

Generierung künstlicher Bindeproteine basierend auf dem humanen γ B-Kristallin.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Diplom-Biologe Patrick Studte
geb. am 26.12.1981 in Haldensleben

Gutachter: 1. Dr. habil. Hauke Lilie
 2. Prof. Dr. Katja Arndt
 3. Prof. Dr. Frank Bordusa

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20.06.2016, Halle (Saale)

Für meine Eltern.

Zusammenfassung

Antikörper und deren Derivate sind immer noch die am häufigsten eingesetzten Bindemoleküle für klinische Anwendungen. Der ständig wachsende Bedarf an innovativen Diagnostika und Therapeutika hat neben den intrinsischen Nachteilen der Antikörper-Architektur die Entwicklung konzeptioneller Alternativen zum ursprünglichen Bindungskonzept der Antikörper erheblich vorangetrieben. Dabei sollten diese sogenannten künstlichen Bindeproteine die hohe Affinität und Spezifität der Antikörper mit den Vorteilen ihrer minimalistischen Architektur vereinen. Gewährleistet wird dies durch die Mutation von Aminosäureresten in verschiedenen Sekundärstrukturbereichen des Gerüstproteins.

Das aus zwei Domänen bestehende humane gammaB-Kristallin wurde bereits in vorherigen Arbeiten als Bindeprotein etabliert, in dem auf einem der äußeren, Domänen abgewandten β -Faltblätter ein *de novo*-Paratop geschaffen wurde. Um den anfänglichen Ansatz weiterzuentwickeln wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Paratop in der Interdomänen-Kontaktfläche generiert. Hierzu wurden verschiedene Bibliotheksformate erstellt, von der Einzeldomäne mit bis zu acht randomisierten Aminosäurepositionen, bis hin zum Volllängenprotein mit insgesamt 13 randomisierten Resten. Als Zielstruktur für entsprechende Selektionen im TAT-abhängigen Phagen-*display* wurde das pharmakologisch relevante Protein Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha ausgewählt. Das Einzeldomänenkonzept erwies sich dabei gegenüber dem Volllängenkonzept als nicht funktional. Im Volllängen-Format war hingegen die Generierung einer hochfunktionalen Bibliothek möglich die letztlich zur Isolierung spezifischer TNF α -bindender Proteinvarianten führte. Die Variante mit der höchsten Spezifität und den besten physikochemischen Eigenschaften wurde detaillierter analysiert. Die 13 Austausche zeigten sowohl deutliche strukturelle Einflüsse als auch Auswirkungen auf die thermische Stabilität. Die Affinität zwischen beiden Proteinen lag im nanomolaren Bereich, wobei die Interaktion mit dem TNF α -Monomer auf einer 1:1 Stöchiometrie beruhte. Die Untersuchungen wiesen auf ein ungewöhnliches Bindungsverhalten hin, da bisher noch kein reiner Monomer-Binder beschrieben wurde. Das Epitop wird innerhalb der Monomer-Kontaktfläche vermutet, da die Bindung der Kristallin-Variante mit der Dissoziation des TNF α -Homotrimers einherging.

Die Funktionalität des neuen Paratops innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche des humanen γ B-Kristallins konnte mit der erfolgreichen Selektion der TNF α -bindenden Kristallin-Variante eindeutig gezeigt werden.

Inhaltsverzeichnis	II
<hr/>	
Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Alternative Bindeproteine.....	3
1.2 Erstellung von DNA-Bibliotheken für die Selektion von Bindeproteinen.....	6
1.3 Selektion von Bindeproteinen	10
1.4 Humanes gamma B-Kristallin (hgBC) als Gerüstprotein	12
1.5 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) als Zielstruktur.....	16
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Ergebnisse	21
2.1 Selektion einer Einzeldomänen-hgBC-Bibliothek gegen TNF α	21
2.1.1 Auswahl geeigneter Aminosäuren in der C-terminalen Domäne	22
2.1.2 PCR-basierte Assemblierung der C-hgBC-Bibliotheken.....	23
2.1.3 Charakterisierung naiver Bibliotheksvarianten.....	26
2.2 Selektion einer Volllängen-hgBC-Bibliothek gegen TNF α	29
2.2.1 Auswahl geeigneter Aminosäuren im Volllängen-Protein.....	30
2.2.2 Modulare Erstellung der Volllängen-hgBC-Bibliothek	31
2.2.3 Löslichkeitsanalyse naiver Bibliotheksmitglieder	34
2.2.4 Selektion der hgBC-Bibliothek gegen TNF α	36
2.2.5 Identifizierung von TNF α -bindenden Varianten	37
2.3 Charakterisierung der TNF α -bindenden Variante R3-B11	40
2.3.1 Expression und Reinigung im Schüttelkolben	40
2.3.2 Struktur und Stabilität von R3-B11.....	42
2.3.3 Interaktion von R3-B11 mit humanem TNF α	44
2.3.4 Qualitativer Nachweis des Komplexes aus R3-B11 und TNF α	46
2.3.5 Fluoreszenzkinetische Untersuchung der TNF α -Trimerdissoziation.....	48
3. Diskussion	51
3.1 Qualität der Einzeldomänen-Bibliothek und Selektion gegen TNF α	52
3.2 Qualität der hgBC-Volllängen-Bibliothek.....	55
3.3 Selektion der hgBC-Volllängen-Bibliothek gegen TNF α	57
3.4 Charakterisierung der TNF α -bindenden hgBC-Variante R3-B11	59
4. Ausblick	66
5. Material und Methoden	68

5.1 Chemikalien	68
5.2 Puffer und Lösungen.....	70
5.3 Kulturmedien und Antibiotika	71
5.4 Enzyme und andere Proteine	72
5.5 Standards und Kits	73
5.6 Oligodesoxynukleotide	74
5.7 Plasmide.....	77
5.8 Mikroorganismen und Phagen.....	77
5.9 Geräte und Zubehör	78
5.10 Sonstige Materialien	81
5.11 Software	82
5.12 Molekularbiologische Methoden	83
5.12.1 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> und Agarosegelen.....	83
5.12.2 DNA-Spaltung und -Dephosphorylierung	84
5.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten	84
5.12.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA	84
5.12.5 DNA-Fällung mittels Ethanol	85
5.12.6 Konzentrationsbestimmung von DNA- und Proteinlösungen.....	85
5.12.7 DNA-Sequenzierung und Analyse	86
5.12.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	86
5.13 Mikrobiologische Methoden.....	86
5.13.1 Stammhaltung und Kultivierung von <i>E. coli</i>	86
5.13.2 Herstellung kompetenter Zellen	87
5.13.3 Transformation von <i>E. coli</i>	88
5.13.4 Transgenexpression im Schüttelkolben.....	89
5.13.5 Transgenexpression in 96-well-Platten	89
5.14 Evolutionäre Selektion durch TAT-Phagen- <i>display</i>	91
5.14.1 Erstellung von Kristallin-DNA-Bibliotheken für das Phagen- <i>display</i>	91
5.14.1.1 NNK-basierte Bibliotheken der C-terminalen Domäne	91
5.14.1.2 Trinukleotid-basierte Vollängen-Bibliothek	93
5.14.2 Selektion der Bibliothek(en) gegen humanes TNF α	96
5.14.3 Durchmusterung und Subklonierung erhaltener Varianten.....	99
5.15 Proteinbiochemische Methoden.....	100
5.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	100
5.15.2 Proteinreinigung	101
5.15.2.1 Reinigung von hgBC und dessen Varianten	102

5.15.2.2	Reinigung des Zielproteins TNF α	103
5.15.3	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	103
5.15.4	Analytische Größenausschlusschromatographie	103
5.15.5	Amin-spezifische Modifikation von Proteinen	103
5.15.6	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	104
5.15.7	Analytische Ultrazentrifugation	105
5.15.8	Massenspektrometrie.....	105
5.15.9	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	106
5.15.10	Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie.....	106
5.15.11	Dissoziationsverhalten von TNF α (Fluoreszenz-Selbstausschaltung) ..	107
6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Anhang	125
	Danksagung	128
	Publikationen und Poster	129
	Eidesstattliche Erklärung	130
	Angaben zur Person	131

Abkürzungsverzeichnis

Ab	<i>antibody</i> (Antikörper)
Abb.	Abbildung
AC	<i>affinity chromatography</i> (Affinitätschromatographie)
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
A.U.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>absorbance units</i> (Absorptionseinheiten)
A _x	Extinktion bei der Wellenlänge X nm
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Carb ^R	Carbenicillin-Resistenz
CD	Zirkulardichroismus
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
C _H /C _L	<i>constant region heavy chain (H)/light chain (L)</i>
ck	chemisch kompetente Zellen
C-hgBC	C-terminale Domäne des hgBC
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
dA	Desoxyadenosintriphosphat
dC	Desoxycytidintriphosphat
dG	Desoxyguanosintriphosphat
dT	Desoxythymidintriphosphat
Da / kDa	Dalton / Kilodalton
DARP	<i>designed ankyrin-repeat protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DSF	<i>differential scanning fluorimetry</i>
ddH ₂ O	<i>double distilled water</i> (mehrfach destilliertes Wasser)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ek	elektrokompetente Zellen
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen-binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
GF	Gelfiltration
Gln.	Gleichung
FD	<i>fast digest</i> Restriktionsendonukleasen
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
hgBC	humanes gamma B-Kristallin
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
Ig	Immunglobuline
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen(paare)
LB	<i>lysogeny broth</i>
LB _{Cam}	LB-Medium versetzt mit Chloramphenicol

MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MTP	Mikrotiterplatte
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (molekulare Größenausschlussgrenze)
N-hgBC	N-terminale Domäne des hgBC
NWG	Nachwuchsgruppe Künstliche Bindeproteine
o/n	<i>over night</i> (Inkubation über Nacht bei angegebener Temperatur)
p.A.	<i>pro analysi</i> (analyserein)
pAb	<i>polyclonal antibody</i> (polyklonaler Antikörper)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PBST	PBS versetzt mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDB	<i>protein data bank</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
red.	Reduzierend
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>single-chain variable fragment</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SOC	<i>super optimal broth medium</i> mit Glukose
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNF α converting enzyme</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
T _m	mittlere Übergangstemperatur
TMB	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (Peroxidase-Substrat)
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
UV	ultraviolett
V _H /V _L	<i>variable region heavy chain/light chain</i>
VHH	<i>antigen-binding variable domain</i> der H-Kette der <i>heavy-chain antibodies</i>
VMA	<i>vacuolar membrane ATPase</i>
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
wt hgBC-SG ₄	Wildtyp gamma B-Kristallin mit zusätzlichen fünf Aminosäuren (SG ₄) im Wildtyp <i>linker</i> -Peptid
(w/v)	<i>weight / volume</i> (Gewicht pro Volumen)
(v/v)	<i>volume / volume</i> (Volumen pro Gesamtvolumen)

Allgemein übliche bzw. gebräuchliche Abkürzungen sowie Maßeinheiten sind hier nicht weiter aufgeführt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

1	Schematische Darstellung eines Antikörpers der IgG-Familie.	1
2	Leserahmenselektionssysteme im Überblick.	9
3	M13 Phagen-display.	11
4	Strukturmodell des humanen γ B-Kristallins.	13
5	Strategien des Bibliotheksdesigns.	15
6	Freies und Rezeptor-gebundenes TNF-alpha.	19
7	Randomisierungsfläche in der C-terminalen Domäne des humanen γ B-Kristallins.	22
8	Randomisierte Aminosäurepositionen in den C-hgBC-DNA-Bibliotheken.	23
9	Nukleotid- und Aminosäureverteilung in den fünf C-hgBC-Bibliotheken.	26
10	Expressionsanalyse der naiven C-hgBC-Bibliotheken.	27
11	Apparente Schmelztemperaturen (app. T_m) der Bibliotheksmitglieder.	28
12	Randomisierungsflächen in der Volllängen-hgBC-Bibliothek.	30
13	Modularer Aufbau des Volllängen-hgBC.	32
14	Aminosäureverteilung in der modularen naiven Volllängen-hgBC-Bibliothek.	34
15	Expressionsanalyse der naiven Volllängen-hgBC-Bibliothek.	35
16	Einzelphagen-ELISA putativer TNF α -Binder.	38
17	Analyse ausgewählter TNF α -bindender hgBC-Varianten.	39
18	Chromatographische Reinigung der hgBC-Variante R3-B11.	41
19	Fern-UV-CD-Spektren der selektierten Variante.	43
20	Temperaturinduzierte Entfaltung von R3-B11.	44
21	Ermittlung der Bindungsspezifität der Variante R3-B11 über ELISA.	45
22	Ermittlung der Affinität zwischen R3-B11 und TNF α .	46
23	Analyse der Komplexbildung von TNF α und R3-B11 über analytische Gelfiltration.	47
24	Bestimmung des Molekulargewichts des Komplexes aus TNF α und Fluorescein-R3-B11 über Gleichgewichtssedimentation.	48
25	Einfluss verschiedener Interaktoren auf den Austausch an Monomeren im TNF α .	50
26	Generierung der C-hgBC-DNA-Bibliotheken.	92
27	Zusammensetzung der Module zur Volllängen-hgBC-Bibliothek.	95
A1	Vektoren für die Selektion der hgBC-Bibliothek und die Expression einzelner Varianten.	125
A2	Phagen- <i>pool</i> -ELISA.	126
A3	Komplexassoziation mit und ohne Tween-20.	126

Tabellen:

1	TNF α -Binder im Überblick.	18
2	Funktionalitäten der C-hgBC-Bibliotheken.	24
3	Zusammenfassung der Daten zu den C-hgBC-Einzeldomänen Bibliotheken.	29
4	Funktionalität der Vollängen-Bibliothek Lib13.1A im Vergleich zur Einzeldomänen-Bibliothek Lib6.1A.	33
5	Selektionsverlauf.	37
6	Sekundärstrukturanteile in den untersuchten Proteinen nach Auswertung durch CONTINLL.	43
7	Liste der verwendeten Chemikalien.	68
8	Liste verwendeter Puffer und Lösungen.	70
9	Liste der Nährmedien für Mikroorganismen.	71
10	Übersicht der eingesetzten Antibiotika.	72
11	Auflistung verwendeter Enzyme und Standardproteine.	72
12	Liste der verwendeten Kits und Standards.	73
13	Liste der Oligodesoxynukleotide.	74
14	Codonverteilung bei der Verwendung von NNK-Motiven.	76
15	Codonverteilung an den degenerierten Positionen (mix) der gelisteten Oligodesoxynukleotide in Tabelle 13.	76
16	Liste der verwendeten Plasmide.	77
17	Liste verwendeter Mikroorganismen und Phagen.	77
18	Geräte- und Zubehörliste.	78
19	Liste sonstiger Materialien.	81
20	Liste der verwendeten Software.	82
21	Sequenzfragmente für die Assemblierung der hgBC-Bibliothek.	94
22	Selektionsstrategie der Vollängen- (hgBC_Lib13.1A) und der Einzeldomänen-Bibliothek (C-hgBC_Lib6.1A) gegen TNF α .	97
23	Parameter der Peak-Erkennung für AC und SEC.	102
24	Verdünnungen von Antikörpern und Immunkonjugaten.	105
A1	Statistische Parameter zu den Bibliotheken (χ^2 -Test).	127

1 Einleitung

Ohne Interaktion gäbe es weder eine mikroskopische noch makroskopische Welt, so wie wir sie heute kennen. Als fundamentaler Bestandteil zellulärer Reaktionsmechanismen ist sie auch die treibende Kraft evolutiver Prozesse, die es den Organismen dieses Planeten ermöglicht sich an ständig verändernde Bedingungen anzupassen. Gemäß Burnet und Fenner (1949) müssen carnivore Organismen notwendigerweise Fähigkeiten zur „Fremderkennung“ besitzen, um körpereigene von körperfremden Molekülen zu unterscheiden. Kiefertragende Vertebraten haben dafür Antikörper (Immunglobuline, Ig) als universelle Bindemoleküle entwickelt. Antikörper bilden zusammen mit dem Komplementsystem den basalen Bestandteil der humoralen Immunantwort (proteinbasiert) in Vertebraten und lassen sich in fünf Klassen untergliedern (Vidarsson *et al.*, 2014). Die Vertreter der IgG-Klasse bestehen aus vier Polypeptidketten, je zwei identischen leichten (L-Kette, ca. 25 kDa) und zwei identischen schweren Ketten (H-Kette, ca. 55 kDa), die intra- und intermolekular durch Disulfidbrücken verbunden sind (Padlan, 1994; Muyldermans, 2013; vgl. Abb. 1). Die einzelnen Ketten sind ihrerseits aus mehreren Immunglobulindomänen mit überwiegend antiparalleler β -Faltblatt-Struktur zusammengesetzt.

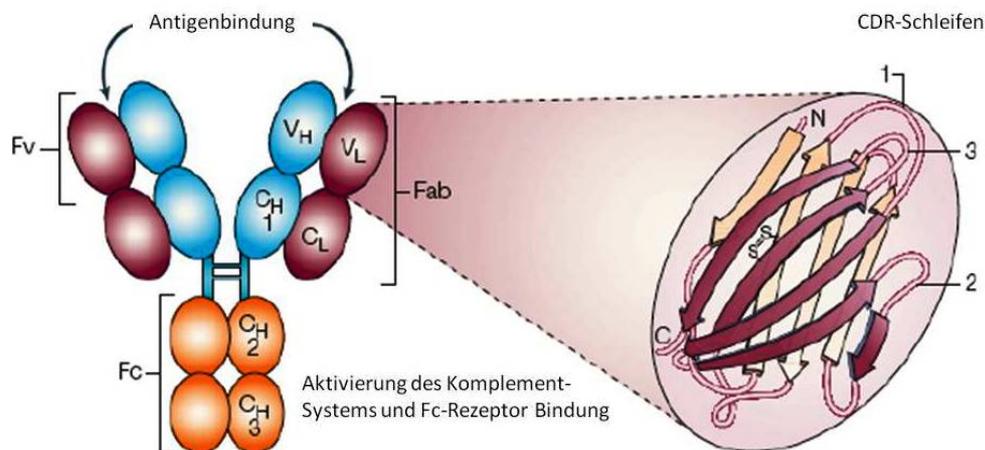


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Antikörpers der IgG-Familie. Die β -sandwich-Topologie (*zoom*, rechte Seite) bildet das übergeordnete Sekundärstrukturmerkmal der heterotetrameren Antikörper. Sie bestehen aus zwei identischen leichten (violett, mit CL und VL), sowie zwei identischen schweren Ketten (blau und orange, mit CH und VH). Die schweren Ketten sind in der Scharnierregion (blaue Striche) durch Disulfidbrücken verknüpft und die leichten Ketten ihrerseits über Disulfidbrücken kovalent mit den schweren Ketten verbunden. Die variablen Domänen sowohl der schweren als auch der leichten Kette (Fv) enthalten die als hypervariable Regionen (CDR) bezeichneten Antigenbindemotive. Die beiden Antikörperfragmente Fc und Fab entstehen durch den enzymatischen Verdau mit Papain. Die Abbildung wurde modifiziert nach Brekke und Sandlie (2003).

Bereits 1890 konnten durch Emil Adolf von Behring und Shibasaburo Kitasato sogenannte „Antitoxine“ im Serum von Patienten, die eine Diphtherieinfektion überstanden hatten, nachgewiesen werden. Im Jahre 1926 gelang es schließlich Lloyd Felton, die mittlerweile als Antikörper bezeichneten Moleküle (Paul Ehrlich, 1891), erstmals zu reinigen. Als Meilensteine der Immunforschung gelten sowohl die spätere Strukturaufklärung der Antikörper durch Rodney R. Porter (1959 bis 1961), als auch die Entwicklung der Hybridom-Technik, mit der es erstmals gelang monoklonale Antikörper herzustellen (Kohler und Milstein, 1975). Diese Errungenschaften ebneten endgültig den Weg für ihren Einsatz in Diagnostik und Therapie. Muromomab-CD3 (Orthoclone OKT₃) war 1986 der erste von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für therapeutische Anwendungen zugelassene monoklonale murine Antikörper (Goldstein *et al.*, 1985). Er wurde als Immunsuppressivum bei Transplantationsabwehrreaktionen eingesetzt und war gegen den CD3-Rezeptor der T-Lymphozyten gerichtet. Da spezie fremde Antikörper unerwünschte Immunreaktionen auslösen können (Waldmann, 2003), wurde die Entwicklung chimärer (Neuberger *et al.*, 1985), humanisierter (CDR *grafting*; Jones *et al.*, 1986) und letztlich vollständig humaner Antikörper vorangetrieben (Hoogenboom und Chames, 2000; He *et al.*, 2002; Lonberg, 2008). Derzeit sind etwa 35 Antikörper für die Behandlung immunologischer und neoplastischer Krankheiten in den USA und Europa zugelassen - insgesamt rund 70 chimäre und humanisierte monoklonale Antikörper befinden sich noch in der klinischen Phase (DeMeyer *et al.*, 2014; Reichert, 2013).

Trotz ihrer langen Erfolgsgeschichte und bis heute gültigen Vormachtstellung im Bereich therapeutischer Agenzien (Reichert, 2010; Reichert, 2012) bringen Immunoglobuline auch einige Limitierungen mit sich (Chames *et al.*, 2009). So lassen sie sich nicht ohne Weiteres in bakteriellen Zellen herstellen (Skerra und Plückthun, 1988), da sie aus vier disulfidverbrückten Polypeptidketten bestehen und zudem funktionsbedingt an den schweren Ketten glykosyliert sind. Demzufolge ist oftmals eine Expression in eukaryotischen Zellen erforderlich. Werden Antikörper mit zusätzlichen Effektoren fusioniert, die z.B. ihre therapeutische Effizienz oder Detektion verbessern sollen, zeigen sie zudem Aggregationsanfälligkeit (de Graaf *et al.*, 2002; Ruigrok *et al.*, 2011). Ihr durchschnittliches Molekulargewicht von 150 kDa schränkt auch ihre Gewebepenetration ein (Chester und Hawkins, 1995), resultierend in einer geringen *Clearance*-Rate (Ausscheidungsrate über die Nieren) und somit erhöhten Verweilzeit gerade auch in gesundem Gewebe, was sie für den Einsatz im *tumor targeting* oder in der Radiotherapie unbrauchbar macht (Lorey *et al.*, 2014). Des Weiteren sind über den Fc-Teil vermittelte Effektorfunktionen, wie etwa antikörperabhängige zellvermittelte Zytolyse (ADCC) und komplementabhängige Zytolyse (CDC),

nicht für alle Therapieanwendungen erwünscht (Clynes *et al.*, 2000; Lutterotti und Martin, 2008, Chames *et al.*, 2009). Für nicht therapeutische Anwendungen, wie z.B. in der Affinitätschromatographie, erweisen sie sich durch ihre geringe pH-Stabilität für stringente Regenerationsbedingungen ebenfalls als ungeeignet (Ruigrok *et al.*, 2011). Schlussendlich trugen komplexe Patentsituationen ebenfalls dazu bei, dass die Entwicklung von Alternativen zu den extensiv genutzten Antikörpern vorangetrieben wurde (Binz *et al.*, 2005).

Dabei wurden Ig-basierte Bindemoleküle zunächst konsequent weiterentwickelt. Von Modifizierungen am Fc-Teil zur Veränderung von Effektorfunktion (Desjarlais *et al.*, 2007) und Serumhalbwertszeit (Vaccaro *et al.*, 2005), über die Verwendung verschiedenster Formate von Antikörper-Fragmenten (Holliger und Hudson, 2005), bis hin zur Fusion von Fragmenten mit diversen Effektormolekülen (Ebbinghaus *et al.*, 2005; Alderson *et al.*, 2006; Pastan *et al.*, 2007; Eshhar, 2008). Einige Nachteile lassen sich zwar durch diese Strategien umgehen, aber dennoch bleiben diverse Anwendungslücken bestehen, wie z.B. *in vitro* Anwendungen. Um diese Lücken zu schließen werden seit nunmehr fast 25 Jahren Ig-unabhängige Gerüstproteine, sogenannte *scaffolds*, als putative Bindeproteine erforscht und etabliert. Sie werden im Folgenden näher behandelt.

1.1 Alternative Bindeproteine

Bis zu Beginn der 90er Jahre wurde das Immunsystem als einzige Quelle molekularer Diversität angesehen, mit der nach Belieben Bindungsspezifität erzeugt werden kann (Binz *et al.*, 2005). Durch Fortschritte in den Methoden der gerichteten molekularen Evolution (Erstellung synthetischer DNA-Bibliotheken, vgl. 1.2) und dazugehörigen Selektionsverfahren (vgl. 1.3) konnte dieser Prozess allerdings vom Immunsystem entkoppelt und künstliche Bindeproteine immer leichter und effektiver erzeugt werden. Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden daher mehr als 50 nicht Ig-basierte *scaffolds* als alternative Plattformen für die Erzeugung von Bindeproteinen vorgeschlagen (Gebauer und Skerra, 2009). Der Begriff „*scaffold*“ steht in diesem Zusammenhang für eine Polypeptidkette mit veränderten Aminosäuren oder Sequenzinsertionen, die den Proteinvarianten bestimmte Eigenschaften zukommen lassen – in den meisten Fällen die Bindung spezifischer Zielstrukturen (Binz *et al.*, 2005). Wichtig ist dabei, dass diese Veränderungen die thermodynamischen Eigenschaften nicht signifikant negativ beeinflussen. Die Besonderheit aller *scaffolds* liegt in ihrer reduzierten Komplexität (im Vergleich zu Antikörpern), die sich über sämtliche Ebenen erstreckt: Struktur (eine Polypeptidkette; 3,5 - 82 kDa schwer), genetische Manipulierbarkeit, biochemisches Handling bis hin zur technischen Produktion und Analytik, kombiniert mit

herausragenden biophysikalischen Eigenschaften (hohe intrinsische Stabilität) und modularem Moleküldesign (Lorey *et al.*, 2014).

Das Repertoire an aktuell verfügbaren Bindeproteinen ist sehr divers im Hinblick auf Größe, Topologie, Bindungsmodus und Anwendbarkeit (Hey *et al.*, 2005; Binz *et al.*, 2005; Ruigrok *et al.*, 2011). Sie lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: in Moleküle mit dem Bindungsparatop auf exponierten, flexiblen Schleifen (*loops*) oder in mehr oder weniger rigiden Sekundärstrukturen (Weidle *et al.*, 2013). Des Weiteren wird noch zwischen Ig-basierten und Ig-unabhängigen Gerüstproteinen unterschieden. Das erste durch die FDA zugelassene nicht-Ig-basierte Medikament war 2004 das Cystin-Knoten-Protein ω -Conotoxin-MVIIA (Prialt) (Williams *et al.*, 2008). Es ist ein Calciumkanal-Blocker und wird zur chronischen Schmerztherapie als Morphinersatz verabreicht.

