ gemessenen Signale waren deutlich geringer als in Gegenwart von Ni²⁺ und im Falle der Variante EPIII.109 am niedrigsten (Abbildung 34B). Wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte nur mit BSA beschichtet, wurden keine Bindungssignale detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die zweite Affinitätsmaturierung mittels *Error Prone* PCR hatte demzufolge keine signifikante Verbesserung der Affinität zum His₆-Target mit sich gebracht.

3.4 Eliminierung der Disulfidbrücken in der BBP-Variante EPII.44

Die in *E. coli* JM83 produzierte und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte Proteinpräparation der BBP-Variante EPII.44 wurde mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden sowie nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht (Abbildung 35). Die Variante zeigte im reduzierten Zustand eine gegenüber dem Wildtyp-BBP erniedrigte elektrophoretische Mobilität. Die nicht reduzierte Proteinprobe wies dagegen zwei Proteinbanden mit einer deutlich erhöhten Mobilität auf. Die Bande mit einer zum nicht-reduzierten Wildtyp-BBP vergleichbaren Mobilität kann auf die kompaktere Form der Polypeptidkette nach Ausbildung der beiden Disulfidbrücken zurückgeführt werden. Die zweite Proteinbande, mit etwas erniedrigter Mobilität, deutete auf die Anwesenheit eines nicht nativen Disulfidisomers hin. Weiterhin waren im oberen Gel-Bereich zwei weitere prominente Proteinbanden mit apparenten Molmassen von ca. 34 bis 40 kDa zu sehen. Dabei könnte es sich um kovalente Dimere handeln.

Variationen der Expressionsbedingungen änderten nichts an der Ausbildung von Disulfidisomeren. Eine leichte Verbesserung brachte die Koexpression von Proteindisulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC und Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase PPI, die auf dem Vektor pTUM3 codiert sind. Dabei wurde das Verhältnis zwischen dem nativen und dem nicht-nativen Disulfidisomer zugunsten des ersten verschoben (Daten nicht gezeigt).

Die vier Cysteinreste Cys8, Cys42, Cys115 und Cys170 in der Variante EPII.44 sind an der Ausbildung der beiden Disulfidisomere beteiligt. Cys8 und Cys115 bilden im Wildtyp-BBP eine Disulfidbrücke aus, die das N-terminale Segment des Proteins mit dem β -Strang G des β -Barrel verbindet. Cys42, am Übergang der Peptidschleife 1 in den β -Strang B, und Cys170

verbinden das kurze C-terminale Peptid mit dem β -Barrel (Huber *et al.*, 1987b). Um eine weniger heterogene Proteinpräparation der BBP-Variante EPII.44 zu erhalten, wurde versucht, diese Cysteinreste mittels ortsspezifischer Mutagenese durch Serin zu ersetzen (Abbildung 36).

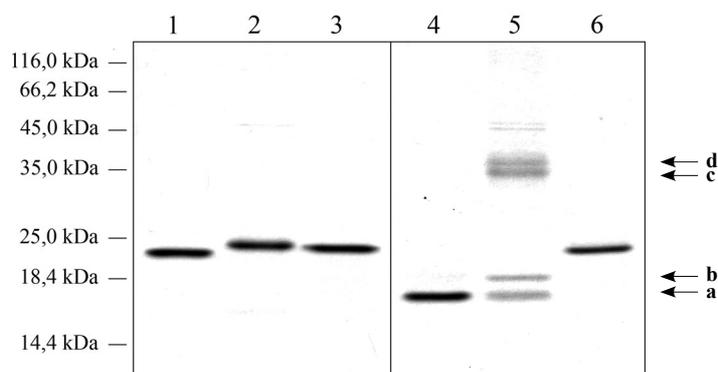


Abbildung 35: Analyse der gereinigten BBP-Varianten EPII.44 und EPII.44C4 in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteinproben der Spuren 1 bis 3 wurden vor der Elektrophorese mit Mercaptoethanol behandelt, die Proben der Spuren 4 bis 6 wurden nicht reduziert: BBP (Spur 1 und 4), EPII.44 (Spur 2 und 5) und EPII.44C4 (Spur 3 und 6). Die mit Buchstaben a-d markierten Pfeile auf der rechten Seite des Gels kennzeichnen die im Text erwähnten einzelnen Proteinbanden in Spur 5. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

3.4.1 Entfernung der Disulfidbrücke C42-C170 (Variante EPII.44CC)

Die BBP-Variante EPII.44 trägt in der Peptidschleife 1 (Abbildung 29) drei Aminosäuresubstitutionen, Tyr39→His und Lys41→Glu sowie Lys38→Glu, und einen weiteren Austausch Lys31→Glu am Ende des β -Stranges A. Lys31 ist im Wildtyp-BBP an der Salzbrücke mit Glu28 beteiligt und soll zur Stabilisierung des β -Barrels beitragen (Huber *et al.*, 1987b). Dennoch hatte im Falle des Anticalins DigA16 (Schlehuber, 2001) das Fehlen dieser Salzbrücke durch die Austausche Glu28→Gln und Lys31→Ala keinen negativen Effekt auf die Proteinestabilität.

Durch die oben genannten Mutationen konnte die Peptidschleife 1 eine Konformationsänderung erfahren, die zur Ausbildung nicht-nativer Disulfidisomere führen könnte. Darum wurden im ersten Schritt die Cysteinreste der Disulfidbrücke Cys42-Cys170 durch Serin ausgetauscht. Die auf diese Weise erzeugte Mutante wurde als EPII.44CC bezeichnet.

Um das Ausmaß an Zellyse während der Induktionsphase und an Protein-Verunreinigungen in der Proteinpräparation zu erniedrigen, wurden die Expressionsbedingungen für diese Mutante optimiert. Die besten Ergebnisse wurden bei Verwendung des *E. coli* Stamms KS272 in Verbindung mit pTUM4 erzielt. Dieser Vektor codiert für die Proteindisulfid-Oxido-

reduktasen DsbA und DsbC unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten *dsbA* Promotors sowie für Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen FkpA und SurA unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierten *fkpA* Promotors (Schlupschy *et al.*, 2006).

```

OmpA      1          8      10          20          30
AlaGlnAla Asp ValTyrHisAspGlyAla Cys ProGluValLysProValAspAsnPheAspTrpSer Gln TyrHisGlyLysTrpTrpGluValAlaGluTyrProGlnAlaSerTrp EPII.44
GCCGAGGCCGACGTGTACCACGACGGTGCCTGTCCCGAAGTCAAGCCAGTCGACAACTTCGACTGGTCCAGTACCATGGTAAATGGTGGGAAGTCGCCGAATACCCACAGGCCTCCTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGCGTCCGGCTGCACATGGTGTGCCACGGACAGGCTTCAGTTCGGTCAAGCTGTTGAAGCTGACCAGGTCATGTTACCATTATACCACCTTCAGCGGTTTATGGGTGTCGGGAGGACC
          40      42          50          60          70
GluHisGlyGlu Cys GlyTrpAlaGluTyrThrProGluGlyLysSerValGluValSerSerTyrPheValIleHisGlyLysGluTyrPheGluGlyThrAlaTyrProValGly EPII.44
GAGCAGCGAGAGTGCAGTGGGCTGAGTACACTCCTGAAGCAAGACTGTCGAAGTCTCGTCTACTTTGTAATCCACGGCAAGGAATCTTTTCGAAGTACCAGCTACCCAGTGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCGTGCCTCTCACGCCTACCCGACTCATGTGAGGACTTCGTTCTCACAGTTCAGAGCAGCATGAACATTAGGTGCGGTTCCCTTATGAAAAGCTTCCATGGCGGATGGGTCAACCA
          80          90          100          110          115
AspSerLysIleGlyArgIleTyrHisSerAspThrGlyGlyThrThrThrGluAspAlaLeuAsnValLeuSerProAspAsnLysSerTyrIleIleGlyTyrMetCysValTyr EPII.44
GACTCCAAGATTGGAAGGATCTACCACAGCGACACTGGTGGAGGTACCACCACCGAGAATCGCGCTCAACGTAATCTCCCTGACAACAAGAGCTACATCATCGGATACATGTGGTGTAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGAGTTCTAACCCTCCTAGATGGTGTGCGTGTGACCACCTCCATGGTGGCTCTTCCGCGAGTGCATGAGAGGGGACTGTTGTTCTCGATGTAGTACGCTATGTACACGCACATG
          120          130          140          150
AspGluAspLysLysGlyHisGluAspValTrpValLeuSerArgSerMetValLeuThrGlyGluAlaLysThrAlaValGluAsnTyrLeuIleGlySerProValValAspSer EPII.44
GACGAGGACAAGAAGGGGCACGAGGACGATGTCTGGTGTCTCCAGAAGCATGGTCTTACTGGTGAAGCCAAGACCGCTGTCGAGAATACCTTATCGGCTCCCGAGTACGACTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGCTCCTGTTCTCCCGTGTCTTCCGTAACAGACCCACGAGAGGTCTTCTGTAACAGGAATGACCACCTTCGGTTCGGCGACAGCTCTTGATGGAATAGCCGAGGGGTATCAGCTGAGG
          160          170          174          Strep-tag II
GlnLysLeuValTyrSerAspPheSerGluAlaAla Cys LysValAsnAsnSerAsnTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd EPII.44
CAGAACTGATATACACTGACTTCTCTGAAGCCGCTGCAAGGTCAACAATAGCAACTGGTCTCACCCGCACTTCGAAAAATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCTTTGACCATATGTCACGTGAAGAGACTTCGGCGGAGCTTCCAGTTCGTTATCGTTGACCAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTTATT
          160          170          174          Strep-tag II
          GAGACTTCGGCATCGGTCCAGTTGT :ZL3
          Ser

```

Abbildung 36: DNA-Sequenzen der für den Austausch von Cysteinresten verwendeten Oligodesoxynukleotide zusammen mit der Sequenz des EPII.44-Strukturgens. Der Ausschnitt der Gensequenz des Vektors pBBP21 beginnt innerhalb der OmpA-Signalsequenz (unterstrichen) und endet mit einem Stoppcodon, das sich an die Sequenz des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels (unterstrichen) anschließt. Die Position der Aminosäurereste in EPII.44 ist oberhalb der Sequenz angegeben, zusätzlich geben die Zahlen am Zeilenende die Position der Nukleotide im Vektor pBBP21 an. Die für die gerichtete Mutagenese verwendeten Oligodesoxynukleotide sind unterhalb der Gensequenz angegeben, wobei komplementäre Bereiche blau und mutierte Bereiche mit den dazugehörigen Aminosäuren rot dargestellt sind. Vier gezielt in das Wildtyp-BBP eingeführte Aminosäuresubstitutionen (Abschnitt 1.3; Asp1, Gln21, Ser87 und Met135) sind lila (Beste *et al.*, 1999) und die gegenüber BBP ausgetauschten Aminosäuren sind grün gekennzeichnet.

Das Anticalin wurde aus der periplasmatischen Zellfraktion mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration unter Verwendung des GF-Puffers (Abschnitt 2.5.1.4) gereinigt. Dabei eluierte die Mutante EPII.44CC von der Gelfiltrationssäule bei einem Volumen, welches einer Molmasse von 51 kDa entspricht. Eine Probe der Elutionsfraktion wurde mithilfe der SDS-PAGE unter reduzierenden sowie nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert (Abbildung 37).

EPII.44CC zeigte im reduzierten Zustand eine zum Wildtyp-BBP erniedrigte elektrophoretische Mobilität. Dasselbe wurde auch schon für die Mutante EPII.44 beobachtet (Abbildung 35). Die nicht reduzierte Proteinprobe von EPII.44CC wies zwei Proteinbanden auf. Die Bande a erschien auf der halben Höhe zwischen den Proteinbanden für das Wildtyp-

BBP unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Das kann durch eine im Vergleich zum Wildtyp-BBP weniger kompakte Form der durch SDS denaturierten Polypeptidkette durch die Anwesenheit nur einer Disulfidbrücke (Cys8-Cys115) erklärt werden. Die Proteinbande b trat ausschließlich bei der nicht reduzierten Proteinprobe EPII.44CC auf. Sie zeigte eine apparente Molmasse von ca. 41 kDa auf, was einem Dimer von EPII.44CC entsprechen würde. In Verbindung mit dem oben genannten Elutionsvolumen bei der Gelfiltration ergibt sich, dass die Proteinbande b einem kovalenten Dimer und die Proteinbande a einem nicht-kovalenten Dimer entspricht.

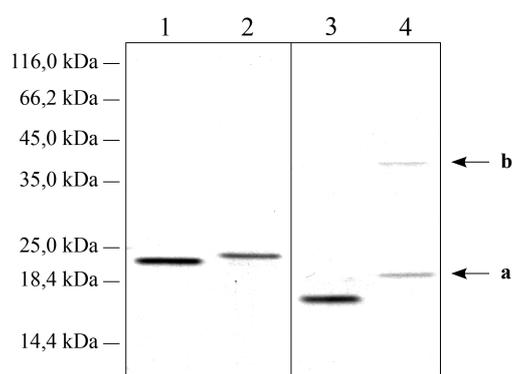


Abbildung 37: Analyse der gereinigten BBP-Variante EPII.44CC in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteinproben der Spuren 1 bis 2 wurden vor der Elektrophorese mit Mercaptoethanol behandelt, die Proben der Spuren 3 bis 4 wurden nicht reduziert: BBP (Spur 1 und 3) und EPII.44CC (Spur 2 und 4). Die mit Buchstaben a und b markierten Pfeile auf der rechten Seite des Gels kennzeichnen die beiden im Text genannten Proteinbanden in der Spur 4. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

3.4.2 Entfernung der beiden Disulfidbrücken C42-C170 und C8-C115 (Variante EPII.44C4)

Um die Ausbildung eines kovalenten Dimers in der Variante EPII.44CC weiter zu unterbinden und dadurch eine homogene Proteinpräparation zu erhalten, wurden im zweiten Schritt die Cysteinreste der Disulfidbrücke Cys8-Cys115 durch Serin ausgetauscht. Die auf diese Weise erzeugte Cystein-freie Mutante wurde mit EPII.44C4 bezeichnet (vgl. Abbildung 36).

Diese Mutante wurde zunächst im *E. coli* Stamm JM83 produziert (Abschnitt 2.4.2) und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt. Wie im Fall von EPII.44 neigten auch hier die Zellen während der Induktionphase zur Lyse. Daher wurde die Zellernte nach 2,5 Stunden Induktion eingeleitet. Nach der affinitätschromatographischen Reinigung waren noch einige kleinere Proteinverunreinigungen auf einem SDS-Polyacrylamidgel nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zur BBP-Variante EPII.44 wurde allerdings eine

Steigerung der Ausbeute von 150 µg/l auf 315 µg/l Kulturmedium erreicht. Um das Ausmaß an Zelllyse während der Induktionsphase und an Protein-Verunreinigungen in der Proteinpräparation zu erniedrigen, wurden die Expressionsbedingungen optimiert. Die besten Ergebnisse wurden wie schon im Fall von EPII.44CC mit dem *E. coli* Stamm KS272/pTUM4 erreicht, wobei die Ausbeute nach 2,5-stündiger Induktion 750 µg/l Kulturmedium betrug.

Für die Produktion größerer Proteinmengen wurde die Mutante EPII.44C4 mithilfe eines *Fed-Batch* Fermentationsverfahrens (Abschnitt 2.4.3) unter Verwendung eines synthetischen Glucose/Mineralsalzmediums hergestellt (Schiweck & Skerra, 1995). Als Wirtsorganismus wurde dabei der *E. coli* Stamm KS272, der mit den Vektoren pBBP21-EPII.44C4 und pTUM4 transformiert worden war, verwendet.

Dabei zeigten die Zellen ein exponentielles Wachstum (Abbildung 38A) und hatten nach ca. 18 h Stunden einen OD₅₅₀-Wert von 21 erreicht, woraufhin die Induktion der Genexpression mit 0,5 mg aTc pro Liter Kultur erfolgte. Nach 2,25 Stunden Induktion traten erste Anzeichen von Zelllyse auf, und die Zellernte wurde begonnen. Die erreichte Zelldichte betrug 34. Das Protein wurde mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraktion isoliert (Abbildung 38B). Die Ausbeute aus der Fermentation im 8 l-Maßstab betrug nach dem ersten Reinigungsschritt ca. 200 mg.

Um verbliebene Proteinverunreinigungen abzutrennen (Abbildung 38B, Spur 3), wurden Versuche mit Anionenaustausch- bzw. Gelpermeations-Chromatographie durchgeführt.

Die Anionenaustausch-Chromatographie wurde wie im Abschnitt 2.5.1.4 beschrieben mit dem Laufpuffer AX2-L (20 mM NaPi pH 5,5) durchgeführt. Das Protein EPII.44C4 mit einem kalkulatorischen isoelektrischen Punkt von 4,6 wurde unter diesen Bedingungen an der Säule zurückgehalten und konnte mit einem linearen Salzgradienten bei einer NaCl-Konzentration von 327 mM von der Säule eluiert werden (Abbildung 38C). Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abbildung 38B, Spur 4) zeigte, dass dabei alle Verunreinigungen bis auf eine schwache Bande mit einer apparenten Molmasse von ca. 17 kDa abgetrennt wurden. Die Molmasse für die so isolierte Mutante EPII.44C4 wurde mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie zu 20697,0 Da bestimmt, was in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretisch berechneten Molmasse von 20696,4 Da für die prozessierte Form steht. Für die verbliebene Proteinverunreinigung wurde eine Molmasse von 17223,0 Da ermittelt. Dies könnte einem proteolytischen Fragment der Mutante EPII.44C4 mit der Aminosäuresequenz von Ala30 bis Lys184 und einer theoretisch bestimmten Masse von 17222,7 Da entsprechen. Dies wurde durch die N-terminale Sequenzierung der ersten 10 Aminosäurereste bestätigt.

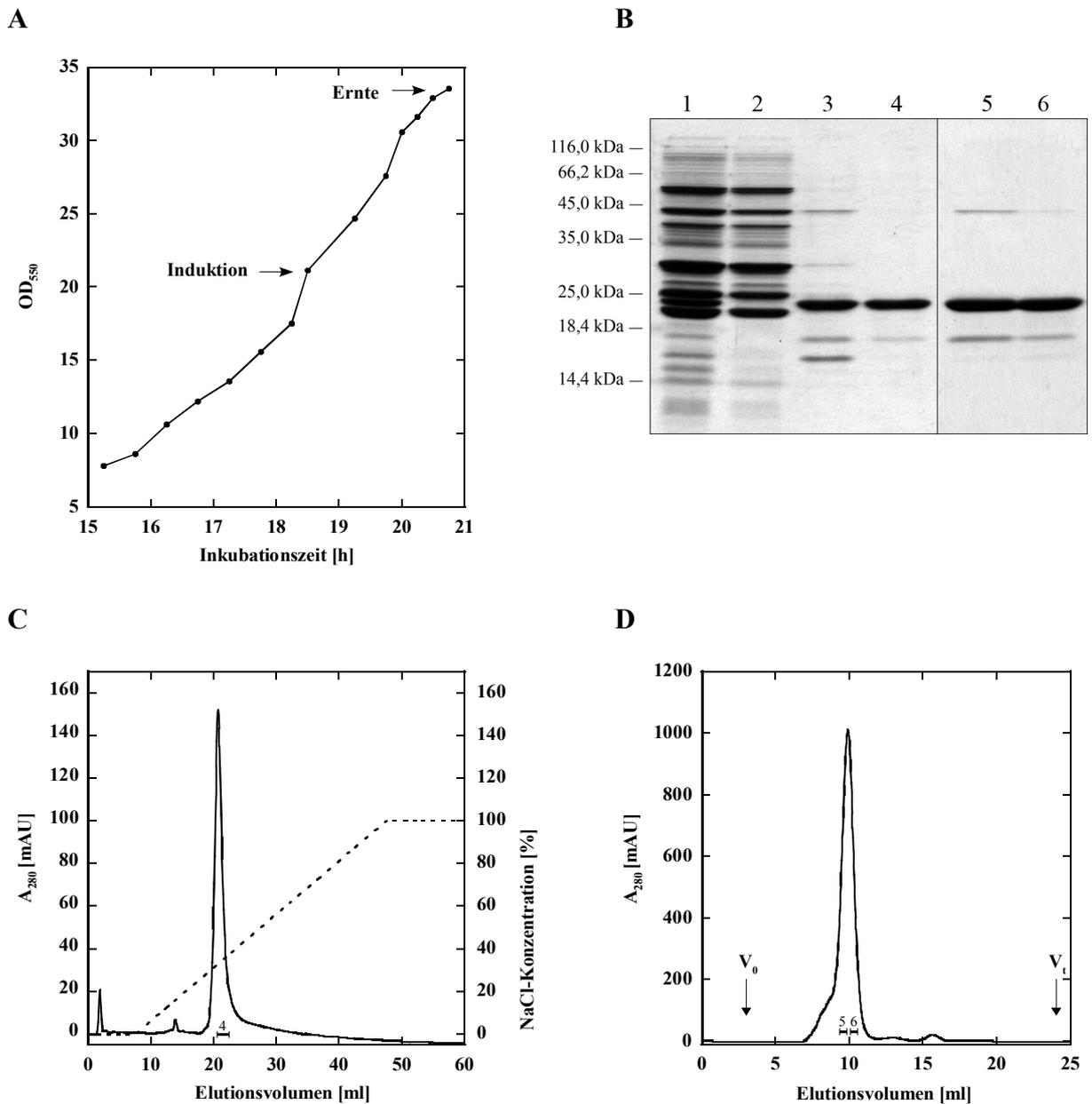


Abbildung 38: Produktion der BBP-Variante EPII.44C4 mithilfe von KS272/pTUM4/pBBP21-EPII.44C4 im 8 l-Fermenter unter Verwendung eines Glucose/Mineralsalz-Mediums mit Ampicillin und Chloramphenicol als Antibiotika. **(A)** Das Wachstum der Kultur wurde durch halbstündliche Messung der optischen Dichte bei 550 nm dokumentiert. Die Expression der Gene für das EPII.44C4 wurde bei $OD_{550} = 21,15$ induziert und die Zellen 2,25 h Stunden nach der Induktion mittels Zentrifugation geerntet. **(B)** Dokumentation der Reinigung des EPII.44C4 aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von **(A)** auf einem 15 %igen SDS-Gel (reduzierend). Aufgetragen wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (1), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (2), des Eluates aus der Streptavidin-Affinitätschromatographie (3) und des mittels Anionenaustausch-Chromatographie (4) sowie des mittels Gelfiltration gereinigten Proteins (5,6). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. **(C)** Elutionsprofil der Reinigung des EPII.44C4 nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Die ansteigende NaCl-Konzentration im Elutionsgradienten von 0 bis 1 M ist markiert (rechte Skala). **(D)** Elutionsprofil der Reinigung des EPII.44C4 nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration.

Ein Teil der mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isolierten Proteinpräparation wurde einem Gelpermeations-Chromatographie-Versuch mit dem GF-Laufpuffer (50 mM NaPi, 150 mM NaCl pH 7.5) unterzogen (Abschnitt 2.5.1.3; Abbildung 38D). Die Mutante EPII.44C4 wurde bei einem Elutionsvolumen eluiert, welches einer Molmasse von 41 kDa entspricht. Proben der Elutionsfraktion wurden auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 38B). Dabei zeigte sich, dass die Elutionsfraktion zusätzlich zum EPII.44C4-Protein zwei Proteinverunreinigungen mit Molmassen von ca. 17 kDa bzw. ca. 45 kDa enthielt. Die erste Proteinverunreinigung könnte das oben bereits erwähnte proteolytische Fragment der Mutante EPII.44C4 darstellen. Bei der letzteren hingegen könnte es sich um die Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase SurA handeln, die auf dem Plasmid pTUM4 codiert ist.

Zum Vergleich wurden die BBP-Varianten EPII.44 und EPII.44C4 auf einem weiteren 15 %igen SDS-PAGE aufgetragen. Mutante EPII.44C4 zeigte sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen das gleiche Laufverhalten (Abbildung 35, Spuren 3 und 6) mit einer Bande bei ca. 22 kDa. Diese zeigte die gleiche Mobilität wie die Proteinbande für die Variante EPII.44 unter reduzierenden Bedingungen.

Die Reinigungsversuche mit Anionenaustausch-Chromatographie lieferten eine sauberere Proteinpräparation (Abbildung 38B). In den Fluoreszenztitrations-Versuchen zeigte die auf diese Weise gereinigte Proteinvariante jedoch eine um den Faktor 4 höhere Dissoziationskonstante als eine nur mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigte Proteinpräparation (Daten nicht gezeigt). Das könnte auf eine partielle Deaktivierung des Proteins bei dem verwendeten niedrigen pH von 5,5 bei der Reinigung zurückzuführen sein. Daher wurde für die Charakterisierung der Liganden-Bindungseigenschaften die Gelpermeations-Chromatographie als zweiter Reinigungsschritt angewendet.

3.4.3 Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von EPII.44C4

Um den Oligomerisierungsstatus von EPII.44C4 zu bestimmen, wurden Experimente mittels Gelpermeations-Chromatographie und chemischer Quervernetzung durchgeführt.

Die Gelfiltrations-Versuche wurden mit Lösungen von EPII.44C4 – bzw. von Wildtyp-BBP als Kontrolle – unter standardisierten Pufferbedingungen mit dem GF-Laufpuffer durchgeführt (Abschnitt 2.5.1.3). Die Proteinproben wurden auf eine analytische Superdex 75 HR-Gelpermeationssäule, die zuvor mit 5 Markerproteinen kalibriert worden war, aufgetragen (Abbildung 39). Dabei zeigte sich, dass die Retentionszeit der rekombinanten Variante EPII.44C4 kürzer als die des Bilin-Bindungs-Proteins war. EPII.44C4 eluierte als Dimer von der Säule bei einer apparenten Molmasse von 40,7 kDa. Dies stimmt gut mit der kalkulatorischen Molmasse von 41,4 kDa (entsprechend 2 x 20,7 kDa für das Monomer) überein.

In einem weiteren Schritt wurde die Oligomerisierung der Variante EPII.44C4 durch die chemische Quervernetzung über Lysinseitenketten untersucht. Dabei wurde das rekombinante Protein mit Disuccinimidylsuberat (DSS) umgesetzt (Abschnitt 2.5.7) und durch 15 %ige SDS-PAGE analysiert (Abbildung 39B). Die dimere Form des Proteins wurde als eine prominente Bande bei etwa 42 kDa sichtbar. Auf der Höhe des unvernetzten Monomers war nur ein leichter Schatten erkennbar. Als Kontrolle wurde auf demselben Gel eine Probe des nicht-quervernetzten Proteins aufgetragen, das nur eine starke Bande bei ca. 22 kDa zeigt. Demzufolge tritt die cysteinfreie BBP-Variante EPII.44C4 in Lösung als nicht-kovalentes Dimer auf.

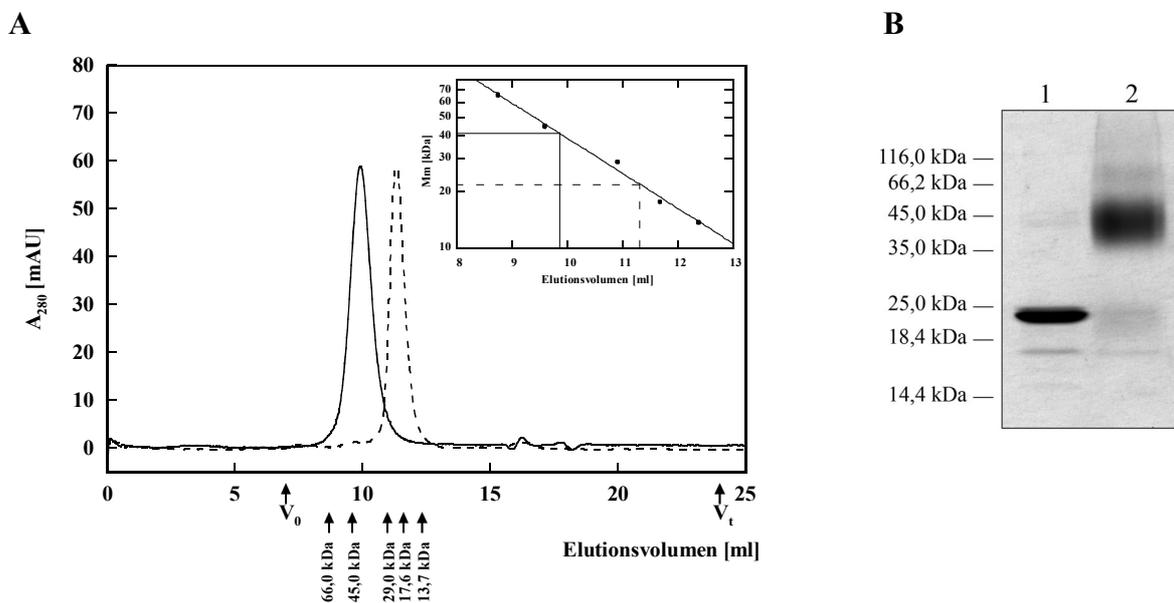


Abbildung 39: Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens von EPII.44C4. **(A)** Überlagerung der Elutionsprofile der analytischen Gelfiltration von rekombinantem Wildtyp-BBP (gestrichelte Linie) und dessen Variante EPII.44C4 (durchgezogene Linie). In *E. coli* produzierte und mittels Streptavidin-Affinitäts- sowie Gelpermeations-Chromatographie gereinigte Proteinlösungen wurden auf eine Superdex 75 HR 10/30-Gelpermeationssäule aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit GF-Puffer als Laufpuffer aufgetrennt. Gleichzeitig wurde die Absorption der eluierten Lösung bei 280 nm in einem Durchflussphotometer gemessen. V_0 und V_t bezeichnen das Ausschluss- bzw. das Bettvolumen der Säule. Die Pfeile bezeichnen das jeweilige Elutionsvolumen der entsprechenden Markerproteine: Ribonuklease A, 13,7 kDa; Myoglobin, 17,6 kDa; Carboanhydrase, 29 kDa; Ovalbumin, 45 kDa; BSA, 66 kDa. Das Kleinbild zeigt das Diagramm von $\log M_m$ der Markerproteine als Funktion ihrer Elutionsvolumina, das zur Bestimmung der Molmasse von EPII.44C4 verwendet wurde. BBP eluierte von der Säule mit dem Retentionsvolumen von 11,3 ml, was einer Masse von 21,8 kDa entspricht, während EPII.44C4 ein Retentionsvolumen von 9,8 ml, einer Masse von 40,7 kDa entsprechend, zeigte. **(B)** Analyse von EPII.44C4 auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach chemischer Quervernetzung. Dazu wurde die gereinigte Proteinlösung mit Disuccinimidylsuberat (DSS) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Spur 1: gereinigtes EPII.44C4 vor der Quervernetzung; Spur 2: quervernetztes EPII.44C4. Die aus der Aminosäuresequenz kalkulierte Molmasse der BBP-Variante EPII.44C4 betragen 20,7 kDa für das Monomer bzw. 41,4 kDa für das Dimer. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

3.4.4 Untersuchung der Liganden-Bindungseigenschaften von EPII.44C4 mittels ELISA und *Western Blot*

Die BBP-Variante EPII.44C4 wurde in einem ELISA auf ihre Liganden-Bindungseigenschaften zum His₆-tag analysiert und mit EPII.44 sowie Wildtyp-BBP als Kontrolle verglichen (Abbildung 40). Dazu wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und anschließend mit einer Verdünnungsreihe der jeweiligen BBP-Variante in Gegenwart von Ni²⁺ inkubiert. Die Variante EPII.44C4 zeigte dabei deutlich höhere konzentrationsabhängige Bindungssignale als die Variante EPII.44 und eine um den Faktor 10 niedrigere apparente Dissoziationskonstante von $1,6 \pm 0,1$ nM.

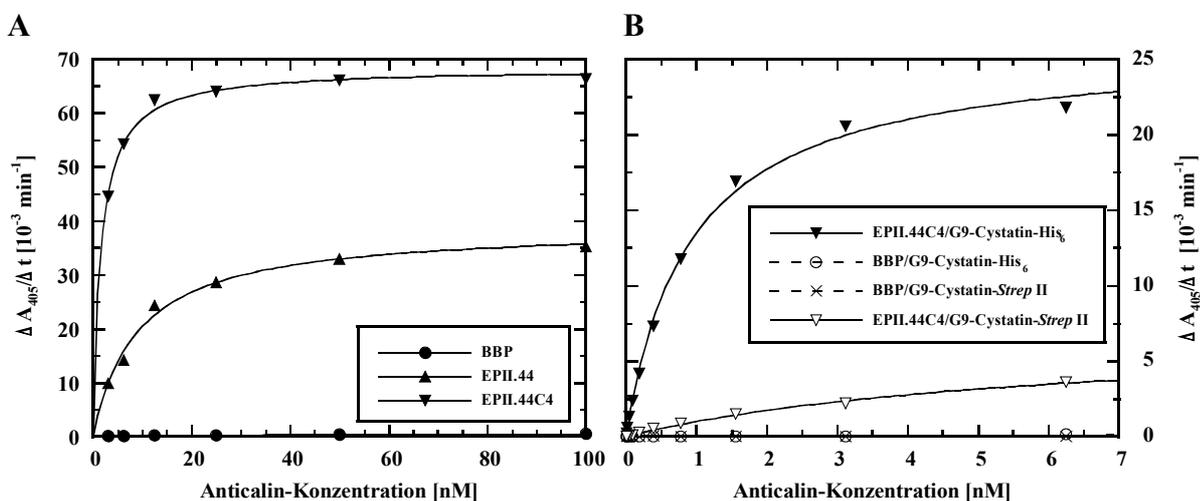


Abbildung 40: ELISAs zur Untersuchung der Liganden-Bindungsaktivität der BBP-Variante EPII.44C4 im Vergleich zum Wildtyp-BBP und EPII.44. **(A)** Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des Anticalins in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ appliziert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mithilfe des *Strep*-tag II mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. **(B)** Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ bzw. G9-Cystatin-*Strep* II beschichtet und mit einer Verdünnungsreihe des jeweiligen Anticalin-Digoxigenin-Konjugates in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ inkubiert. Gebundenes rekombinantes Protein wurde anschließend mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Anticalins aufgetragen. Die Anpassung der Messwerte erfolgte mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (5).

Um zu demonstrieren, dass die Affinität von EPII.44C4 zu G9-Cystatin-His₆ auf der Wechselwirkung mit dem His₆-tags beruht, wurde ein ELISA durchgeführt, bei dem die Mikrotiterplatte mit dem rekombinanten G9-Cystatin-His₆ bzw. mit G9-Cystatin-*Strep* II beladen wurde (Abbildung 40). Anschließend wurde die Platte mit einer Verdünnungsreihe von digoxigeniertem EPII.44C4 in Gegenwart von Ni²⁺ inkubiert. Das gebundene

rekombinante Protein wurde mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Für die Bindungsaktivität der Variante EPII.44C4 gegenüber G9-Cystatin-His₆ konnten erneut konzentrationsabhängige Signale gemessen werden. Die daraus resultierende apparente Dissoziationskonstante von $0,92 \pm 0,06$ nM stimmte gut mit der im vorherigen Bindungsexperiment ermittelten K_D überein. Im Fall des G9-Cystatin-*Strep* II konnte nur eine geringe Hintergrund-Bindungsaktivität detektiert werden.

Die praktische Verwendbarkeit von EPII.44C4 als Reagens zur Detektion von mit dem His₆-tag markierten rekombinanten Proteinen wurde in einem *Western Blot*-Experiment überprüft (Abbildung 41). Dazu wurden unterschiedliche rekombinante Proteine, BBP-His₆, F_{ab}-Fragment IN1-His₆ (präpariert von H. Zander), mB7.1-His₆ (präpariert von G. Haug) und G9-Cystatin-His₆, nicht markierte Proteine (BSA und Ovalbumin) sowie ein Gesamtzellextrakt von *E. coli* JM83/pBBP25 mit dem Wildtyp-BBP-His₆ auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Die Oberfläche der Membran wurde mit Magermilchpulver abgesättigt und mit einer Lösung von EPII.44C4-Digoxigenin-Konjugat in Gegenwart von Ni²⁺ inkubiert. Die Anfärbung der gebundenen Proteine erfolgte durch anschließende Inkubation mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat und chromogene Reaktion. In einem Kontrollexperiment wurde eine identische Membran mit Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat entwickelt.

Das Experiment ergab, dass die BBP-Variante EPII.44C4 alle gereinigten rekombinanten Proteine mit dem His₆-tag band, während nicht markierte Proteine nicht erkannt wurden. Im Fall des Wildtyp-BBP-His₆ im Gesamtzellaufschluss von *E. coli* JM83 wurden zwei Banden detektiert, wobei die obere höchstwahrscheinlich die unprozessierte Form (als Fusion mit der *OmpA*-Signalsequenz) und die untere das mature Protein darstellt. Weiterhin wurde von EPII.44C4 eine dritte Bande im Gesamtzellextrakt angefärbt. Diese wurde unter vergleichbaren Bedingungen auch von Ni-NTA erkannt, was auf einen ähnlichen Erkennungsmodus der beiden Detektionsreagenzien hindeutet. Bei der dritten Bande könnte es sich um das Ni²⁺-bindende Protein Whp/SlyD handeln (Wülfing *et al.*, 1994). Diese cytoplasmatische Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase mit einer C-terminalen Metallbindungsdomäne von 50 Aminosäuren wurde schon früher als typische Verunreinigung bei der Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* mittels IMAC beschrieben.

Demzufolge zeigt die BBP-Variante EPII.44C4 eine spezifische Bindung von Oligohistidinsequenzen und ist als Nachweisreagenz für mit dem His₆-tag markierte Proteine in ELISA- und *Western Blot*-Experimenten geeignet.