Die Mutation von Aminosäuren innerhalb von flexiblen *loop*-Strukturen orientiert sich dabei vorrangig am natürlichen Vorbild der Antikörper. Beim Antibiotikum Neocarzinostatin wurden Peptid-bindende *loops* (CDRs) eines V_HH-Kamel Antikörpers in das Polypeptidgerüst eingesetzt (*loop grafting*) und so die Bindung an Lysozym erzielt (Nicaise *et al.*, 2004). Das bereits 2009 zur Behandlung des hereditären Angioödems FDA-zugelassene Medikament Kalbitor stellt ein weiteres Beispiel dar, bei dem einzelne *loops* mutiert wurden (Beck *et al.*, 2010). Es inhibiert die Serinprotease Plasma-Kallikrein mit einer inhibitorischen Konstante von 44 pM (Lehmann, 2008). Die Basis für Kalbitor bildet die erste Kunitz-Domäne des humanen Lipoprotein-assoziierten Koagulationsinhibitors, deren *loops* durch rationelles Design verändert wurden (Williams und Baird, 2003).

Bei den Bindemolekülen, die unter den Namen AdNectine und Anticaline laufen, werden, wie auch bei den Antikörpern, mehrere *loops* randomisiert, um so eine durchgängige Bindefläche zu erschaffen. Als *scaffold* für AdNectine dient die zehnte extrazelluläre Domäne des Fibronectin Typ III mit Antikörper-ähnlicher β -sandwich-Struktur. Mit ihr konnten bisher u.a. Binder gegen TNF α (Xu *et al.*, 2002), Ubiquitin (Koide *et al.*, 1998), EGFR (Hackel *et al.*, 2010) und VEGFR-2 (Getmanova *et al.*, 2006) erzeugt werden. Der aussichtreichste Kandidat, der VEGFR-2-Inhibitor Angiocept (CT-322), soll in der Therapie von Glioblastomen, colorektalem Krebs und kleinzelligem Lungenkrebs Verwendung finden und befindet sich derzeit in der klinischen Phase II (Mamluk *et al.*, 2010; Lipovsek, 2010). Unter dem Begriff Anticaline sind Proteine der Lipocalin-Familie mit β -Fass-Struktur zusammengefasst (Flower, 1996). Im Gegensatz zu den AdNectinen werden bei ihnen neben Schleifen auch einige Reste im β -Faltblatt randomisiert. Mit dieser Molekülklasse wurden u.a. Bindeproteine gegen CTLA-4 (Schlehuber und Skerra, 2005), VEGF (Hohlbaum und Skerra, 2007) und verschiedene Haptene (Schlehuber *et al.*, 2000; Korndörfer *et al.*, 2003) erzeugt.

Der VEGFR-1-Binder Angiocal (PRS-050) befindet sich bereits in der klinischen Phase I und soll zur Behandlung solider Tumore eingesetzt werden (Mintz und Crea, 2013).

Ein in Gänze Ig-unabhängiges Konzept stellt die Randomisierung von Aminosäuren in Sekundärstrukturbereichen dar. Im Gegensatz zu den flexiblen *loops* in Antikörpern und ihren Analoga, die ihre Zielstruktur über den *induced fit*-Mechanismus binden, wird für rigide Sekundärstrukturen angenommen, dass sie eher dem Schlüssel-Schloss-Prinzip folgen und somit geringere entropische Verluste bei der Bindung zu verzeichnen haben (Binz *et al.*, 2004). Zu den sehr erfolgreichen *scaffold*-Klassen dieser Kategorie gehören Affibodies und DARPin. Bei den Affibodies werden 13 Aminosäuren der α -Helix 1 und 2 der Z-Domäne des Protein A aus *Staphylococcus spec.* randomisiert (Nord *et al.*, 1995). Ihr bakterieller Ursprung begrenzt ihre Anwendung allerdings auf nicht therapeutische Bereiche. Ein vielversprechender Kandidat ist ABY-002 ($Z_{\text{Her2:342}}$), ein Affibody-Konjugat das gegen HER-2 gerichtet ist und in Studien der Phase I zur Visualisierung von Brustkrebs eingesetzt wird (Orlova *et al.*, 2007; Löfblom *et al.*, 2010). Mit den erzielten Affinitäten im mittleren bis unteren nanomolaren Bereich (Friedman und Stahl, 2009) konnten noch weitere Zielmoleküle gebunden werden. So z.B. TNF α (Kronqvist *et al.*, 2008; Löfdahl *et al.*, 2009), Faktor VIII (Nord *et al.*, 2001), EGFR (Friedman *et al.*, 2007) und das A β -Peptid (Grönwall *et al.*, 2007), jedoch hat keiner dieser Binder bisher die klinische Phase erreicht.

Die zweite *scaffold*-Klasse dieser Kategorie bezeichnen die DARPin (*designed ankyrin repeat proteins*). Dies sind modulare Proteine bestehend aus designten Ankyrin-*repeats* (Bork, 1993), bei denen jeweils in der ersten α -Helix und dem angrenzenden β -turn sieben Aminosäurepositionen randomisiert werden (Binz *et al.*, 2003). Die so erzeugte Randomisierungsfläche korreliert mit der natürlichen Bindungsfläche der Ankyrin-*repeat* Proteine (Binz *et al.*, 2004). Mit Hilfe des Phagen- und Ribosomen-*display* konnten bereits Bindeproteine für TNF α , HER2 (Steiner *et al.*, 2008), diverse Kinasen (Amstutz *et al.*, 2005; Kummer *et al.*, 2012), extrazelluläre Proteine (Stefan *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 2013) und verschiedene Membranproteine (Milovnik *et al.*, 2009) generiert werden. Das DARPin MP0112, ein potenter VEGF-Inhibitor zur Therapie der neovaskulären, altersbedingten Makuladegeneration (nAMD), steht gerade am Übergang von Phase I zu II (Tamaskovic *et al.*, 2012; Campochiaro *et al.*, 2013).

Neben α -helikalen Strukturen werden auch rigide β -Faltblätter als Randomisierungsflächen genutzt. Mittlerweile wurde das Konzept an mehreren Gerüstproteinen erfolgreich angewendet, wobei Affinitäten vom niedrig mikromolaren bis in den subnanomolaren Bereich realisiert werden konnten. Mit dem humanen Ubiquitin als *scaffold* wurden bereits Binder

gegen TNF α (Hoffmann *et al.*, 2012), nPAC-1Rs (Song, 2012) und die extrazelluläre Domäne B des Fibronectin (Lorey *et al.*, 2014) isoliert. Ein weiterer Vertreter dieser Kategorie ist das humane γ B-Kristallin. Die Bindung an proNGF, Estradiol (Ebersbach *et al.*, 2007), das E7-Protein des humanen Papillomavirus (Mirecka *et al.*, 2009) und nPTH-1R (Zhang, 2013) konnte mit diesem *scaffold*-Protein bereits gezeigt werden. Als letztes wäre noch das komplett *de novo* designte, thermodynamisch sehr stabile, Protein M7 zu erwähnen (Stordeur *et al.*, 2008). Die Randomisierung von zehn Aminosäurepositionen führte über Ribosomen-*display* zur Selektion eines Binders der die Fibrillierungskinetik von A β (1–40)- und A β (1–42)-Peptiden beeinflusst (Stordeur, 2013).

Die hier angeführten Beispiele zeigen eindrucksvoll, wie viel Potential hinter dem Konzept alternativer Gerüstproteine steckt und wie leicht sie im Vergleich zu Immunglobulinen über Protein *engineering* an ihre Aufgaben anzupassen sind. Um spezifische Bindemoleküle zu erzeugen, bedarf es allerdings hochgradig diverser DNA-Bibliotheken (die für entsprechende Proteinvarianten kodieren), die über geeignete Selektions- (vgl. 1.3) und *screening*-Verfahren zu Proteinvarianten mit den gewünschten Eigenschaften führen. Wie solche DNA-Bibliotheken generiert werden, wird im nachstehenden Abschnitt anhand verschiedener Beispiele verdeutlicht.

1.2 Erstellung von DNA-Bibliotheken für die Selektion von Bindern

Die Erstellung artifizieller Bindeproteine beruht auf der Mutation von Aminosäuren in dem als Bindefläche definierten Bereich des Gerüstproteins in Abhängigkeit zur Zielstruktur die gebunden werden soll (Schneider, 2010). Dabei soll die mitunter *de novo* erzeugte Bindefläche die Eigenschaften größtmöglicher Affinität bei gleichzeitiger Spezifität für die Zielstruktur in sich vereinen. Die dafür notwendigen Mutationen über rationales Proteindesign (gezielter Austausch von Aminosäuren) zu lokalisieren ist nach aktuellem Stand der Dinge nur schwer möglich. Hierfür müsste einerseits die Struktur des *targets* bekannt sein, was nicht immer gegeben ist, und andererseits welche Mutationen maßgeblich Löslichkeit, Stabilität und vor allem Bindungseigenschaften des *scaffolds* beeinflussen. Die Methode ist demzufolge sehr informationsintensiv und daher wirtschaftlich ineffizient (Sen *et al.*, 2007; Schneider, 2010).

Deshalb stellt sich die Frage: Wie lässt sich die nötige Variabilität generieren, um eine Vielzahl unterschiedlicher Proteinvarianten zu erzeugen, aus denen im Nachhinein Varianten mit gewünschten Eigenschaften isoliert werden können? Ein möglicher Lösungsansatz ist in der gerichteten molekularen Evolution zu finden, deren Konzept erstmals 1967 eingeführt

wurde (Mills *et al.*, 1967). Sie umfasst die Selektion und Identifizierung neuer bzw. verbesserter Eigenschaften aus zuvor erstellten Variantenbibliotheken durch zufallsbasierte Mutagenese. Die Bibliotheken werden, wegen der leichteren Manipulier- und Auswertbarkeit, auf DNA-Ebene erstellt, wobei hierfür bereits verschiedene Verfahren etabliert wurden. Es existieren bisher zwei methodische Ansätze: Bibliotheken basierend auf mehreren DNA-Sequenzen (rekombinatorisch) und Bibliotheken basierend auf nur einer DNA-Sequenz (nicht-rekombinatorisch). Ausführliche Erläuterungen hierzu finden sich in den Übersichtsartikeln von Jaeger *et al.* (2001), Sen *et al.* (2007) und der Arbeit von M. Schneider (2010). Daher wird auch an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Vielmehr soll der Fokus auf der ortsgerichteten Sättigungsmutagenese (*site-specific saturation mutagenesis*) liegen, da sie die einzige Methode ist, die Sequenzveränderungen an definierten Positionen einfügen kann. Die Randomisierung erfolgt oftmals PCR-basiert unter Verwendung synthetischer Oligodesoxynukleotidmischungen. In die Oligodesoxynukleotide kann an den Stellen, die randomisiert sein sollen, je nach Bedarf ein unterschiedliches Mischungsverhältnis der einzelnen Desoxynukleotide (dA, dC, dG, dT) eingebracht werden (Horwitz und Loeb, 1986; Miyazaki und Arnold, 1999). Ein häufig verwendetes Triplet-Motiv ist das sogenannte NNK-Motiv bei dem an den N-Positionen alle vier Desoxynukleotide eingebaut werden, an der K-Position hingegen nur dG oder dT. Somit sind alle proteinogenen Aminosäuren abgedeckt, aber zwei der drei unerwünschten Stopp-Codone ausgeschlossen. Dennoch ist die Methode mit Nachteilen verbunden. Zum Einen bewirkt die Degeneriertheit des genetischen Codes (Aminosäuren durch mehrere Codone kodiert) eine gewisse Ungleichverteilung von Aminosäuren hin zu denen die durch mehrere Triplets kodiert sind. Zum Anderen ist die Kopplungsreaktion bei der Oligodesoxynukleotid-Synthese nie vollständig, sodass infolge verkürzte Nebenprodukte entstehen die bei der anschließenden Reinigung aufgrund der heterogenen Eigenschaften der Zielprodukte nicht vollständig abgetrennt werden können. Dies äußert sich dann in einem nicht unerheblichen Anteil an Leserahmenverschiebungen innerhalb der generierten DNA-Bibliotheken (Schneider, 2010). Aufgrund dessen ist es mit dieser Methode daher unmöglich eine kontrollierte Diversität unter Ausschluss nicht erwünschter Aminosäuren (u.a. Cystein, Prolin) und Stopp-Codone in den resultierenden Oligodesoxynukleotiden zu erzielen (Kayushin *et al.*, 1996).

Als kontinuierliche Weiterentwicklung in dieser Hinsicht ist der Einbau von kompletten Basen-Triplets, sogenannten Trinukleotid-Synthons (Trinukleotidphosphoramidite), an den zu randomisierenden Positionen der Oligodesoxynukleotide zu sehen (Sondek und Shortle, 1992; Virnekäs *et al.*, 1994; Kayushin *et al.*, 1996). Die Mischungsverhältnisse der Phosphoramidite lassen sich exakt einstellen, sodass alle möglichen Triplets an den

randomisierten Positionen gleichverteilt vorliegen. Nach dem gleichen Prinzip können auch Stopp-Codone und unerwünschte Aminosäuren einfach ausgelassen werden. Durch unterschiedliche Reaktivitäten der einzelnen Synthons müssen die Verhältnisse allerdings entsprechend angepasst werden, um letztlich Aminosäureungleichverteilungen zu vermeiden (Kayushin *et al.*, 1996). Da in diesem Fall der verwendete Triplett-Code nicht degeneriert ist, d.h. jeweils nur ein Codon für eine Aminosäure kodiert, reduziert sich die Komplexität der erzeugten Bibliothek (im Vergleich zu NNK-basierter Mutagenese) bei gleichbleibender Aminosäureabdeckung und somit der *screening*-Aufwand, der betrieben werden muss, um gewünschte Varianten zu isolieren. Unter Verwendung von NNK-Motiven ergeben sich demnach 32 mögliche Variationen je Position, beim Einsatz von Trinukleotid-Synthons hingegen nur 20. Die realistisch zu erreichende maximale Bibliothekskomplexität bewegt sich zwischen 10^{12} bis 10^{13} Varianten auf DNA-Ebene, was wiederum acht bis neun zu randomisierenden Positionen bei NNK-Motiven bzw. zehn bei Trinukleotid-Synthons entspricht.

Trotz stetiger Verbesserungen der Synthesysteme für *primer* können immer noch vereinzelt Deletionen bzw. Insertionen in deren Sequenzen auftreten. Diese führen zu *frame shifts* in den Amplifikaten und letztlich zu fehlerhaften, unter Umständen nicht funktionalen, Proteinen mit ungewollten Mutationen. *Frame shifts* reduzieren demzufolge die Diversität und letztlich Qualität der Bibliothek. Aus diesem Grund sollten fehlerhafte Sequenzen vor dem eigentlichen Selektionsprozess aus dem System abgereichert bzw. eliminiert werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Leserahmenselektionssysteme entwickelt. Sie reichen von einfacher 3'-Fusion mit Reportergen (Seehaus *et al.*, 1992; Maxwell *et al.*, 1999; Waldo *et al.*, 1999), über zweigeteilte Systeme bei denen das *gene of interest* (GOI) zwischen eine 5'-gelegene Signalsequenz und einem 3'-gelegenen Reportergen kloniert wird (Daugelat und Jacobs, 1999; Cho *et al.*, 2000; Ansuini *et al.*, 2002; Lutz *et al.*, 2002; Zacchi *et al.*, 2003), bis hin zu dreigeteilten Systemen bei denen zu den vorherigen Komponenten noch ein *splicing*-Schritt hinzukommt (Gerth *et al.*, 2004) (vgl. Abb. 2).

Durch die Fusion der Bibliotheksvarianten mit einem C-terminalen Reporterprotein wird sichergestellt, dass nur *in-frame* Varianten zur Ausprägung des gewünschten Reporter-Phänotyps führen (z.B. Antibiotikaresistenz). Interne Ribosomenbindestellen können allerdings die Selektion falsch positiver Varianten bedingen (Sieber *et al.*, 2001; Lutz *et al.*, 2002). Das Anfügen einer N-terminalen Signalsequenz (z.B. für den TAT-Translokator) und eines C-terminalen, periplasmatisch aktiven Reporterproteins (z.B. Antibiotikaresistenz) soll dies verhindern. Erst ein korrekter Leserahmen führt zur Expression eines vollständigen Fusionsproteins (TAT-Signalsequenz + *gene of interest* (GOI) + Reporter) und dessen Export

ins Periplasma (vgl. Abb. 2). Der Nachteil hierbei ist, dass durch den Transport über die Zellmembran oftmals auf Faltungseigenschaften und Löslichkeit der Varianten selektiert wird (Sieber *et al.*, 2001; Lutz *et al.*, 2002; Zacchi *et al.*, 2003; Bittker *et al.*, 2004).

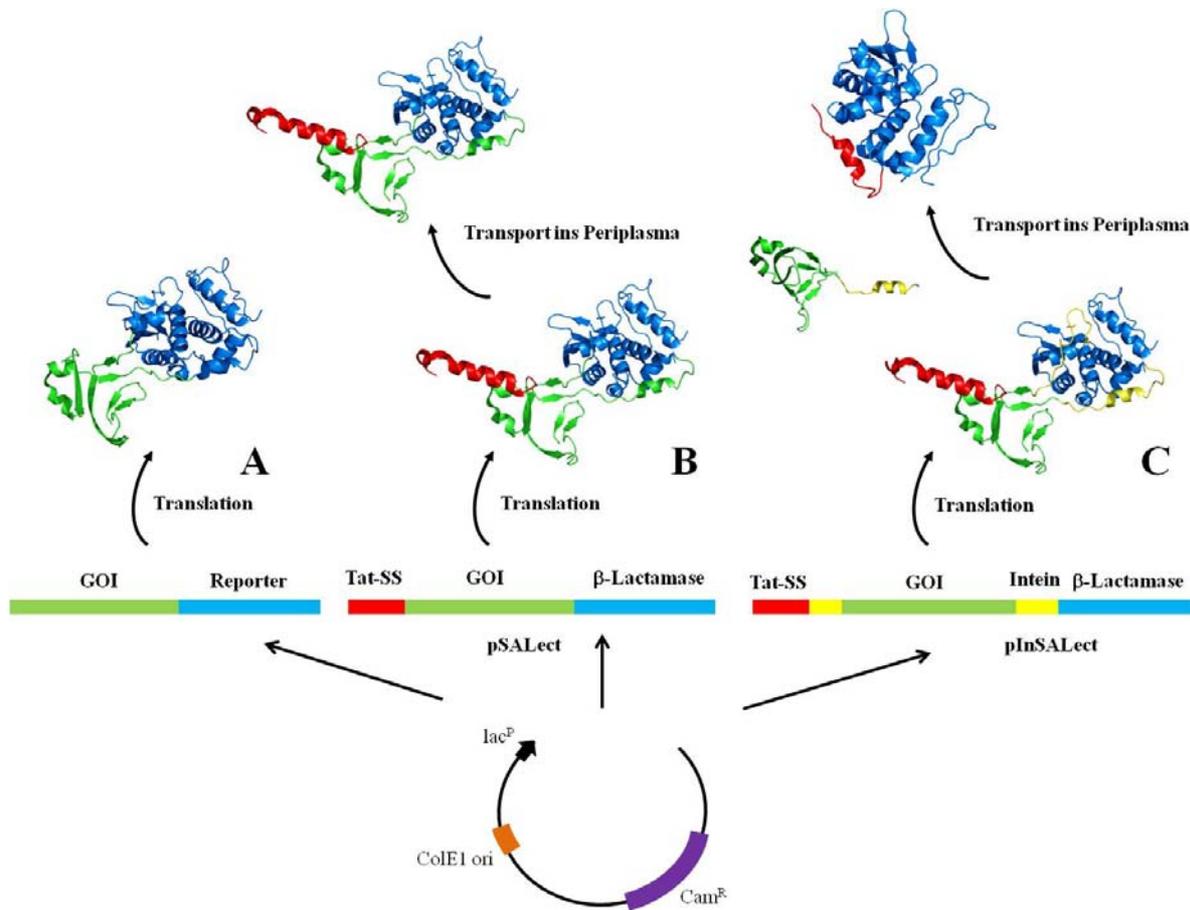


Abb. 2: Leserahmenselektionssysteme im Überblick. **A:** Fusion des *gene of interest* (GOI, grün) an ein C-terminales Reporter gen (z.B. Antibiotikaresistenz, blau). **B:** Das GOI ist zwischen N-terminaler TAT-Signalsequenz (Tat-SS, rot) und C-terminalem Reporter gen (β-Lactamase, blau) kloniert. Diese Anordnung verhindert das Auftreten falsch positiver Varianten durch interne Translationsstarts. Das System ist allerdings nur für GOIs geeignet, die für nicht aggregierende Fusionsproteine kodieren. **C:** Die das GOI flankierenden Inteinsequenzen (gelb) schneiden sich und das GOI posttranslational autokatalytisch aus, gleichzeitig vermitteln sie dabei die Ligation der Exteine (Tat-SS und β-Lactamase). Die Extein-Fusion wird letztlich ins Periplasma exportiert und führt zu einem selektierbaren Phänotyp. Abbildung modifiziert nach Gerth *et al.* (2004).

Durch die Vorselektion entfallen putativ funktionale Varianten die womöglich einen nützlichen Beitrag zur Diversität der Bibliothek leisten können, die für bestimmte Anwendungen nötig ist (Lutz *et al.*, 2001). Um dies zu umgehen, wurde durch Gerth *et al.* (2004) ein modifiziertes Vektorsystem, ausgehend von pSALect (Lutz *et al.*, 2002), entwickelt bei dem das *cis-splicing* Intein VMA aus *S. cerevisiae* zwischen 5'-TAT-Signalsequenz (Chaddock *et al.*, 1995; Cristobal *et al.*, 1999; DeLisa *et al.*, 2003) und 3'-β-Lactamase kloniert wurde (vgl. Abb. 2). Das Intein schneidet sich und das dazwischen liegende POI posttranslational über mehrere nukleophile Schritte aus dem Fusionskonstrukt

heraus, während es seine flankierenden Sequenzen (Exteine, in diesem Fall TAT-Signalsequenz und β -Lactamase) wieder miteinander verknüpft (Gogarten *et al.*, 2002). Am Ende liegen POI und TAT- β -Lactamase getrennt im Cytoplasma vor, wobei die TAT- β -Lactamase-Fusion, unabhängig vom Faltungszustand des POI, in den periplasmatischen Raum exportiert wird und letztlich zur Ampicillinresistenz führt. Durch die Trennung beider Prozesse selektiert das System somit nur auf den Leserahmen des GOI, nicht aber auf die Faltung des POI. Die so selektierten unlöslichen Varianten müssen nicht von Nachteil sein, da ihre Löslichkeit später noch optimiert werden kann.

Die grundlegenden Methoden der molekularen Evolution zur Erzeugung von komplexen DNA-Bibliotheken wurden erklärt. Nun gilt es aus der Vielzahl an Varianten die herauszufinden, welche die gewünschten Eigenschaften zeigen. Der folgende Abschnitt behandelt Selektionsprozesse, die dazu in der Lage sind.

1.3 Selektion von Bindeproteinen

Die Isolierung geeigneter Kandidaten geschieht im Allgemeinen mit Hilfe von *in vivo*- oder *in vitro*-Selektions- und sich anschließenden *screening*-Verfahren. Eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion von Bindemolekülen ist die Kopplung von Geno- (DNA) und Phänotyp (Protein). Die räumliche Verknüpfung kann dabei durch die Präsentation des Proteins auf Oberflächen von Zellen oder Viren, die den jeweiligen Genotyp in sich tragen (u.a. *phage display*, *yeast surface display*, *bacterial surface display*), die Präsentation innerhalb der Zelle (u.a. *yeast two-hybrid*, *protein fragment complementation assays*), über Zell-freie Systeme während der Translation (*ribosome display*, *mRNA display*) oder künstliche Kompartimentierung (*in vitro compartmentalization*) erreicht werden (Binz *et al.*, 2005).

Entsprechende Selektionssysteme wurden erstmals für die Herstellung von Antikörpern bzw. deren Fragmenten entwickelt (McCafferty *et al.*, 1990), um u.a. die Immunisierung von Tieren zu umgehen. Verschiedene Faktoren bedingen dabei die Wahl des geeigneten Selektionsverfahrens. Sie hängt in entscheidendem Maße ab vom *scaffold* selbst, von der Verfügbarkeit des *targets* (Zielstruktur in löslicher Form exprimierbar) und der Größe der Bibliothek, die selektiert werden soll (Stordeur, 2013). Die am weitesten verbreitete und als erstes entwickelte Methode stellt das Phagen-*display* dar (Smith, 1985). Da dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit Verwendung findet, soll an dieser Stelle nur hierauf näher eingegangen werden.

Eine für entsprechende *scaffold*-Varianten kodierende DNA-Bibliothek wird genetisch mit dem M13 Phagen-Hüllprotein pIII fusioniert, deren Phänotypen (Proteinvarianten) exprimiert

und letztlich auf der Phagenoberfläche präsentiert (vgl. Abb. 3). Durch Inkubation der Phagen mit der immobilisierten Zielstruktur werden bindende Varianten fixiert, nicht bindende hingegen durch stringente Waschschriffe abgetrennt. Alle gebundenen Varianten werden anschließend von der Matrix eluiert und stehen sowohl Sequenzanalysen (Qualitätskontrolle), als auch erneuten Selektionsrunden zu Verfügung. Im Zuge sich wiederholender Selektionsrunden wird so der Variantenpool immer weiter eingeeengt, bis am Ende nur noch hochaffine Binder mit den gewünschten Eigenschaften übrig bleiben.

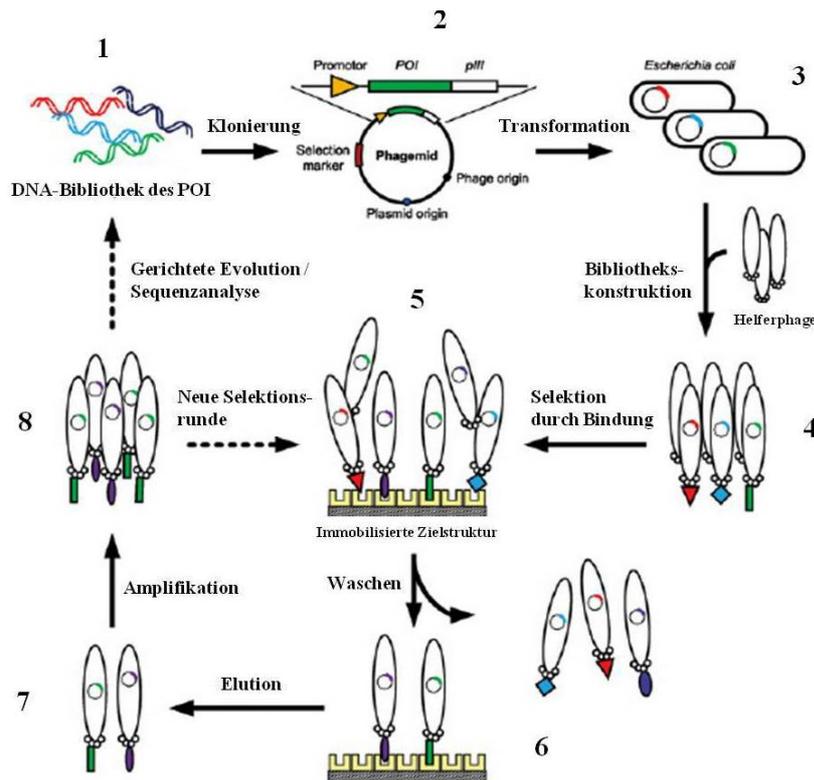


Abb. 3: M13 Phagen-*display*.

Fragmente einer DNA-Bibliothek, die für Varianten des *protein of interest* (POI) kodieren (1), werden mit dem Gen für das M13-Hüllprotein pIII fusioniert und in ein *phagemid* kloniert (2). Nach Transformation des *phagemids* in *E. coli* (3) werden mit Hilfe von Helferphagen POI-tragende Phagen produziert (4). Die resultierende Phagenbibliothek wird einem immobilisierten Zielmolekül präsentiert (5) und nicht-bindende Varianten weggewaschen (6). Die gebundenen Phagen werden eluiert (7) und durch erneute Transformation in *E. coli*-Zellen wieder vermehrt (8). Die DNA hochaffiner Binder kann sequenziert oder aber die

entsprechenden Phagen einer neuen Selektionsrunde unterzogen werden (8→5). Abbildung verändert nach Ruigrok *et al.* (2011).

Die Assemblierung der M13-Phagenpartikel findet im Periplasma von *E. coli* statt (Clackson und Lowman, 2004). Hierfür müssen sie über die innere Membran transportiert werden, was über den Sec- oder TAT-Transportweg realisiert wird (Pugsley, 1993; Settles *et al.*, 1997). Die Besonderheit des in dieser Arbeit verwendeten TAT-abhängigen Phagen-*display* ist, dass durch den Export der Varianten über den TAT-Translokator eine präsekretorische Faltungskontrolle stattfindet und demzufolge nur korrekt gefaltete Varianten auf der Phagenoberfläche präsentiert werden (DeLisa *et al.*, 2003; Paschke und Höhne, 2005). Einen detaillierteren Überblick über die Methode gibt Abschnitt 4.14.2. Mit Hilfe des TAT-Phagen-*display* sollen geeignete Bindeproteine aus einer Varianten-Bibliothek des humanen

gammaB-Kristallin gegen humanes TNF α selektiert werden. Die nächsten beiden Abschnitte stellen Gerüstprotein und Zielstruktur vor.

1.4 Humanes gamma-B-Kristallin (hgBC) als Gerüstprotein

Die wichtigste Anforderung an künstliche Bindeproteine mit therapeutischem Potential ist eine möglichst geringe Immunogenität, dies wird hauptsächlich durch den Einsatz von Gerüstproteinen humanen Ursprungs gewährleistet. Was letztlich nicht bedeutet, dass humane Proteine keinerlei Immunreaktionen zeigen. Das humane γ B-Kristallin (hgBC), das schon von der Firma Scil Proteins GmbH (Halle) erfolgreich als künstliches Bindeprotein evaluiert werden konnte (vgl. 1.1), sollte auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung finden und das Portfolio an bereits existierenden hgBC-Bibliotheksformaten erweitern (vgl. Fiedler und Rudolph, 2001; Ebersbach, 2004; Ebersbach *et al.*, 2007; Mirecka *et al.*, 2009; Mirecka, 2010; Zhang, 2013).

Das hgBC ist ein 21 kDa (174 Aminosäuren) schweres, monomeres Strukturprotein der Augenlinse in Vertebraten und gehört zusammen mit den homodimeren bzw. heterooligomeren β -Kristallinen zur Superfamilie der $\beta\gamma$ -Kristalline (Driessen *et al.*, 1981; Bax *et al.*, 1990; Jänicke und Slingsby, 2001; Bloemendal *et al.*, 2004). Die Vertreter dieser Superfamilie zeichnen sich durch zwei strukturell symmetrische Domänen aus, hauptsächlich bestehend aus β -Faltblattstrukturen, die über ein kurzes *linker*-Peptid miteinander verbunden sind (vgl. Abb.4). Beide Domänen stellen dabei unabhängige Faltungseinheiten dar (Mayr *et al.*, 1994; Palme *et al.*, 1997). Den Grundbaustein der $\beta\gamma$ -Topologie bildet das sogenannte *Greek key*-Motiv (Richardson, 1977), das aus vier antiparallelen β -Faltblattsträngen besteht allein aber nicht faltungsfähig ist (Kretschmar, 1999). Erst die Verdoppelung des Motivs führt zu einer faltungsfähigen und stabilen Einheit. Jede Kristallin-Domäne besteht aus zwei interkalierenden *Greek key*-Motiven, die zusammen eine β -*sandwich*-Topologie als übergeordnete Supersekundärstruktur bilden (vgl. Abb. 4; Blundell *et al.*, 1981; Wistow *et al.*, 1983). Der hierarchische Aufbau legt nahe, dass die Proteinfamilie aus einer einzelnen Domäne durch Genduplikation mit anschließender Genfusion hervorging (Lubsen *et al.*, 1988). Kristalline mit nur einer Domäne sind lediglich in Mikroorganismen, wie z.B. Schleimpilzen und Hefen, zu finden (Palme *et al.*, 1997; Jänicke und Slingsby, 2001; Bloemendal *et al.*, 2004).

Der Kontakt zwischen beiden Domänen wird hauptsächlich über das kurze *linker*-Peptid und sechs hydrophobe Reste der Interdomänen-Kontaktfläche hergestellt - jeweils drei topologisch äquivalente Reste pro Domäne. In der N-terminalen Domäne des hgBC (NhgBC)

sind dies die Aminosäuren Met43, Phe56 und Ile81 und in der C-terminalen Domäne (ChgBC) Ile132, Leu145 sowie Val170 (Wistow *et al.*, 1983; Bax. *et al.*, 1990; Lapatto *et al.*, 1991; Najmudin *et al.* 1993; Palme *et al.*, 1997). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Quartärstruktur des bovinen γ B-Kristallins von der Sequenz, Konformation und Länge des *linker*-Peptids abhängig ist (Mayr *et al.*, 1994; Mayr, 1995).

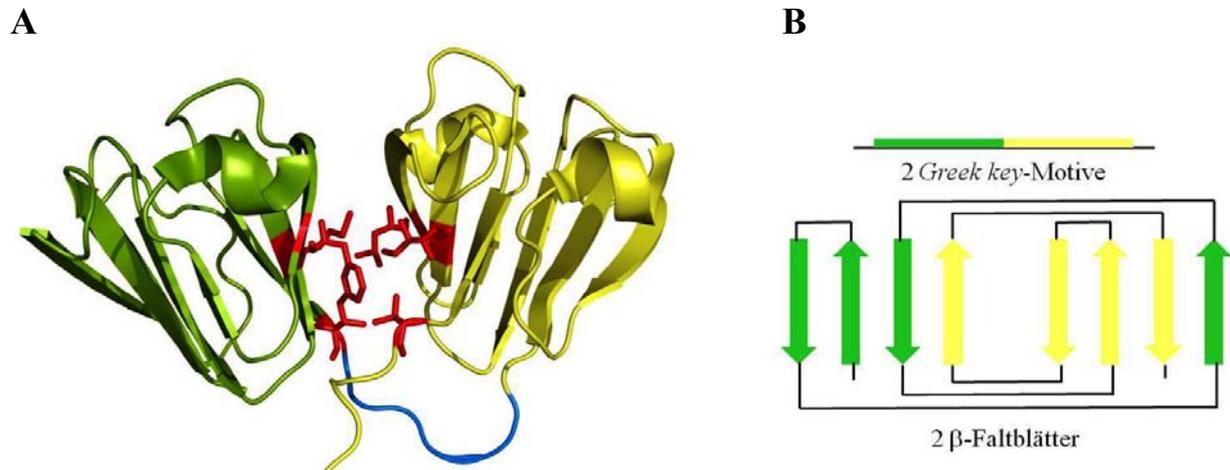


Abb. 4: Strukturmodell des humanen γ B-Kristallins (hgBC; Ebersbach *et al.*, 2007).

A: Raumstruktur des hgBC mit der N-terminalen Domäne (N-hgBC) in grün und der C-terminalen Domäne (C-hgBC) in gelb. Das die beiden Einzeldomänen verbindende *linker*-Peptid ist blau eingefärbt und die an der Interaktion beider Domänen beteiligten sechs hydrophoben Aminosäurereste sind in roter *stick*-Darstellung hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt (PDB: 2jdf). **B:** Schematische Darstellung des struktur-bestimmenden Motivs der $\beta\gamma$ -Kristallin Superfamilie: dem *Greek key*. Interkalierende β -Faltblattstränge, von denen jeweils vier ein β -Faltblatt und somit ein *greek key*-Motiv bilden, sind als Pfeile dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bloemendal *et al.* (2004).

γ -Kristalline werden ausschließlich in der frühen Embryonalentwicklung synthetisiert und finden sich daher vorrangig in der Zentralregion der Augenlinse wieder (Waley, 1969; Harding und Dilley, 1976). Aufgrund ihrer biologischen Funktion und Lokalisierung müssen sie sehr gut löslich und stabil sein. In der Linse erzeugen sie durch sehr hohe lokale Konzentrationen von bis zu 860 mg/ml (Kumaraswamy *et al.*, 1996) einen hohen Brechungsindex. Dieser hält die Streuung des Lichtes beim Durchtritt durch die Linse möglichst gering, um so ein scharfes Bild auf der Retina abzubilden. Vergleichbar hohe Proteinkonzentrationen sind in keinem anderen Gewebe zu finden (Jänicke, 1994). Im isolierten Kompartiment der Augenlinse unterliegen sie zudem nur geringen Umsatzprozessen (Wannemacher und Spector, 1968) und verbleiben daher auf Lebenszeit, sodass sie ihre funktionale Struktur über einen sehr langen Zeitraum aufrechterhalten müssen. Sie besitzen deshalb eine der längsten bisher bekannten Halbwertszeiten für Proteine (Jänicke, 1996). Aber schon wenige Punktmutationen innerhalb der Proteinprimärsequenz können zu Aggregation, Quervernetzung (z.B. Disulfidbrücken) und schließlich Denaturierung der Proteine führen

und somit die Ausprägung von Katarakten einhergehend mit verminderter Sehfähigkeit nach sich ziehen (Philipson und Fagerholm, 1973; Harding und Dilley, 1976; Takemoto und Azari, 1976; Truscott und Augusteyn, 1977; Jedziniak *et al.*, 1978; Anderson und Spector, 1978; Spector und Roy, 1978; Spector *et al.*, 1979).

Die ungewöhnlich hohe Stabilität zeigt sich beim bovinen γ B-Kristallin durch Resistenz gegenüber 8 M Harnstoff bei neutralem pH-Wert, Tolerierung von Temperaturen bis zu 75 °C in Anwesenheit von 7 M Harnstoff (Jänicke, 1994) und selbst pH-Werte zwischen 1 und 10 führen nicht zur Denaturierung des Proteins (Rudolph *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1990). Desweiteren lassen sich beide Domänen getrennt voneinander löslich in Prokaryoten exprimieren, dabei ist die N-terminale Domäne stabiler als die C-terminale, die demnach durch Domäneninteraktionen im Kontext des Volllängenproteins stabilisiert wird (Rudolph *et al.*, 1990; Mayr *et al.*, 1994; Palme *et al.*, 1997).

Die hier angeführten Eigenschaften des γ B-Kristallins, wie seine hohe Löslichkeit, thermische und chemische Stabilität, sowie geringe Größe und kostengünstige Herstellung, machen es zu einem idealen Gerüstprotein zur Erzeugung künstlicher Bindeproteine. Für das bovine und das humane γ B-Kristallin konnte dies zuvor schon gezeigt werden (Ebersbach, 2004). So wurden hierfür jeweils acht oberflächenexponierte Aminosäurereste auf dem äußeren β -Faltblatt der N-terminalen Domäne (vgl. Abb. 5) randomisiert und aus entsprechenden Proteinbibliotheken über Phagen-*display* Bindemoleküle gegen diverse Zielstrukturen isoliert (Ebersbach *et al.*, 2007; Mirecka *et al.*, 2009; Zhang, 2013). Da diese allerdings oft nur geringe Affinitäten gegenüber ihren *targets* aufwiesen, sollten neue hgBC-basierte Bibliotheken erstellt werden.

Anhand des Strukturmodells des γ B-Kristallins ist erkennbar, dass jeweils zwei der insgesamt vier β -Faltblätter des Proteins einander zugewandt sind (vgl. Abb. 4 und 5). Über sie wird letztendlich die Wechselwirkung beider Domänen gewährleistet. Die äußeren β -Faltblätter sind hingegen evolutiv auf eine möglichst geringe Bindungsfähigkeit ausgerichtet (Slingsby und Wistow, 2014). Da Kristalline in der Augenlinse in sehr hohen Konzentrationen anzutreffen sind, hätten Interaktionen, oder gar Aggregation, mit benachbarten Molekülen womöglich fatale Folgen für die Transparenz der Linse. Für die inneren Faltblätter trifft dies hingegen nicht zu, sie besitzen in Form der gegenüberliegenden Domäne bereits einen natürlichen Bindungspartner. Daher erscheint die Interdomänen-Kontaktfläche auch geeigneter für die Generierung eines artifiziellen Paratops. Zudem verdoppelt sich die Bindungsfläche, wenn die Faltblätter beider Domänen in das Paratop einbezogen werden.

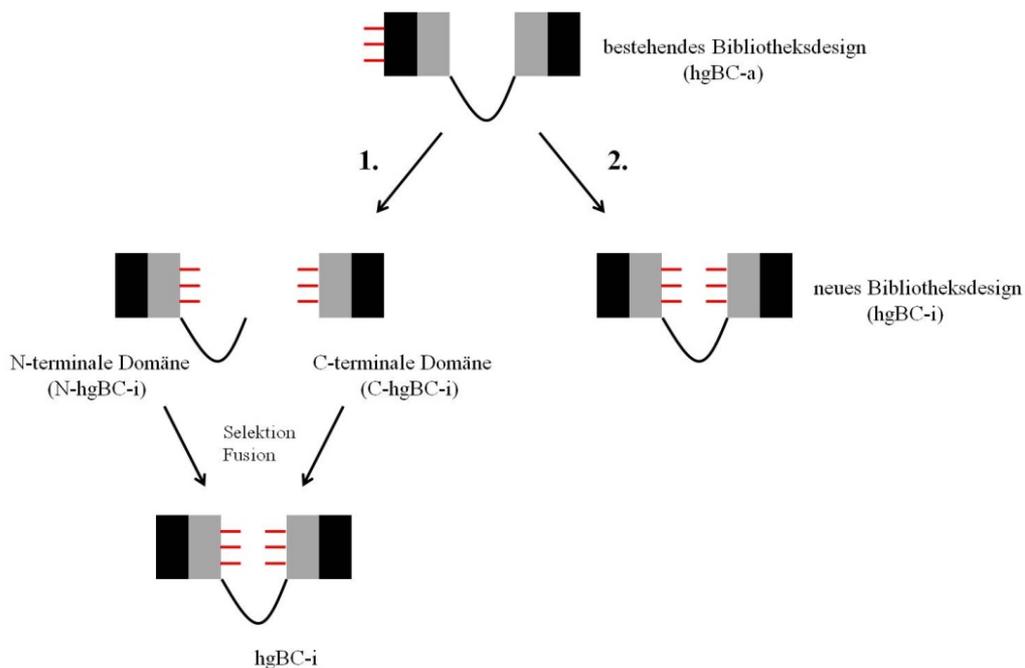


Abb. 5: Strategien des Bibliotheksdesigns. Die Domänen des hgBC sind schematisch als schwarz-graue Vierecke dargestellt, mit den inneren β -Faltblattregionen (domänenzugewandt) in grau und den äußeren (domänenabgewandt) in schwarz. Das beide Domänen verknüpfende *linker*-Peptid ist als schwarzer Strich eingezeichnet und randomisierte Aminosäuren als rote Striche hervorgehoben. Für die bereits bestehenden hgBC-Bibliotheken (ehemals Affiline®) wurden auf dem äußeren β -Faltblatt der N-hgBC acht lösungsmittlexponierte Aminosäuren randomisiert. Für das jetzige Bibliotheksdesign sollen hingegen die inneren β -Faltblätter beider Domänen als putative Bindeflächen herangezogen werden. Zwei Strategien werden dabei verfolgt: **1.** Die Generierung von Einzeldomänen-Bibliotheken für die N-hgBC und C-hgBC und deren Selektion gegen geeignete Zielmoleküle. Im nächsten Schritt werden isolierte Binder für die Affinitätsmaturierung mit anderen bindenden Varianten bzw. Bibliotheken der korrespondierenden Domäne fusioniert und erneuten Selektionsprozessen unterzogen (sequentielle Multimerisierung). Die abzudeckenden Diversitäten sind auf Ebene der Einzeldomänen gering und praktisch realisierbar. **2.** Die Generierung von Bibliotheken auf Basis des Volllängen-hgBC (parallele Multimerisierung). Die abzudeckenden Diversitäten sind sehr hoch und praktisch nicht immer realisierbar (von der Anzahl randomisierter Positionen abhängig), die erreichbare Bindungsfläche allerdings dementsprechend hoch.

hgBC-a = humanes γ B-Kristallin mit randomisiertem äußeren β -Faltblatt; hgBC-i = humanes γ B-Kristallin mit randomisierten inneren β -Faltblättern

Um zu untersuchen inwieweit sich die Kontaktfläche als putatives Paratop eignet, werden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: auf der einen Seite die Generierung von Einzeldomänen-Bindern mit der Option auf anschließende Multimerisierung und auf der anderen Bindemoleküle auf Basis des Volllängen-hgBC (vgl. Abb. 5 sowie 2.1.1 und 2.2.1). Insgesamt sollen so 13 Aminosäurepositionen auf den β -Faltblattstrukturen randomisiert werden, davon befinden sich sieben in der N-hgBC und sechs in der C-hgBC. Die zu mutierenden Aminosäuren schließen die an der natürlichen Interaktion beider Domänen beteiligten sechs hydrophoben Reste mit ein.

1.5 Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) als Zielstruktur

Zur Evaluierung von *scaffold*-Bibliotheken wird anhand etablierter Zielstrukturen überprüft, inwiefern isolierte Kandidaten die gewünschten Eigenschaften zeigen. Eine potentielle Zielstruktur stellt der seit mehr als 40 Jahren erforschte Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha dar. Er steuert die Expression von bis zu 500 Genen und übernimmt Schlüsselfunktionen in der Angiogenese, zellulären Differenzierung, Mitogenese und nicht zuletzt Apoptose (Beutler und Cerami, 1986 a/b; Rosenblum und Donato, 1989; Stordeur, 2013). Zudem ist er in erste Immunreaktionen bei Infektionen und Krankheiten involviert (Ghezzi und Cerami, 2005; Stordeur, 2013). Als pleiotropes Zytokin (Faustman und Davis, 2010) ist es zudem pharmakologisch äußerst relevant, da es an der Ausprägung zahlreicher Entzündungs- sowie Autoimmunkrankheiten beteiligt ist und somit als Zielmolekül für therapeutische Wirkstoffe in Frage kommt (vgl. Tab. 1; Ghezzi und Cerami, 2005; Balkwill, 2009). Seinen Namen erhielt das Molekül aufgrund seiner tumorzerstörenden Wirkung im Zuge Endotoxin-vermittelter Freisetzung aus Makrophagen (Carswell *et al.*, 1975).

Nachdem die Klonierung und Expression des Gens gelang (Pennica *et al.*, 1984; Marmenout *et al.*, 1985; Shirai *et al.*, 1985) konnte schließlich 1989 die Struktur des TNF α aufgeklärt werden (Eck und Sprang, 1989). Etwa zur gleichen Zeit wurde bekannt, dass der parallel untersuchte Faktor Cachectin, welcher Fieber, septischen Schock und Kachexie vermittelt, sequenzidentisch zu TNF α ist (Beutler *et al.*, 1985 a/b; Beutler und Cerami, 1986 a/b). Seine biologische Aktivität entfaltet TNF α über die Bindung an spezifische Rezeptoren (Aggarwal *et al.*, 1985), die sowohl membranständig als auch löslich im Cytoplasma vorkommen (Engelmann *et al.*, 1990; Seckinger *et al.*, 1990). Die Reinigung der beiden Oberflächenrezeptoren TNFR1 und TNFR2 und die Klonierung dazugehöriger Gene gelang Anfang der 90er Jahre (Engelmann *et al.*, 1989; Engelmann *et al.*, 1990; Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Heller *et al.*, 1990).

TNF α wird in verschiedenen Zelltypen in seiner Vorläuferform als Transmembranprotein (26 kDa; Pennica *et al.*, 1984) exprimiert, das sich zu nicht kovalent verknüpften Homotrimeren zusammenlagert. Eine membranständige Metalloprotease (TNF α *converting enzyme*, TACE) spaltet ein lösliches Homotrimer ab (Black *et al.*, 1997), das wiederum aus 17 kDa schweren Monomeren besteht (vgl. Abb. 6; Smith und Baglioni, 1987; Eck und Sprang, 1989). Sowohl die lösliche als auch die membranständige Form des TNF α können jeweils beide Rezeptoren binden und so komplexe Signalkaskaden auslösen (Idriss und Naismith, 2000; Faustman und Davis, 2010). Jede Untereinheit besteht ihrerseits aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die in einer *jelly roll*-Topologie angeordnet sind (Eck und Sprang, 1989) und

eine zusätzliche Disulfidbrücke aufweisen. Diese ist zwar essentiell für dessen volle biologische Aktivität, nimmt allerdings keinerlei Einfluss auf die Struktur des Monomers (Narachi *et al.*, 1987; Arakawa *et al.*, 1990). Die instabilen und biologisch inaktiven Monomere (Smith und Baglioni, 1987) assoziieren über hydrophobe Wechselwirkungen, an denen maßgeblich die C-terminalen hydrophoben Reste 101-114 beteiligt sind (Liu *et al.*, 2012), zu einem glockenförmigen Homotrimer (51 kDa) und formen so über die entstehende Dreifach-Symmetrieachse die Rezeptorbindestellen (vgl. Abb. 6; Mukai *et al.*, 2010).

Die Dissoziationskonstanten der Trimere, als auch der Komplexe aus Trimer und Rezeptoren, liegen im niedrigen picomolaren Bereich (Poiesi *et al.*, 1993; Grell *et al.*, 1998). Für die Trimerdissoziation wurden Halbwertszeiten zwischen 4 h und 20 h beobachtet, wobei diese in erheblichem Maße von den Pufferbedingungen abhängig sind (Kunitani *et al.*, 1988; Poiesi *et al.*, 1993; Alzani *et al.*, 1995). Detergenzien und DMSO beschleunigen die Trimerdissoziation (Poiesi *et al.*, 1993; He *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2012), eine Reassoziierung der Monomere ist jedoch möglich (Corti *et al.*, 1992; Poiesi *et al.*, 1993). Es wird vermutet, dass der Dissoziation eine konformationelle Umlagerung im Molekül vorausgeht (Alzani *et al.*, 1995). Die Dissoziation des Trimers wird daher als Ansatzpunkt zur Inaktivierung von TNF α *in vivo* diskutiert (Smith und Baglioni, 1987; Corti *et al.*, 1992). Weitere Möglichkeiten den TNF-Signalweg zu blockieren sind einerseits die gezielte Inhibierung der Interaktion zwischen Ligand und seinem Rezeptor (TNFR1) und andererseits die Inhibierung der Metalloprotease TACE (Moss *et al.*, 2001).

Neuere Erkenntnisse schreiben TNF α neben Tumor-destruierenden auch Tumor-verstärkende Wirkungen zu (Devoogdt *et al.*, 2006; Balkwill, 2006; Brambilla *et al.*, 2011). Dennoch wird es in der Tumorthherapie eingesetzt (Lejeune *et al.*, 2006). Besonders bei der Behandlung von Entzündungskrankheiten, wie rheumatische Arthritis, Psoriasis, Morbus Crohn, oder Uveitis, steht das Protein als Zielmolekül im Fokus (Naguwa, 2005; Rutgeerts *et al.*, 2009; Ottiger *et al.*, 2009). Dies untermauert noch einmal die zentrale Stellung des TNF α bei Immun- und Entzündungsreaktionen und dessen pharmakologisches Potential.

Der erste zugelassene TNF α -Inhibitor war Enbrel (Etanercept), ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil des IgG1 und zwei Rezeptordomänen des TNFR-2, welches dadurch nur das intakte Homotrimer erkennt. Den weitaus größten Teil der bisher zugelassenen Inhibitoren stellen jedoch monoklonale Antikörper dar (vgl. Tab. 1). Sie binden sowohl die monomere, als auch die trimere Form des Moleküls, da sie zur Interaktion nur eine Untereinheit benötigen (Jespers *et al.*, 1994; Kohno *et al.*, 2007; Kaymakcalan *et al.*, 2009). Der inhibitorische Effekt resultiert in diesem Fall aus der Überlappung von Epitop und Rezeptorbindestelle.