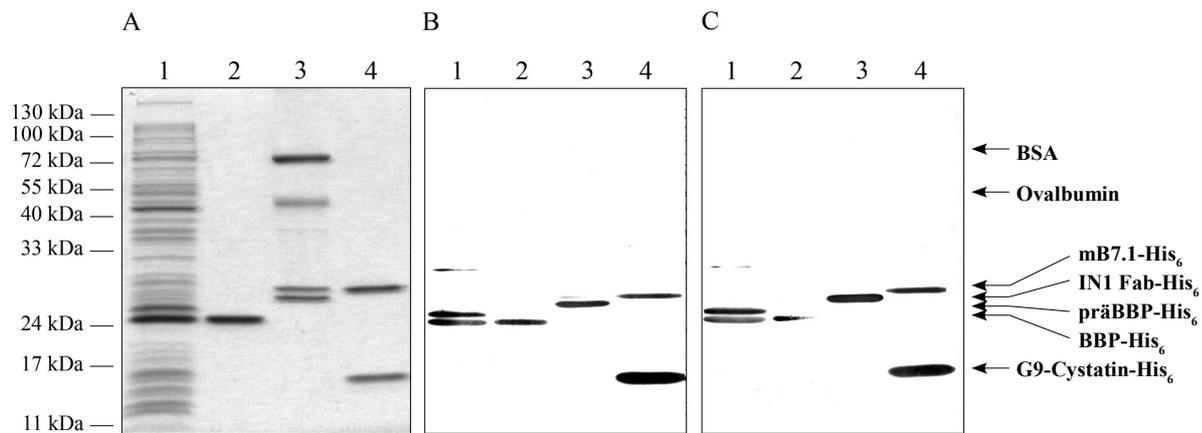


Abbildung 41: Nachweis des His₆-tags mithilfe von EPII.44C4 auf dem *Western Blot*. **(A)** Auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden folgende Proben aufgetrennt: Gesamtzellaufschluss von *E. coli* JM83/pBBP25 mit Wildtyp-BBP-His₆ (Spur 1), gereinigtes rekombinantes Wildtyp-BBP-His₆ (Spur 2), ein Gemisch von BSA, Ovalbumin und rekombinatem F_{ab}-Fragment (HC-His₆) des Antikörpers IN1 (Spur 3), Gemisch von rekombinatem mB7-1-His₆ und G9-Cystatin-His₆ (Spur 4). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. **(B)** Ein Duplikat des SDS-PAGE aus (A) wurde vorbereitet und die Proteine wurden mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Die Oberfläche der Membran wurde mit Magermilchpulver abgesättigt und mit einer 100 nM Lösung von EPII.44C4-Digoxigenin-Konjugat in Gegenwart von 1 mM Ni²⁺ inkubiert. Das gebundene Anticalin wurde anschließend mit Anti-Digoxigenin-F_{ab}-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch chromogene Reaktion von NBT und BCIP nachgewiesen. **(C)** Zum Vergleich wurde eine identische Nitrozellulose-Membran nur mit Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat inkubiert und analog angefärbt.

3.4.5 Untersuchung der Liganden-Affinität von EPII.44C4 mittels Fluoreszenztitration

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) in Lösung für den Komplex aus der BBP-Variante EPII.44C4, einem synthetischen His₆-Peptid und einem Ni²⁺-Ion wurde mithilfe der Fluoreszenztitration nach einer im Prinzip etablierten Methode (Voss & Skerra, 1997) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Änderung der Trp-Fluoreszenzeigenschaften des Proteins infolge der Komplexbildung (Abschnitt 2.7.2). Das synthetische Hexahistidinpeptid (Abz-His₆) trug am N-Terminus eine 2-Aminobenzoylgruppe, die als Resonanz-Energie-Akzeptor diente.

Zur Fluoreszenztitration wurde eine 1 μM Proteinlösung der BBP-Variante EPII.44C4 in TBS, welche mit einer NiSO₄-Stammlösung auf die gewünschte Ni²⁺-Konzentration gebracht wurde, mit einer 1 mM Lösung des Liganden in TBS titriert. Für die Messung der Fluoreszenztitration in Abwesenheit von Ni²⁺, wurde die Proteinlösung auf eine 1 mM EDTA-Konzentration eingestellt, um möglichst alle in der Lösung vorhandenen zweiwertigen Metallionen zu komplexieren.

Bei der Titration von EPII.44C4 mit Abz-His₆ in Gegenwart von Ni²⁺ (Abbildung 42) nahm die Proteinfluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen Liganden ab (*Quenching*). Bei einer 100 μM Ni²⁺-Konzentration wurde eine Dissoziationskonstante von $8,2 \pm 0,2$ μM für das Abz-His₆-Peptid ermittelt. Diese war erheblich höher als die im ELISA bestimmte apparente K_D zum G9-Cystatin-His₆-tag (vgl. Abschnitt 3.4.4).

In einem weiteren Titrationsexperiment wurde die Ni²⁺-Konzentration auf 1 μM herabgesetzt und eine analog konzentrierte Proteinlösung eingesetzt. Bei der Zugabe des Abz-His₆-Peptids wurde eine starke Abnahme der Proteinfluoreszenz detektiert. Der beobachtete *Quenching*-Effekt lag bei 65 % und die Dissoziationskonstante wurde zu $1,90 \pm 0,12$ μM ermittelt.

Bei der Titration von EPII.44C4 mit Abz-His₆ in Abwesenheit von Ni²⁺ konnte dagegen keine signifikante Abnahme der Proteinfluoreszenz gemessen werden, was die Ni²⁺-Abhängigkeit der Wechselwirkung bestätigt.

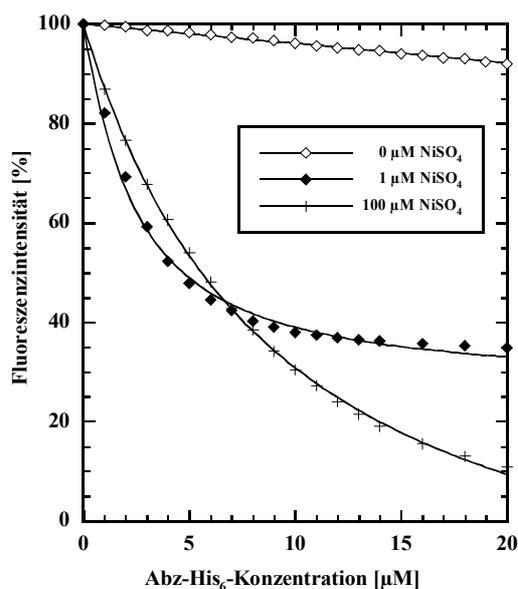


Abbildung 42: Fluoreszenztitration von EPII.44C4 mit dem Abz-His₆-Peptid bei verschiedenen NiSO₄-Konzentrationen. Das Protein wurde in *E. coli* produziert und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Die 1 μM Proteinlösung in TBS/NiSO₄ wurde mit einer Liganden-Stammlösung in H₂O titriert und die Abnahme der Proteinfluoreszenz (Anregungswellenlänge = 280 nm, Emissionswellenlänge = 340 nm) in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration verfolgt. Die Messwerte wurden auf einen Ausgangswert von 100 % skaliert und mittels nichtlinearer Regression gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst (siehe Abschnitt 2.7.2).

3.5 Herstellung eines Fusionsproteins aus einer BBP-Variante und der TEM1 β -Lactamase

In ELISAs und *Western Blot*-Experimenten wurde gezeigt, dass die BBP-Variante EPII.44C4 ein geeignetes Nachweisreagenz für mit dem His₆-tag markierte Proteine darstellt (Abschnitt 3.4.4). Um eine bequeme Ein-Schritt-Detektion der Antigenbindung zu ermöglichen, sollte ein Fusionsprotein aus diesem Anticalin und einem Reporterenzym als bioanalytisches Nachweisreagenz produziert und getestet werden. Erfolgreich wurde das schon am Beispiel der Digoxigenin bindenden Anticaline DigA16 und DigA16/19 mit der Alkalischen Phosphatase demonstriert (Schlehuber, 2001).

Als Reporterenzym wurde hier die β -Lactamase, ein relativ kleines (ca. 30 kDa) und sehr stabiles Protein, ausgewählt. β -Lactamasen sind äußerst effiziente Enzyme. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung der Amidbindung im β -Lactamring. Einige Vertreter der Klasse A β -Lactamasen (TEM1, *Bacillus cereus* I, *Bacillus licheniformis*) werden bei der Umsetzung geeigneter Substrate als „perfekte“ Enzyme betrachtet, deren Umsatzrate nur von der Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates bei der Substratsättigung begrenzt ist (Christensen *et al.*, 1990). Im Gegensatz zur Alkalischen Phosphatase sind diese Enzyme in Säugetieren nicht vorhanden und könnten daher für therapeutische Anwendungen zur *Prodrug*-Aktivierung in Betracht kommen (McDonagh *et al.*, 2003).

Die TEM1 β -Lactamase (EC 3.5.2.6.) ist verantwortlich für die Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika bei der Behandlung bakterieller Infektionen (Frère, 1995). In der Molekularbiologie wird sie als ein wichtiger Selektionsmarker verwendet. Die Struktur und die Funktion der TEM1 β -Lactamase wurden in mehreren Studien untersucht (Strynadka *et al.*, 1992; Jelsch *et al.*, 1993; Minasov *et al.*, 2002).

Die Verwendung der β -Lactamase als Reporterenzym in ELISA-Experimenten wurde nur in Einzelfällen untersucht (Khatkhatay & Desai 1999), obwohl drei chromogene Substrate CENTA (Jones *et al.*, 1982b), PADAC (Jones *et al.*, 1982a) und Nitrocefin (O'Callaghan *et al.*, 1972) kommerziell verfügbar sind. Zudem wurde eine Reaktion beschrieben, die zur Bildung eines chromogenen Präzipitates führt, es wurden jedoch keine Anwendungen für den *Western Blot* publiziert (Bieniarz *et al.*, 1992a; Bieniarz *et al.*, 1992b).

Die TEM1 β -Lactamase wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra bereits erfolgreich als Rezeptorenzym in einem Fusionsprotein mit dem F_{ab}-Fragment des Anti-Lysozym-Antikörpers D1.3 eingesetzt (Fiedler, 2002).

3.5.1 Gentechnische Produktion des Fusionsproteins in *E. coli*

Zur Produktion von Fusionsproteinen mit der bakteriellen β -Lactamase (*bla*) wurden in der Arbeitsgruppe zwei Vektoren konstruiert. Vektor pBBP33 codiert für das Anticalin-*Strep*-tag II- β -Lactamase Fusionsprotein, während im Vektor pBBP34 die β -Lactamase als Linker zwischen dem Anticalin und dem *Strep*-tag II angeordnet ist. Versuche zur Proteinproduktion von Digoxigenin bindenden BBP-Varianten DigA16 und DigA16/19 (Schlehuber, 2001) mit beiden Vektoren haben ergeben, dass im Falle des Plasmids pBBP34 (Abbildung 43A) die Fragmentierung des Fusionsproteins geringer war (persönliche Mitteilung von J.-P. Mayer). Daher wurde dieses Plasmid für die Produktion von His1 Δ C*- β -Lactamase Fusionsprotein ausgewählt.

Zur bakteriellen Produktion des Fusionsproteins aus der BBP-Variante His1 Δ C* und der β -Lactamase wurde das Strukturgen von His1 Δ C* mittels der beiden *Bst*XI-Schnittstellen aus dem Plasmid pBBP21 auf dem Expressionsvektor pBBP34 subkloniert. Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* JM83 produziert (Abschnitt 2.4.2) und mittels Strepavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Die Ausbeute betrug typischerweise 25 μ g/l Kulturmedium. Zur Analyse wurde das gereinigte Protein auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abbildung 43B).

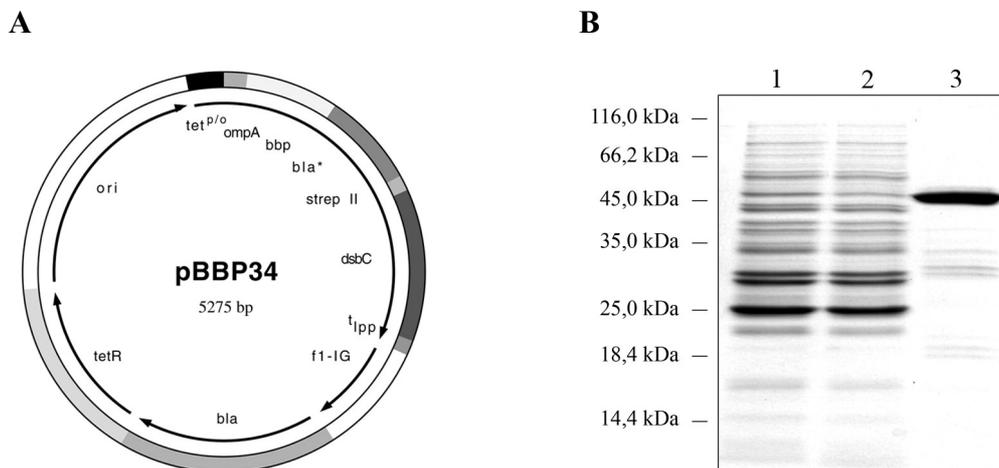


Abbildung 43: Produktion von His1 Δ C*-Bla in *E. coli* JM83/pBBP34. **(A)** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pBBP34. Das Strukturgen für ein Fusionsprotein aus dem *OmpA*-Signalpeptid, BBP, Tri-Glycin-*Linker*, β -Lactamase und dem *Strep*-tag II steht unter der Kontrolle des *tet*-Promotors/Operators (*tet*^{P/O}). Zusätzlich befindet sich das *DsbC*-Strukturgen (*dsbC*) auf einem zweiten Cistron. Die Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 4. **(B)** Analyse der Proteinreinigung mittels SDS-PAGE. Auf ein 15 %iges SDS-Gel wurden unter reduzierenden Bedingungen jeweils 20 μ l des periplasmatischen Proteinextraktes (1), des nicht an die Säule gebundenen Proteins (2) sowie die aufkonzentrierte Elutionsfraktion (3) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

Dabei zeigte das Fusionsprotein eine einheitliche Bande mit der erwarteten Größe von ca. 50 kDa. Zusätzlich wurden leichte Kontaminationen mit kleineren Proteinen beobachtet. Das geringste Ausmaß an Verunreinigungen wurde erreicht, wenn der periplasmatische Proteinextrakt möglichst schnell weiter verarbeitet und nicht zwischenzeitlich eingefroren wurde. Interessanterweise war die Proteinpräparation des Fusionsproteins im Gegensatz zum unfusionierten His1 Δ C*-Anticalin nicht durch Skp kontaminiert, obwohl die Produktion im *E. coli* Stamm JM83 stattfand.

3.5.2 Funktionelle Analyse des Fusionsproteins und Anwendung im ELISA

Die katalytische Aktivität der β -Lactamase im Fusionsprotein mit dem Anticalin His1 Δ C* wurde mithilfe des kommerziell erhältlichen Cephalosporin-Derivates Nitrocefin (O'Callaghan *et al.*, 1972) als Substrat untersucht (Abbildung 44). Die kinetischen Parameter für die enzymatische Umsetzung von Nitrocefin durch das Fusionsprotein His1 Δ C*-Bla wurden ermittelt und mit denjenigen für die freie β -Lactamase und für das β -Lactamase-Fusionsprotein mit dem F_{ab}-Fragment des Anti-Lysozym-Antikörpers D1.3 (D1.3-F_{ab}(HC-Bla)) verglichen (Tabelle 8). Die Messungen zeigten, dass die Aktivität der β -Lactamase im Fusionsprotein mit dem Anticalin His1 Δ C* erhalten blieb. Die kinetischen Parameter des Fusionsproteins waren vergleichbar mit denen von D1.3 F_{ab}(HC-Bla).

	His1 Δ C*-Bla	D1.3 F _{ab} (HC-Bla) ^a	TEM1 β -Lactamase ^b
K _M [μ M]	51,3 (\pm 8,0)	123,4 (\pm 26)	136
v _{max} [μ M min ⁻¹]	24,4	33,0	---
k _{kat} [s ⁻¹]	40,6	22,0	---
k _{kat} /K _M [μ M ⁻¹ s ⁻¹]	0,79	0,17	---
spezifische Aktivität [μ mol min ⁻¹ mg ⁻¹]	48,8	15,8	1,06

Tabelle 8: Charakterisierung der enzymatischen Aktivität der β -Lactamase im Fusionsprotein His1 Δ C*-Bla gegenüber Nitrocefin im Vergleich mit den publizierten Daten für freie β -Lactamase und einem F_{ab}- β -Lactamase-Fusionsprotein. ^a Lysozym bindendes F_{ab}-Fragment D1.3 mit der β -Lactamase fusioniert am C-Terminus der schweren Kette (Fiedler, 2002), ^b O'Callaghan *et al.*, 1972.

In weiterer Folge wurde das Fusionsprotein His1 Δ C*-Bla in einem ELISA eingesetzt (Abbildung 44). Dazu wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit G9-Cystatin-His₆ als Antigen beladen und anschließend mit einer Verdünnungsreihe des gereinigten rekombinanten Fusionsproteins in Gegenwart von Ni²⁺ inkubiert. Gebundenes Fusionsprotein

wurde durch enzymkatalysierte Hydrolyse von Nitrocefin nach mehreren Waschschrinen direkt nachgewiesen. Dabei zeigte His1 Δ C*-Bla konzentrationsabhängige Bindungssignale mit einem Sättigungsverhalten bei höheren Konzentrationen an Fusionsprotein. In den Vertiefungen, die als Kontrolle mit BSA belegt worden waren, konnten keine Bindungssignale detektiert werden. Demzufolge wird das Bindungsverhalten des Anticalins durch dessen Kopplung an die β -Lactamase nicht beeinträchtigt.

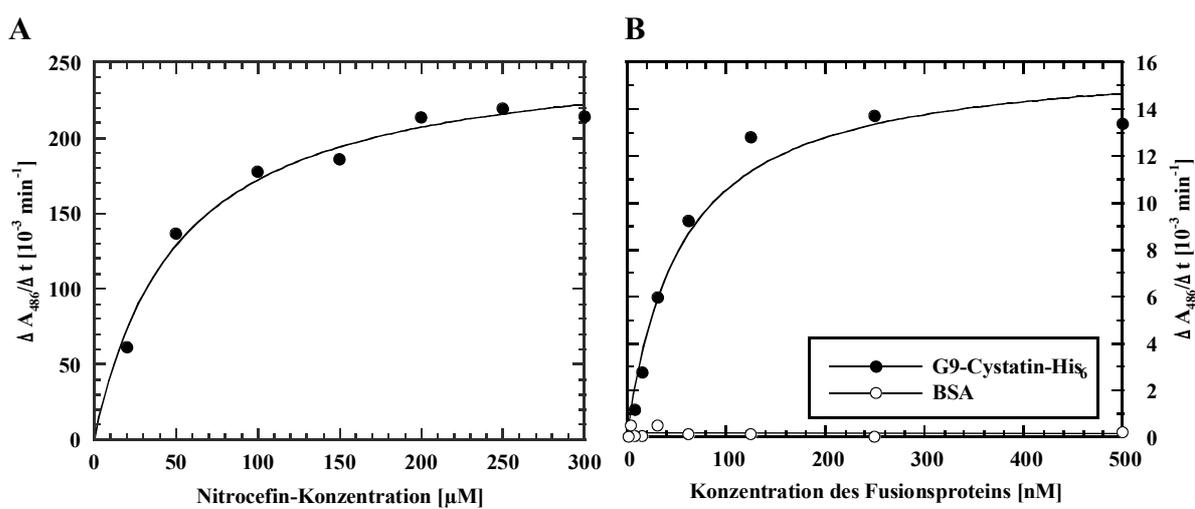


Abbildung 44: Funktionelle Analyse von Fusionsproteinen aus β -Lactamase und dem Anticalin His1 Δ C*. (A) Enzymatische Aktivität der β -Lactamase in Form des Fusionsproteins mit dem Anticalin His1 Δ C* gegenüber Nitrocefin. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe des Substrats vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 210 nM His1 Δ C*-Bla-Lösung gestartet. Die gemessene enzymatische Anfangsaktivität des Reporterenzyms ($\Delta A_{486}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Nitrocefin aufgetragen. Die Anpassung der Messwerte erfolgte mithilfe des Computerprogramms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (12). (B) ELISA zum Nachweis der funktionellen Aktivität des Fusionsproteins His1 Δ C*-Bla. Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit G9-Cystatin-His₆ beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des gereinigten Fusionsproteins in Gegenwart von 100 μM Ni²⁺ appliziert. Gebundenes rekombinantes Fusionsprotein wurde anschließend durch enzymkatalysierte Hydrolyse von Nitrocefin nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzyms ($\Delta A_{486}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Anticalins aufgetragen. Die Anpassung der Messwerte erfolgte mithilfe des Computer-programms „Kaleidagraph“ nach Gleichung (5).

3.5.3 Einsatz des Fusionsproteins zum direkten Nachweis von His₆-Gruppen auf dem Western Blot unter Verwendung eines neuartigen Substrates

Ein neues Substrat für die β -Lactamase (TIC: 7 β -(2-Thienylacetamido)-3-(indolylthioly)-3-cephem-4-carbonsäure; Abbildung 45), welches nach der enzymatischen Hydrolyse ein chromogenes Präzipitat liefert, wurde von Dr. R. Medina in der Arbeitsgruppe synthetisiert und die Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion evaluiert (Lazar *et al.*, in Vorbereitung).

Die chromogene Nachweisreaktion läuft in zwei Schritten ab (Abbildung 45). Im ersten Schritt erfolgt die enzymkatalysierte hydrolytische Spaltung des β -Lactam Ringes des **1** (TIC). Dieser folgt eine post-enzymatische Eliminierung des C3'-Thiolatsubstituenten, die ein substituiertes 1,3-Thiazin **2** und 3-Mercaptoindol **3** liefert. Im zweiten Schritt reagiert 3-Mercaptoindol **3** in einer Redoxreaktion mit NBT **4**. Dabei wird das 3-Mercaptoindol **3** zu einem Bisindolyl-3,3'-disulfid **5** oxidiert und das NBT **4** gleichzeitig zu einem chromogenen Präzipitat der Diformazanform von NBT **6** reduziert.

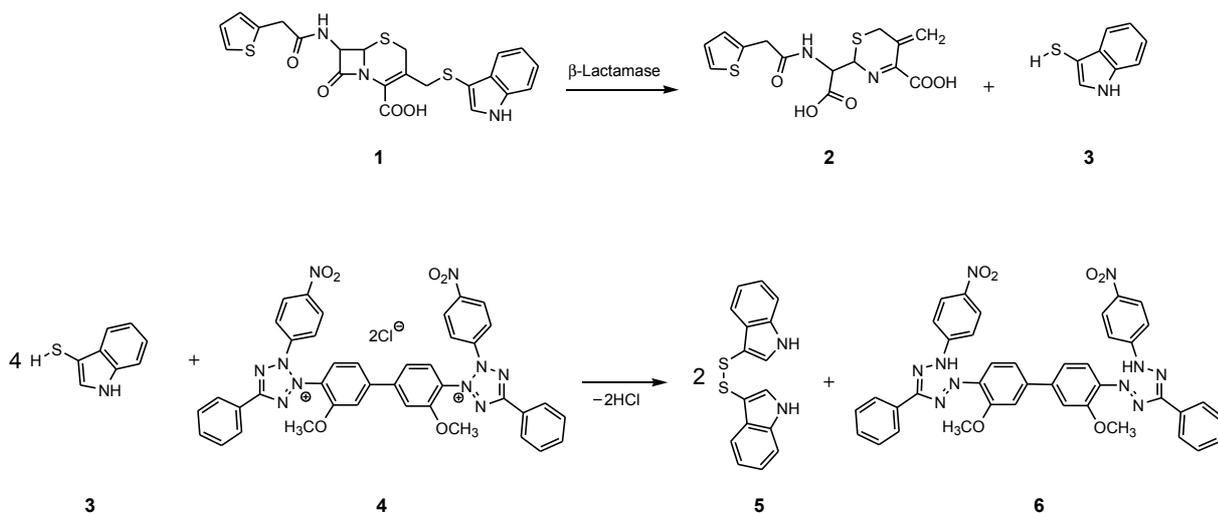


Abbildung 45: Reaktionsgleichung der β -Lactamase-katalysierten Umsetzung von TIC in Gegenwart von NBT. Die Bezeichnungen der nummerierten Substanzen 1-6 befinden sich im Text (Abschnitt 3.5.3).

In einem *Western Blot*-Experiment sollte die Anwendbarkeit dieses Substrates für Festphasen-*Assays* in Verbindung mit dem oben beschriebenen Anticalin- β -Lactamase-Fusionsprotein als immunochemisches Nachweisreagenz getestet werden. Dazu wurde ein Proteingemisch aus BSA, Ovalbumin und G9-Cystatin-His₆ auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine ImmobilonTM-P-Membran überführt. Danach wurde die Oberfläche der Membran mit BSA abgesättigt und mit einer Lösung von His1 Δ C*-Bla in Gegenwart von Ni²⁺ inkubiert. Das gebundene Fusionsprotein wurde schließlich anhand seiner katalytischen Aktivität in Gegenwart von TIC und NBT sichtbar gemacht (Abbildung 46).

Bereits nach 6 min trat eine rosa Färbung der Proteinbande von G9-Cystatin-His₆ ein. Eine verlängerte Inkubation mit dem Substrat bis zu 45 min führte noch zu keiner nennenswerten Hintergrundfärbung, wie sie sonst oft im Falle der Alkalischen Phosphatase als Reporterenzym unter Verwendung von NBT und BCIP (Blake et al., 1984) beobachtet wird. Das Fusionsprotein His1 Δ C*-Bla führte zu einem eindeutigen Signal für das gereinigte

rekombinante G9-Cystatin-His₆, während nicht markierte Proteine (BSA und Ovalbumin) nicht erkannt wurden.

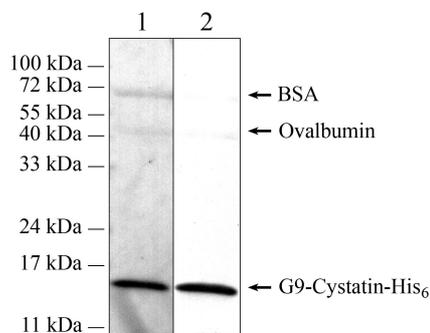


Abbildung 46: Nachweis des His₆-tags mithilfe eines Fusionsproteins aus der β -Lactamase und dem His1 Δ C*-Anticalin auf dem *Western Blot*. Auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde ein Gemisch aus BSA, Ovalbumin und G9-Cystatin-His₆ aufgetrennt. Nach Elektrotransfer der Proteine auf eine ImmobilonTM-P-Membran wurde diese mit Ponceau S-Lösung gefärbt (1). Die Oberfläche der Membran wurde mit BSA abgesättigt und mit einer 300 nM Lösung von His1 Δ C*-Bla in Gegenwart von 1 mM Ni²⁺ (2) inkubiert. Danach wurde das gebundene Fusionsprotein anhand seiner katalytischen Aktivität in Gegenwart von TIC und NBT angefärbt (Abschnitt 2.6.2).

Aus den durchgeführten Experimenten ist ersichtlich, dass das eingesetzte Fusionsprotein His1DC*-Bla sowohl bezüglich seiner Antigen-Bindungsaktivität als auch hinsichtlich seiner enzymatischen Aktivität vollständig funktionell ist und somit zum direkten Nachweis entsprechend markierter Biomoleküle verwendet werden kann. Die Anwendbarkeit der hinsichtlich des Bindungsverhaltens verbesserten Variante EPII.44C4 wurde nicht untersucht.

4 Diskussion

4.1 Komplexbildung zwischen Anticalinen, Ni^{II} und His₆-tag

Der His₆-Ni-NTA-Komplex ist das meistverbreitete Reinigungs- und Detektionssystem in der Proteinchemie. In diesem oktaedrischen Komplex belegt NTA vier Koordinationsstellen des Nickels. An die restlichen zwei Koordinationsstellen binden zwei Histidin-Reste des His₆-tags (Hearn & Acosta, 2001). Die Aufgabe dieser Arbeit war ein Anticalin zu generieren, das an die Stelle der NTA treten kann und dabei einen ternären Komplex mit Ni²⁺ und dem His₆-tag bildet. Unter der Annahme, dass die oktaedrische Geometrie dabei erhalten bleibt, bleiben in diesem Modell maximal vier Koordinationsstellen für die Ausbildung von koordinativen Bindungen des Nickels mit den Aminosäuren des Anticalins frei.

In den Proteinen gehen die Übergangsmetallionen Ni²⁺, Zn²⁺ und Cu²⁺ im Allgemeinen Koordinationsbindungen mit Elektron-Donor-Gruppen wie N-, S- und O-Atomen ein (Chao *et al.*, 1998). Dabei werden Histidin-, Cystein- und Tryptophan-Reste sowie die α -Aminogruppe am N-Terminus des Proteins bevorzugt (Hearn & Acosta, 2001).

Den häufigsten Bindungspartner stellt dabei das freie Elektronenpaar des N-Atoms des Imidazolringes von Histidin dar. Dies veranschaulicht das aktive Zentrum der Urease aus *Klebsiella aerogenes*, das zwei Ni-Atome beinhaltet. Diese gehen Koordinationsbindungen mit N-Atomen von vier Histidin-Resten, dem O-Atom der Carboxylgruppe eines Aspartat-Restes sowie mit Wasser ein (Pearson *et al.*, 1998). Zusätzlich dazu sind die Ni-Atome über ein Wassermolekül und einen modifizierten Lysin-Rest miteinander verbunden. Sie besitzen eine verzerrte oktaedrische Geometrie, da ein Ni-Atom sechsfach und das andere fünffach koordiniert ist.

Cystein ist eine schwache Lewis-Säure und bildet stabile Koordinationsbindungen mit Metallionen. In unterschiedlichen Ni-Fe-Enzymen wie der Ni-Fe-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* (Volbeda *et al.*, 1995), CO-Dehydrogenase aus *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* (Dobbek *et al.*, 2001) und CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase aus *Moorella thermoacetica* (Darnault *et al.*, 2003) werden Metallionen der Ni-Fe-Zentren über Cystein-Reste miteinander verbrückt. Die Nickelatome werden dabei in verschiedenen Geometrien koordiniert.

Auch die freie α -Aminogruppe des N-Terminus eines Proteins kann Nickel koordinieren, wie im Falle von Thioredoxin aus *E. coli* (Jensen *et al.*, 2005) und Ni-Superoxiddismutase aus *Streptomyces coelicolor* (Barondeau *et al.*, 2004) gezeigt wurde. Ni-Superoxiddismutase besitzt am N-Terminus sogar einen sogenannten Ni-Haken aus neun Aminosäureresten (H-C-X-X-P-C-G-X-Y). Während der katalysierten Disproportionierung von Superoxid wird

das Ni im aktiven Zentrum des Enzyms abwechselnd oxidiert und reduziert. Dabei wechselt Nickel von der Ni²⁺ quadratisch-planaren in die Ni³⁺ quadratisch-pyramidale Geometrie. Ni²⁺ wird von der α -Aminogruppe des N-Terminus des Enzyms, S-Atomen zweier Cystein-Reste und einer Amidgruppe des Proteinrückgrades koordiniert. Ni³⁺ wird zusätzlich von einem N-Atom des Imidazolringes des N-terminalen Histidins koordiniert.

Darüberhinaus werden Ni-Ionen oft von Seitenketten saurer Aminosäuren koordiniert. Sowohl in der Ni-abhängigen Glyoxylase aus *E. coli* (He *et al.*, 2000) als auch in Acireducton-Dioxygenase aus *Mus musculus* (Xu *et al.*, 2006) wird Nickel in einer oktaedrischen Geometrie von den Seitenketten von Histidin- und Glutamat-Resten koordiniert. Die noch freien Koordinationstellen werden bei der Glyoxylase von Wasser und bei der Acireducton-Dioxygenase von einem noch unbekanntem Liganden belegt.

Viele Bakterien sind fähig Nickel mithilfe von Nickel-spezifischen Transportsystemen aufzunehmen und das Metallion danach mittels Nickel-Helferproteinen spezifisch in Nickel-abhängige Enzyme einzubauen. Von den meisten dieser Transport- und Helferproteine sind noch keine Kristallstrukturen bekannt. Aus spektroskopischen Untersuchungen ist jedoch ersichtlich, dass Nickel in diesen Proteinen von Histidin-, Cystein-, Aspartat- sowie Glutamat-Resten koordiniert wird (Mulrooney & Hausinger, 2003).

Auch Whp/SlyD, eine cytosolische Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase von *E. coli*, enthält eine 50 Aminosäuren umfassende Metallionen bindende Domäne. Zum ersten Mal wurde dieses Protein als Verunreinigung bei der Isolierung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* mittels IMAC beobachtet (Wülfing *et al.*, 1994). Bindungsexperimente zeigten, dass Ni²⁺- und Zn²⁺-Ionen am stärksten gebunden wurden. Dabei wurden drei Ni²⁺-Ionen pro SlyD-Molekül gebunden und eine Dissoziationskonstante von 1,8 μ M für das NiCl₂ ermittelt (Hottenrott *et al.*, 1997). Die Metallionen bindende Domäne besteht zu 12 % aus Cys, 30 % His, 32 % Gly, 10 % Asp und 4 % Glu. Im Vergleich dazu wurden während der Affinitätsmaturierung der BBP-Variante His1 Δ C* ähnliche Metallionen bindende Aminosäuren (His, Cys, Glu, Asp) eingeführt, die möglicherweise zur metallionenabhängigen Bindung von Oligohistidinsequenzen beitragen (Abbildung 29).

Sowohl die Variante His1 Δ C*-13 aus der ersten Stufe der Affinitätsmaturierung als auch die Variante EPII.1 aus der Zufallsmutagenese EPII weisen eine Tyr109 \rightarrow His Substitution am Boden der BBP-Bindungstasche auf (Abbildung 22, 29). Dieser Histidin-Rest kann zur Bindung des Ni²⁺-Ions beitragen, wenn der Ni²⁺-His₆-Komplex tief in die Bindungstasche des Anticalins eindringt. Bei der Variante EPII.44 hingegen tritt diese Substitution am anderen Ende der Bindungstasche in der Schleifenregion 1 (Tyr39 \rightarrow His) auf (Abbildung 29). An dieser Position kann der Histidin-Rest nur dann Ni²⁺-Ionen koordinieren, wenn der Ni²⁺-His₆-Komplex nicht tief in die Bindungstasche eindringt. In der Kristallstruktur einer Mutante des

Anti-His-tag scFv Antikörperfragmentes 3D5 gehen die Histidin-Reste des scFv hydrophobe Interaktionen mit den Imidazolringen der Histidin-Reste des His₆-tags ein (Kaufmann *et al.*, 2002). Das könnte auch die Rolle des His39-Restes in der Variante EPII.44 sein, im Fall dass der Ni²⁺-His₆-Komplex tief in die Bindungstasche des Anticalins eingedrungen ist.

Cystein-Reste treten bei den Varianten aus der ersten Stufe der Affinitätsmaturierung in den Schleifenregionen 1 und 3 auf. Mehrere selektierte Varianten aus den Zufallsmutagenesen EPII und EPIII weisen an unterschiedlichen Positionen Tyr(TAC)→Cys(TGC) Substitutionen auf, die als Folge einer einzelnen A→G Punktmutation aufgetreten sind.

Am häufigsten wurden während der Affinitätsmaturierung jedoch jene Varianten selektiert, die neue saure Aminosäuregruppen trugen. In der ersten Stufe der Affinitätsmaturierung wurden bei sieben von neun selektierten Varianten in der Schleifenregion 3 unterschiedliche Aminosäuren gegen einen Asp-Rest ausgetauscht. Bei fünf der selektierten Varianten traten zusätzliche Lys→Glu Substitutionen außerhalb der randomisierten Bereiche auf. Diese Substitution trat auch bei allen acht aus der Zufallsmutagenese EPII selektierten Mutanten mehrfach entweder in den Schleifenregionen 1 und 4 oder in den Peptidschlaufen am Boden der Bindungstasche auf. Daraus ist ersichtlich, dass im Laufe der Affinitätsmaturierung sehr viele saure Aminosäuregruppen in den exponierten Regionen der Peptidschleifen am Eingang in die Bindungstasche des BBPs aufgetreten sind. Unter der Voraussetzung, dass der Ni²⁺-His₆-Komplex tief in der Bindungstasche des Anticalins bindet, kann angenommen werden, dass diese Glutamat- und Aspartat-Reste Salzbrücken mit Histidin-Resten des His₆-tags ausbilden. Solche Wechselwirkungen sind auch aus der Kristallstruktur des oben bereits erwähnten Anti-His-tag scFv erkennbar (Kaufmann *et al.*, 2002). Die sauren Aminosäuregruppen am Boden der Bindungstasche hingegen können Nickel koordinieren.

Interessant erweist sich die Primärstruktur der Peptidschleife 3 der Variante His1ΔC*-16. Sie beinhaltet drei saure Aminosäure- sowie vier Threonin-Reste. Die letzteren sind theoretisch befähigt, Wasserstoffbrückenbindungen mit N-Atomen der Histidin-Reste des Liganden zu bilden. Die aus der Zufallsmutagenese EPII selektierte Variante EPII.44 beinhaltet zusätzlich dazu einen Histidin-, einen Tyrosin- sowie vier saure Aminosäure-Reste in der Peptidschleife 4. Aromatische Aminosäure-Reste können π - π -stacking Wechselwirkungen mit den Imidazolringen der Histidin-Reste eingehen und diese dadurch stabilisieren, wie am Beispiel des Histamin-Bindungsproteins aus *Rhiphicephalus appendiculatus* (Andersen *et al.*, 2002).

Bis dato wurden drei Lipocaline gefunden, die befähigt sind Metallionen zu binden. Das *E. coli* Outlier Lipocalin YodA ist in die Stressantwort der Bakterien involviert. Die gelösten Kristallstrukturen in Anwesenheit der Liganden zeigen in der zentralen Metallbindungsstelle entweder ein Cadmiumion, das oktaedrisch von drei Histidin-Resten sowie drei Wassermolekülen koordiniert wird, oder zwei Zinkionen, die von Histidin- und Glutamat-Resten

koordiniert werden. Die Röntgenfluoreszenzanalyse der nativen Form zeigt die Anwesenheit eines Nickelions, das von drei Histidin-Resten und einem Wassermolekül koordiniert wird (David *et al.*, 2003).

Zwei humane Lipocaline, NGAL und Tränenlipocalin, komplexieren Eisenionen. Sie gehen jedoch keine direkte Bindung mit den Metallionen ein, sondern binden bakterielle Siderophore, die ihrerseits das Eisen komplexieren. Siderophore sind in der mikrobiellen Eisenaufnahme involviert. Während NGAL spezifisch bakterielle Catechol-Siderophore bindet (Goetz *et al.*, 2002), geht Tränenlipocalin zusätzlich Interaktionen mit Hydroxamat-Siderophoren von Bakteriellen sowie Pilzen ein. Wegen der hohen Bindungsaffinität von NGAL zum Eisen-Enterobactin-Komplex wird dieses Lipocalin als ein Bakteriostatikum angesehen. Das Tränenlipocalin gilt jedoch nicht als ein siderophorspezifisches Bindungsprotein sondern eher als ein *Scavenger* mit einer breiten Ligandenspezifität (Fluckinger *et al.*, 2004).

4.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von His₆-tag bindenden Anticalinen

Die Bildung eines Anticalin/Ni²⁺/His₆-Sandwich-Komplexes hängt ähnlich wie bei IMAG (Schmidt, 1998) von einer Reihe von Konkurrenzreaktionen ab (Abbildung 47). Ni^{II} reagiert mit His₆ unter Bildung eines His₆•Ni^{II}-Komplexes. Für diese Reaktion wurde mit der Methode der Gleichgewichtsanalyse eine Dissoziationskonstante (K_D) von 14,7 ± 1,3 μM bestimmt (Schmidt *et al.*, 1996). In der Folge reagiert His₆•Ni^{II} idealerweise mit einem Anticalin (zur Vereinfachung als BBP_A abgekürzt) unter Ausbildung eines ternären BBP_A[His₆•Ni^{II}]-Komplexes. Da theoretisch in einem His₆-Peptid jeweils zwei Histidine ein Ni^{II}-Ion komplexieren können, kann ein His₆-Peptid bis zu drei Ni^{II}-Ionen binden (Hearn & Acosta, 2001). Bei einem erheblichen Ni^{II}-Überschuss im Reaktionsgemisch ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass der His₆•Ni^{II}-Komplex weitere Ni^{II}-Ionen unter Ausbildung von His₆•Ni^{II}₂ bzw. His₆•Ni^{II}₃ komplexiert und daher keine Bindung mit BBP_A eingeht. Die Komplexbildung mit BBP_A kann erst dann erfolgen, wenn die überschüssigen Ni^{II}-Ionen abdissoziieren.