1 Einleitung

Tab. 1: TNF α -Binder im Überblick. CTLD₃ = trimere *C-type lectin-like domain*; EP = Entwicklungsphase; KP = klinische Phase; LDLR = *low density lipoprotein receptor*; n.b. = nicht bekannt; TNFR2 = TNF α -Rezeptor 2; zg = zugelassen

Bezeichnung	scaffold	Gerüstprotein	Anwendung	KP	Affinität	Referenz
Remicade	mAb	chimerer monoklonaler Antikörper (IgG1)	Crohn Krankheit	zg (1998)	27 pM	Kaymakcalan <i>et al.</i> , 2009
Enbrel	Fusionsprotein	Fusionsprotein aus Fc-Teil von IgG1 & extrazellulärer Domäne des TNFR2	Rheumatoide Arthritis	zg (1998)	21 pM	Kaymakcalan <i>et al.</i> , 2009
Cimzia	mAb	humanisiertes pegyliertes Fab-Fragment	Crohn Krankheit	zg (2008)	vergleichbar Enbrel	Nesbitt <i>et al.</i> , 2007; Tracey <i>et al.</i> , 2008
Humira	mAb	monoklonaler Antikörper (IgG1)	Rheumatoide Arthritis	zg (2002)	30 pM	Kaymakcalan <i>et al.</i> , 2009
Simponi	mAb	monoklonaler Antikörper (IgG1)	Rheumatoide & psoriaische Arthritis, ankylosierende Spondylitis	zg (2009)	18 pM	Shealy <i>et al.</i> , 2010
DOM-0200	Domänen-Antikörper	variable Domäne der schweren oder leichten Kette	Psoriasis, Rheumatoide Arthritis	2	n.b.	Beck <i>et al.</i> , 2010; Mintz & Crea, 2013
Ozoralizumab	Nanobody	VHH (Kamel-Antikörper)	Hämatologie	2	n.b.	Mintz & Crea, 2013
ATN-192	Nanobody	VHH (Kamel-Antikörper)	verschiedene	1	n.b.	Mintz & Crea, 2013
ESBA105	scFv	variable Domäne der schweren oder leichten Kette, chimer	Uveitis	2	vergleichbar Remicade	Ottiger <i>et al.</i> , 2009
AMG-220	Avimer	Domäne A des LDLR	Crohn Krankheit	1	< 0,2 nM	Silverman <i>et al.</i> , 2005
AVX-470	pAb	polyklonaler Antikörper	ulcerative Colitis, Crohn Krankheit, Mukositis	1	n.b.	Bhol <i>et al.</i> , 2013
TN2-B1-C31	Atrimer	CTLD ₃	Crohn-Krankheit, Psoriasis, Rheumatoide Arthritis	EP	0,34 nM	Byla <i>et al.</i> , 2010
10F	Affilin	Ubiquitin	n.b.	EP	390 nM	Hoffmann <i>et al.</i> , 2012
Z _{TNFα:P1}	Affibody	Protein A (Z-Domäne)	verschiedene	EP	0,23 nM	Löfdahl & Nygren, 2010
T_01	DARPin	Ankyrin Repeat Protein	verschiedene	EP	niedrig nM	Steiner <i>et al.</i> , 2008
M12.04	AdNectin	zehnte Fibronectin-Typ III-Domäne	verschiedene	EP	20 pM	Xu <i>et al.</i> , 2002

Ähnlich verhält es sich auch mit künstlichen Bindeproteinen auf Basis diverser Gerüstproteine die mittlerweile gegen TNF α erzeugt wurden. Hier konnten sowohl Kandidaten mit inhibitorischen Eigenschaften (Affibody, Atrimer), als auch Kandidaten, für die bisher nur das Bindungsereignis *per se* bekannt ist (DARPin, AdNectin, Affilin), generiert werden (vgl. Tab. 1). Ein weiterer Inhibitionsmechanismus beruht auf der Erkennung von

Epitopen innerhalb der Kontaktfläche der Monomere. Dies konnte mit Hilfe eines kleinen inhibitorischen Moleküls erreicht werden, dessen Bindung die Dissoziation des TNF-Trimers begünstigt und gleichzeitig dessen Reassoziierung verhindert (He *et al.*, 2005). Aufgrund der hohen Affinitäten zwischen den Monomeren *per se*, sowie TNF α -Trimeren und ihren Rezeptoren, müssen potentielle TNF-Inhibitoren, um biologische Aktivität zu zeigen, selbst sehr hohe Affinitäten besitzen. Der momentan aussichtsreichste Kandidat für Ig-unabhängige *scaffolds* scheint das Avimer AMG-220 der Firma Amgen zu sein. Es hat bisher als einziger die klinische Phase erreicht (vgl. Tab. 1; Silverman *et al.*, 2005). Das immer noch in der Entwicklungsphase befindliche AdNectin M12.04 ist mit einer Affinität von 20 pM ebenfalls erfolgsversprechend (Xu *et al.*, 2002).

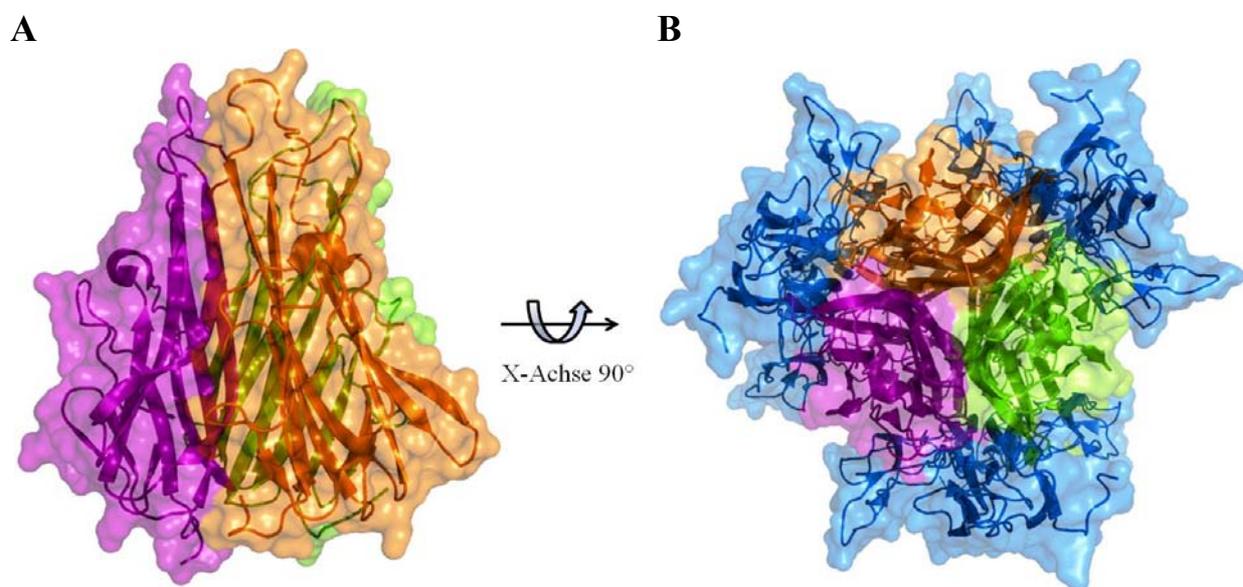


Abb. 6: Freies und Rezeptor-gebundenes TNF-alpha. **A:** Die lösliche Form des TNF α wird proteolytisch von einer membranständigen Vorform abgespalten und besteht aus drei nicht kovalent verbundenen Untereinheiten (PDB: 1tnf). Die Dreifachsymmetrie resultiert in furchenförmigen Rezeptorbindestellen (blau), an deren Ausbildung jeweils zwei Untereinheiten beteiligt sind (Van Ostade *et al.*, 1994). **B:** Demnach binden drei Rezeptormoleküle ein Trimer. Dargestellt ist der Komplex aus TNFR2 (blau) und dem löslichen TNF α -Trimer (PDB: 3ALQ). Die entsprechenden Monomere sind in violett, orange und grün hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

Ein anderer Ansatz nutzt Methoden des *protein engineering* um TNF α -Monomere so zu verändern, dass sie nicht mehr miteinander interagieren (Steed *et al.*, 2003; Brambilla *et al.*, 2011). Diese Technik soll in der Behandlung der Multiplen Sklerose Einsatz finden. Studien dieser Arbeitsgruppe deuten auch darauf hin, dass nicht allein die Blockade der generellen TNF α -Signalkaskade von therapeutischem Vorteil ist, sondern eher die gezielte Inhibierung der löslichen Form des TNF α (Spohn *et al.*, 2007; Brambilla *et al.*, 2011). Sie sprechen der membranständigen Form eine positive, entzündungshemmende und das Überleben der Zelle vermittelnde Rolle zu und der löslichen Form des TNF α eine negative (vermittelt Zelltod,

entzündungsfördernd). Das Zusammenspiel und die richtige Konzentration beider Formen sorgt demnach für die Balance des Systems (Brambilla *et al.*, 2011).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem humanen γ B-Kristallin steht ein bereits etabliertes Gerüstprotein zu Verfügung. In allen bisherigen Bibliotheken wurden basierend auf *in silico*-Analysen acht Aminosäurepositionen auf dem äußeren β -Faltblatt der N-terminalen Domäne des Proteins randomisiert und spezifische Bindemoleküle gegen diverse Zielstrukturen isoliert (Ebersbach *et al.*, 2007; Zhang, 2013). Das hierbei generierte Paratop stellte eine *de novo*-Bindestelle dar. Die erzielten Affinitäten waren allerdings nicht sehr hoch, sodass ein neues Konzept in Erwägung gezogen wurde. Unter Einbezug der natürlichen Bindestellen innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche sollte ein alternatives Paratop geschaffen werden. Hierzu sollten sowohl DNA-Bibliotheken auf Basis der Einzeldomänen als auch des Volllängenproteins erstellt werden. In den beiden Einzeldomänen wurden jeweils sechs bzw. sieben Aminosäurepositionen randomisiert, im Volllängenprotein ergaben sich daraus dreizehn. DNA-Sequenzanalysen und die Analyse zufälliger Proteinvarianten sorgten für die nötige präselektive Qualitätskontrolle. Die Selektion der Bibliothek(en) über TAT-abhängiges Phagen-*display* gegen die Zielstruktur TNF α und anschließendes *screening* putativer TNF α -Binder mittels ELISA waren die nächsten Schritte. Da sich TNF α als eine pharmakologisch äußerst relevante Zielstruktur darstellt, existiert bislang eine Vielzahl unterschiedlicher Bindemoleküle für dieses Protein (vgl. 1.5 Tab. 1). Dies lässt wiederum vergleichende Analysen mit den in dieser Arbeit isolierten Bindemolekülen zu. Im Zuge der biophysikalischen Charakterisierung der bindenden Varianten standen Affinität, Spezifität, Stöchiometrie des Komplexes und thermische Stabilität im Mittelpunkt. Zudem galt es den Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Faltung der Proteinvariante über Sekundärstrukturanalysen zu beurteilen.

Anhand der erhobenen Daten ließ sich einschätzen, inwieweit die randomisierten Reste des Volllängen-hgBC und der Einzeldomänen zu funktionalen Bibliotheksmitgliedern führten, die Interdomänen-Kontaktfläche zur Gesamtstabilität des Volllängenproteins beiträgt (Rudolph *et al.*, 1990; Mayr *et al.*, 1994; Palme *et al.*, 1997) und ob sich die Kontaktfläche letztlich als alternatives Paratop eignet. Desweiteren sollte geklärt werden, ob das Bibliotheksformat generell für das TAT-Phagen-*display* zugänglich ist und ob die grundlegenden Eigenschaften des *scaffolds* erhalten bleiben.

2 Ergebnisse

Dass sich das humane γ B-Kristallin (hgBC) zur Erzeugung künstlicher Bindeproteine eignet, konnte u.a. durch Ebersbach *et al.* (2007) und Zhang (2013) erfolgreich gezeigt werden. Hierbei wurden acht oberflächenexponierte Aminosäuren auf dem äußeren β -Faltblatt der N-terminalen Domäne des Proteins randomisiert und die resultierende Bibliothek erfolgreich gegen diverse Zielstrukturen selektiert. Die Auswahl entsprechender Aminosäurepositionen geschah größtenteils *in silico* unter Berücksichtigung der Toleranz gegenüber Substitutionen und der Lokalisierung innerhalb des rigiden β -Faltblattes.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderer Ansatz verfolgt: die Validierung der Interdomänen-Kontaktfläche des γ B-Kristallins als potentiell Paratop stand im Vordergrund. Für die Selektionsprozesse mittels Phagen-*display* wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, zum einen die Selektion einer Einzeldomänen-Bibliothek vor dem Hintergrund einer nachfolgenden Fusion mit Bibliotheken der korrespondierenden Domäne (sequenzielle Multimerisierung) und zum anderen die präselektive Fusion von Einzeldomänen-Bibliotheken zum Volllängen-Protein (parallele Multimerisierung). Aus der Volllängen-hgBC-Bibliothek konnten TNF α -bindende Varianten isoliert werden, wobei die Variante R3-B11 hinsichtlich ihrer Interaktion mit TNF α näher charakterisiert wurde.

2.1 Selektion einer Einzeldomänen-C-hgBC-Bibliothek gegen TNF α

Unter Zuhilfenahme evolutionärer Selektionsmethoden, wie dem Phagen-*display*, können Moleküle mit spezifischen Eigenschaften aus einem großen *pool* an Varianten mit überschaubarem Aufwand identifiziert und isoliert werden. Allerdings wird durch limitierende Faktoren, wie einzelnen Ligations- und Transformationsschritten, sowie der Wahl des Phagen-Systems *per se*, die real erreichbare Bibliotheksgröße auf rund 10^{10} Varianten beschränkt (Paschke, 2006). Trotz der Limitationen konnten aus qualitativ hochwertigen hgBC-Bibliotheken bereits erfolgreich Binder selektiert werden (Fiedler *et al.*, 2006; Ebersbach *et al.*, 2007; Mirecka *et al.*, 2009; Zhang, 2013). Zunächst sollte eine Einzeldomänen-Bibliothek basierend auf der C-terminalen Domäne gegen das Zielmolekül TNF α selektiert werden. Erhaltene Binder können dann zur weiteren Affinitätsmaturierung miteinander fusioniert bzw. an weitere Bibliotheken gekoppelt und erneuten Selektionsschritten unterzogen werden.

2.1.1 Auswahl geeigneter Aminosäurereste in der C-terminalen Domäne

Die N-terminale Domäne des hgBC (N-hgBC) wurde in unserer Arbeitsgruppe schon eingehender untersucht (Schneider, 2010), daher lag der Fokus dieser Arbeit zunächst auf der C-terminalen Domäne des Proteins (C-hgBC). Zudem enthält sie, im Gegensatz zur N-hgBC, nur ein Cystein. Die insgesamt 6 Cysteine der N-hgBC könnten womöglich negative Auswirkungen auf den Erfolg späterer Selektionsprozesse haben; in Form von unspezifischer Bindung zwischen *scaffold* und Zielmolekül über Disulfidverbrückung. Proteine ohne Disulfidbrücken gestatten außerdem eine effizientere Produktion, gerade auch in Bezug auf technische Maßstäbe. Das zu erzeugende Paratop sollte sich um die Aminosäurereste erstrecken, die an der natürlichen Interaktion mit der N-hgBC beteiligt sind, namentlich I137, L150 und V174 und diese mit in die Bindefläche integrieren. Sequenzvergleiche zwischen Mitgliedern der $\beta\gamma$ -Protein-Superfamilie ergaben einen hohen Konservierungsgrad innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche.

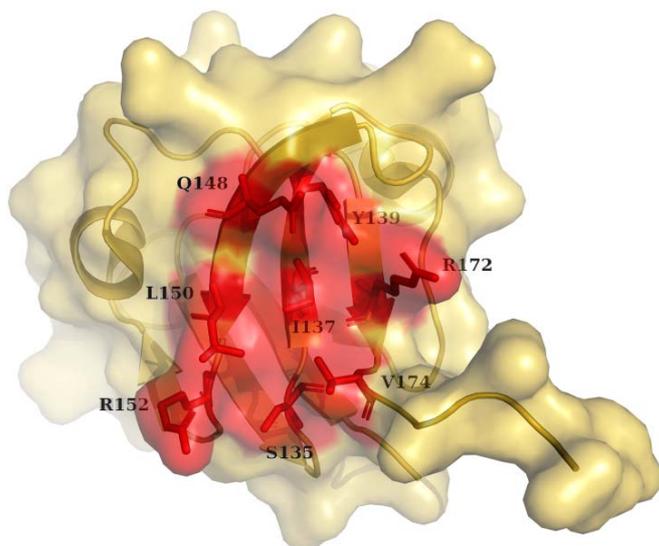


Abb. 7: Randomisierungsfläche in der C-terminalen Domäne des humanen γ B-Kristallins. Die in rot hervorgehobenen acht Aminosäureseitenketten bilden zusammen die maximale Paratopfläche (587 \AA^2) innerhalb des inneren β -Faltblattes (Interdomänen-Kontaktfläche), die in den erstellten C-hgBC-Bibliotheken erreicht wird. Die drei Reste, die an der natürlichen Interaktion beider Domänen beteiligt sind (I137, L150, V174), wurden ebenfalls mit in die Bindefläche einbezogen. Die Nummerierung der entsprechenden Wildtyp-Reste korrespondiert hierbei mit der Aminosäureabfolge im Volllängen-Protein mit verlängertem Linker-Peptid (vgl.

2.2.1 Abb. 12). Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt (PDB: 2jdf).

Daher konzentrierten sich *in silico*-Analysen (PyMol 0.99rc6) der Domänenstruktur auf Reste die sich primär auf den β -Strängen oder angrenzenden *loop*-Regionen befanden und in Summe eine zusammenhängende Bindefläche bildeten. Folglich wurden die Aminosäuren S135, I137, Y139, Q148, L150, R152, R172 und V174 in die Randomisierung einbezogen (vgl. Abb. 7). Vorherige Studien an einem C-hgBC-Bibliotheksformat konnten zeigen, dass mit zunehmender Anzahl an mutierten Positionen die Löslichkeit der Domäne stark absank (nicht gezeigte Daten). Aus diesem Grund sollten Bibliotheken mit unterschiedlicher Anzahl randomisierter Positionen erstellt werden, d.h. zwischen vier und acht Aminosäuren, um den bestmöglichen Kompromiss aus maximaler potentieller Bindungsfläche (Affinität) unter

Beibehaltung größtmöglicher Löslichkeit und Stabilität zu ermitteln (vgl. 2.1.2). Anhand der Lösungsmittelzugänglichkeit der Wildtyp-Reste ergaben sich für die verschiedenen Bibliotheken Paratopflächen zwischen 290 \AA^2 (Lib4.1A) und 587 \AA^2 (Lib8.1B), was mit einer Veränderung von 4,4 % (Lib4.1A) bis 8,8 % (Lib8.1B) der Protein-Primärsequenz einherging.

2.1.2 PCR-basierte Assemblierung der C-hgBC-Bibliotheken

Die Zusammensetzung der verschiedenen C-hgBC-Bibliotheken (vgl. Abb. 8) erfolgte auf Grundlage einer synthetischen, für die Expression in *E. coli* Codon-optimierten Gensequenz (TopGenTechnology, Montreal, Kanada) mit Hilfe von überlappenden, degenerierten Oligodesoxynukleotiden (vgl. 5.6, Tab. 15). Die entsprechenden PCR-Produkte wurden gemäß Abschnitt 5.14.1.1 mit *Bsa* I geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Der Einsatz von NNK-Motiven (vgl. 5.6 Tab. 16; 5.14.1.1) an den randomisierten Positionen resultiert in 32 möglichen Codonen für jede Position und somit in theoretisch erreichbaren Bibliotheksgrößen zwischen $32^4 = 1,05 \times 10^6$ (= 1,74 amol bzw. 331 fg DNA) bis $32^8 = 1,1 \times 10^{12}$ (= 1,83 pmol bzw. 347,1 ng DNA). Nach Assemblierung der Bibliotheken konnten reale Komplexitäten von $9,9 \times 10^{12}$ (Lib4.1A), $3,3 \times 10^{11}$ (Lib5.1A), $4,6 \times 10^{11}$ (Lib6.1A), $1,9 \times 10^{12}$ (Lib7.1A) und 3×10^{12} (Lib8.1B) erzielt werden.



Abb. 8: Randomisierte Aminosäurepositionen in den C-hgBC-DNA-Bibliotheken. Das Gen für die C-terminale Domäne ist als grauer Balken dargestellt, die über Oligodesoxynukleotide (vgl. 5.14.1.1) eingefügten NNK-Motive sind rot hervorgehoben. Die Nummerierung der randomisierten Reste entspricht der Position der Aminosäure im Volllängenprotein mit verlängertem *linker*-Peptid (vgl. 2.2.1 Abb. 12).

Zur Überprüfung der Qualität der naiven Bibliotheken wurde eine Teilmenge der generierten Bibliotheksfragmente über *Nco*I- und *Xho*I-tragende Oligonukleotide reamplifiziert und nachfolgend in pET23SP (vgl. 5.7 Tab. 18) subkloniert.

Zur statistischen Erfassung wurden 96 zufällig ausgewählte bakterielle Klone der Lib6.1A bzw. je 48 Klone der restlichen Bibliotheken regeneriert, wovon 83 bzw. 44 (Lib4.1A), 46

(Lib5.1A), 39 (Lib7.1A) und 34 (Lib8.1B) auswertbare Sequenzen ergaben (vgl. Tab. 2). Der Anteil an funktionalen DNA-Sequenzen lag hierbei zwischen 74 % (Lib8.1B) und 33 % (Lib5.1A). Varianten mit Deletionen, hauptsächlich um die eingeführten NNK-Motive lokalisiert, konnten zu 50 % in Lib4.1A, 67 % in Lib5.1A, 63 % in Lib6.1A, 54 % in Lib7.1A und zu 27 % in Lib8.1B beobachtet werden. Auf Proteinebene lagen die Funktionalitäten zwischen 50 % (Lib4.1A) und 30 % (Lib5.1A).

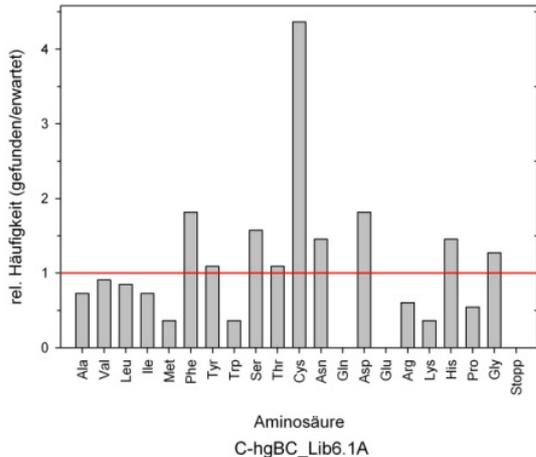
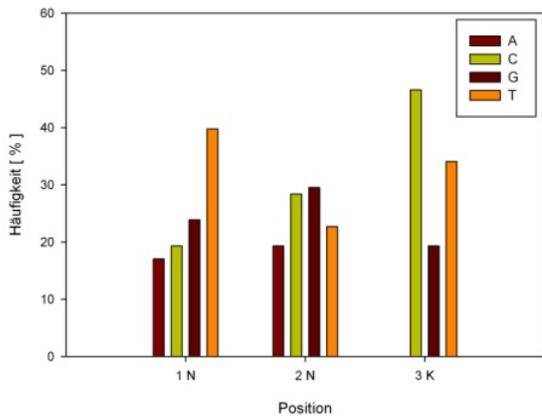
Tab. 2: Funktionalitäten der C-hgBC-Bibliotheken. Als funktional auf DNA-Ebene wurden all diejenigen Sequenzen betrachtet, die einen korrekten, offenen Leserahmen aufwiesen. Auf Proteinebene wurden *Amber*-Stopp Codon tragende Varianten allerdings nicht mehr als funktional angesehen. Substitutionen galten auf beiden Ebenen als funktional. Angegeben sind absolute Zahlen, mit den jeweiligen Prozentangaben in Klammern.

	Lib4.1A	Lib5.1A	Lib6.1A	Lib7.1A	Lib8.1B
Anzahl untersuchter Sequenzen	44	46	83	39	34
Funktionale Sequenzen (DNA)	22 (50)	15 (33)	31 (37)	18 (46)	25 (74)
Funktionale Sequenzen (Protein)	22 (50)	14 (30)	28 (34)	16 (41)	16 (47)

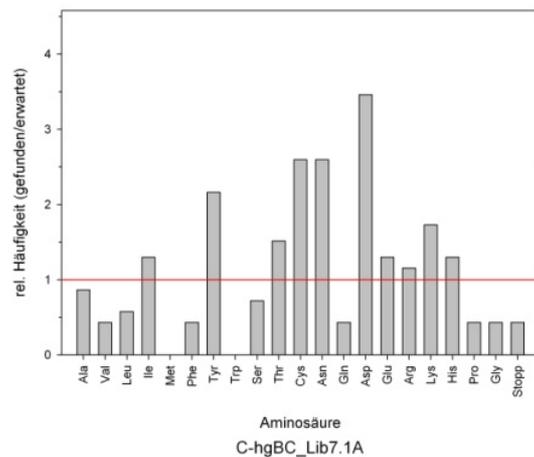
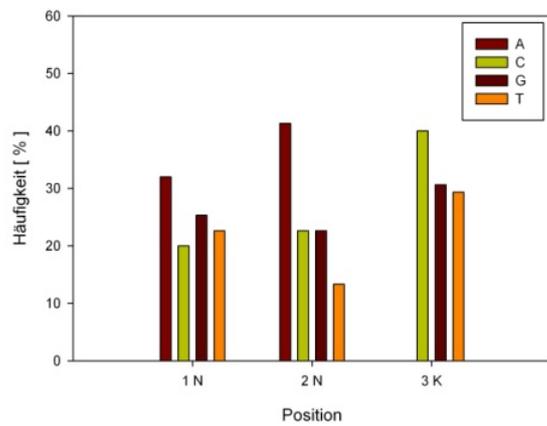
Ein Blick auf die Nukleotidverteilungen zeigt, dass lediglich die Verteilung in der Bibliothek Lib8.1B der erwarteten (N: 25 %; N: 25 %; K: 50 %) nahe kommt, alle anderen weichen davon teilweise deutlich ab (vgl. Abb. 9). Auffällig ist zudem, dass an der K-Position in den Bibliotheken Lib4.1A, 5.1A, 6.1A und 7.1A vermehrt Cytosin zu finden ist, was laut Synthesestrategie der für die Randomisierung verwendeten Oligodesoxynukleotide nicht der Fall sein sollte (nur G und T an dieser Position „erlaubt“). Der Anteil liegt bei 45 % in der Lib4.1A und sinkt mit steigender Anzahl an randomisierten Positionen kontinuierlich ab bis auf einen Wert von 25 % in der Bibliothek 7.1A. In Lib8.1B ist kein nennenswerter Anteil an Cytosin an Position K zu beobachten.