Auf der anderen Seite können Ni^{II}-Ionen anstatt mit His₆ mit BBP_A einen BBP_A•Ni^{II}-Komplex bilden. Wenn die Bindungstasche von BBP_A mit Ni^{II}-Ionen besetzt ist, bleiben keine Koordinationsstellen für die Bindung des His₆•Ni^{II}-Komplexes mehr frei. Dieser kann erst dann an das BBP_A binden, wenn das Ni^{II}-Ion vom BBP_A•Ni^{II} abdissoziiert ist, was wiederum von der Dissoziationskonstante für diese Reaktion abhängt.

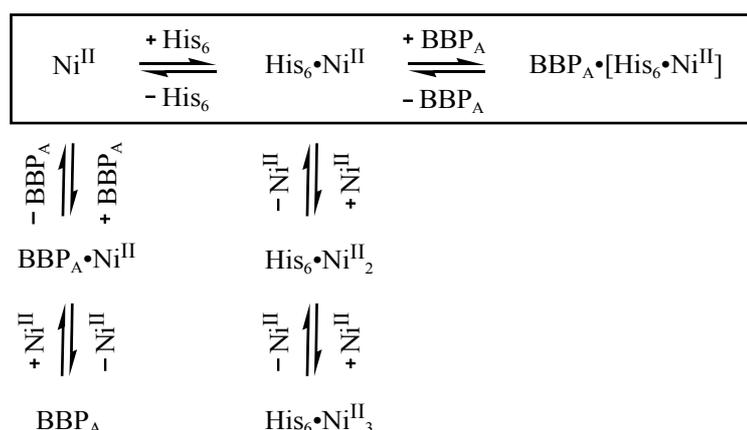


Abbildung 47: Reaktionsschema der Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen dem Anticalin (vereinfacht als BBP_A abgekürzt), Ni^{II} -Ionen und His_6 -tag.

Die Quantifizierung der Bindung zwischen der BBP-Variante His1 Δ C* und G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von Ni^{2+} -Ionen erfolgte mit der Methode der Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR; Huber *et al.*, 1999). Unter Anwendung der Gleichgewichtsanalyse wurde dabei eine Komplex-Dissoziationskonstante von $2,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ bei einer Ni^{2+} -Konzentration von $100 \mu\text{M}$ ermittelt (Abschnitt 3.1.6). Die Komplexbildung ist dabei abhängig von der Ni^{2+} -Konzentration und nähert sich im millimolaren Bereich bezüglich des Metallions der Sättigung. Man muss jedoch vermerken, dass die auf diese Weise bestimmte Dissoziationskonstante vom realen Wert in Lösung abweichen kann, da einer der Bindungspartner an einer Festphase immobilisiert war.

Die Komplexbildung des His1 Δ C*-Bla Fusionsproteins mit G9-Cystatin-His₆ in Gegenwart von Ni^{2+} -Ionen ($100 \mu\text{M}$ Konzentration) wurde in einem ELISA analysiert (Abschnitt 3.5.2). Die dabei ermittelte apparente Dissoziationskonstante war um den Faktor 40 niedriger als die für das unfusionierte His1 Δ C* in SPR-Experimenten bestimmte. Dies könnte eine Folge der unspezifischen Wechselwirkung des Fusionspartners mit dem G9-Cystatin-His₆ sein.

Die Dissoziationskonstante der BBP-Variante EPII.44C4 gegenüber dem His₆-tag (am C-Terminus von G9-Cystatin) wurde in zwei unterschiedlichen ELISA-Experimenten in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ Ni^{2+} mit $1,6 \text{ nM}$ bzw. $0,92 \text{ nM}$ bestimmt. Zugleich konnte gezeigt werden, dass das Trägerprotein des His₆-tags nicht wesentlich zu dessen Bindung beiträgt (Abschnitt 3.4.4). Diese Affinität liegt durchaus im Bereich der kommerziell erhältlichen anti-His-tag Antikörper (Abschnitt 1.5, Tabelle 2).

Die Bindungsaffinität von EPII.44C4 zu einem Abz-His₆-Peptid wurde durch Fluoreszenztitrations-Experimente in Gegenwart von $1 \mu\text{M}$ Ni^{2+} bestimmt (Abschnitt 3,4,5). Mit einem

Wert von 1,90 μM ist diese Bindungsaffinität vergleichbar mit derjenigen von His₆-tag zu Ni-NTA. Diese wurde mittels eines mit Ni²⁺-Ionen aktivierten NTA-Chips zu 1 μM bestimmt (Nieba *et al.*, 1997). Darüber hinaus liegt die K_D vom Abz-His₆/Ni²⁺/EPII.44C4-Komplex in der Größenordnung derjenigen für den *Strep* tag II/ Streptavidin Mutante 1-Komplex (1.37 μM) (Voss and Skerra 1997), der stark verbreitet in der Affinitätsreinigung sowie für die Detektion von Proteinen angewendet wird.

Die Diskrepanz in den Bindungsaffinitäten von EPII.44C4 könnte mehrere Ursachen haben. Bei der ELISA-Methode handelt es sich um ein Verfahren, bei dem einer der Bindungspartner an einer Oberfläche immobilisiert ist, während bei der Fluoreszenztitration die Reaktion in der Lösung stattfindet. Zusätzlich dazu wurde in einem Fall ein His₆-Peptid als Zielmolekül verwendet. Im anderem Fall war der His₆-tag mit dem C-Terminus eines Proteins fusioniert, wodurch die räumliche Struktur des Hexahistidinpeptides beeinflusst werden könnte. Um diesen Sachverhalt genauer zu klären, müssten entweder ELISA Experimente mit dem Abz-His₆-Peptid oder Fluoreszenztitrationen mit G9-Cystatin-His₆ durchgeführt werden.

Die *Western Blot*-Experimente zeigten, dass die BBP-Variante EPII.44C4 selektiv Proteine mit dem His₆-Affinitätsanhängsel bindet. Im Falle des Gesamtzellextraktes von *E. coli* wurde neben dem Wildtyp BBP-His₆ eine weitere Proteinbande mit einer apparenten Molmasse von ca. 30 kDa angefärbt (Abschnitt 3.4.4). Dabei könnte es sich um Whp/SlyD, eine Ni²⁺-Ionen bindende cytosolische Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase von *E. coli*, handeln (Abschnitt 4.1). Der Erkennungsmodus war dabei identisch mit dem gängigsten kommerziellen Produkt zur Detektion von His₆-tags, dem Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Dies macht das EPII.44C4 zu einem geeigneten Reagens zur Detektion von Proteinen mit dem His₆-Affinitätsanhängsel.

4.3 *In vitro* Affinitätsmaturierung von His1 Δ C*

Die Affinität von Bindungsproteinen, die aus einer Zufallsbibliothek isoliert wurden, korreliert nach theoretischen Erwägungen mit der Komplexität der eingesetzten Bibliothek (Perelson & Oster, 1979). Proteinbibliotheken können anhand zweier unterschiedlicher Vorgehensweisen konstruiert werden (Ladner, 1996). Im Falle des *Minority Sampling* werden Bibliotheken mit einer großen Anzahl an mutagenisierten Aminosäurepositionen konstruiert, wobei dessen theoretische Diversität experimentell nur partiell erzielt werden kann. So beinhaltete die BBP-Zufallsbibliothek mit $3,7 \cdot 10^8$ unabhängigen Transformanten, die in weiterer Folge zur Generierung von His1 Δ C* führte, lediglich einen sehr geringen Anteil der bei einer konzertierten Mutagenese von 16 Aminosäurepositionen insgesamt möglichen Anzahl von $32^{16} \approx 1,2 \cdot 10^{24}$ kombinatorischen Nukleinsäure-Varianten. Die daraus selektierte

BBP-Variante His1 und die von ihr abgeleitete Mutante His1 Δ C* waren wahrscheinlich nicht optimal zur Bindung des vorgegebenen Liganden befähigt und wurden daher in weiterer Folge einer Affinitätsmaturierung unterzogen. In diesem als *Majority Sampling* bezeichneten Verfahren werden nur einige wenige Aminosäurepositionen variiert, wodurch im Prinzip alle theoretisch möglichen Proteinvarianten der Bibliothek durchgemustert werden können. Dabei wird vorausgesetzt, dass für die Bindung relevante Aminosäurepositionen bereits bekannt sind (Hawkins *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1995; Schlehuber & Skerra, 2002).

Zur Erzeugung genetischer Diversität werden neben der bereits erwähnten Zufallsmutagenese der ausgewählten Aminosäurepositionen auch Verfahren zur randomisierten Mutagenese der gesamten Gen-Region angewendet. Diese bedienen sich der natürlichen Mutationsrate von mutagenen Polymerasen (Cline & Hogrefe, 2000) oder bakteriellen Mutatorstämmen (Low *et al.*, 1996; Nguyen & Daugherty, 2003). Zur Affinitätsanreicherung wird jedoch am häufigsten das *in vitro* Verfahren der *Error Prone* PCR (Neylon, 2004) eingesetzt, bei dem mittels PCR-Amplifizierung unter Bedingungen, die Basenfehlpaarungen begünstigen, Genbibliotheken der Zufallsmutanten hergestellt werden. Dies wird durch Zugabe von Mn²⁺-Ionen, Nukleotidanaloga oder durch unbalancierte Konzentrationen an dNTPs erzielt, wobei die Mutationsrate sowohl von deren Konzentration als auch von der Anzahl an Amplifizierungszyklen abhängt.

Die Verwendung von Mn²⁺-Ionen und/oder unbalancierten Konzentrationen an dNTPs ist die am häufigsten verwendete *Error Prone* PCR Strategie. Sie hat den Nachteil, dass hauptsächlich Transitionen generiert werden, wodurch die theoretische Komplexität einer Bibliothek erheblich eingeschränkt ist. Dagegen wurde die Verwendung von Nukleotidanaloga bereits erfolgreich zur Verbesserung der Bindungsaffinitäten von Antikörpern sowie der enzymatischen Aktivität von Enzymen und katalytischen Antikörpern angewendet (Cesaro-Tadic *et al.*, 2003; Jermutus *et al.*, 2001, Zacco & Gherardi, 1999). Nukleotidanaloga dPTP und 8-oxo-dGTP zeichnen sich durch hohe Stabilität unter PCR-Bedingungen, guten Einbau durch die *Taq* DNA-Polymerase und hohe Mutageneseeffizienz aus (Zacco *et al.*, 1996). dPTP generiert Transitionen, während 8-oxo-dGTP zu Transversionen führt. dITP ist im Gegensatz dazu ein schlechtes Substrat für die *Taq* DNA-Polymerase, ruft lediglich eine niedrige Mutagenesefrequenz hervor und verursacht hauptsächlich Transitionen (Zacco *et al.*, 1996).

Durch die zielgerichtete Mutagenese der Schleifenregionen von His1 Δ C* wurde eine Verbesserung der Affinität zum His₆-tag erreicht, jedoch nicht in dem erhofften Ausmaß. Um die Bindungsaffinität weiter anzuheben, sollten auch Aminosäurepositionen mutiert werden, die außerhalb der Schleifenregionen von His1 Δ C*-16 liegen und auf direkte oder indirekte Weise einen positiven Effekt auf die Bindung von His₆-tag ausüben könnten. Nachdem sich

solche Aminosäurepositionen nur schlecht eingrenzen lassen, sollten Zufallsmutationen über die gesamte Länge des Gens erzeugt werden. Dazu wurde das Verfahren der *Error Prone PCR* nach der Methode von Zacco *et al.* (1996) unter Verwendung der Nukleotidanaloga dPTP und 8-oxo-dGTP in Kombination mit dem Screening-Verfahren des *Filter Sandwich Colony Screening Assay* angewendet.

Die Bedingungen für die *Error Prone PCR* wurden in dieser Arbeit so gewählt, dass eine überschaubare Anzahl an Mutationen von ein bis fünf Basenaustausche pro BBP-Gen erreicht wurde. Dazu wurde die Konzentration von dNTPs konstant gehalten und die der Nukleotidanaloga variiert. Die erwünschte Häufigkeit der Mutationen in den selektierten Varianten wurde bei einem Verhältnis der Konzentrationen von Nukleotidanaloga zu dNTPs von 1:5 erreicht (Abschnitt 3.3.2.1). Die Art und die Häufigkeit der ermittelten Mutationen bezog sich jedoch nur auf die mittels *Filter Sandwich Colony Screening Assay* selektierten Varianten, welche Affinität gegenüber His₆-tag zeigten, und sind daher für die Gesamtbibliothek nicht repräsentativ.

In den isolierten Varianten wurden überwiegend A→G Transitionen generiert. Dabei wurde am häufigsten ein positiv geladenes Lys (AAA, AAG) durch ein negativ geladenes Glu (GAA, GAG) ausgetauscht. Am häufigsten ist die Lys→Glu Substitution an Positionen am oberen Ende der Bindungstasche der BBP-Varianten in den Peptidschleifen 1 (Positionen 31 und 41) sowie 4 (Positionen 121, 122, 125) aufgetreten (Abschnitt 3.3.2.1). Diese Substitutionen wurden vereinzelt sogar als spontane Mutationen in den Varianten aus der ersten Affinitätsmaturierung der dritten und der vierten Schleife des His1ΔC* an den Positionen 31, 38, 41, 55 und 122 generiert (Abschnitt 3.2.4).

Hier spiegelt sich ein Schwachpunkt der *Error Prone PCR* Mutagenese wider (Neylon, 2004). Aus statistischen Gründen werden meistens nur einzelne Punktmutationen pro Basentriplet erzeugt, d.h. Lys kann nur durch Arg, Asn, Gln, Glu, Ile, Met und Thr ersetzt werden. Die restlichen Substitutionen können nur als Folge einer Doppel- oder Dreifachmutation erreicht werden, z.B. Lys zu Asp, das wie Glu negativ geladen ist. Da Transitionen, vor allem A→G, bevorzugt auftreten, ist es wahrscheinlicher, dass eine Substitution von Lys (AAA, AAG) zu Glu (GAA, GAG) oder Arg (AGA, AGG) und nicht zu Gln (CAA, CAG) eintritt. In den selektierten Varianten der Zufallsmutagenese EPII wurde Lys zu 2,9 % gegen Thr, zu 20 % gegen Arg und zu 77,1 % gegen Glu ausgetauscht und im Falle der Zufallsmutagenese EPIII sogar zu 29 % gegen Arg und zu 71 % gegen Glu. Das deutet darauf hin, dass Varianten mit dieser Art von Substitution bevorzugt selektiert wurden.

Die bei der Zufallsmutagenese EPII selektierte BBP-Variante EPII.44, die im ELISA und *Filter Sandwich Colony Screening Assay* die höchste Bindungsaktivität gegenüber dem His₆-tag in Gegenwart von Ni²⁺-Ionen aufwies, trägt insgesamt neun Aminosäuresubstitutionen.

Davon sind vier Lys→Glu Austausche an den Positionen 31, 41, 55 und 125 und eine Tyr39→His Substitution (Abschnitt 3.3.2.1). Eine weitere, aus derselben Bibliothek selektierte Variante EPII.23 besitzt einen Lys125→Glu Austausch, zeigt jedoch im ELISA eine geringere Bindungsaffinität zum Liganden als EPII.44 (Daten nicht gezeigt). EPII.44 diente als Matrize für die Zufallsmutagenese EPIII. Bei den daraus selektierten Varianten wurde keine weitere Verbesserung der Bindungsaffinität erzielt, obwohl bei drei im ELISA getesteten Varianten eine Lys122→Glu Substitution aufgetreten ist. Bei der Variante EPIII.105 wurde Glu55 gegen Gly ausgetauscht, was jedoch keinen negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität hatte (Abschnitt 3.3.3.2). Unter der Voraussetzung, dass Lys→Glu Substitutionen den größten Effekt auf die Bindung des His₆-tags ausüben und andere aufgetretene Aminosäuresubstitutionen keine wesentliche Rolle für die Liganden-Bindung spielen, kann man ableiten, dass Mutationen von Lys zu Glu an den Positionen 55, 122 und 125 keinen relevanten Beitrag zur Bindung des His₆-tags leisten.

Das würde wiederum bedeuten, dass bei der Variante EPII.44 der Austausch Lys→Glu an den Positionen 31 und 41 sowie die Tyr39→His Substitution überwiegend für die Verbesserung der Bindungsaffinität zum His₆-tag verantwortlich sind. Natürlich können sich die Beiträge der einzelnen Aminosäuresubstitutionen einer Variante zur Antigen-Bindung gegenseitig kompensieren (d.h. der positive Effekt einer Substitution wird durch den negativen Effekt einer anderen, in der selben Mutagenese generierten Substitution aufgehoben). Einen genaueren Aufschluss über die Rolle der einzelnen Aminosäureaustausche könnten kristallographische Untersuchungen des EPII.44/Ni²⁺/His₆-tag Komplexes oder gerichtete Rückmutationen der einzelnen Aminosäuren liefern.

4.4 Produktion von His₆-tag bindenden Anticalinen in *E. coli*

Das *E. coli* eigene periplasmatische Chaperon Skp (*Seventeen Kilodalton Protein*) ist an der Faltung von verschiedenen äußeren Membranproteinen mit einer β -Barrel Topologie beteiligt (Harms *et al.*, 2001). Bei der Produktion der His₆-tag bindenden BBP-Variante His1 Δ C* im *E. coli* Stamm JM83 wurde Skp mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie mit His1 Δ C* aus dem Periplasma mitisoliert (Abschnitt 3.1.1). Dieses Protein konnte durch Größenausschluss-Chromatographie unter Verwendung denaturierender Reagenzien bzw. Puffer mit unterschiedlichen Ionenstärken nicht abgetrennt werden, was auf eine Komplexbildung zwischen dem Skp und His1 Δ C* schließen lässt.

In der Arbeitsgruppe wurde bei einigen voneinander unabhängig generierten, rekombinanten BBP-Varianten eine Komplexbildung mit Skp beobachtet, während dies bei dem parentalen Wildtyp BBP nicht der Fall war (Korndörfer *et al.*, 2004). His1 Δ C* unterscheidet sich in der

Primärstruktur durch insgesamt 21 Aminosäureaustausche vom Wildtyp BBP. Die meisten davon befinden sich in den vier Peptidschleifen. Zwei Aminosäuren im β -Barrel wurden im Laufe der Mutagenese durch zwei Aminosäuren, die als starke β -Faltblatt-Brecher bekannt sind, ausgetauscht (Thr104→Pro am Ende des Faltblatts F und Phe127→Asp am Anfang des Faltblatts H). Diese Modifikation des β -Barrels könnte für die Komplexbildung mit Skp mitentscheidend sein.

Die Komplexbildung könnte auch eine Folge der Erkennung eines Sekundärstrukturmotivs sein oder einer Bindung der teilweise ungefalteten Proteinkette, was auf die Existenz eines Faltungsproblems hindeutet. Letzteres wird unterstützt von den Ergebnissen der Produktion des His1 Δ C*-Bla Fusionsproteins im Expressionsstamm JM83, wo keine Komplexbildung mit dem Skp beobachtet wurde (Abschnitt 3.5.1). Es ist denkbar, dass die β -Lactamase des Fusionsproteins als intramolekulares Chaperon fungiert und somit zu einer korrekten Faltung des fusionierten Anticalins beiträgt (Nygren *et al.*, 1994).