2 Ergebnisse

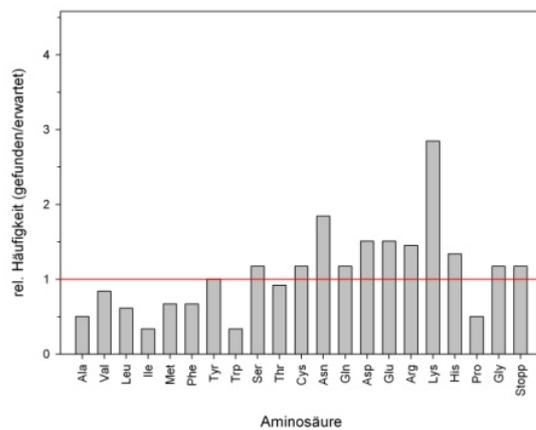
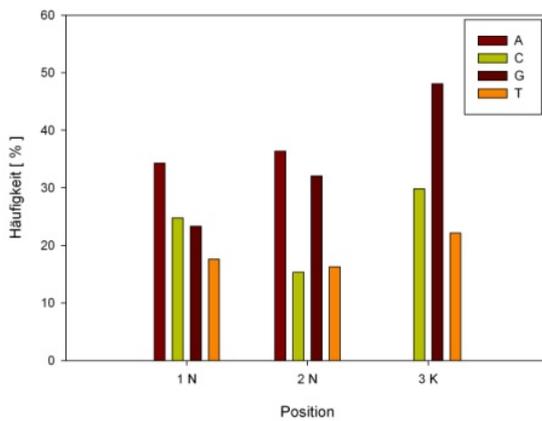
C-hgBC_Lib4.1A



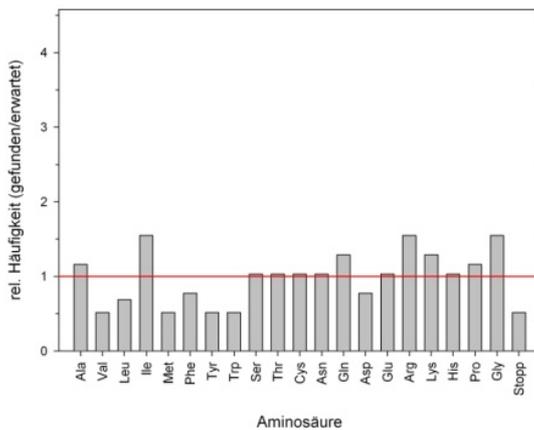
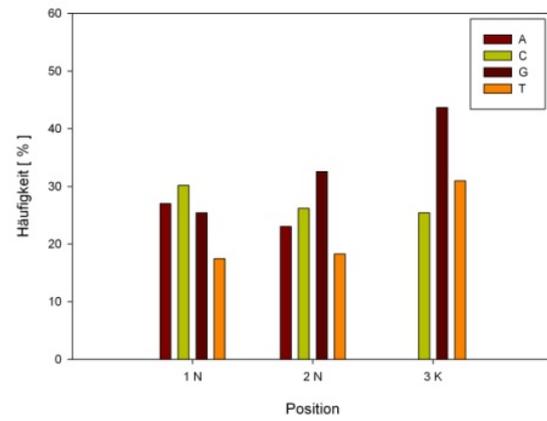
C-hgBC_Lib5.1A



C-hgBC_Lib6.1A



C-hgBC_Lib7.1A



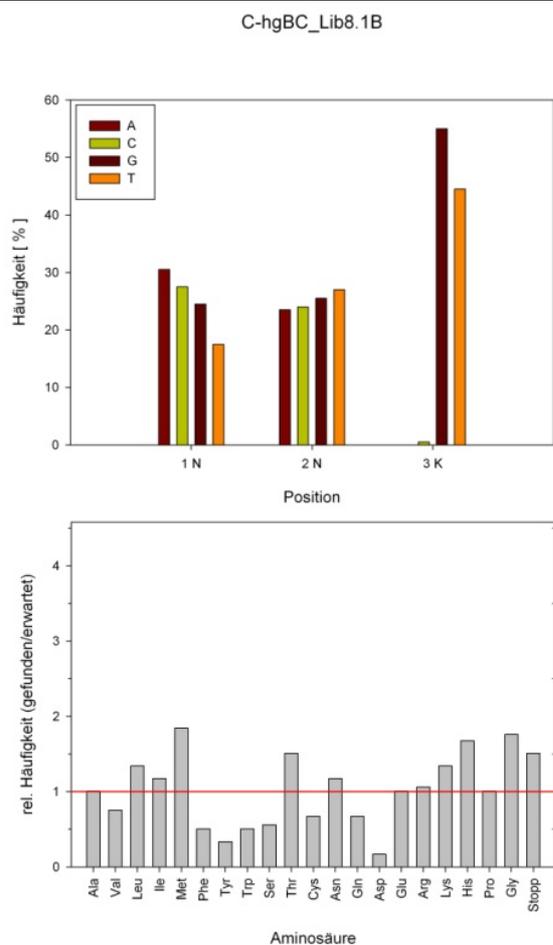


Abb. 9: Nukleotid- und Aminosäureverteilung in den fünf C-hgBC-Bibliotheken. Es wurden 22 (Lib4.1A), 15 (Lib5.1A), 35 (Lib6.1A), 18 (Lib7.1A) respektive 25 (Lib8.1B) funktionale DNA-Sequenzen aus zufälligen bakteriellen Klonen für die Analysen herangezogen. Im oberen Teil jeder Darstellung findet sich die Nukleotidverteilung an den jeweiligen Positionen im NNK-Motiv, darunter die dazugehörige Aminosäureverteilung. Für diese wurde die gefundene Anzahl auf die erwartete normiert (rote Linie: gefundene entspricht erwarteter Anzahl), wobei die Verteilung jeweils über alle randomisierten Positionen berechnet wurde.

Legt man ein Signifikanzniveau von $p = 0,1$ zugrunde, dann genügten lediglich die Nukleotidverteilungen der ersten N-Position der NNK-Motive in den Bibliotheken Lib5.1A und Lib7.1A dem Erwartungswert, für die zweite N-Position traf dies für Lib4.1A, Lib7.1A und Lib8.1B zu (vgl. Anhang

Tab. A1). Auffällig war zudem, dass die zweite N-Position für Lib8.1B eine nahezu ideale Verteilung aufwies ($p = 0,896$). An Position K entsprach nur Lib8.1B der erwarteten Verteilung, alle anderen wichen durch das Auftreten von Cytosin deutlich ab. Die Abweichungen spiegelten sich auch auf Aminosäureebene wider, hier genügte lediglich die Bibliothek Lib7.1A der erwarteten Verteilung.

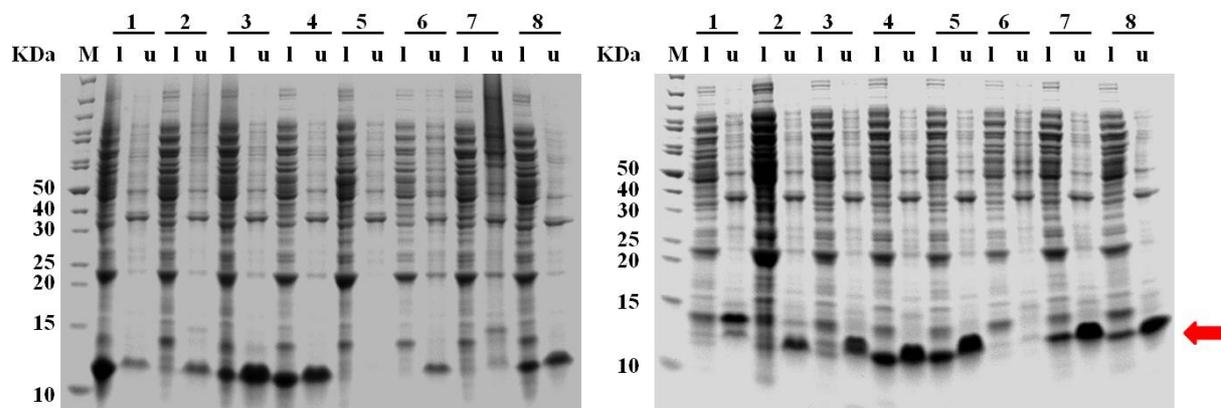
2.1.3 Charakterisierung naiver Bibliotheksvarianten

Veränderungen in der Primärsequenz eines *scaffolds* können selbige auch auf Strukturebene hervorrufen, was nicht selten zu verminderter löslicher Expression führt. Um Aussagen zur Löslichkeit der Bibliotheken machen zu können, wurden die zuvor sequenzierten Varianten (vgl. 2.1.2) in 500 μl -MTPs (Nunc, Dänemark), befüllt mit je 200 μl ZYM-5052-Medium pro Kavität, kultiviert und die geernteten Zellpellets gemäß Abschnitt 5.13.5 aufgeschlossen. Alle zuvor sequenzierten naiven Bibliotheksvertreter wurden bezüglich ihres Expressionsverhaltens in SDS-PAGE-Analysen untersucht (vgl. Abb. 10A), bei den beiden C-hgBC-Bibliotheken Lib7.1A und Lib8.1B wurde sich dabei lediglich auf die Vollängenvarianten beschränkt. Als Vollängenvarianten galten alle Varianten, für die eine vollständige Gensequenz ohne Deletionen bzw. Insertionen und *loss-of-function* Mutationen (TAG-Codon)

2 Ergebnisse

ermittelt werden konnte. Die Daten zeigen, dass die Löslichkeit der Varianten mit zunehmender Anzahl an Randomisierungspositionen abnimmt (vgl. Abb. 10B). Die Vertreter aus Bibliothek Lib8.1B waren zu 100 % unlöslich.

A



B

	Lib4.1A	Lib5.1A	Lib6.1A	Lib7.1A	Lib8.1B
Anteil löslicher Varianten *	77	67	58	22	0
Varianten > 50 % Löslichkeit	36	13	9	6	0
Anteil unlöslicher Varianten	22	33	42	78	100

Abb. 10: Expressionsanalyse der naiven C-hgBC-Bibliotheken. **A:** Zwei exemplarische SDS-Gele zur Expression von Bibliotheksmitgliedern. Lösliches (l) sowie unlösliches (u) Zelllysate aus MTP-Expressionen (vgl. 5.13.5) wurde zu je 7 μ l auf 16 % ClearPAGE-Gele aufgetragen und die Proteine nach erfolgter SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung visualisiert. Der rote Pfeil kennzeichnet die Laufhöhe der Varianten; im Mittel beträgt sie ca. 12 kDa. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder. Links: 8 Varianten der Bibliothek 4.1A. Rechts: 8 Varianten der Bibliothek 6.1A. **B:** Densitometrische Auswertung zu A. Alle Zahlen sind Prozentangaben. * Anteil an Varianten mit detektierbarem Protein in der löslichen Fraktion

Um den Einfluss eingeführter Mutationen auf die Stabilität der Varianten festzustellen wurden einzelne lösliche Varianten gereinigt (vgl. 5.15.2) und mittels DSF (*Differential Scanning Fluorimetry*)-Analysen untersucht (vgl. 5.15.9). Bei dieser Methode wird die thermische Entfaltung eines Proteins in Anwesenheit eines umgebungsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes, wie z.B. *Sypro orange*, verfolgt (Niesen *et al.*, 2007). Dazu wurden zunächst die 96-*well*-Vorkulturen aller Vollängenvarianten auf zwei MTP zusammengeführt, erneut für 6-7 h inkubiert und anschließend in der Hauptkultur mit Hilfe des EnBase Flo-Mediums zur Proteinexpression gebracht (vgl. 5.13.5). Die geernteten Zellen wurden aufgeschlossen (vgl. 5.13.5), affinitätschromatographisch (IMAC) gereinigt und anschließend durch Gelfiltration in den entsprechenden Analysepuffer überführt (vgl. 5.15.2.1).

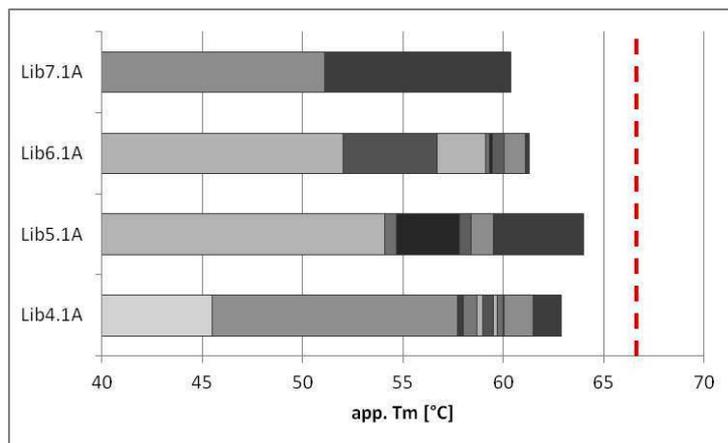


Abb. 11: Apparente Schmelztemperaturen (app. T_m) der Bibliotheksmitglieder. Alle löslich exprimierten sequenzkorrekten Varianten wurden affinitätschromatographisch gereinigt und über DSF auf ihre thermische Stabilität überprüft. Jeder vertikale Strich entspricht dem Messwert einer Variante der entsprechenden Bibliothek. Die rote gestrichelte Linie markiert den T_m-Wert der Wildtyp-Domäne. Die Messungen erfolgten in PBS (pH 7,4). Mittlere Schmelztemperaturen für einzelne Bibliotheken: 58,5 °C (Lib4.1A); 58,1 °C (Lib5.1A); 58,7 °C (Lib6.1A); 56 °C (Lib7.1A).

Alle untersuchten Varianten wurden durch die Einführung von Mutationen im inneren β -Faltblatt destabilisiert (vgl. Abb. 11). Im Vergleich zur Wildtyp-Domäne reduzierte sich die apparente Schmelztemperatur bei einzelnen Varianten um bis zu 15 K, im Mittel allerdings nur um rund 8 K. Der Großteil der analysierten Bibliotheksvarianten ($\sim 85\%$ mit $T_m > 57\text{ °C}$) wies somit eine immer noch hohe thermische Stabilität auf, was die Eignung der C-terminalen Domäne als *scaffold* noch einmal untermauerte. Die Randomisierung von Aminosäureresten innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche der C-hgBC nimmt demnach weniger Einfluss auf deren Stabilität, als auf deren Löslichkeit (vgl. Abb. 10 und Abb. 11).

Anhand der erhobenen Daten erschien die C-hgBC-Bibliothek 6.1A als die geeignetste für eine anschließende Selektion im Phagen-*display* zu sein, da sie das Optimum aus größtmöglicher Randomisierungsfläche und somit größtmöglicher Affinität, bei maximal erreichbarer Löslichkeit und Stabilität darstellt (vgl. Tab. 3). Die Bibliothek wurde daraufhin in das *phagemid* pCD87SA kloniert und für die Selektion gegen humanes TNF α eingesetzt. Die für die Subklonierung verwendeten DNA-Mengen gewährleisteten dabei stets die mindestens 200-fache Abdeckung der theoretisch möglichen Variabilität ($1 \times 10^9 / 325\text{ pg}$). Nach Transformation von *E. coli* Zellen mit der Bibliothek konnte letztlich eine real verfügbare Komplexität von ca. 2×10^7 erzielt werden, was wiederum 2 % des theoretisch möglichen Wertes entsprach. Der Selektionsprozess erfolgte über insgesamt vier Runden im TAT-abhängigen Phagen-*display* unter variablen Bedingungen (vgl. 5.14.2 Tab. 24), wobei die Anreicherung von bindenden Varianten nicht zu verzeichnen war. Einzelklon-Analysen mittels *single phage* ELISA führten zum gleichen Ergebnis, TNF α -bindende Varianten konnten auch hiermit nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten).

Tab. 3: Zusammenfassung der Daten zu den C-hgBC-Einzeldomänen-Bibliotheken.

	Lib4.1A	Lib5.1A	Lib6.1A	Lib7.1A	Lib81B
Paratopfläche [Å²]	290	304	428	527	587
Fkt. AS-Sequenzebene [%]	50	30	34	41	47
Löslichkeit [%]*	36,4	13,3	9,1	5,6	0
thermische Stabilität [°C]**	58,5	58,1	58,7	56	n.b.

AS = Aminosäure; Fkt. = Funktionalität; n.b. = nicht bestimmbar

* Varianten mit über 50 % Proteinanteil in der löslichen Fraktion

** Mittelwert der apparenten Schmelztemperaturen über alle gemessenen Varianten der Bibliothek

Die erzielte Funktionalität auf DNA- (37 %) gepaart mit geringer Löslichkeit auf Proteinebene (nur 9 % der Varianten mit mehr als 50 % Zielprotein in der löslichen Fraktion) waren wenig überzeugend und ließen die Einzeldomäne im Vergleich zu einem Vollängenkonstrukt ungeeignet erscheinen. In der Folge wurde von der sequenziellen zur parallelen Multimerisierung übergegangen, d.h. der präselektiven Fusion von Einzeldomänen-Bibliotheken zum Vollängen-hgBC-Protein als Startpunkt für die Bindergenerierung.

2.2 Selektion einer Vollängen-hgBC-Bibliothek gegen TNF α

Nach der erfolglosen Selektion von Einzeldomänenbindern basierend auf der C-terminalen Domäne des hgBC und dem damit einhergehenden Erfahrungsgewinn bezüglich Bibliotheksdesign und – konstruktion verlagerte sich der Fokus auf das Vollängenprotein mit Hauptaugenmerk auf der Qualität der Ausgangsbibliothek. Diese sollte durch den Einsatz von vorsynthetisierten Trinukleotidbausteinen in den zum Bibliotheksaufbau verwendeten Oligodesoxynukleotiden in Kombination mit einer Leserahmenselektion wesentlich erhöht werden. Trinukleotidbausteine besitzen gegenüber NNK-Motiven den Vorteil, dass der durch sie eingebrachte genetische Code nicht degeneriert vorliegt, sowie Stopp- und unerwünschte Aminosäure-Codone (z.B. Cys, Pro) im Syntheseprozess ausgeschlossen werden können. Demzufolge verringert sich die abzudeckende Diversität auf DNA- aber nicht auf Proteinebene. Dennoch ist die Diversität solcher multimerer Bibliotheksformate sehr hoch (abhängig von Anzahl mutierter Positionen) und praktisch nicht abzudecken (vgl. 1.2); dem gegenüber steht eine größere potentielle Bindefläche. Ein weiterer Vorteil ist die theoretische Gleichverteilung aller Aminosäuren an den Randomisierungspositionen. Ungleichverteilungen resultieren in der Anhäufung bestimmter Aminosäuren und damit verbundener physikochemischer Eigenschaften, was letztlich wieder einer Reduktion an Diversität gleichkommt. Dieser Effekt potenziert sich mit der Anzahl an randomisierten Positionen im Protein.

In Summe standen 13 randomisierbare Positionen zur Verfügung, die zusammen eine maximal mögliche Bindefläche von etwa 1080 Å² ergaben (vgl. Abb. 12) und folglich 7,2 % der Primärsequenz des Proteins veränderten. Die Paratopfläche wurde dabei anhand der Lösungsmittelzugänglichkeit der Wildtyp-Reste berechnet. Die beiden Einzeldomänen-Bibliotheken wurden durch das natürliche *linker*-Peptid, das zusätzlich durch ein SG₄-Sequenzmotiv verlängert wurde, miteinander verbunden. Die Verlängerung sollte den Abstand zwischen beiden Domänen erhöhen und letztlich deren gegenseitige Interaktion vermindern, um so die Bindung von Zielstrukturen durch das gesamte Paratop zu forcieren.

2.2.2 Modulare Erstellung der Vollängen-hgBC-Bibliothek

Wie zuvor bei der Einzeldomäne (C-hgBC) sollten auch hier die Aminosäuresubstitutionen über randomisierte Oligodesoxynukleotide eingeführt werden. Hierzu wurde die DNA-Sequenz des hgBC ausgehend von den zu mutierenden β -Faltblattstrukturen in verschiedene überlappende Sequenzabschnitte unterteilt und diese schrittweise durch Restriktions-Ligationsreaktionen zum Vollängenkonstrukt zusammengefügt (vgl. Abb. 13 und 5.14.1.2). Im Gegensatz zur C-hgBC wurde bei der Vollängen-hgBC-Bibliothek allerdings an den randomisierten Positionen auf Trinukleotid-basierte Oligodesoxynukleotide gesetzt, um schon bei deren Synthese Einzelnukleotiddeletionen weitestgehend zu vermeiden. Durch Kopplung mit einer Leserahmenselektion für die Einzelfragmente sollte die Funktionalität der finalen Bibliothek nochmals erhöht werden (vgl. 1.2 und 5.14.1.2; Gerth *et al.* 2004).

Um die Identifizierung von löslichen Varianten aus komplexen Bibliotheken zu beschleunigen bzw. zu vereinfachen sollte in diesem Zusammenhang ein Hochdurchsatzfähiges Löslichkeits-*sceening* etabliert werden (vgl. 2.2.3). Die C-terminale Fusion der Varianten mit *superfolder* GFP (sfGFP; Pedelacq *et al.* 2006), welches unabhängig vom Fusionspartner faltet, sollte hierbei den gewünschten Effekt erzielen. Variante und sfGFP sind in diesem Fall durch ein *amber stop* Codon voneinander abgegrenzt und können durch die Wahl eines geeigneten Suppressor- (z.B. Nova Blue) oder Nicht-Suppressorstammes (z.B. BL21) getrennt voneinander hergestellt werden.

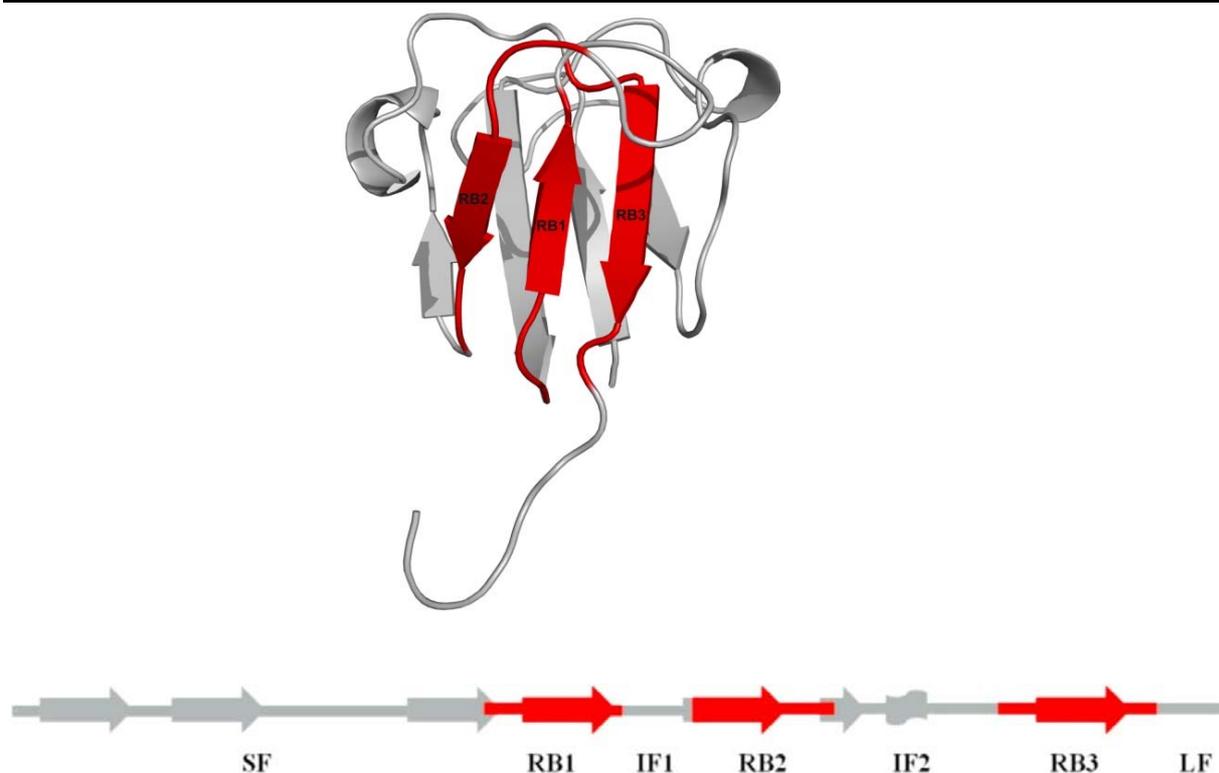


Abb. 13: Modularer Aufbau des Vollängen-hgBC. Er soll hier am Beispiel der N-terminalen Domäne verdeutlicht werden; der Aufbau der C-terminalen Domäne ist analog. **Oben:** Räumliche Anordnung der randomisierten RB-Fragmente (rot) in der N-hgBC-Domäne. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt (PDB: 2jdf). **Unten:** Abfolge der einzelnen Module und Sekundärstrukturelemente in der N-hgBC-Primärsequenz. Abbildung modifiziert nach Schneider (2010).

➡ β-Faltblattstränge; ▭ helikale Bereiche; SF = Startfragment; IF = intermediäre Fragmente; RB = randomisierte β-Faltblatt Fragmente; LF = Linker-Fragment

Eine auf korrekten Leserahmen vorselektierte naive hgBC-Lib13.1A-Teilbibliothek wurde zur Funktionalitätsanalyse in diesen *screening*-Vektor subkloniert und die entsprechenden Plasmide aus 384 zufälligen *E.coli* Transformanden sequenziert, wovon 264 auswertbare Sequenzen ergaben (Karte des *solubility screening*-Vektors, vgl. Anhang Abb. A1). Die Funktionalität sowohl auf DNA-, als auch auf Proteinebene, konnte im neuen Bibliotheksdesign im Vergleich zu den vorherigen C-hgBC-Bibliotheken erheblich gesteigert werden – auf einen Wert von 97 % (vgl. Tab. 4). Dabei sank auch der Anteil an Sequenzen mit Einzeldelationen bzw. -insertionen drastisch ab (auf 1,5 %). Die Kombination von Trinukleotid-basierten Oligodesoxynukleotiden zur Synthese von DNA-Fragmenten und deren gleichzeitige Vorselektion auf korrekten Leserahmen verliefen demnach erfolgreich. Da in der vorliegenden Bibliothek die Aminosäureverteilung die entsprechende Nukleotidverteilung direkt widerspiegelt (keine Degeneration), soll hier nur auf diese eingegangen werden. Für die Oligodesoxynukleotide zum Aufbau der randomisierten Module wurden für die Einzeldomänen unterschiedliche vorgefertigte Trinukleotidmischungen verwendet: in der modularen N-hgBC wurde Cystein ausgelassen, in der C-hgBC hingegen Prolin und Cystein.

Dennoch wurde in einer Variante Cystein in der N-hgBC gefunden (entspricht 0,4 %) und in zwei Varianten trat Prolin innerhalb der C-hgBC auf (entspricht 0,8 %). Auch unter Ausschluss dieser Tatsache genügte die beobachtete Aminosäureverteilung in der naiven hgBC-Bibliothek nicht der erwarteten, dies traf auch auf die entsprechenden Einzeldomänen zu (vgl. Anhang Tab. A1). Eine Gleichverteilung der 19 erwünschten Aminosäuren an allen Randomisierungspositionen war demnach nicht zu beobachten (vgl. Abb. 14).

Tab. 4: Funktionalität der Vollängen-Bibliothek Lib13.1A im Vergleich zur Einzeldomänen-Bibliothek Lib6.1A. Als funktional wurden all diejenigen Sequenzen betrachtet, die weder zusätzliche Insertionen, Deletionen, noch *amber*-Stop Codone trugen und zudem einen korrekten Leserahmen aufwiesen. Stille Mutationen und Substitutionen wurden als funktional angesehen. Angegeben sind absolute Zahlen, mit den jeweiligen Prozentangaben in Klammern.

* Deletion bzw. Insertion eines kompletten Basentriplets; n.b. = nicht beobachtet

	Lib13.1A	Lib6.1A
Anzahl untersuchter Sequenzen	264	83
Sequenzen mit NNN-Deletionen / -Insertionen*	9 (3)	n.b.
Sequenzen mit Einzeldeleitionen / -insertionen	4 (2)	48 (58)
Substitutionen	19 (8)	3 (4)
Funktionale Sequenzen	255 (97)	28 (34)

Auffällig war der hohe Anteil an Tryptophan und Glutamin in der N-hgBC (Pos. 41 - Pos. 81), besonders an Position 54 und 56 trat Tryptophan in fast 20 % der sequenzierten Varianten auf. Ebenfalls stark vertreten an diesen beiden Positionen war Prolin mit rund 10 % Anteil (vgl. Abb. 14). Aspartat und Asparagin waren in der N-hgBC nicht so oft anzufinden, wohingegen in der C-hgBC (Pos. 135 – Pos. 174) der Anteil an Aspartat anstieg. Verhältnismäßig viel Glycin und Glutamat fanden sich in der C-hgBC wieder, insbesondere an Position 150, respektive 135.

Nachdem Funktionalität (DNA) und Aminosäureverteilung der modularen Vollängen-Bibliothek betrachtet wurden ging es anschließend darum das Expressionsverhalten einzelner Varianten der naiven Bibliothek zu beurteilen.

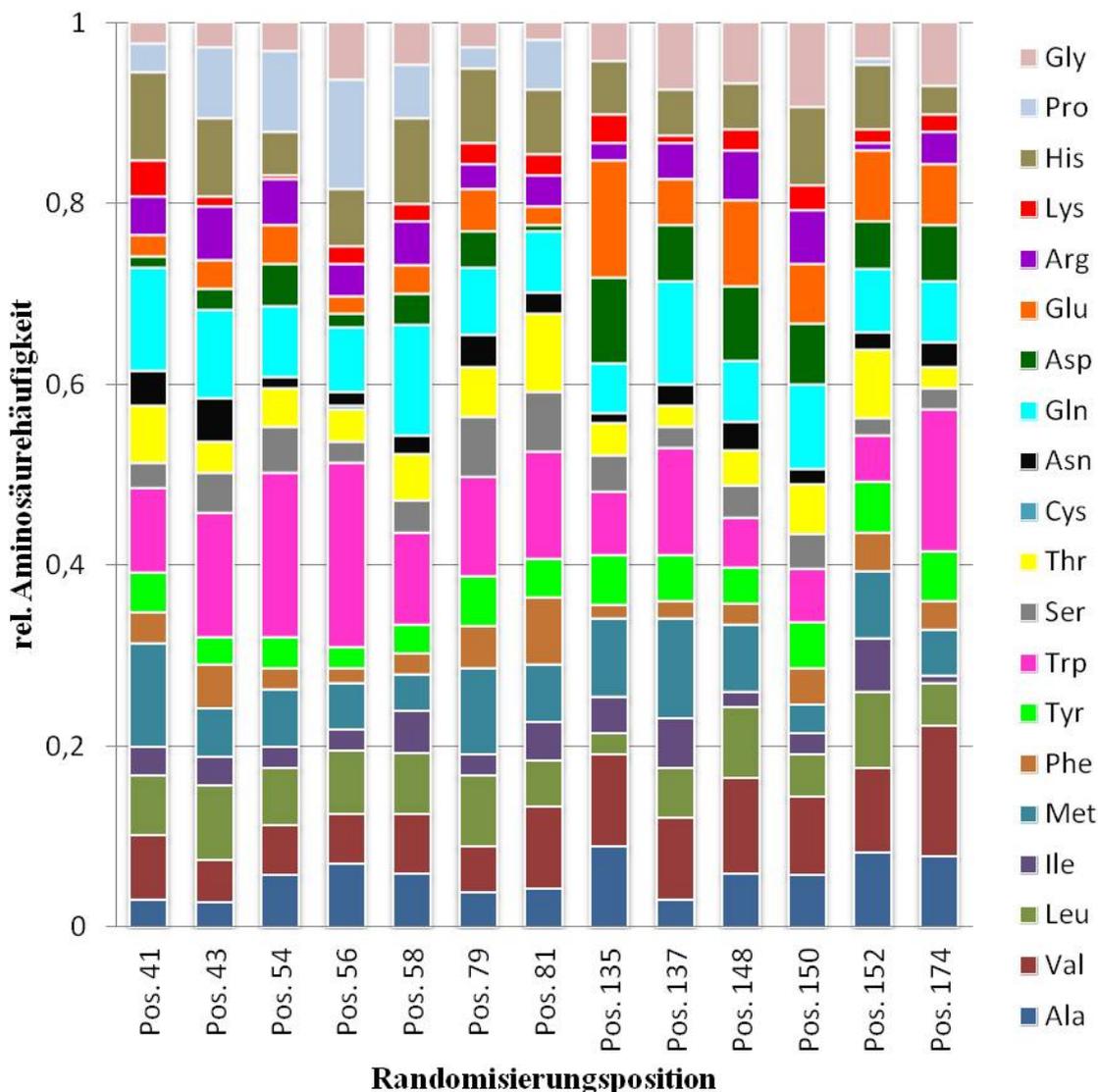


Abb. 14: Aminosäureverteilung in der modularen naiven Vollängen-hgBC-Bibliothek. Es wurden die Sequenzen von 255 zufälligen bakteriellen Klonen mit insgesamt 3312 Aminosäuren untersucht, wobei 1784 auf die N-hgBC und 1528 auf die C-hgBC entfielen. Dargestellt ist die Verteilung der Aminosäuren für jede Randomisierungsposition im hgBC. Pos. 41 bis Pos. 81 gehören dabei zur N-hgBC und Pos. 135 bis Pos. 174 entsprechend zur C-hgBC.

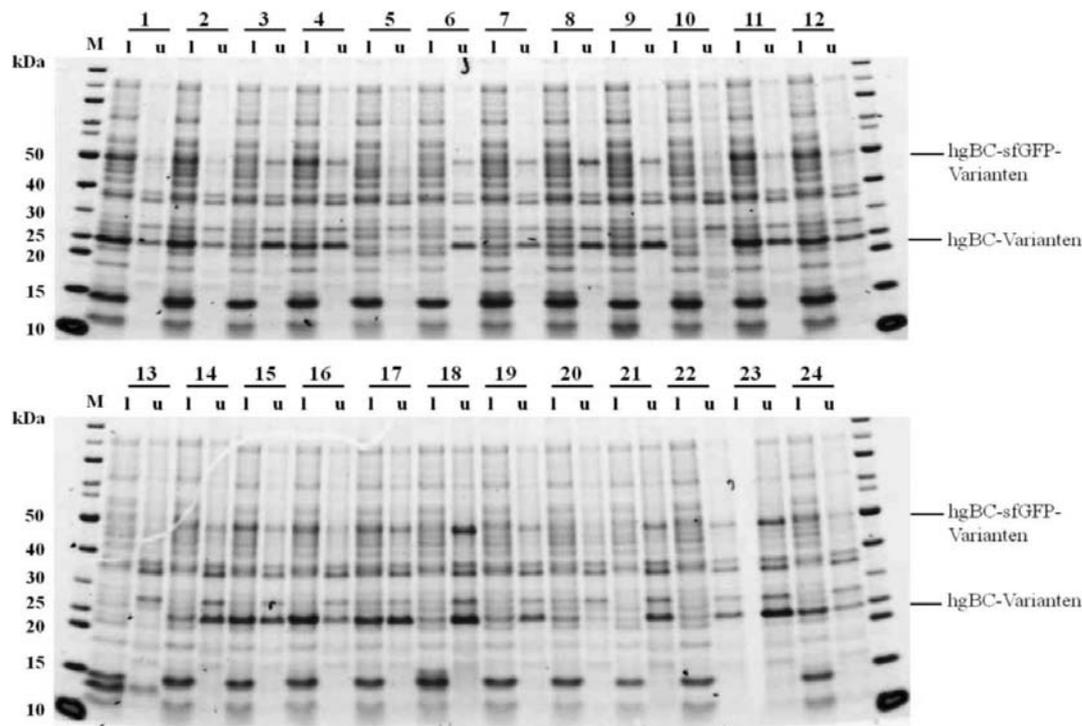
2.2.3 Löslichkeitsanalyse naiver Bibliotheksmitglieder

Zur Bestimmung der Löslichkeit der naiven Vollängen-Bibliothek wurden 184 der zuvor sequenzierten Varianten, wie bereits unter 2.1.3 erläutert, im MTP-Maßstab in Nova Blue (DE3) exprimiert, die Zellen geerntet und deren Pellets gemäß 5.13.5 aufgeschlossen. Die Löslichkeiten wurden über verschiedene Wege bestimmt. Zum Einen wurden lösliche und unlösliche Zellfraktionen per SDS-PAGE densitometrisch analysiert und zum Anderen die Fluoreszenz der Variante-sfGFP-Fusion aufgenommen. Der Schwellenwert für Löslichkeit wurde hierbei auf 50 % gesetzt, alle Varianten mit höherem löslichem Proteinanteil wurden

2 Ergebnisse

als löslich betrachtet. 177 der 184 untersuchten Varianten zeigten den Zielproteinen entsprechende Proteinbanden (sfGFP-Fusion als auch nicht fusioniertes Protein), lediglich bei sieben war keinerlei Expression zu beobachten (entspricht 3,8 %).

A



B

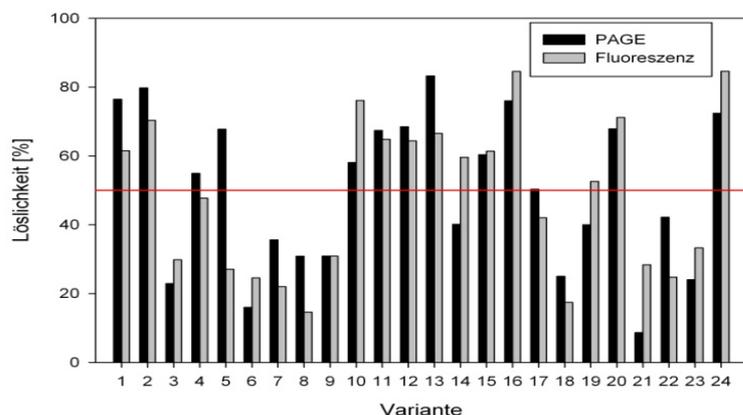


Abb. 15: Expressionsanalyse der naiven Vollängen-hgBC-Bibliothek. A: SDS-PAGE-Analyse ausgesuchter Varianten. Lösliches (l) sowie unlösliches (u) Zellysate aus MTP-Expressionen (vgl. 5.13.5) wurde zu je 10 μ l auf Criterion Gradientengele (4-20 %) aufgetragen und die Proteine nach dem Lauf mittels Gel Doc EZ System (Bio Rad) färbefrei visualisiert. Die mittlere Laufhöhe der Varianten beträgt etwa 23 kDa, die der sfGFP-fusionierten etwa 50 kDa. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder. **B:** Fluoreszenzdaten und Densitometrie der unter A aufgezeigten naiven Varianten. Die Fluoreszenzwerte spiegeln dabei den löslichen Anteil (= löslich / (löslich + unlöslich)) des Fusionsproteins wieder, die PAGE-Werte den der nicht fusionierten Varianten. Varianten die eine Löslichkeit größer 50 % aufwiesen (rote Linie) wurden in diesem Zusammenhang als löslich bezeichnet. Densitometrische Daten wurden mittels BioRad Analysesoftware bestimmt und die Fluoreszenzwerte der entsprechenden Fusionsproteine mit einem Plattenlesegerät aufgenommen.

Somit genügten nach densitometrischer Auswertung 52 % und laut Fluoreszenzmessungen immerhin noch 45 % der Varianten den Anforderungen der eingangs definierten löslichen Expression. Etwa 11 % der Varianten zeigten eine gute bis sehr gute (80-100 % im löslichen Überstand), 41 % eine mittlere Löslichkeit (50-80 % im löslichen Überstand) und 48 % zeigten sich laut vorheriger Definition unlöslich (< 50 % im löslichen Überstand). Die Korrelation zwischen SDS-PAGE- und Fluoreszenzdaten war in den überwiegenden Fällen gegeben, Varianten mit niedrigem Expressionslevel zeigten dabei die größten Abweichungen (vgl. Abb. 15A und 14B). Bei Varianten mit verminderter Löslichkeit führte die Fusion mit sfGFP teilweise zur geringfügigen Erhöhung ihrer Löslichkeit, was wiederum in Divergenzen zwischen Fluoreszenz- und SDS-PAGE-basierten Werten resultierte.

Die Randomisierung von 13 Aminosäurepositionen innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche des hgBC zeigte deutlichen Einfluss auf dessen lösliche Expression, im Vergleich zu den Einzeldomänen-Varianten allerdings weitaus weniger (vgl. 2.1.3). Somit war die Bibliothek hgBC-Lib13.1A nach Ermittlung von Funktionalität und Expressionsverhalten bereit für die Selektion gegen das Zielmolekül.

2.2.4 Selektion der hgBC-Bibliothek gegen TNF α

Die Selektion erfolgte, wie schon zuvor für die Einzeldomäne, im TAT-abhängigen Phagen-*display*. Da die theoretisch mögliche Variabilität zu groß war um sie vollständig abbilden zu können (3×10^{16} / 18 mg DNA) wurde lediglich eine Teilbibliothek in das *phagemid* pCD87AB kloniert (vgl. 5.7 Tab. 18 und Anhang Tab. A1; modifizierte MCS mit *AgeI* und *BamHI* Schnittstelle) und für die Selektion gegen humanes TNF α eingesetzt (komplette Bibliothek: $1,7 \times 10^{13}$ Moleküle). Die Teilbibliothek umfasste insgesamt $6,7 \times 10^{12}$ Moleküle (4 μ g DNA) und deckte somit 0,022 % der theoretischen Komplexität der Bibliothek ab. Nach Transformation von *E. coli* Zellen konnte letzten Endes eine real verfügbare Komplexität von $3,1 \times 10^7$ erzielt werden. Der anschließende Selektionsprozess erfolgte über fünf Runden gegen biotinyliertes TNF α . Die chemische Modifikation des Proteins wurde zuvor durch zwei unabhängige Experimente überprüft (vgl. 5.15.5). Sowohl ein *pull-down*-Experiment an einer Streptavidin-Matrix als auch ein entsprechendes Massenspektrum (MALDI-TOF) bestätigten die Biotinylierung (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Erfahrungen mit der Einzeldomäne und den nicht abzuschätzenden Affinitäten innerhalb der Vollängen-Bibliothek, wurde sich für milde Selektionsbedingungen entschieden (detailliertes Protokoll unter 5.14.2; Tab. 22).

Tab. 5: Selektionsverlauf. *Input:* Anzahl an Phagen die für jede Selektionsrunde eingesetzt wurden. *Output:* Anzahl an Phagen die mutmaßlich an die Zielstruktur gebunden hatten, dargestellt als Prozentsatz des Phagen-*input*. Von Runde zu Runde wurde immer nur ein Parameter verändert. * *output* der jeweiligen Runde geteilt durch *output* der Runde 1 (Nord *et al.*, 1997; Mutuberría *et al.*, 1999).

Runde	TNF α -Konz. [nM]	geänderter Parameter	<i>output</i> (% <i>input</i>)	Anreicherung*
1	1000	-	$7,3 \times 10^{-4}$	1
2	1000	von M280 zu M270	$1,1 \times 10^{-2}$	15
3	250	TNF α -Konz. verringert	$4,8 \times 10^{-4}$	0,7
4	250	Waschschritte erhöht	$5,5 \times 10^{-2}$	75
5	50	TNF α -Konz. verringert	$2,0 \times 10^{-1}$	274

Während des Selektionsprozesses konnte eine diskontinuierliche Anreicherung bindender Phagen beobachtet werden, mit einem signifikanten Verlust an Bindern in Runde drei (vgl. Tab. 5). Letztlich konnte jedoch nach insgesamt fünf Runden ein Anreicherungsfaktor von 274 gegenüber der initialen Runde erzielt werden. Die Analyse einzelner Runden im Phagen-*pool*-ELISA bestätigten die Anreicherung TNF α -bindender Phagen (vgl. Anhang Abb. A2). Nachdem die eigentliche Selektion erfolgreich gewesen ist sollten nun TNF α -bindende Einzelvarianten jeder Runde anteilig bestimmt werden. Daraus konnte abgeschätzt werden welche Runde geeignet ist sie im anschließenden *screening* auf putative Binder einzusetzen.

2.2.5 Identifizierung von TNF α -bindenden Varianten

Der von der präsentierten Zielstruktur TNF α eluierte *pool* aus Phagen-tragenden *E. coli* - Zellen jeder Selektionsrunde wurde auf Antibiotika-haltigen Agarplatten (SOC_{Cam}) vereinzelt, mit den gewachsenen Kolonien *deepwell* Platten beimpft und diese für die erneute Phagenpropagierung unter adäquaten Bedingungen kultiviert (vgl. 5.12.3). Die so erhaltenen Phagen wurden unverdünnt in einem Einzelphagen-ELISA auf Bindung gegen immobilisiertes TNF α und als Kontrolle gegen hgBC-Antikörper getestet. Die Bindung an den Antikörper sollte dabei als Nachweis der korrekten Präsentation der Variante auf den Phagen dienen.

2 Ergebnisse

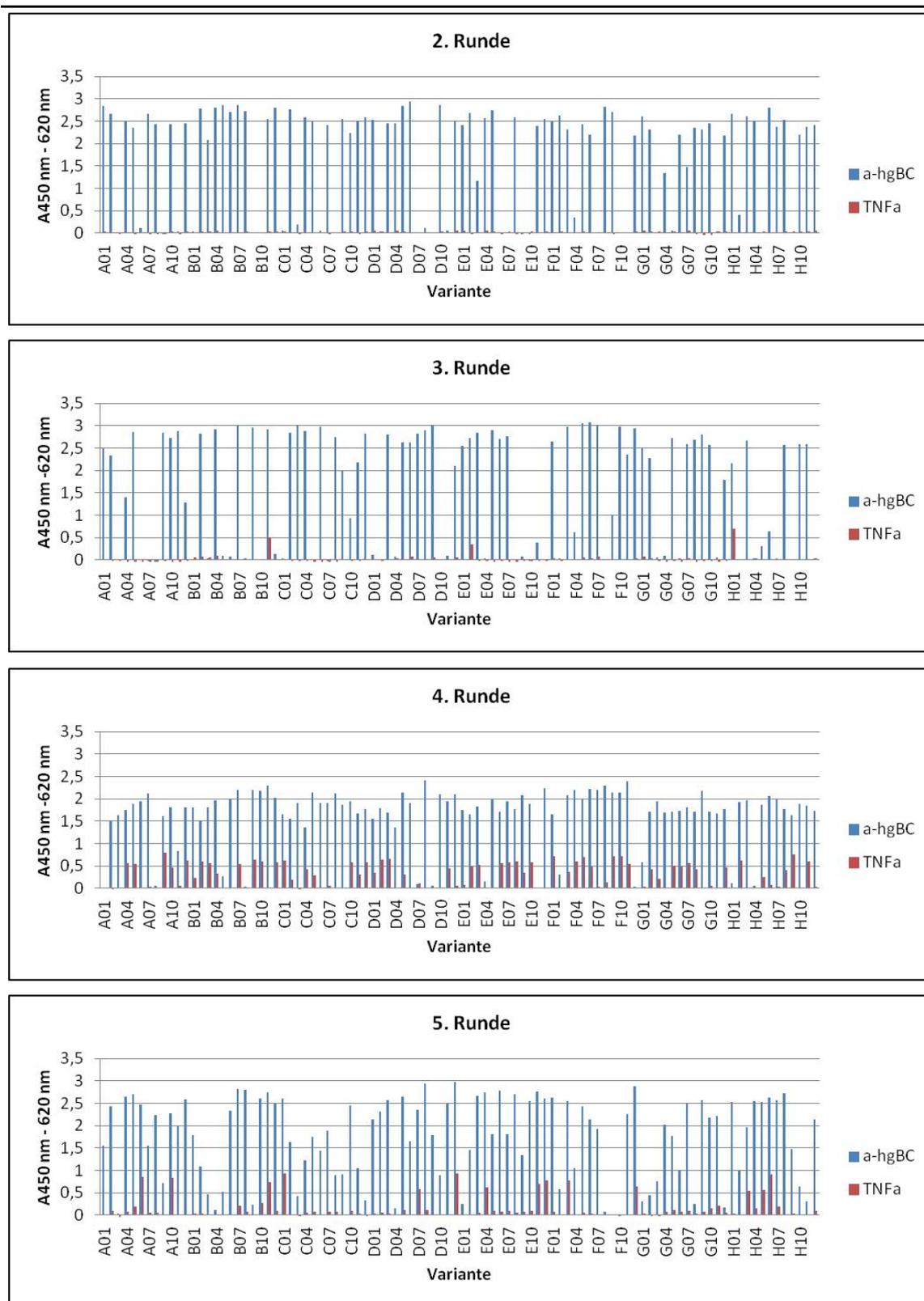
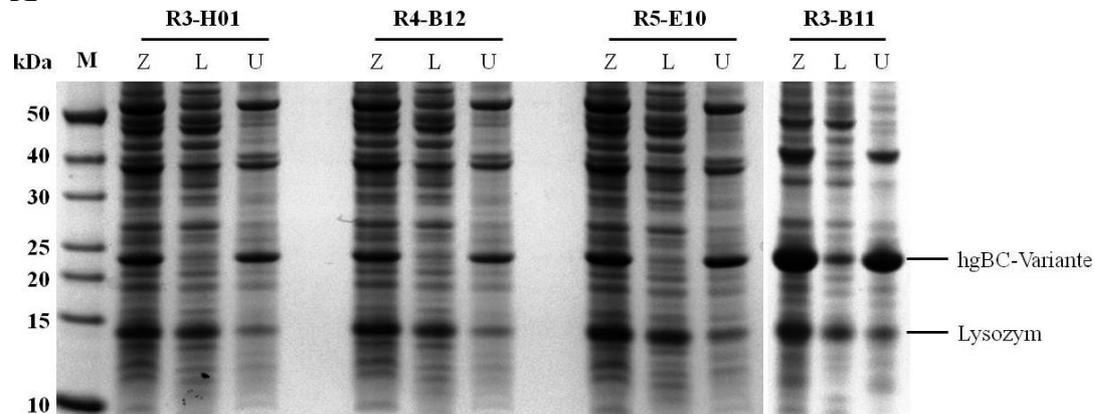


Abb. 16: Einzelphagen-ELISA putativer TNF α -Binder. Aus jeder Selektionsrunde wurden 96 zufällige bakterielle Klone kultiviert, die durch sie exprimierten Phagen präpariert und diese mit Sigma Blocker versetzt im ELISA verwendet. 500 ng pro Kavität gereinigtes TNF α bzw. anti-hgBC-Antikörper (a-hgBC) wurden über Nacht auf MTPs (Medisorp, Nunc) immobilisiert und die entsprechenden Phagensuspensionen am Folgetag hinzugefügt. Der Nachweis der Interaktion erfolgte mit Peroxidase-konjugiertem anti-pVIII-Antikörper (1:5000 verdünnt). Alle Signale über 0,15 wurden als putative TNF α -Binder definiert (rote Balken). Sämtliche Werte wurden um die Hintergrundbindung des Antikörpers an die nur mit Zielproteinen beschichtete Platte korrigiert.

Wie aus den Daten des Einzelphagen-ELISA ersichtlich wird, konnten ab der dritten Selektionsrunde putative TNF α -Binder detektiert werden – 5 % der untersuchten Varianten zeigten hier Bindungssignal gegen TNF α .