Bei der periplasmatischen Produktion von EPII.44 in *E. coli* kam es zur teilweisen Ausbildung von nicht-nativen Disulfidbindungen. Im Falle des apo-RBP mit 3 Disulfidbindungen (Schmidt *et al.*, 1998; Müller & Skerra, 1993) hatte die Überexpression der Protein-disulfidisomerase DsbC bei der Proteinproduktion in *E. coli* zur Ausbildung eines homogenen Disulfidbindungsmusters geführt. In dieser Arbeit wurden während der Produktion der His₆-tag bindenden BBP-Variante EPII.44 drei die Faltung beeinflussende Faktoren, die Protein-disulfidisomerasen DsbC und DsbA sowie die Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase PPI, überexprimiert. Dadurch wurde lediglich eine Verschiebung des Verhältnisses der Proteindisulfid-Isomere zugunsten des nativen Disulfidisomers erzielt (Daten nicht gezeigt). Die vier Cysteinreste dieser Variante sollten wie beim Wildtyp-BBP zwei Disulfidbrücken (Cys8-Cys115 und Cys42-Cys170) ausbilden, die den N- und den C-Terminus der Polypeptidkette an das β -Barrel heften. Beide Termini sind im BBP kein Bestandteil von ausgeprägten Sekundärstrukturen (Huber *et al.*, 1987).

Für das Lipocalin RBP wurde bereits gezeigt, dass trotz Eliminierung der drei Disulfidbrücken das β -Barrel nach wie vor kompakt gefaltet ist (Schmidt, 1998). In dieser Arbeit wurde die Problematik der Disulfidisomerenbildung durch stufenweise Eliminierung der Disulfidbrücken der BBP-Variante EPII.44 umgangen. Nach Entfernung der Disulfidbrücke Cys42-Cys170, die zur Generierung von EPII.44CC führte, lag die BBP-Variante EPII.44CC in Lösung als Gemisch aus kovalentem und nicht-kovalentem Dimer vor (Abschnitt 3.4.1). Auch die Überexpression von DsbC, DsbA und PPI konnte die Ausbildung der intermolekularen Disulfidbindungen nicht unterdrücken. Daraufhin wurde auch die zweite Disulfidbrücke (Cys8-Cys115) entfernt. Für die dabei generierte Variante EPII.44C4 wurde

durch Gelpermeations-Chromatographie und chemische Quervernetzung gezeigt, dass diese als nicht-kovalentes Dimer vorliegt (Abschnitt 3.4.3).

Bei der bakteriellen periplasmatischen Produktion von EPII.44C4 (wie auch von EPII.44CC und von EPII.44) in *E. coli* wurde wiederholt Zellyse während der Induktion der Bakterienkultur beobachtet. Dieser toxische Effekt wurde schon bei der Produktion sekretorischer Antikörperfragmente beschrieben (Plückthun & Skerra, 1989) und kann eine Folge der Anhäufung an im Periplasma denaturiertem Protein in Form von periplasmatischen Einschlusskörpern sein. Dabei können missgefaltete Proteine entweder Phospholipasen aktivieren (Langen *et al.*, 2001) oder durch ihre exponierten hydrophoben Oberflächenbereiche direkt eine Permeabilisierung der äußeren Zellmembran bewirken und dadurch die Zellyse begünstigen (Skerra, 1989). Im Falle der BBP-Varianten EPII.44 sowie EPII.44CC können auch freie Cysteinreste des ungefalteten Proteins mit wirtseigenen periplasmatischen oder membranständigen Proteinen in Wechselwirkung treten und dadurch einen letalen Effekt auf die Wirtszelle ausüben (Schmiedl *et al.*, 2000).

Bei der Optimierung der Expressionsbedingungen für die BBP-Variante EPII.44C4 wurde das niedrigste Ausmaß an Zellyse und die höchste Ausbeute an gereinigtem Protein unter den Bedingungen der Überexpression von Proteindisulfidisomerasen (PDIs) DsbA und DsbC sowie der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIs) FkpA und SurA mit pTUM4 erzielt. Da diese Variante jedoch keine Cysteine trägt, kann dieser Effekt nur mit der Überexpression der PPIs zusammenhängen. FkpA und SurA sind periplasmatische *E. coli* PPIs, die die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidylprolyl-Bindung in Proteinen katalysieren. Zusätzlich dazu agieren sie auch als periplasmatische Chaperone, indem sie die Proteinaggregation unterbinden (Behrens *et al.*, 2001, Ramm & Plückthun, 2000).

SurA ist für den Transport von Porinen durch das Periplasma zur äußeren Membran von *E. coli* verantwortlich (Bitto & McKay, 2002). Bei der Untersuchung der Spezifität von SurA wurde ein Bindungsmotiv als eine Abfolge von fünf Aminosäureresten mit der Sequenz aromatisch-polar-aromatisch-unpolar-Prolin identifiziert (Bitto & McKay, 2003). Eine schwächere Bindung wurde auch für das Tripeptid aromatisch-beliebig-aromatisch ermittelt. Dieses Motiv findet man mit hoher Frequenz in unterschiedlichen Proteinen der äußeren Membran von *E. coli*. Auch in der Variante EPII.44C4 tritt dieses Motiv zweimal auf: als Tyr-Phe-Phe im β -Faltblatt D und Phe-Asp-Trp am Boden der Bindungstasche. Geht man davon aus, dass SurA in der gereinigten Präparation von EPII.44C4 vorhanden ist, dann könnte dies aufgrund der Bindung von SurA an die oben genannten Segmente infolge der Ausübung seiner Chaperonaktivität erklärt werden.

In zwei getrennten Selektionsexperimenten wurden FkpA (Bothmann & Plückthun, 2000) bzw. Skp (Bothmann & Plückthun, 1998) als Faktoren, die zur Verbesserung der

periplasmatischen Expression von scFv-Fragmenten in *E. coli* beitragen, isoliert. Bei der Produktion von Antikörperfragmenten im Periplasma von *E. coli* zeigte die Überexpression des periplasmatischen Chaperons Skp eine Verbesserung der Faltungseffizienz und damit der Proteinausbeute (Mavrangelos *et al.*, 2001). Im Falle des FkpA wurde dies sogar in Abwesenheit von *cis*-Prolinresten in dem scFv-Fragment erreicht, was auf die Unabhängigkeit der Chaperon-Aktivität von der Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase-Funktion des FkpA hinweist (Ramm & Plückthun, 2000). Demzufolge könnten die PPIs FkpA und SurA bei der Produktion von EPII.44C4 die Faltung des Proteins als Chaperone positiv beeinflussen und wahrscheinlich die Rolle des Skp bei der Produktion von vorherigen BBP-Varianten His1 Δ C* und His1 Δ C*-16 übernehmen.

Die BBP-Variante EPII.44C4 zeigt im Vergleich zu EPII.44 neben der höheren Ausbeute bei der Produktion auch eine verbesserte Affinität zum His₆-tag. Das Fehlen der Disulfidbrücken, die oft die native räumliche Struktur des Proteins stabilisieren, übt somit bei dieser Variante keinen negativen Effekt auf die Faltung des Proteins aus. Daher wäre es theoretisch auch möglich, die BBP-Variante EPII.44C4 in größeren Mengen im Cytosol von *E. coli* zu produzieren.

4.5 Dimerisierungsverhalten von His₆-tag bindenden Anticalinen

Assoziation von Monomeren zu Dimeren oder höheren Oligomeren ist ein geläufiges Phänomen in der Proteinchemie. Die Oligomerisierung bringt strukturelle und funktionelle Vorteile, wie verbesserte Stabilität und Kontrolle der Erreichbarkeit der aktiven Zentren sowie deren Spezifität. Die Mechanismen der Dimerisierung sind sehr unterschiedlich. Kovalente Dimere werden über Disulfidbrücken verbunden. Nicht-kovalente Dimere können durch Interaktion von hydrophoben *Patches*, durch polare Wechselwirkungen, *Domain Swapping* oder auch durch Metallionenbindung entstehen (Marianayagam *et al.*, 2004). Im DNA Korrekturprotein RAD50 kommt es bei der Dimerisierung zur Bildung eines Zink-Haken-Motivs. Dabei koordinieren jeweils zwei Cystein-Reste jedes Monomers ein einziges Zn²⁺-Ion in einer tetraedrischen Geometrie. Nur wenige Dimerisierungs-Schnittstellen bestehen aus nur einem Sekundärstrukturtyp (Helix, Faltblatt oder Schleife), die meisten sind gemischt (Jones & Thornton, 1996).

Auch einige Vertreter der Lipocalin-Familie bilden Homodimere aus. Das native BBP existiert in *Pieris brassicae* in zwei Isoformen: als monomeres BBP II mit einem N-terminalen Asp-Rest und als dimeres BBP I mit einem N-terminalem Asn-Rest. Die mittels Röntgenbeugung ermittelte Kristallstruktur beider Isoformen ist nahezu gleich. Die

Dimerisierung der Isoform BBP I beruht auf den Interaktionen der Aminosäuren 1-4 beider Peptidketten (Huber *et al.*, 1987b).

Das bovine OBP bildet ein verschränktes Dimer, bei dem die α -Helix der ersten Proteindomäne ein Strukturelement der jeweils zweiten Proteindomäne darstellt. Der Vergleich mit dem monomeren porcinen OBP zeigt, dass die Abwesenheit des Gly121 im Schleifensegment zwischen dem β -Barrel und der α -Helix bei bovinem OBP mitverantwortlich für *Swapping* der Helices ist. Im bovinen OBP fehlt auch jene intramolekulare Disulfidbrücke, die bei vielen Lipocalinen den C-Terminus mit dem β -Barrel verbindet, daher ist dieser terminale Bereich in seiner räumlichen Konformation flexibler (Ramoni *et al.*, 2002).

Bei *E. coli* Lipocalin Blc sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäureresten für die Dimerisierung verantwortlich. Die Dimerisierungsregion erstreckt sich über Teile der β -Stränge $\beta 6$ und $\beta 7$ sowie das dazwischenliegende Schleifensegment. Dabei werden die Ligandenbindungstaschen beider Monomere leicht zueinander gedreht, so dass sich eine einzige vergrößerte Bindungstasche ausbildet. Pro Dimer wird in dieser Bindungstasche nur ein Ligand gebunden (Campanacci *et al.*, 2006).

Auch die Dimerisierungskontaktfläche des von Pferden ausgeschiedenen Allergen Equ c1 besteht aus hydrophoben Aminosäureresten. Die β -Barrels beider Monomere sind im Dimer durch Interaktionen der β -Faltblätter F, G und H seitlich und antiparallel zueinander ausgerichtet, so dass die Ligandenbindungstaschen an entgegengesetzten Seiten des Dimers liegen (Lascombe *et al.*, 2000).

Das bovine und das porcine β -Lactoglobulin (BLG) weisen unterschiedliche Dimerisierungsmechanismen auf. Während es im porcinen BLG zum *Swapping* der N-Termini zwischen zwei Monomeren kommt, geht im bovinen BLG das β -Faltblatt I des ersten Monomers eine antiparallele Interaktion mit demselben Faltblatt im zweiten Monomer ein. Zusätzlich dazu wird das Dimer im bovinen BLG durch Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten in dem die β -Faltblätter A und B verbindenden Schleifensegment stabilisiert. Ein weiterer Unterschied zwischen den zwei BLGs äußert sich in der pH-Abhängigkeit der Dimerisierung: das bovine BLG dimerisiert im neutralen pH-Bereich und dissoziiert zu Monomeren im sauren pH-Bereich, während beim porcinen BLG dieses Verhalten umgekehrt ist (Invernizzi *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit generierte BBP-Variante EPII.44CC liegt in Lösung als Gemisch aus kovalentem und nicht-kovalentem Dimer vor. Die Dimerisierungsregion dieser Variante kann nicht dieselbe wie im Falle des BBP I sein, da EPII.44CC einen N-terminalen Asp-Rest trägt

und keinen Asn-Rest. Der letztere ist maßgeblich für die Dimerisierung des BBP I verantwortlich.

Die BBP-Variante EPII.44CC besitzt die gleichen zwei Cystein-Reste, die im Wildtyp-BBP eine intramolekulare Disulfidbrücke (Cys8-Cys115) bilden. Wenn die Geschwindigkeit der Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken größer als jene der intramolekularen ist, kommt es zur Bildung eines kovalenten Dimers. Die freien Cysteinreste können jedoch während der Expression mit unterschiedlichen niedermolekularen Substanzen wie z.B. einzelnen Aminosäuren oder Sulfinsäuren kovalente Bindungen eingehen. Dadurch wird die Ausbildung von kovalenten Dimeren unterbunden, die Assoziation zu nicht kovalenten Dimeren jedoch nicht.

Im Wildtyp-BBP verbinden vier Cystein-Reste sowohl den N- wie auch den C-Terminus mit dem β -Barrel über zwei Disulfidbrücken (Abbildung 2). In der BBP-Variante EPII.44C4 fehlen diese Cystein-Reste, dadurch sind die Termini dieses Anticalins in ihrer räumlichen Anordnung flexibler. Die Dimerisierung dieser BBP-Variante könnte daher durch hydrophobe Wechselwirkungen oder durch *Domain Swapping* erfolgen. Es gibt Hinweise, dass eine lokale Destabilisierung der Monomere die Bildung von Dimeren initiiert. Dies führt vor allem in den terminalen Bereichen der Proteine zur Ausbildung von *Domain Swapped*-Dimeren (Hoedemaeker *et al.*, 2002). Genauere Aufschlüsse könnte die Aufklärung der Kristallstruktur des Proteins ergeben.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde auf der Basis des Bilin-Bindungsproteins, eines typischen Vertreters der Lipocalin-Proteinfamilie, ein Anticalin mit metallionenabhängiger Bindungsaktivität für das His₆-tag entwickelt. Das Engineering künstlicher Bindungsproteine, sogenannter Anticaline, ausgehend von der Lipocalin-Architektur bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der rekombinanten Antikörpertechnologie, vor allem wegen der geringen Größe, der Zusammensetzung aus bloß einer Polypeptidkette und der nicht erforderlichen Glycosylierung. Die Lipocaline zeigen eine für das Protein-Engineering besonders geeignete Faltung mit einer zentralen β -Barrel-Struktur, an deren einem Ende vier variable Peptidschleifen den Eingang zu einer Bindungstasche bilden. Das His₆-tag ist aufgrund seiner weitverbreiteten Anwendung bei der gentechnischen Herstellung von Proteinen ein interessantes Target für die Generierung eines spezifischen Anticalins, welches neue bioanalytische Anwendungen eröffnen sollte.

Beginnend mit der bereits aus Vorarbeiten vorhandenen BBP-Variante His1 Δ C* wurden mehrere Zyklen der Affinitätsmaturierung durchgeführt. Daraus selektierte Varianten trugen zusätzliche His-, Cys-, Glu- und Asp-Reste, die vermutlich eine Rolle bei der angestrebten metallionenabhängigen Bindung der Oligohistidinsequenz spielen.

Im ersten Schritt der Affinitätsmaturierung wurden durch ortsgerichtete Randomisierung mit Hilfe degenerierter Oligodesoxynukleotide in den Schleifenbereichen 3 und 4 zwei Molekülbibliotheken hergestellt und als Mischung der Selektion auf His₆-tag-bindende Varianten mittels *Phage Display* unterworfen. Von den neun aus dem anschließendem *Filter Sandwich Colony Screening Assay* isolierten Varianten stammten alle aus der Bibliothek mit der randomisierten Schleifenregion 3. Die dabei gefundene Variante His1 Δ C*-16 zeigte im ELISA und *Western Blot*-Experiment signifikant erhöhte Bindungsaffinität zum His₆-tag.

In der zweiten Stufe der *in vitro* Affinitätsmaturierung wurde mittels *Error Prone PCR* eines Großteils der für die BBP-Variante kodierenden Region, einschließlich aller vier Schleifen, unter Einsatz der Nukleotidanaloga dPTP und 8-oxo-dGTP eine Bibliothek mit Zufallsmutationen präpariert. Diese wurde im *Filter Sandwich Colony Screening Assay* auf verbesserte Bindung durchmustert. Die dabei identifizierte Variante EPII.44 mit weiter gesteigerter Bindungsaktivität wurde in *E. coli* produziert und chromatographisch gereinigt. Die bei dieser Variante beobachtete Problematik der Bildung von nicht nativen Disulfidisomeren und kovalenten Dimeren konnte erfolgreich durch paarweise Substitution der an den beiden Disulfidbrücken (C42-C170, C8-C115) beteiligten Cysteinreste gegen Serin behoben werden. Auf diese Weise wurde die Variante EPII.44C4 generiert, die im ELISA keine wesentliche Einbußen bezüglich der Bindungsaffinität zum Liganden zeigte.

Überraschenderweise trat die cysteinfreie Variante EPII.44C4 jedoch in Lösung in Form eines nicht kovalenten Dimers auf.

Nichtsdestotrotz konnte in ELISA und *Western Blot*-Experimenten gezeigt werden, daß diese BBP-Variante eine ähnliche Selektivität aufweist wie das gängigste kommerzielle Produkt zur Detektion des His₆-tags, das Ni-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Gemäß dem ELISA besitzt EPII.44C4 mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 1,6 nM eine hohe Bindungsaffinität zu dem mit G9-Cystatin als Trägerprotein fusionierten His₆-tag. In Fluoreszenz-Titrationsexperimenten mit einem synthetischen His₆-Peptid wurde jedoch eine weitaus niedrigere Affinität mit einer K_D von 1,9 μ M ermittelt. Allerdings liegt EPII.44C4 damit dennoch in der Größenordnung gängiger kommerziell erhältlicher Affinitätsreagenzien.

Abschließend wurde ein Fusionsprotein aus der Variante His1 Δ C* und der TEM 1 β -Lactamase in *E. coli* produziert und seine enzymatische Aktivität sowie die Bindungsaktivität für das His₆-tag mit Hilfe enzymkinetischer Experimente und im ELISA nachgewiesen. Das dabei erhaltene funktionelle Fusionsprotein kann als Reagenz für immunchemische Nachweismethoden verwendet werden. In einem *Western Blot*-Experiment wurde das neue β -Lactamase Substrat TIC (7 β -(2-Thienylacetamido)-3-(indolylthioly)-3-cephem-4-carbonsäure), welches nach enzymatischer Hydrolyse ein gefärbtes Präzipitat bildet, getestet. Durch den schnellen Umsatz durch die β -Lactamase, gute Farbintensität und geringe Hintergrundfärbung eignet sich TIC gut zur Anwendung in Festphasen-*Assays* wie dem *Western Blot* oder auch dem *Filter Sandwich Colony Screening Assay*.