A



B

rand. Pos. / Variante	Ser41	Met43	Gln54	Phe56	Arg58	Ser79	Ile81	Ser135	Ile137	Gln148	Leu150	Arg152	Val174	Häufigkeit [%]
R3-B11	Leu	Ile	Arg	Leu	Trp	His	Trp	Arg	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ala	12
R4-B12	Leu	Leu	Ala	Met	Trp	His	Trp	Trp	Trp	Ser	Thr	Gly	Asp	79
R4-C02	Leu	Met	Pro	Leu	Trp	His	Trp	Arg	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ala	3
R4-C05	Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	His	Trp	Trp	Trp	Ser	Thr	Leu	Asp	1,5
R4-G03	Asn	His	Ser	Trp	Pro	Tyr	Ser	Met	Gly	Asn	Thr	Gln	Val	1,5
R5-E10	Leu	Ile	Pro	Pro	Tyr	His	His	Trp	Trp	His	Gln	Gln	Tyr	1,5
R5-H03	Glu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Ile	Val	Trp	Ser	Lys	Tyr	Leu	Val	1,5

Abb. 17: Analyse ausgewählter TNF α -binder hgBC-Varianten. **A:** SDS-PAGE-Analyse des Zelllysates (Z), der löslichen (L) sowie unlöslichen (U) Fraktion aus Nova Blue (DE3)-Expressionen im Kulturröhrchen (5 ml; vgl. 5.13.4). Es wurden je 10 μ l Probe auf NuPAGE-Gradientengele (16-20 %) aufgetragen und die Proteine nach erfolgter SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung visualisiert. Die mittlere Laufhöhe der Varianten beträgt etwa 23 kDa. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder. **B:** Aminosäureverteilung an den randomisierten Positionen der nach Selektion gegen TNF α erhaltenen hgBC-Varianten mit ihren ermittelten Häufigkeiten innerhalb der Stichprobe. Hydrophobe Aminosäuren sind gelb, positiv geladene rot, negativ geladene blau, aromatische grün und polare Aminosäuren violett hinterlegt. rand. Pos. = randomisierte Position

Ihre Zahl stieg nach Runde vier stark an (62 % putative Binder), um sich letztlich in der fünften Runde auf 26 % putative Binder zu vermindern (vgl. Abb. 16). Für die erste Runde

und die naïve Bibliothek zeigte sich ein ähnliches Bild wie für Runde zwei, es konnten keine Binder in den jeweiligen Stichproben detektiert werden (nicht gezeigte Daten). Über die Verwendung des anti-hgBC-Antikörpers konnte im Gegenzug die Präsentation der Varianten auf den Phagen verfolgt werden. Demzufolge präsentierten alle ermittelten putativen Binder die hgBC-Proteinsequenz (vgl. Abb. 16). Die anschließende Sequenzierung von 81 putativen TNF α -Bindern zeigte die Anreicherung von sieben unterschiedlichen Sequenzen (vgl. Abb. 17B). Um auszuschließen, dass die *target*-Bindung aus der Fusion von Variante und Phagenprotein pIII resultiert (vgl. 1.3), wurden alle Varianten in den Expressionsvektor pETSoSc1.2T7lac kloniert (vgl. 5.7 Tab. 18) und im 5 ml-Maßstab in Nova Blue (DE3) und BL21 (DE3) exprimiert. Der Großteil der Varianten wurde jedoch aufgrund schlechter Löslichkeit nicht weiter verwendet. Lediglich die Variante R3-B11, deren Sequenz in der Testmenge insgesamt acht Mal auftrat (zwei Mal in Runde drei und sechs Mal in Runde vier), wurde für eine nähere Charakterisierung herangezogen (vgl. Abb. 17A).

2.3 Charakterisierung der TNF α -bindenden Variante R3-B11

Nachdem die hgBC-Volllängen-Bibliothek den Selektionsprozess bezüglich Bindung der Zielstruktur humanes TNF α durchlaufen hatte, galt es nun die einzig verbliebene und geeignete Variante hinsichtlich ihrer Eigenschaften näher zu untersuchen. Da von dieser Variante acht auf Aminosäureebene identische Klone existierten (vgl. 2.2.5) wurde sich willkürlich für den Klon R3-B11 entschieden. Die Wechselwirkung zwischen beiden Interaktoren mit der dazugehörigen Stöchiometrie - funktionales TNF α liegt als Homotrimer vor, so dass bis zu drei identische Epitope gebunden werden können - als auch Struktur und Stabilität der selektierten hgBC-Variante standen im Fokus der nachfolgenden Analysen.

2.3.1 Expression und Reinigung im Schüttelkolben

Für die eingehende Charakterisierung der gegen TNF α selektierten Variante R3-B11 musste diese in größerem Maßstab exprimiert und anschließend in zwei Schritten gereinigt werden (vgl. 5.13.4 und 5.15.2). Dafür wurde die schon im Expressionsvektor pETSoSc1.2T7lac und im Stamm Nova Blue (DE3) befindliche Variante in Autoinduktionsmedium ZYM-5052 enthaltenden Schüttelkolben bei 37 °C über Nacht kultiviert. Obwohl in diesem Stammhintergrund eine Mischung aus sfGFP-fusionierter und nicht fusionierter Variante hergestellt wird (vgl. 1.2 und 2.2.2) wurde sich für diesen entschieden, da die Expression in BL21 (DE3) (ausschließlich native Variante exprimiert) keinen löslichen Proteinanteil hervorbrachte. Die optischen Dichten der Kulturen lagen zwischen 9 und 10 (A_{600nm}), was

einer Biofeuchtmasse von etwa 14 g/l Kulturvolumen entsprach. Der aus den Zellpellets gewonnene Zellrohextrakt wurde im ersten Schritt über eine 5 ml-HisTrap HP-Säule an einer ÄKTExpress aufgeklärt und die Elutionsfraktionen im Anschluss auf eine Gelfiltrationssäule überführt. Im entsprechenden Chromatogramm traten zwei Hauptpeaks auf (vgl. Abb. 18A). Der erste bei 68 ml (G), dieser entsprach der sfGFP-fusionierten Variante, und der zweite bei 85 ml (R), korrespondierend zur nicht fusionierten Variante. Anhand des Elutionsvolumens konnte eine apparente Molekülmasse für die nicht fusionierte Variante von 9,9 kDa bestimmt werden. Dieser Wert divergierte stark von der theoretisch ermittelten Molekülmasse von 22,7 kDa; es reflektierte eher das Laufverhalten der Einzeldomäne (~12 kDa). Dieses ungewöhnliche Laufverhalten konnte allerdings auch für den Wildtyp des hgBC beobachtet werden (vgl. Abb. 18A). Seine apparente Molekülmasse betrug 13,5 kDa, der theoretische Wert liegt hingegen bei 22,6 kDa.

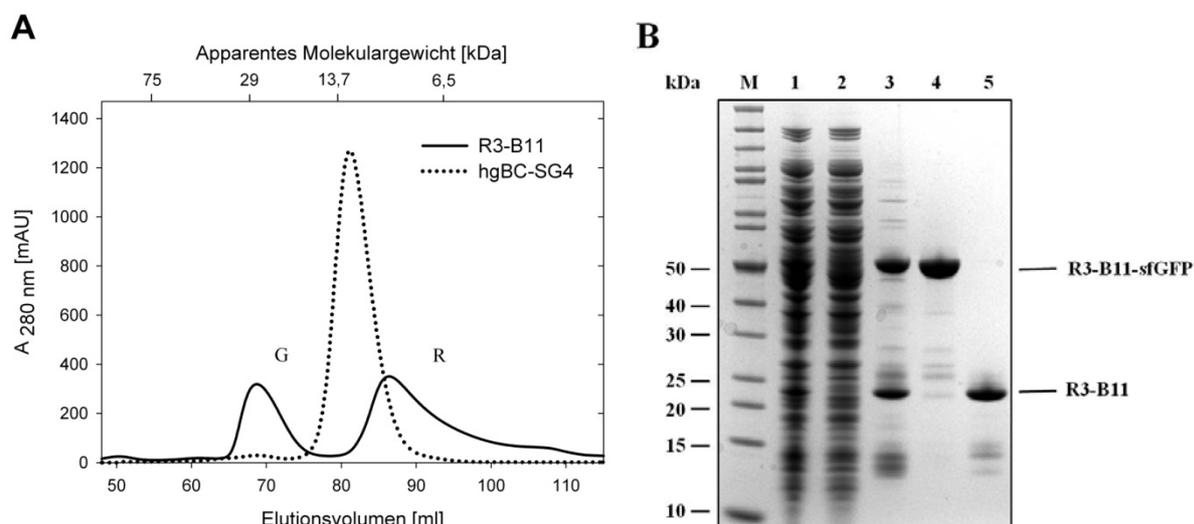


Abb. 18: Chromatographische Reinigung der hgBC-Variante R3-B11. Nach Expression und Zellaufschluss erfolgte die Reinigung der His6-markierten Proteine über IMAC und Größenausschlusschromatographie. **A:** Größenausschlusschromatographie von R3-B11 und des Wildtyps (hgBC-SG4) über eine *HiLoad 16/60 Superdex 75* pg-Säule mit PBS (pH 7,4) als Laufpuffer. Die Säule wurde zuvor mit Standardproteinen (GE Healthcare) kalibriert. Alle Läufe erfolgten bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1 ml/min. **B:** Analyse der einzelnen Schritte der R3-B11-Reinigung mittels SDS-PAGE. Es wurden je 5 µl (1, 4, 5) bzw. 10 µl Probe (2, 3) auf NuPAGE-Gradientengele (16-20 %) aufgetragen und die Proteine nach dem Lauf mittels Coomassiefärbung visualisiert. Die mittlere Laufhöhe der nicht fusionierten Variante beträgt etwa 23 kDa (R), die der fusionierten ca. 50 kDa (G). M: Page Ruler Unstained Protein Ladder; 1: lösliches Zelllysate; 2: Durchfluss der IMAC; 3: Waschfraktion der IMAC; 4: Elutionsfraktion der Größenausschlusschromatographie bei 68 ml; 5: Elutionsfraktion der Größenausschlusschromatographie bei 85 ml.

Auffällig war zudem das starke *tailing* von R3-B11, das scheinbar durch Abbauprodukte des Proteins hervorgerufen wird (vgl. Abb. 18A und 18B). Bei dem den beiden Hauptpeaks vorgelagerten kleineren *peak*, bei etwa 50 ml, handelt es sich vermutlich um Multimere oder

Aggregate. Der Wildtyp hgBC-SG4 zeigte hingegen einen symmetrischen *peak* mit einem möglichen Dimer- oder Aggregat-*peak* bei ca. 69 ml. Das Protein R3-B11 konnte am Ende mit einer Reinheit von etwa 80 % (vgl. Abb. 18B) und Ausbeuten von 5-6 mg/l Kulturvolumen (0,36-0,43 mg/g Biofeuchtmasse) hergestellt werden. Für den Wildtyp betrug diese dagegen etwa 50 mg/l Kulturvolumen (4,35 mg/g Biofeuchtmasse), verbunden mit einer ca. 90%igen Reinheit des Proteins (Daten nicht gezeigt). Nachdem nun die Variante in ausreichenden Mengen produziert wurde, galt es als erstes festzustellen ob sie strukturiert vorlag und wie die eingebrachten Aminosäureaustausche die Stabilität des Proteins beeinflussten.

2.3.2 Struktur und Stabilität von R3-B11

Um erste Aussagen über die Sekundärstruktur der Variante machen zu können, wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen (vgl. 5.15.10). Die CD-Spektren des nativen Zustandes der gegen TNF α selektierten Variante R3-B11 wiesen auf eine ausgeprägte Sekundärstruktur hin (vgl. Abb. 19). Im Vergleich zum Gerüstprotein hgBC-SG4 zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in Form und Intensität der Spektren. In der Form der beiden Wildtyp-Spektren (hgBC und hgBC-SG4) fanden sich mehr Übereinstimmungen als zur Variante, allerdings unterschieden sich auch hier die Intensitäten. Sie zeigten beide ein lokales Minimum bei 217 nm, was typisch ist für Proteine mit überwiegendem β -Faltblattanteil (Brahms und Brahms, 1980), wohingegen bei R3-B11 ein breites Minimum zwischen 205 und 220 nm zu finden ist. Womöglich ist dies mit den unterschiedlichen Beiträgen von Aromaten und den substituierten Aminosäuren an sich zu erklären (vgl. Abb. 17B; Woody und Dunker, 1996; Vuilleumier *et al.*, 1993). Die charakteristische Schulter bei 208 nm trat bei R3-B11 nicht mehr in Erscheinung (Mandal *et al.*, 1985).

Um Sekundärstrukturanteile anhand der Spektren bestimmen zu können, wurde der CONTINLL-Algorithmus herangezogen (Provencher und Gloeckner, 1981), wobei Cryst175 als Kristallin-Referenzdatenbank diente (Evans *et al.*, 2007). Für den ursprünglichen Wildtyp (hgBC) lag der β -Faltblattanteil, laut Berechnungen, bei ca. 59 %, 18 % konnten α -helikalen Strukturen und 13 % keiner der definierten Strukturen zugeordnet werden (vgl. Tab. 6). Der modifizierte Wildtyp (hgBC-SG4) zeigte im Vergleich dazu einen verminderten Anteil an β -Faltblattstrukturen, im Gegenzug allerdings einen höheren Anteil an ungeordneten Bereichen. Bei der Variante R3-B11 nahm der Anteil an β -Strukturen um 35 % gegenüber dem hgBC ab, der Anteil an ungeordneten Strukturen hatte sich hingegen mehr als verdoppelt (> 67 %

Zunahme). Der Anteil an α -helikalen Strukturbereichen ist in der Variante ebenfalls deutlich vermindert (ca. 20 % Abnahme im Vergleich zu hgBC).

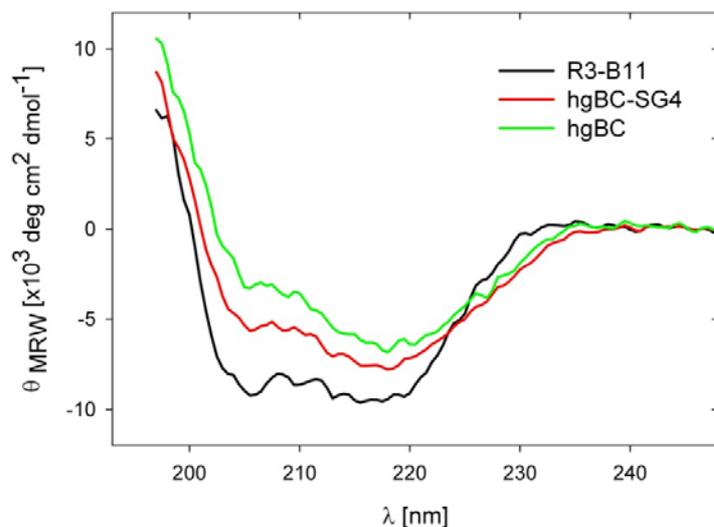


Abb. 19: Fern-UV-CD-Spektrum der selektierten Variante. Die Messungen wurden in 10 mM KH_2PO_4 (pH 7,4) mit Proteinkonzentrationen von jeweils 5 μM durchgeführt und die Spektren in 1 mm-Quarzglasküvetten bei 20 °C aufgenommen. Dargestellt sind Spektren der nativen TNF α -bindenden Variante R3-B11 und der dazugehörigen nativen Gerüstproteine hgBC-SG4 (Wildtyp zu R3-B11) und hgBC (Wildtyp zu hgBC-SG4).

Die spektralen Eigenschaften von R3-B11 zeigten, dass mit der Mutation von 13 Aminosäureresten in der ehemaligen Interdomänen-Kontaktfläche des Proteins größere strukturelle Veränderungen einhergingen, der globale β -Faltblattcharakter des Moleküls (38 % β -Faltblattstrukturen) dennoch weitestgehend erhalten blieb.

Tab. 6: Sekundärstrukturanteile in den untersuchten Proteinen nach Auswertung durch CONTINLL: $f(\alpha)$ - α -helikaler Anteil; $f(\beta)$ - Anteil an β -Faltblattstrukturen; $f(t)$ – Anteil an β -turn Strukturen; $f(u)$ – Anteil ungeordneter Strukturen.

Variante	$f(\alpha)$	$f(\beta)$	$f(t)$	$f(u)$
hgBC	0,179	0,585	0,107	0,128
hgBC-SG4	0,175	0,529	0,099	0,196
R3-B11	0,144	0,381	0,082	0,393

Ein Grund für die Auswahl alternativer Gerüstproteine zur Erstellung von Bibliotheken ist u.a. ihre hohe intrinsische Stabilität, die ihre Destabilisierung im Zuge einzuführender Mutationen minimieren soll. Nachdem eine strukturierte Variante mit hohem β -Faltblattanteil vorlag, sollte nun deren thermische Stabilität mit einer einfachen, effektiven Methode bestimmt werden. Dies geschah, wie schon zuvor für die Varianten der Einzeldomänen-Bibliotheken (vgl. 2.1.3), unter Zuhilfenahme der *differential scanning fluorimetry* (DSF).

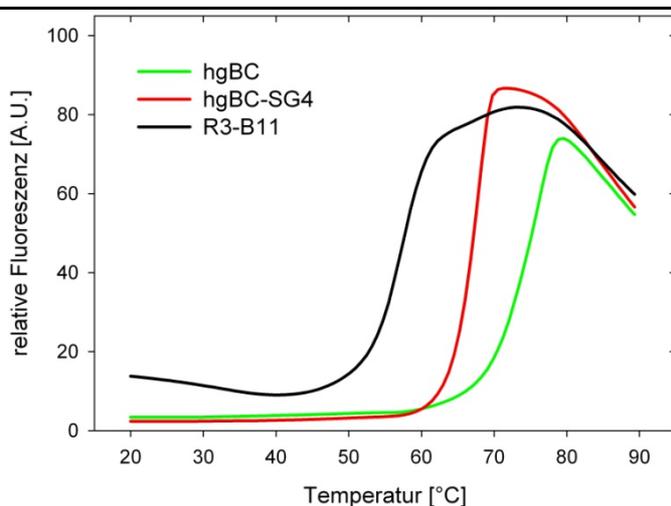


Abb. 20: Temperaturinduzierte Entfaltung von R3-B11. Die thermische Stabilität der Variante wurde über DSF (vgl. 5.15.9) im Vergleich zum dazugehörigen Wildtyp (hgBC-SG4) und zum ursprünglichen humanen γ B-Kristallin (hgBC) in einem Temperaturbereich von 20 °C-90 °C bestimmt. Alle Messungen erfolgten in PBS (pH 7,4) mit je 15 μ g gereinigtem Protein und wurden im *Lightcycler 480* (Roche) aufgenommen (Fluoreszenzanregung: 465 nm; Fluoreszenzemission: 585 nm; Heizrate: 1K / min). Die dargestellten Graphen resultieren aus den Mittelwerten einer

Dreifachmessung, sind pufferkorrigiert und wurden mittels eines *Matlab*-basierten Programmes ausgewertet (Schneider, 2009).

Im Laufe der Entfaltung nahm die relative Fluoreszenzintensität zu. Die hieraus ermittelten apparenten Schmelztemperaturen für die drei untersuchten Proteine lagen bei $74,8 \pm 0,3$ °C (hgBC), $66,0 \pm 0,1$ °C (hgBC-SG4) und $57,3 \pm 0,02$ °C (R3-B11) und zeigten deutlich, dass die Variante R3-B11 trotz ihrer 13 mutierten Reste noch immer eine hohe Stabilität aufwies (vgl. Abb. 20). Allein die Verlängerung des *linker*-Peptids im hgBC-SG4 um fünf Aminosäuren destabilisiert das Protein schon um 9 K, da hier scheinbar die Interaktion zwischen beiden Domänen fehlt, bzw. verringert ist, um das Protein weiter zu stabilisieren. Die höhere Anfangsfluoreszenz von R3-B11 im Vergleich zu den beiden Wildtypen spricht für einen höheren Anteil lösungsmittelzugänglicher hydrophober Reste.

2.3.3 Interaktion von R3-B11 mit humanem TNF α

Da die im Phagen-*display* gegen TNF α selektierte Variante löslich exprimiert werden konnte, zudem gefaltet vorlag und eine immer noch hohe thermische Stabilität aufwies, sollte nun die Interaktion mit dem Zielprotein, unter den Aspekten der Bindungsspezifität und Affinität zum Zielmolekül, eingehender betrachtet werden. Als Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen humanem TNF α und der hgBC-Variante R3-B11 diente der ELISA (vgl. 5.15.6), wobei die Bindung an TNF α und verschiedene Kontrollproteine untersucht wurde. Lediglich humanes TNF α und TNF α der Maus, mit 78 % Sequenzidentität zum humanen Pendant, wurden durch die Variante R3-B11 spezifisch erkannt (vgl. Abb. 21A). Die beiden humanen Vertreter der TNF-Superfamilie, Lymphotoxin α und BAFF, mit 33 % respektive 19 % Sequenzidentität (Hoffmann, 2012), wurden hingegen nicht erkannt. Auch gegen die restlichen nicht verwandten Kontrollproteine konnte kein signifikantes Bindungssignal detektiert werden.

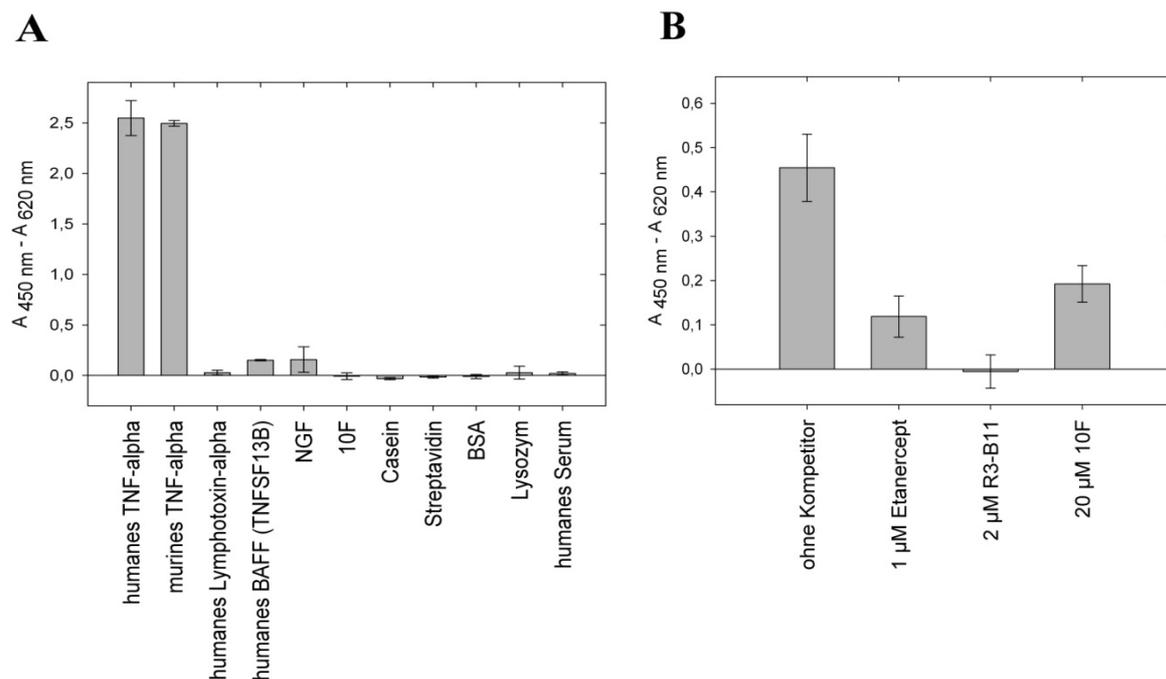


Abb. 21: Ermittlung der Bindungsspezifität der Variante R3-B11 über ELISA.

A: Erkennung verschiedener Zielproteine durch R3-B11. Je Kavität einer MTP (Medisorp, Nunc) wurden 500 ng der entsprechenden Proteine über Nacht bei 4 °C immobilisiert: humanes TNF α , verschiedene Vertreter der TNF-Superfamilie (murines TNF α , humanes Lymphotoxin α , humanes BAFF), nicht verwandte Proteine (NGF: Nervenwachstumsfaktor, 10F, Casein, Streptavidin, BSA, Lysozym) und humanes Serum (1:10 verdünnt). Die immobilisierten Zielproteine wurden mit je 1 μ M R3-B11 für 2h inkubiert und die Interaktion über Peroxidase-konjugierten anti-hgBC Antikörper (1:2000 verdünnt) nachgewiesen. Alle Werte wurden um die Hintergrundbindung des Antikörpers an die nur mit Zielproteinen beschichtete Platte korrigiert. **B:** Konkurrenz der Bindung zwischen TNF α und R3-B11. 70 nM biotinyliertes TNF α (trimerbezogen) wurde für 1 h mit bzw. ohne Kompetitor in PBS / 1mM EDTA / 0,05 % Tween-20 (pH7,4) vorinkubiert und anschließend zu 53 ng je Kavität immobilisiertem R3-B11 gegeben (Inkubationszeit: 10 min). Die Detektion der Interaktion erfolgte über Avidin-Peroxidase-Konjugat (1:2000 verdünnt). Alle Werte wurden um die Hintergrundbindung des Konjugates an die nur mit Zielproteinen beschichtete Platte korrigiert.

Eine weitere Methode die Spezifität der Bindung zu ermitteln ist eine gezielte Inhibition der Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen durch bekannte Interaktionspartner. Im ELISA wurde hierfür die Bindung von biotinyliertem TNF α an immobilisiertes R3-B11 in An- und Abwesenheit löslicher Kompetitoren untersucht (vgl. Abb. 21B). Etanercept (Fusion aus TNF-Rezeptor 2 und IgG-F_c-Teil), 10F (TNF α -bindende Ubiquitin-Variante; Hoffmann, 2012), sowie R3-B11 selbst konnten die Interaktion vermindern.

Die quantitative Analyse der Bindung erfolgte über einen konzentrationsabhängigen ELISA, in dem unterschiedliche Konzentrationen an R3-B11 mit immobilisiertem TNF α inkubiert wurden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte ein K_D von $9,5 \pm 0,49$ nM ermittelt werden (vgl. Abb. 22).

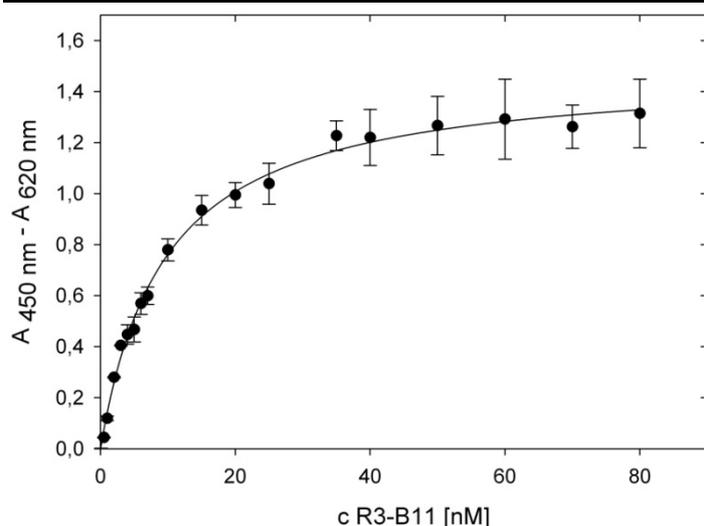


Abb. 22: Ermittlung der Affinität zwischen R3-B11 und TNF α . Verschiedene Konzentrationen an hgBC-Variante R3-B11 befindlich in PBS / 1mM EDTA / 0,05 % Tween-20 (pH 7,4) wurden zu 150 ng je Kavität immobilisiertem TNF α gegeben und für 1h inkubiert. Nachweisantikörper war Peroxidase-konjugierter anti-hgBC (1:2000 verdünnt). Alle Werte wurden um die Hintergrundbindung des Antikörpers korrigiert.