6 Abkürzungsverzeichnis

A_x	Absorption bei x nm
Å	Angström (1×10^{-10} m)
ABD	Albumin-Bindungsdomäne des Proteins G aus <i>Streptococcus</i> G148
Amb	<i>Amber</i> -Stoppkodon (TAG)
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
BBP	Bilin-Bindungsprotein
Bla	β -Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
c	Konzentration
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
CBP	Calmodulin-Bindungspeptid
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
$\Delta\Delta pIII$	Aminosäuren 198 bis 406 umfassendes Segment des Phagenhüllproteins pIII
DsbC	Bakterielle Disulfidisomerase C
E	Extinktion
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
F	Fluoreszenzintensität
F _{ab}	Antigen-bindendes Fragment eines Immunglobulins
F _v	Immunglobulinfragment bestehend aus den beiden variablen Domänen
f_x	molare Fluoreszenz eines Moleküls oder Komplexes X
GST	Glutathion-S-Transferase
HSA	Humanes Serum Albumin
IDA	Iminodiessigsäure
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
K_D	Komplexdissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasen
k_{cat}	Enzymatische Wechselzahl

kDa	Kilodalton
MBP	Maltose-Bindungsprotein
Mm	Molmasse
moi	<i>Multiplicity of Infection</i>
NaPi	Natriumphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i>
pIII	Hüllprotein des filamentösen Bakteriophagen M13
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pfu	<i>Plaque Forming Units</i>
RBP	Retinol-Bindungsprotein
RNase A	Ribonuclease A
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
RU	Resonanz-Einheiten
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPA	<i>Staphylococcus</i> Protein A
SPR	Oberflächen-Plasmonresonanz
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tc	Tetracyclin
<i>tet</i> _{p/o}	Tetracyclin-Promotor/Operator
u	Einheit der Enzymaktivität (unit)
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse (<i>Weight</i>) pro Volumen
WT	Wildtyp

7 Literatur

- Åkerstrom, B., Lögdberg, L., Berggård, T., Osmark, P. & Lindqvist, A. (2000b) α 1-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 172-184.
- Andersen, J. F., Francischetti, I. M. B., Valenzuela, J. G., Schuck, P. & Ribeiro, J. M. C. (2003) Inhibition of hemostasis by a high-affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *J. Biol. Chem.* **278**, 4611-4617.
- Arnold, F. H. (1991) Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Bio/Technology* **9**, 151-156.
- Auerswald, E. A., Genenger, G., Assfalg-Machleidt, I., Kos, J. & Bode, W. (1989) Synthesis of a (desSer1 Ile29 Leu89) chicken cystatin gene, expression in *E. coli* as fusion protein and its isolation. *FEBS Lett.* **243**, 186-192.
- Baggio, R., Burgstaller, P., Hale, S. P., Putney, A. R., Lane, M., Lipovsek, D., Wright, M. C., Roberts, R. W., Liu, R., Szostak, J. W. & Wagner, R. W. (2002) Identification of epitope-like consensus motifs using mRNA display. *J. Mol. Recognit.* **15**, 126-134.
- Banaszak, L., Winter, N., Xu, Z. H., Bernlohr, D. A., Cowan, S. & Jones, T. A. (1994) Lipid binding proteins – a family of fatty-acid and retinoid transport proteins. *Adv. Protein Chem.* **45**, 89-151.
- Bandtlow, C., Schiweck, W., Tai, H. H., Schwab, M. E. & Skerra, A. (1996) The *Escherichia coli*-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur. J. Biochem.* **241**, 468-475.
- Barbas, C. F., Bain, J. D., Hoekstra, D. M. & Lerner, R. A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4457-4461.
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (2001) Phage Display: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (2004) Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* **43**, 8038-8047.
- Baumann, U., Bauer, M., Letoffe, S., Delepelaire, P. & Wandersman, C. (1995) Crystal-structure of a complex between *Serratia marcescens* metalloprotease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Mol. Biol.* **248**, 653-661.

- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F. X. & Gross, C. A.** (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO J.* **20**, 285-294.
- Berggard, T., Thelin, N., Falkenberg, C., Enghild, J. J. & Akerstrom, B.** (1997) Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes with alpha1-microglobulin in human plasma. *Eur. J. Biochem.* **245**, 676-683.
- Beste, G.** (1998) Evolutes Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der β -Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. & Skerra, A.** (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1898-1903.
- Bianchet, M. A., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S. H., Monaco, H. L. & Amzel, L. M.** (1996) The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nature Struct. Biol.* **3**, 934-939.
- Bieniarz, C., Cornwell, M. J. & Young, D. F.** (1992a) Chromogenic redox assay for beta-lactamases yielding water-insoluble products. II. Heterogeneous sandwich assay for hCG. *Anal. Biochem.* **207**, 329-334.
- Bieniarz, C., Young, D. F. & Cornwell, M. J.** (1992b) Chromogenic redox assay for beta-lactamases yielding water-insoluble products. I. Kinetic behavior and redox chemistry. *Anal. Biochem.* **207**, 321-328.
- Bird, R. E. & Walker, B. W.** (1991) Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol.* **9**, 132-137.
- Birnboim, C. & Doly, J.** (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bishop, R. E.** (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 73-83.
- Bitto, E. & McKay, D. B.** (2002) Crystallographic Structure of SurA, a Molecular Chaperone that Facilitates Folding of Outer Membrane Porins. *Structure* **10**, 1489-1498.
- Bitto, E. & McKay, D. B.** (2003) The Periplasmic Molecular Chaperone Protein SurA Binds a Peptide Motif That Is Characteristic of Integral Outer Membrane Proteins. *J. Biol. Chem.* **49**, 49316-49322.

- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russel-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Bloch, W.** (1991) A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30**, 2735-2747.
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J. & Turk, V.** (1988) The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg-white cystatin and its possible mode of interaction with cystatin proteinases. *EMBO J.* **7**, 2593-2599.
- Bothmann, H. & Plückthun, A.** (1998) Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nature Biotechnol.* **16**, 376-380.
- Bothmann, H. & Plückthun, A.** (2000) The Periplasmic *Escherichia coli* Peptidylprolyl *cis,trans*-Isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without *cis*-prolines. *J. Biol. Chem.* **22**, 17100-17105.
- Breustedt, D. A., Korndoerfer, I. P., Redl, B. & Skerra, A.** (2005) The 1.8 Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J. Biol. Chem.* **280**, 484-493.
- Briand, L., Eloit, C., Nespoulous, C., Bezirard, V., Huet, J. C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D. & Pernollet, J. C.** (2002) Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* **41**, 7241-7252.
- Bulieris, P. V., Behrens, S., Holst, O., & Kleinschmidt, J. H.** (2003). Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **278**, 9092–9099.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Campanacci, V., Bishop, R. E., Blangy, S., Tegoni, M. & Cambillau, C.** (2006) The membrane bound bacterial lipocalin Blc is a functional dimer with binding preference for lysophospholipids. *FEBS Lett.* **580**, 4877-4883.
- Cavaggioni, A. & Mucignat-Caretta, C.** (2000) Major urinary proteins, α_{2u} -globulins and aphrodisin. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 218-228.

- Cesaro-Tadic, S., Lagos, D., Honegger, A., Rickard, J. H., Partridge, L. J., Blackburn, G. M. & Pluckthun, A.** (2003) Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library. *Nat. Biotechnol.* **21**, 679-685.
- Chao, H., Bautista, D. L., Litowski, J., Irvin, R. T. & Hodges, R. S.** (1998) Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. *J. Chromatogr. B* **715**, 307-329.
- Chayen, N. E., Cianci, M., Grossmann, J. G., Habash, J., Helliwell, J. R., Nnjeji, G. A., Raftery, J., Rizkallah, P. J. & Zagalsky, F.** (2003) Unravelling the structural chemistry of the colouration mechanism in lobster shell. *Acta Cryst.* **D59**, 2072-2082.
- Chen, E. Y. & Seeburg, P. H.** (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Chester, K. A. & Hawkins, R. E.** (1995) Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* **13**, 294-300.
- Christensen, H., Martin, M. T. & Waley, S. G.** (1990) Beta-lactamases as fully efficient enzymes. Determination of all the rate constants in the acyl-enzyme mechanism. *Biochem. J.* **266**, 853-861.
- Cianci, M., Rizkallah, P. J., Olczak, A., Raftery, J., Chayen, N. E., Zagalsky, P. F. & Helliwell, J. R.** (2002) The molecular basis of the coloration mechanism in lobster shell: beta-crustacyanin at 3.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9795-9800.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G.** (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**, 624-628.
- Cline, J. & Hogrefe, H. H.** (2000) Randomize gene sequences with new PCR mutagenesis kit. *Strategies*, **13**, 157-161.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L.** (1972) A rapid and convenient method for the preparing and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3580.
- Cole, R. B.** (ed) (1997) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons.
- Connelly, P. Rp, Varadarajan, R., Sturtevant, J. M. & Richards, F. M.** (1990) Thermodynamics of Protein-Peptide Interactions in the Ribonuclease S System Studied by Titration Calorimetry. *Biochemistry* **29**, 6108-6114.
- Cowan, S. W., Newcomer, M. E. & Jones, T. A.** (1990) Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2 Å resolution. *Proteins* **8**, 44-61.

- Darnault, C., Volbeda, A., Kim, E. J., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P. A. & Fontecilla-Camps, J. C.** (2003) Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 271-279.
- David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S. & Lewit-Bentley, A.** (2003) YodA from *Escherichia coli* is a metal-binding, lipocalin-like protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 43728-43735.
- Deng, L. W., Malik, P. & Perham, R. N.** (1999) Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of *Escherichia coli*. *Virology* **253**, 271-277.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- di Guan, C., Riggs, P. D. & Inouye, H.** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **15**, 21-30.
- Dobbek, H., Svetlichnyi, V. Gremer, L., Huber, R. & Meyer, O.** (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* **293**, 1281-1285.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127.
- Einhauer, A & Jungbauer, A.** (2001) Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide. *J. Chromatogr. A.* **921**, 25-30.
- Essen, L. O. & Skerra, A.** (1993) Single-step purification of a bacterially expressed antibody F_v fragment by immobilized metal affinity chromatography in the presence of betaine. *J. Chromatogr. A.* **657**, 55-61.
- Essen, L. O. & Skerra, A.** (1994) The *de novo* design of an antibody combining site: crystallographic analysis of the VL domain confirms the structural model. *J. Mol. Biol.* **238**, 226-244.
- Essen, L. O.** (1995) *Protein Design mit Antikörpern: Generierung und röntgenkristallographische Charakterisierung synthetischer Antigen-Bindungsstellen.* Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

- Fernandez-Gacio, A., Uguen, M. & Fastrez, J.** (2003) Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes. *Trends Biotechnol.* **21**, 408-414.
- Fiedler, M.** (2002) Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des Anti-NogoA Antikörpers IN-1 durch Protein *Engineering*. Dissertation, *Life Science Zentrum Weihenstephan der Technischen Universität München*.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88.
- Flower, D. R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**, 1-14.
- Flower D. R.** (2000) Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 327-336.
- Flower, D. R., North, A. C. T. & Sansom, C. E.** (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9-24.
- 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**, 3367-3372.
- Frère, J. M.** (1995) Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**, 385-395.
- Fujii, I., Fukuyama, S., Iwabuchi, Y. & Tanimura, R.** (1998) Evolving catalytic antibodies in a phage-displayed combinatorial library. *Nat. Biotechnol.* **16**, 463-467.
- Frenette Charron, J. B., Breton, G., Badawi, M. & Sarhan, F.** (2002) Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. *FEBS Lett.* **517**, 129-132.
- Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W.D., Huber, R. & Bode, W.** (1997) Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11845-11850.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P.** (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *BioTechniques* **5**, 786-791.

- Gibson, T. J.** (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Cambridge University, Cambridge, UK.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. & Strong, R. K.** (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* **10**, 1033-1043.
- Green, N. M.** (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* **184**, 51-67.
- Griffiths, A. D., Malmquist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C., Hoogenboom, H. R. & Winter, G.** (1993) Human self-antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* **12**, 725-734.
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. & Plückthun, A.** (1998) Ribosome Display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14130-14135.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. & de Cock, H.** (2001) The early interaction of the outer membrane protein PhoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 18804-18811.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G.** (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity – mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226**, 889-896.
- He, M. M., Cluqston, S. L., Honek, J. F. & Matthews, B. W.** (2000) Determination of the structure of *Escherichia coli* glyoxilase I suggests a structural basis of differential metal activation. *Biochemistry* **39**, 8719-8727.
- Hearn, M. T. W. & Acosta, D.** (2001) Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins *J. Mol. Recognit.* **14**, 323–369.
- Hengen, P.N.** (1996) Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 75-76.
- Hieber, A. D., Bugos, R. C. & Yamamoto, H. Y.** (2000) Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 84-91.

- Hill, M., Bechet, J. J., and d'Albis, A.** (1979). Disuccinimidyl esters as bifunctional crosslinking reagents for proteins: assays with myosin. *FEBS Lett.* **102**, 282-286.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel chelate adsorbent. *Biotechnology* **6**, 1321-1325.
- 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 β -lactoglobulin from pig (*Sus scrofa*). *Acta Cryst.* **D58**, 480-486.
- Holck, A., and Kleppe, K.** (1988). Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17K protein of *Escherichia coli*. *Gene* **67**, 117-124.
- 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 liability. *J. Mol. Biol.* **288**, 649-657.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, S. K., Chiswell, D. J., Hudson, P. & Winter, G.** (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4133-4137.
- Hoogenboom, H. R.** (1997) Designing and optimizing selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol.* **15**, 62-70.
- Hoogenboom, H. R., de Bruïne, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J.-W. & Roovers, R. C.** (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1-20.
- Hoogenboom, H. R. & Chames, P.** (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol. Today* **21**, 371-378.
- 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**, 423-434.

- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Müller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H.** (1987b) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 499-513.
- Invernizzi, G., Šamalíková, M., Brocca, S., Lotti, M., Molinari, H. & Grandori, R.** (2006) Comparison of bivariate and porcine β-lactoglobulin: a mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.* **41**, 717-727.
- Jelsch, C., Mourey, L., Masson, J. M. & Samama, J. P.** (1993) Crystal structure of *Escherichia coli* TEM1 beta-lactamase at 1.8 Å resolution. *Proteins* **16**, 364-383.
- Jensen, M. R., Petersen, G., Lauritzen, C., Pedersen, J. & Led, J. J.** (2005) Metal binding sites in proteins: identification and characterization by paramagnetic NMR relaxation. *Biochemistry* **44**, 11014-11023.
- Jermutus, L., Honegger, A., Schweisinger, F., Hanes, J. & Plückthun, A.** (2001) Tailoring *in vitro* evolution for protein affinity or stability. *PNAS* **98**, 75-80.
- Jones, R. N., Wilson, H. W. & Novick, W. J., Jr.** (1982a) In vitro evaluation of pyridine-2-azo-p-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other beta-lactam compounds. *J. Clin. Microbiol.* **15**, 677-683.
- Jones, R. N., Wilson, H. W., Novick, W. J., Jr., Barry, A. L. & Thornsberry, C.** (1982b) In vitro evaluation of CENTA, a new beta-lactamase-susceptible chromogenic cephalosporin reagent. *J. Clin. Microbiol.* **15**, 954-958.
- Jones, S. & Thornton, J. M.** (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13-20.
- Jung, S., Honegger, A. & Plückthun, A.** (1999) Selection for improved protein stability by phage display. *J. Mol. Biol.* **294**, 163-180.
- Kapanidis, A. N., Ebright, Y. W. & Ebright, R. H.** (2001) Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni²⁺:nitrilotriacetic acid)_n-fluorochrome conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12123-12125.
- Kaufmann, M., Lindner, P., Honegger, A., Blank, K., Tschopp, M., Capitani, G., Plückthun, A. & Grutter, M. G.** (2002) Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen. *J. Mol. Biol.* **318**, 135-147.

- Kay, B. K., Winter, J. & McCafferty, J.** (1996) Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. Academic Press, San Diego.
- Kayser, H.** (1984) *De novo* synthesis and levels of cytochrome c and a biliprotein during pupal-adult development of a butterfly, *Pieris brassicae*. *Z. Naturforsch.* **39c**, 938-947.
- Kayser, H.** (1985) Pigments, in *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I., eds.) **10**, 367-415, Pergamon Press, New York.
- Keefe, A. D., Wilson, D. S., Seelig, B. & Szostak, J. W.** (2001) One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.* **23**, 440-446.
- Khatkhatay, M. I. & Desai, M.** (1999) A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to beta-lactamase. *J. Immunoassay* **20**, 151-183.
- Kikuchi, G. & Yoshida, T.** (1980) Heme degradation by the microsomal heme oxygenase system. *Trends Biochem. Sci.* **5**, 323-325.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H. & Borregaard, N.** (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 10425-10432.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B. & Borregaard, N.** (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 272-283.
- Knappik, A. & Plückthun, A.** (1994) An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques.* **17**, 754-761.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.** (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* **296**, 57-86.
- Köhler, G. & Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- König, T. & Skerra, A.** (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83.

- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. & Koide, S.** (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* **284**, 1141-1151.
- Kondo, A. & Ueda, M** (2004) Yeast cell-surface display - applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 28-40.
- Korndörfer, I. P., Beste, G. & Skerra A.** (2003a) Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins.* **53**, 121-129.
- Korndörfer, I. P., Schlehuber S. & Skerra, A.** (2003b) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J. Mol. Biol.* **330**, 385-396.
- Korndörfer, I. P., Dommel, M. K. & Skerra A.** (2004) Structure of the periplasmic chaperone Skp suggests functional similarity with cytosolic chaperones despite differing architecture. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1015-1020.
- Kotz JD, Bond CJ, Cochran AG.** (2004) Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1623-1629.
- Kraulis, P.J.** (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
- Kretzschmar, T. & von Rüden, T.** (2002) Antibody discovery: phage display. *Curr. Opin. Biotechnol* **13**, 598-602.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Ladner, R. C.** (1996) Display and selection of proteins on genetic packages. in: *Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual.* (Kay, B. K., Winter, J. & McCafferty, J.) Academic Press, San Diego, 155-156.
- Ladner, R. C., Sato, A. K., Gorzelany, J. & de Souza, M.** (2004) Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov. Today.* **9**, 525-529.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Langen, G. R., Harper, J. R., Silhavy, T. S. & Howard, S. P.** (2001) Absence of the outer membrane phospholipase A suppresses the temperature-sensitive phenotype of *Escherichia coli degP* mutants and induces the cpx and rE extracytoplasmic stress responses. *J. Bacteriol.* **183**, 5230-5238.
- 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. *J. Biol. Chem.* **275**, 21572-21577.
- Lee, S. Y., Choi, J. H. & Xu, Z.** (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* **21**, 45-52.
- Lipovsek, D. & Plückthun, A.** (2004) In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods.* **290**, 51– 67.
- Low, N. M., Holliger, P. H. & Winter, G.** (1996) Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* **260**, 359-368.
- Lowman, H. B., Bass, S. H., Simpson, N. & Wells, J. A.** (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* **30**, 10832-10838.
- Lowman, H. B. & Wells, J. A.** (1991) Monovalent phage display: a method for selecting variant proteins from random libraries. *Methods: Companion Methods Enzymol.* **3**, 205-216.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A.** (1998) The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 140-147.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Plückthun, A. & Wlodawer, A.** (1999) Filamentous-phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. *Structure Fold. Des.* **7**, 711-722.
- Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J. & Virtanen, T.** (2000) Lipocalins as allergens. *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 308-317.
- Marianayagam, N. J., Sunde, M. & Matthews, J. M.** (2004) The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 618-625.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G.** (1991) By-passing immunization: human antibodies from V gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581-597.

- Matsuura, T. & Plückthun, A.** (2003) Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS Lett.* **539**, 24-28.
- Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R. & Dower, W. J.** (1994) An *in vitro* display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9022-9026.
- Matuo, Y., Nishi, N., Tanaka, Y., Muguruma, Y., Tanaka, K., Akatsuka, Y., Matsui, S. I., Sandberg, A. A. & Wada, F.** (1984) Changes of an androgen-dependent nuclear protein during functional differentiation and by dedifferentiation of the dorsolateral prostate of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 467-473.
- Mavrangelos, C., Thiel, M., Adamson, P. J., Millard, D. J., Nobbs, S., Zola, H. & Nicholson, I. C.** (2001) Increased yield and activity of soluble single-chain antibody fragments by combining high-level expression and the Skp periplasmic chaperonin. *Protein Express. Purif.* **23**, 289-295.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J.** (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
- McDonagh, A.F.** (1979) Bile pigments: bilatrienes and 5,15-biladienes. In: *The porphyrins* (D. Dolphin Ed.) Vol. **6**, 294-492, Academic Press, New York.
- McDonagh, C. F., Beam, K. S., Wu, G. J., Chen, J. H., Chace, D. F., Senter, P. D. & Francisco, J. A.** (2003). Improved yield and stability of L49-sFv-beta-lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation, by protein engineering. *Bioconjug. Chem.* **14**, 860-9.
- Meerman, H. J., & Georgiou, G.** (1994). Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* **12**, 1107-1110.
- Mercader, J. V. & Skerra, A.** (2002) Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Anal. Biochem.* **308**, 269-277.
- Mian, I. S., Bradwell, A. R. & Olson, A. J.** (1991) Structure, function and properties of antibody binding sites. *J. Mol. Biol.* **217**, 133-151.
- Michaelis, I. & Menten, M. L.** (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369.
- Miller, J. H.** (1992) A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Minasov, G., Wang, X. & Shoichet, B. K.** (2002) An ultrahigh resolution structure of TEM-1 beta-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5333-5340.
- Model, P. & Russel, M.** (1988) Filamentous bacteriophage, in *The bacteriophages*, Vol. 2, 375-456, Plenum Publishing, New York.
- Monaco, H. L.** (2000) The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochem. Biophys. Acta* **1482**, 65-72.
- Montfort, R.W., Weichsel, A. & Andersen, J.F.** (2000) Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 110-118.
- Movva, N.R., Nakamura, K. & Inouye, M.** (1980) Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 27-29.
- Müller, H. N. & Skerra, A.** (1993) Functional expression of the uncomplexed serum retinolbinding protein in *Escherichia coli*: ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J. Mol. Biol.* **230**, 725-732.
- Müller, K. M., Arndt, K. M., Bauer, K. & Plückthun, A.** (1998) Tandem Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography/Immunoaffinity Purification of His-tagged Proteins — Evaluation of Two Anti-His-Tag Monoclonal Antibodies. *Anal. Biochem.* **259**, 54–61.
- Mulrooney, S. B. & Hausinger, R. P.** (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 239-261.
- Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y. & Hayaishi, O.** (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionary differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4020-4024.
- Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H. J., Eichinger, A. & Skerra, A.** (2006) Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci.* **15**, 190-199.
- NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry)** (1985) Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. *Eur J. Biochem.* **150**, 1-5.
- Neri, D., de Lalla, C., Petrucci, H., Neri, P. & Winter, G.** (1995) Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments. *Biotechnology* **13**, 373-377.

- Neri, D., Montigiani, S. & Kirkham, P. M.** (1996) Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities. *Trends Biotechnol.* **14**, 465-470.
- Newcomer, M. E. & Ong, D. E.** (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochem. 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**, 1448-1459.
- Nguyen, A. W. & Daugherty, P. S.** (2003) Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains. *Methods Mol. Biol.* **231**, 39-44.
- Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Person, A., Hamalainen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F. & Plückthun, A.** (1997) BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal. Biochem.* **252**, 217-228.
- Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsén, L., Elmlad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T. A. & Uhlén, M.** (1987) A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Prot. Eng.* **1**, 107-113.
- Nygren, P. Å., Ståhl, S. & Uhlén, M.** (1994) Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol.* **12**, 184-188.
- Nygren, P. Å. & Skerra, A.** (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J. Immunol. Methods* **290**, 3-28.
- O'Callaghan, C. A., Morris, A., Kirby, S. M. & Shingler, A. H.** (1972) Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1**, 283-288.
- Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P. A., Ullman, C., FitzGerald, K. & McGregor, D.** (2004) CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2806-2810.
- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M. & Peck, K.** (1992) Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal. Biochem.* **205**, 132-136.
- Paesen, G.C., Adams, P. L., Nuttall, P. A. & Stuart, D. L.** (2000) Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 92-101.

- Parmley, S. E. & Smith, G. P.** (1988) Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**, 305-318.
- Pearson, M. A., Schaller, R. A., Overbye Michel, L., Karplus, P. A. & Hausinger, R. P.** (1998) Chemical rescue of *Klebsiella aerogenes* urease variants lacking the carbamylated-lysine nickel ligand. *Biochemistry* **37**, 6214-6220.
- Pedersen, H., Hölder, S., Sutherlin, D. P., Schwitter, U., King, D. S. & Schultz, P. G.** (1998) A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10523-10528.
- Perelson, A. S. & Oster, G. F.** (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J. Theor. Biol.* **81**, 645-670.
- Pervaiz, S. & Brew, K.** (1985) Homology of beta-lactoglobulin, serum retinol-binding protein and protein HC. *Science* **228**, 335-337.
- Pervaiz, S. & Brew, K.** (1987) Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J.* **1**, 209-214.
- Pini, A., Ricci, C. & Bracci, L.** (2002) Phage Display and colony filter screening for high-throughput selection of antibody libraries. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **5**, 503-510.
- Plückthun, A. & Skerra, A.** (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **178**, 497-515.
- Pogge von Strandmann, E., Zoidl, C., Nakhei, H., Holewa, B., Pogge von Strandmann, R., Lorenz, P., Klein-Hitpass, L. & Ryffel, G. U.** (1995) A highly specific and sensitive monoclonal antibody detecting histidine-tagged recombinant proteins. *Protein Eng.* **8**, 733-735.
- Porath, J., Carlsson, J. Olsson, I. & Belfrage, G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Ramm, K. & Plückthun, A.** (2000) The Periplasmic *Escherichia coli* Peptidylprolyl *cis,trans*-Isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **22**, 17106-17113.

- 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**, 739-748.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. & Milne, R.** (2000) Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 185-198.
- Redl B.** (2000) Human tear lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 241-248.
- Rhyner C, Weichel M, Fluckiger S, Hemmann S, Kleber-Janke T, Cramer R.** (2004) Cloning allergens via phage display. *Methods* **32**, 212-218.
- Riemer A, Scheiner O, Jensen-Jarolim E.** (2004) Allergen mimotopes. *Methods* **32**, 321-327.
- Riley, C.T., Barbeau, B.K., Keimg, P.S., Kezdy, F.J., Henrikson, R.L. & Law, J.H.** (1984) The Covalent Protein Structure of Insecticyanin, a Blue Biliprotein from the Hemolymph of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta* L. *J. Biol. Chem.* **259**, 13159-13165.
- Rodi, D. J. & Makowski, L.** (1999) Phage-display technology – finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol* **10**, 87-93.
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R. & Chen, S. M.** (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4500-4504.
- Rüdiger, W., Klose, W., Vuillaume, M. & Barbier, M.** (1968) On the structure of pterobilin, the blue pigment of *Pieris brassicae*. *Experientia* **24**, 1000.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandstrom, K., Xu, Z., Forsberg, G. & Nygren, P. A.** (2003) Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding affibody ligand developed by combinatorial protein engineering. *Protein Eng.* **16**, 691-697.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

- Sawyer, L. & Kontopidis, G.** (2000) The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 136-148.
- Schäfer, U., Beck, K., & Muller, M.** (1999). Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **274**(35), 24567-24574.
- Schatz, P. J., Cull, M. G., Martin, E. L. & Gates, C. M.** (1996) Screening of peptide libraries linked to lac repressor. *Methods Enzymol.* **267**, 171-191.
- Scheer, H. & Kayser, H.** (1988) Conformational studies of biliproteins from the insects *Pieris brassicae* and *Cerura vinula*. *Z. Naturforsch.* **43c**, 84-90.
- Schiweck, W., Buxbaum, B., Schätzlein, C., Neiss, H. G. & Skerra, A.** (1997) Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 910: the V_H domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. *FEBS* **414**, 33-38.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1995) Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallisation through constant domain shuffling. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **23**, 561-565.
- Schlapschy, M.** (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Schlapschy, M., Dommel, M. K., Hadian, K., Fogarasi, M., Korndorfer, I. P. & Skerra, A.** (2004) The periplasmic E. coli chaperone Skp is a trimer in solution: biophysical and preliminary crystallographic characterization. *Biol. Chem.* **385**, 137-143.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A.** (2006). A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 385-390.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A.** (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* **297**, 1105-1120.
- Schlehuber, S.** (2001) Evolutes Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. Dissertation, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München.
- Schlehuber, S. & Skerra A.** (2001) Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol. Chem.* **382**, 1335-1342.

- Schlehuber, S. & Skerra A.** (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys. Chem.* **96**, 213-228.
- Schlehuber, S. & Skerra A.** (2005) Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to 'anticalins'. *DDT* **10**, 23-33.
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I. & Dübel, S.** (2000) Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Meth.* **242**, 101-114.
- Schmidt, A.M.** (1998) Untersuchungen zur Proteinfaltung durch Protein Design am Retinol-Bindungsprotein. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Schmidt, A.M., Bloß, I. & Skerra, A.** (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *E. coli*: positive influences of *dsbC* coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng.* **11**, 601-607.
- Schmidt, A.M., Müller, H. N. & Skerra, A.** (1996) A Zn(II)-binding site engineered into retinol-binding protein exhibits metal-ion specificity and allows highly efficient affinity purification with a newly designed metal ligand. *Chem. Biol.* **3**, 645-653.
- Schmidt, F.S. & Skerra, A.** (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*: cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* **219**, 855-863.
- Schmidt, F. S.** (1995) Das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae* – die β -Barrel Proteinarchitektur als Grundlage für die evolutive Generierung von Rezeptormolekülen mit neuen Bindungseigenschaften. Dissertation, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Schmidt, T.G.M. & Skerra, A.** (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig F_v fragment. *Prot. Eng.* **6**, 109-122.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A.** (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep Tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr.* **676**, 337-345.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A.** (1996) Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.

- Schneider, S., Baumann, F., Geiselhart, P., Kayser, H. & Scheer, H.** (1988) Biliproteins from the butterfly *Pieris brassicae* studied by time resolved fluorescence and coherent anti-stokes raman spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **48**, 239-242.
- Schreck, S. F., Parker, C., Plumb, M. E. & Sodetz, J. M.** (2000) Human complement protein C8 gamma. *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**, 199-208.
- Sinha, N.D., Biernat, J., McManus, J. & Köster, H.** (1984) Polymer support oligonucleotide synthesis. XVIII: use of β -cyanethyl-N,N-dialkylamino-N-morpholino phosphamidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4539-4557.
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin F_v fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Skerra, A.** (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Skerra, A., Dreher, M.L. & Winter, G.** (1991a) Filter screening of antibody F_{ab} fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal. Biochem.* **196**, 151-155.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A.** (1991b) The functional expression of antibody F_v fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology* **9**, 273-278.
- Skerra, A.** (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 256-262.
- Skerra, A.** (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody F_{ab} fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (1994) Use of the tetracycline promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra A.** (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra A.** (2001) „Anticalins“: a new class of engineered-ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J. Biotechnol.* **74**, 257-275.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G.M** (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for recombinant protein purification and detection. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.

- Skerra A.** (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 683-693.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S.** (1988) One-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Smith, G. P.** (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
- Smith, G. P. & Petrenko, V. A.** (1997) Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391-410.
- Smith, J. C., Derbyshire, R. B., Cook, E., Dunthorne, L., Viney, J., Brewer, S. J., Sassenfeld, H. M. & Bell, L. D.** (1984) Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene* **32**, 321-327.
- Smith, W., Butler, A. J., Hazell, L. A., Chapman, M. D., Pomes, A., Nickels, D. G. & Thomas, W. R.** (2004) Fel d 4, a cat lipocalin allergen. *Clin. Exp. Allergy.* **34**, 1732-1738.
- Söderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A. M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. & Borrebaeck, C. A.** (2000) Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **18**, 852-856.
- Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. & Rasched, I.** (1990) Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites. *J. Mol. Biol.* **212**, 143-149.
- Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K. & James, M. N.** (1992) Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **359**, 700-705.
- Suter, F., Kayser, H. & Zuber, H.** (1988) The complete amino-acid sequence of the bilin-binding protein from *Pieris brassicae* and its similarity to a family of serum transport proteins like the retinol-binding proteins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **369**, 497-505.
- Szardenings M.** (2003) Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **23**, 307-349.

- Tabor, S. & Richardson, C. C.** (1995) A single residue in DNA polymerases of *Escherichia coli* DNA polymerase family I is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxy-nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6339-6343.
- Takahashi, T. T., Austin, R. J. & Roberts, R. W.** (2003) mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 159-165.
- Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Ramoni, R. & Cambillau, C.** (2000) Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 229-240.
- Terpe, K.** (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533.
- Tucker, J. & Grishammer, R.** (1996) Purification of a rat neurotensin receptor in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **317**, 891-899.
- Tudyka, T.** (1998) Konstruktion eines Dimerisierungs- und Effektormoduls für Bindungsproteine: Verwendung der Glutathion S-transferase als sekretierbarer, enzymatisch aktiver Fusionspartner für den Proteaseinhibitor Cystatin. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt.
- Tung, W.L. & Chow, K.C.** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* **11**, 128-129.
- Urade, Y. & Hayaishi, O.** (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 259-271.
- van't Hof, W., Blankenvoorde, M. F. J., Veerman, E. C. I. & Amerongen, A. V. N.** (1997) The salivary lipocalin Von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **272**, 1837-1841.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J. & Johnson, K. S.** (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat. Biotechnol.* **14**, 309-314.
- Valenti, L. E., De Pauli, C. P. & Giacomelli, C. E.** (2006) The binding of Ni(II) ions to hexahistidine as a model system of the interaction between nickel and His-tagged proteins. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 192-200.

- Vieira, J. & Messing, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Vogt, M.** (1996) Evolutes Design eines künstlichen Lipocalin-Proteins mit Bindungsaktivität für Oligo-Histidin-Sequenzen. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie der Technischen Hochschule, Darmstadt.
- Vogt, M. & Skerra, A.** (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem.* **5**, 191-199.
- Volbeda, A., Charon., M.-H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M. & Fontecilla-Camps, J. C.** (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**, 580-587.
- Voss, S. & Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**, 975-982.
- Vuillaume, M. & Dattée, Y.** (1980) Photostimulation de la production d'ATP dans le tégument d'un insecte: interprétation physiologique des analyses *in vivo* et *in vitro*. *Arch. Zool. Exp. Gén.* **121**, 159-172.
- Weichel, M.** (1997) Selektion und Charakterisierung von künstlichen Varianten des Bilin-Bindungsproteins mit Affinität zur Hexahistidin-Sequenz. Diplomarbeit, Fachbereich Chemie der Technischen Hochschule, Darmstadt.
- Weichsel, A., Andersen, J.F., Champagne, D.E., Walker, F.A. & Montfort, W.R.** (1998) Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 304-309.
- Wells, J. A. & Lowman, H. B.** (1992) Rapid evolution of peptide and protein binding properties *in vitro*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 597-604.
- Wernerus, H. & Stahl, S.** (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**, 209-228.
- Widersten, M. & Mannervik, B.** (1995) Glutathione transferases with novel active sites isolated by phage display from a library of random mutants. *J. Mol. Biol.* **250**, 115-122.
- Wojnar P, Lechner M, Merschak P, Redl B.** (2001) Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display. *J. Biol. Chem.* **276**, 20206-20212.

- Wülfing, C., Lombardero, J., and Plückthun, A.** (1994) An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* **269**, 2895-2901.
- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R. G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A. C., Liu, H., Lohse, P. A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R. W. & Lipovsek, D.** (2002) Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem. Biol.* **9**, 933-942.
- Xu, Q., Schwarzenbacher, R., Krishna, S. S., McMullan, D., Agarwalla, S., Quijano, K., Abdubek, P., Ambing, E., Axelrod, H., Biorac, T., Canaves, J. M., Chiu, H. J., Elsliger, M. A., Grittini, C., Grzechnik, S. K., DiDonato, M., Hale, J., Hampton, E., Han, G. W., Haugen, J., Hornsby, M., Jaroszewski, L., Klock, H. E., Knuth, M. W., Koesema, E., Kreuzsch, A., Kuhn, P., Miller, M. D., Moy, K., Nigoghossian, E., Paulsen, J., Reyes, R., Rife, C., Spraggon, G., Stevens, R. C., van den Bedem, H., Velasquez, J., White, A., Wolf, G., Hodgson, K. O., Wooley, J., Deacon, A. M., Godzik, A., Lesley, S. A. & Wilson, I. A.** (2006) Crystal structure of acireductone dioxygenase (ARD) from *Mus musculus* at 2.06 angstrom resolution. *Proteins* **64**, 808-813.
- Yang, W. P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T. B. & Barbas, C. F.** (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* **254**, 392-403.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yonezawa, M. Doi, N., Kawahashi, Y., Higashinakagawa, T. & Yanagawa, H.** (2003) DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries. *Nucleic Acids Res.* **31**, e118.
- 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.
- Zaccolo, M. & Gherardi, E.** (1999). The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase. *J. Mol. Biol.* **285**, 775-783.
- Zachariou M.** (2004) Immobilized metal ion affinity chromatography of proteins. *Methods Mol. Biol.* **251**, 89-102.

- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. & Creighton, T.E.** (1995) Structural and functional characterization of *DsbC*, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 5075-5089.
- Zenobi, R. & Knochenmuss, R.** (1998) Ion formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **17**, 337-366.
- Zentgraf, H., Frey, M., Schwinn, S., Tessmer, C., Willemann, B., Samstag, Y. & Velhagen, I.** (1995) Detection of histidine-tagged fusion proteins by using a high-specific mouse monoclonal anti-histidine tag antibody. *Nucleic Acids Research* **23**, 3347-3348.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. A. Skerra für die hervorragende Betreuung, die unermüdliche Unterstützung und seine ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Dr. Ramiro Medina für die Synthese von TIC und die hilfreiche Unterstützung bei den Western Blots,

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie für die angenehme und ausgezeichnete Zusammenarbeit sowie für die praktische Unterstützung,

meinen Kollegen aus dem Labor, Hilke Zander, Eva Hettich, Martin Schlapschy, Daniel Breustedt, Gilbert Haug, Dagmar Hann, Margrit Winkler, Christian Kirchner, Cristine Cirl, Sven Vopel, Hyun Jin Kim, Sebastian Lücker, Jan-Peter Mayer, Ingo Korndörfer, Ina Theobald, Josef Danzer, Klaus Wachinger und Irmgard Neumaier für die technischen und theoretischen Hilfestellungen.

Insbesondere möchte ich mich bei Markus und meinen Eltern für deren unermessliche Geduld und den Rückhalt, den Sie mir gegeben haben, bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Zala Lazar
Geburtsdatum	27. September 1974
Geburtsort	Maribor, Slowenien
Staatsbürgerschaft	Slowenisch

Schulbildung

1981 – 1989	Grundschule in Maribor, Slowenien
1989 – 1993	Naturwissenschaftliches Gymnasium in Maribor, Slowenien Abschluss Abitur

Akademische Ausbildung

10/1993 – 05/2000	Studium der Technischen Chemie an der Technischen Universität Graz, Österreich Studienzweig Biotechnologie, Biochemie und Lebensmittelchemie
Diplomarbeit	angefertigt bei Prof. Dr. Gerhart Braunegg am Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik an der Technischen Universität Graz mit dem Thema „Versuche zur Produktion von Polyhydroxyalkanoaten mit Lactose als Kohlenstoffquelle“
Sponsion	23.06.2000
Akademischer Grad	Dipl.-Ing. der Technischen Chemie
09/2000 – 09/2004	Promotion bei Prof. Dr. Arne Skerra am Lehrstuhl für Biologische Chemie am Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen des Wissenschaftszentrum Weihenstephan an der Technischen Universität München

Erklärung

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

Zala Lazar

München, 6. Mai 2007