2.3.4 Qualitativer Nachweis des Komplexes aus R3-B11 und TNF α

Vorhergehende Studien konnten zeigen, dass die Komplexdynamik des TNF α -Trimers durch verschiedene Substanzen beeinflusst werden kann (Corti *et al.* 1992; Alzani *et al.* 1993; Alzani *et al.* 1995). In unserem Labor konnte bereits ein Ubiquitin-basierter TNF α -Binder mit Tween-20-abhängiger Bindungskinetik isoliert werden (Hoffmann, 2012). Daher sollte auch an dieser Stelle der Einfluss von Tween-20 auf die Bindungskinetik des Komplexes aus hgBC-Variante und TNF α mit Hilfe der analytischen Größenausschlusschromatographie überprüft werden. Hierfür wurden sowohl die Einzelspezies, TNF α und R3-B11, als auch ein entsprechendes Gemisch beider Proteine über eine Superose 12 10/300 GL-Säule aufgetrennt (vgl. 5.15.4).

Nach einstündiger Inkubation in Anwesenheit von Tween-20 waren für das Gemisch zwei separate *peaks* zu beobachten, wobei der mit dem geringeren Elutionsvolumen dem Komplex zuzuordnen ist (vgl. Abb. 23A). Zu diesem Zeitpunkt und unter den eingesetzten Konzentrationsverhältnissen erfolgte keine vollständige Koelution von R3-B11 und TNF α , wie auf der SDS-PAGE noch einmal deutlich wird (vgl. Abb. 23B). Wird das Konzentrationsverhältnis allerdings zu Gunsten von TNF α verschoben so nimmt die Peakfläche von R3-B11 mit steigender TNF α -Konzentration ab, die des Komplexpeaks somit zu (nicht gezeigte Daten). Ohne Tween-20 im Laufpuffer konnte zum gleichen Zeitpunkt (1h) keine Komplexbildung nachgewiesen werden (nicht gezeigte Daten). Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt jedoch auch hier die Peakfläche der Variante merklich ab (vgl. Abb. 23C/D). Die densitometrische Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE ergab eine Halbwertszeit von $26 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$ für die Komplexbildung in Abwesenheit und von lediglich $1,7 \text{ h} \pm 0,6 \text{ h}$ in Anwesenheit von Tween-20 (vgl. Anhang Abb. A3).

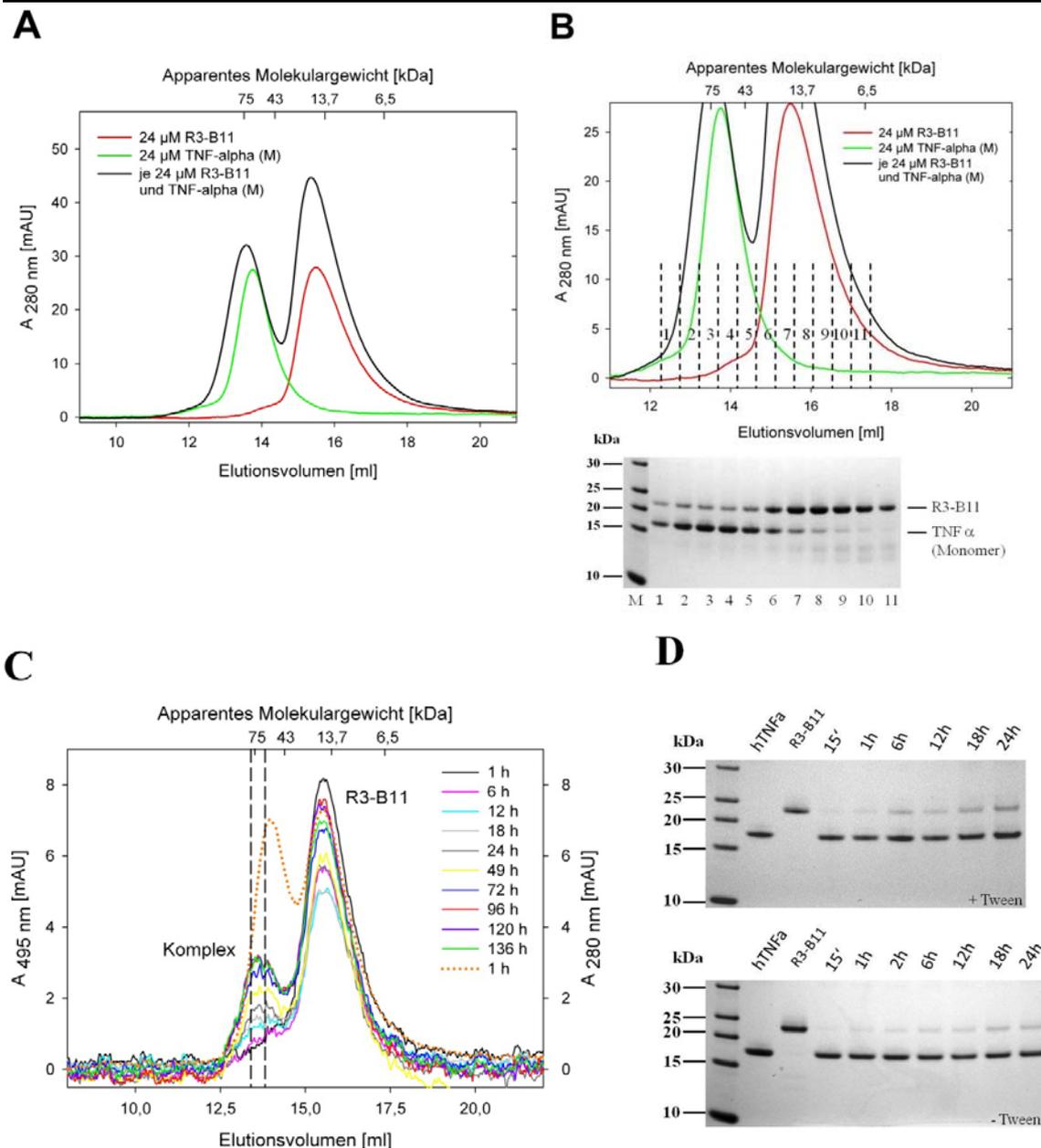


Abb. 23: Analyse der Komplexbildung von TNF α und R3-B11 über analytische Gelfiltration. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 0,6 ml / min über eine Superose 12 10/300 GL-Säule gegeben. Als Laufpuffer diente PBS / 1 mM EDTA (pH 7,4) mit bzw. ohne 0,05 % Tween-20. **A:** SEC in Anwesenheit des Detergens Tween-20. Je 24 μ M R3-B11 bzw. TNF α (bezogen auf Monomer), oder ein Gemisch aus beiden, wurden vor der Chromatographie für 1 h bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Freies und Komplex-gebundenes TNF α unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Elutionsvolumina. **B:** Vergrößerung des Elutionsprofils aus A mit eingezeichneten Fraktionen (1-11) die auf die SDS-PAGE (unten) aufgetragenen wurden. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder. **C:** SEC ohne Tween-20. Ein äquimolares Gemisch (13 μ M) aus TNF α (bezogen auf Trimer) und Fluorescein-markiertem R3-B11 wurde bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert und Aliquote hiervon zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dabei wurde die Absorption der Fluorescein-markierten Variante bei 495 nm verfolgt (geschlossene Linien). Um das Laufverhalten des Komplexes zu verdeutlichen ist beispielhaft eine Messung bei 280 nm dargestellt (gepunktete orange Linie). Es ist eine zeitabhängige Zunahme der R3-B11-Peakfläche innerhalb des Komplexpeaks zu verzeichnen. Die durch gestrichelte Linien eingegrenzte Fraktion (bei ca. 13,5 ml) kennzeichnet die jeweilige Probe für die SDS-PAGE. Freies Fluorescein bindet nicht an TNF α (Hoffmann, 2012). **D:** Zeitabhängiger Verlauf der Komplexassoziation in An- und Abwesenheit von 0,05 % Tween-20. Die markierte Fraktion aus C wurde für verschiedene Zeitpunkte per SDS-PAGE (4-12 % Gradientengele) analysiert und die Proteine über Coomassiefärbung visualisiert. M: Page Ruler Unstained Protein Ladder.

Die auch nach verlängerter Inkubationszeit immer noch nicht vollständige Koelution beider Proteine impliziert, unter Berufung auf den mittels ELISA bestimmten K_D -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (vgl. 2.3.3), dass scheinbar nicht das Trimer gebunden wird sondern eher das Monomer. Dies sollte anhand der Bestimmung des apparenten Molekulargewichts des Komplexes über analytische Ultrazentrifugation überprüft werden (vgl. 5.15.7). Um die Assoziation von R3-B11 mit TNF α optisch verfolgen zu können wurde die Variante N-terminal mit Fluorescein modifiziert (vgl. 5.15.5). Der Fluoreszenzfarbstoff kann bei 490 nm detektiert werden, einer Wellenlänge bei der das freie, ungebundene TNF α nicht absorbiert. Es wurden Gleichgewichtssedimentationsläufe mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF α durchgeführt, wobei für die Variante allein eine Molekularmasse von 25 kDa, was für eine monomere Form spricht, und für den Komplex von 45 kDa berechnet werden konnte (vgl. Abb. 24).

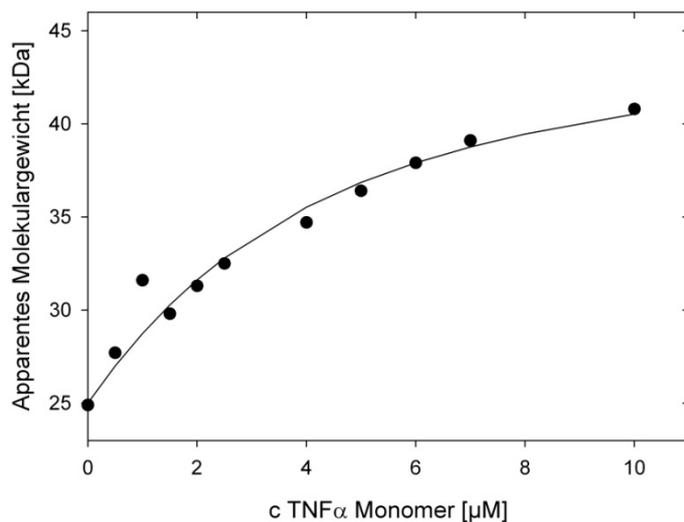


Abb. 24: Bestimmung des Molekulargewichts des Komplexes aus TNF α und Fluorescein-R3-B11 über Gleichgewichtssedimentation. 2 μ M Fluorescein-markiertes R3-B11 wurde mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α in PBS / 1 mM EDTA / 0,05 % Tween-20 (pH 7,4) gemischt und für 24 h bei 4 $^{\circ}$ C vorinkubiert. Die Grafik zeigt die Molekulargewichtsverteilung nach 86 h Zentrifugation bei 10000 rpm / 20 $^{\circ}$ C.

Die ermittelten Daten sind gut mit den theoretischen Werten, 23 kDa für Fluorescein-markiertes R3-B11 und 41 kDa für den R3-B11-TNF α -Monomer-Komplex, in Einklang zu bringen. Abweichungen resultieren aus der Genauigkeit der Methode. Die Messdaten sprechen demnach für ein 1:1 Verhältnis auf Monomerebene. Während der Messzeit von insgesamt 86 h hatte sich jedoch noch kein vollständiges Sedimentationsgleichgewicht zwischen den Interaktionspartnern eingestellt (vgl. Abb. 24).

2.3.5 Fluoreszenzkinetische Untersuchung der TNF α -Trimerdissoziation

Der durch analytische Ultrazentrifugation bestimmte Komplex aus R3-B11 und TNF α -Monomer sollte mit einem fluoreszenzkinetischen Experiment noch einmal überprüft werden. Im Zuge ihrer Forschung haben He *et al.* (2005) einen TNF α -Inhibitor identifiziert der durch

Bindung der Kontaktflächen zwischen den monomeren Untereinheiten zur Dissoziation des Trimers und schlussendlich Inhibierung der TNF α -Funktion *in vivo* führt. Die dissoziationsfördernde Wirkung dieses kleinen Moleküls wurde dabei u.a. durch Fluoreszenz-Homoquenching nachgewiesen (vgl. 5.15.11). Nach dem gleichen Prinzip sollte auch R3-B11 bezüglich seines Verhaltens gegenüber dem TNF α -Trimer untersucht werden. Grundlegend für das Experiment ist dabei die Selbstausschöpfung der Fluoreszenz im TNF α -Trimer bei Verwendung N-terminal Fluorescein-markierter Untereinheiten (5.15.5). Die Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem TNF α resultiert im Austausch der Untereinheiten und somit Vergrößerung des Abstandes der Fluorophore zueinander, was wiederum zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Folglich sollten Substanzen die den Trimer-Zustand binden und stabilisieren den Monomeraustausch verlangsamen, destabilisierende Substanzen, die das Monomer binden, hingegen den gegenteiligen Effekt zeigen. Etanercept, ein TNF α -Binder der primär den trimeren Zustand des Proteins erkennt, blockierte nahezu vollständig den Austausch von Untereinheiten (vgl. Abb. 25). Die Variante R3-B11 führte hingegen zu einem Anstieg der Fluoreszenz und somit zur Erhöhung der Monomeraustauschrates. Sie offenbarte damit ihren dissoziations-fördernden Charakter. Ein ähnliches Verhalten konnte bereits für ein kleines, TNF α inhibierendes Molekül von He und Mitarbeitern nachgewiesen werden. Das als Kontrolle mitgeführte Wildtyp-Protein hgBC-SG4 zeigte keinen erkennbaren Effekt auf die TNF α -Monomerdynamik.

Ziel der Arbeit war es ausgehend vom *scaffold* hgBC TNF α -bindende Proteinvarianten zu isolieren. Zunächst sollte lediglich für die C-terminale Domäne des hgBC (C-hgBC) eine Varianten-Bibliothek erstellt werden, um daraus niedrigaffine Bindeproteine zu selektieren. Die anschließende Kombination mit N-hgBC-basierten Bibliotheken sollte in weiteren Selektionsrunden zum Erhalt hochaffiner Binder führen. Die Einzeldomäne erwies sich allerdings im Laufe der Analysen als ungeeignet für dieses Vorhaben (geringe Funktionalität und Löslichkeit der Varianten), daher sollte infolge das Volllängen-hgBC als neues *scaffold* dienen. Im Gegensatz zur C-hgBC konnte hiermit eine hoch funktionale Bibliothek etabliert werden (96,6 % auf Proteinebene), die in der nachfolgenden Selektion gegen TNF α zur Anreicherung von putativen Bindern führte. Aus der entsprechenden Phagenbibliothek konnte letztlich die stabile und strukturierte Proteinvariante R3-B11 isoliert werden. Weiterführende Analysen ergaben eine hochspezifische Wechselwirkung zwischen der Variante und TNF α mit einer Dissoziationskonstante im niedrigen nanomolaren Bereich, wobei ein Molekül R3-B11 mit einem TNF α -Monomer interagiert. Das Detergens Tween-20 beschleunigte die Assoziation des Komplexes.

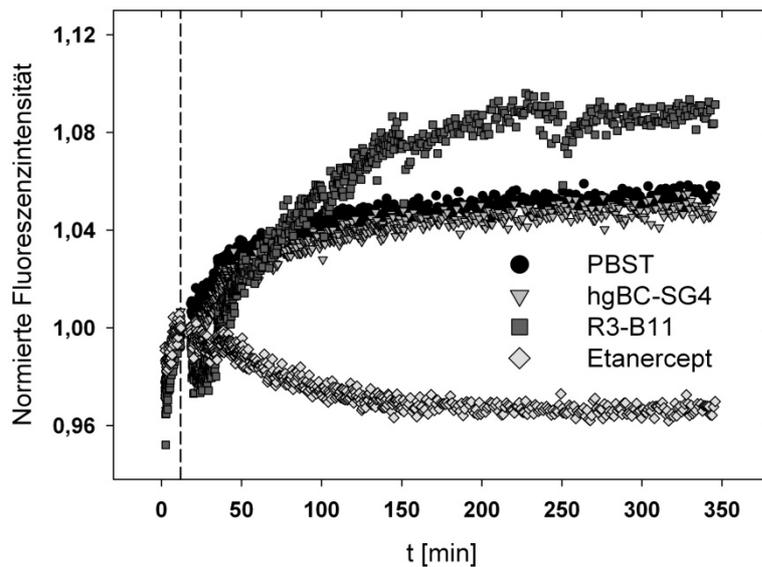


Abb. 25: Einfluss verschiedener Interaktoren auf den Austausch an Monomeren im TNF α . Zur Untersuchung des Monomeraustausches im Homotrimer wurde das Prinzip der Fluoreszenzselbstausschöpfung genutzt. Hierfür wurden 38 nM Fluorescein-markiertes TNF α mit einem 200-fachen Überschuss an nicht markiertem TNF α gemischt und die Änderung der Fluoreszenzintensität zeitlich verfolgt. Zwölf Minuten nach Beginn der Messung (gestrichelte Linie) wurden je 5 μ l R3-B11 (275 μ M), bzw. entsprechender Kontrollen wie PBST, hgBC-SG4 Wildtyp (275 μ M) und Etanercept (71 μ M) zu 150 μ l anfänglichem Probenvolumen gegeben und die Messung fortgesetzt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf den Wert nach Zugabe der Zusätze bei 12 min normiert. Die Messungen erfolgten in PBS / 1mM EDTA / 0,05 % Tween-20 (pH 7,4).

3 Diskussion

Seit der Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler und Milstein, 1975) und der Etablierung bakterieller Expressionssysteme für Antikörperfragmente (Skerra und Plückthun, 1988), haben rekombinante Immunglobuline einen erheblichen Einfluss auf moderne Biopharmazeutika genommen (Fiedler und Skerra, 2007). Mit derzeit 35 für Humantherapien zugelassenen Ig-basierten Medikamenten und insgesamt rund 70 monoklonalen Antikörpern in präklinischen und klinischen Phasen stellen sie dies eindrücklich unter Beweis (Reichert, 2013). Trotz ihrer Erfolgsgeschichte offenbaren sie aufgrund ihrer intrinsischen molekularen Eigenschaften diverse Limitierungen (vgl. Abschnitt 1; Chames *et al.*, 2009). Nicht zuletzt macht die komplexe Patentsituation die Markteinführung neuer Ig-basierter Produkte sehr kostspielig. Die Erkenntnis, dass Immunglobuline ihre biochemische Funktion durch die Kombination eines konservierten Proteingerüsts mit einer räumlich definierten Antigenbindestelle erhalten, wobei letztere hypervariabel in ihrer Aminosäuresequenz und Konformation ist, führte schließlich zur Entwicklung von Ig-unabhängigen *scaffold*-Proteinen mit individuell anpassbarer Ligandenspezifität. Als gezeigt werden konnte, dass diese *scaffolds* so verändert werden können, dass daraus neue Biomoleküle mit Affinitäten und Spezifitäten vergleichbar mit der von Antikörpern entstehen können, wurden zahllose Anstrengungen unternommen diese Moleküle sowohl der biomedizinischen Forschung als auch Humantherapie zugänglich zu machen (Fiedler und Skerra, 2007).

Das für diese Arbeit verwendete *scaffold* ist das eukaryotische Strukturprotein γ B-Kristallin, welches bereits von der Scil Proteins GmbH (Halle / Saale) als Gerüstprotein eingesetzt wurde. Durch Substitution von acht oberflächenexponierten Aminosäuren wurden *de novo* Bindungseigenschaften erzeugt (Ebersbach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). In einem neuen Konzept sollte erstmals die Interdomänen-Kontaktfläche als alternatives Paratop fungieren, d.h. eine natürliche Bindefläche sollte umprogrammiert werden. Die Aminosäurereste die an der natürlichen Interaktion beider Domänen beteiligt sind wurden dabei in das Paratop integriert (vgl. 1.4). Zur Evaluierung der Strategie und Isolierung hochspezifischer Bindemoleküle wurden Proteinbibliotheken für die Einzeldomänen, als auch für das Volllängenprotein, erzeugt und gegen TNF α als therapeutisch relevantes und daher biophysikalisch sehr gut charakterisiertes Zielprotein selektiert. Gleichwohl existiert bereits eine Vielzahl von TNF α -Bindern (vgl. 1.5 Tab. 1) deren Bindungseigenschaften mit einer selektierten hgBC-Variante verglichen werden sollten.

3.1 Qualität der Einzeldomänen-Bibliothek und Selektion gegen TNF α

Hintergrund der Überlegung war es zunächst niedrigaffine Bindeproteine auf Basis der C-hgBC-Einzeldomäne zu isolieren und diese dann später im Zuge einer Affinitätsmaturierung mit einer Bibliothek der Partnerdomäne zu fusionieren und in weiteren Selektionsrunden hochaffine Binder zu gewinnen. In dieser Arbeit sollte innerhalb der hydrophoben Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen des γ B-Kristallins ein neues Bindungsparatop entstehen. Als Startpunkt dienten dabei die an der natürlichen Interaktion beide Domänen beteiligten Aminosäuren (vgl. 2.1.1). Diese Vorgehensweise führte bereits bei unterschiedlichsten *scaffold*-Proteinen zur Isolierung hochaffiner Binder (Nord *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2009; Byla *et al.*, 2010; Hoffman, 2012). Die restlichen für eine zusammenhängende Bindefläche einzubeziehenden Aminosäuren wurden hauptsächlich über *in silico*-Analysen mit der Software PyMOL bestimmt. Zudem wurde sich hinsichtlich Anzahl und Lokalisierung an den positionshomologen Resten des äußeren β -Faltblattes der N-terminalen Domäne orientiert, da diese bereits als Bindefläche evaluiert waren (Ebersbach *et al.*, 2007; Zhang, 2013). Da allerdings nahezu alle für eine Randomisierung im β -Faltblatt in Frage kommenden Lösungsmittel-zugänglichen Aminosäurereste konserviert sind, wurden diese Reste unter dem Risiko eines Struktur- und Stabilitätsverlustes der Domäne randomisiert.

Anhand der getroffenen Positionsauswahl wurde ursprünglich eine C-hgBC-Bibliothek mit den acht randomisierten Aminosäurepositionen S135, I137, Y139, Q148, L150, R152, R172 und V174 mit Hilfe NNK-Motiv enthaltender Oligodesoxynukleotide konstruiert (vgl. 2.1.1 Abb. 7). Da sich dieses Format allerdings als ungeeignet erwies wurden daraufhin fünf verschiedene C-hgBC-Bibliotheken mit vier bis acht Randomisierungspositionen erstellt, um festzustellen wie viel Austausche die Domäne ohne signifikante Einbußen in ihren intrinsischen Eigenschaften (Löslichkeit, Stabilität, Struktur) toleriert (vgl. 2.1.2 Abb. 8). Für die so erstellten fünf Einzelbibliotheken konnten Sequenzfunktionalitäten auf DNA-Ebene zwischen 33 % und 74 % ermittelt werden (vgl. 2.1.2 Tab. 2). Lediglich die Funktionalität der Bibliothek Lib8.1B (74 %) ist mit der anderer zuvor erstellter NNK-Bibliotheken vergleichbar (Hoffmann, 2012; Stordeur, 2013; Zhang, 2013), bei den anderen vier Bibliotheken fielen sie deutlich zu niedrig aus. Ein Grund für die geringen Funktionalitäten lag in der Anhäufung von Nukleotiddeletionen bzw. -insertionen rund um die NNK-Motive begründet. Eine zufällige Verteilung an Punktmutationen über das gesamte Gen hinweg würde eher für einen methodischen Fehler in der PCR-Reaktion, die für die Assemblierung der Bibliotheken

notwendig war, sprechen. Was wiederum im Umkehrschluss bedeutet, dass die Qualität der für die Konstruktion der Bibliotheken eingesetzten Oligodesoxynukleotide nicht optimal war. Bei der Synthese der Desoxyoligonukleotide wird jedes Nukleotid einzeln an eine Matrix gekoppelt und der *primer* so Schritt für Schritt verlängert. Die an den variablen NNK-Positionen verwendeten Nukleotidgemische, in denen jedes einzelne Nukleotid unterschiedliche Kopplungseffizienzen aufweist, können in der Folge zu Deletionen bzw. Insertionen um besagte Positionen führen. Da sich die resultierenden heterogenen Spezies nur geringfügig in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, können fehlerhafte Oligodesoxynukleotide in der nachgeschalteten PAGE-Aufreinigung nur ineffizient aus dem Gemisch entfernt werden. Durch die Kopplung ganzer Trinukleotidbausteine können Einzeldelationen an den Randomisierungspositionen unterbunden (Virnekäs et al., 1994; vgl. 2.2) und die Nukleotidverteilung besser kontrolliert werden (Krumpe et al., 2007).

Im Hinblick auf die zu erwartenden Nukleotidverteilungen wurde nur die Bibliothek Lib8.1B den Erwartungen gerecht, alle anderen Bibliotheken offenbarten teils deutliche Abweichungen (vgl. 2.1.2 Abb. 9). Das spiegelte sich natürlich auch in der Aminosäureverteilung wieder, sie wich ebenfalls von der erwarteten ab. Statistisch betrachtet kam von den fünf untersuchten Bibliotheken nur die Bibliothek Lib8.1A der Idealverteilung auf DNA-Ebene am nächsten, auf Proteinebene war es hingegen die Bibliothek Lib7.1A (vgl. Anhang Tab. A1). Hiermit wird noch einmal der Nachteil der NNK-basierten Mutagenese deutlich: eine Gleichverteilung von Nukleotiden bzw. Aminosäuren ist durch die Verwendung dieser Methode *per se* nicht zu erreichen.

Ein weiterer relevanter Aspekt der sich abzeichnete betraf die Löslichkeit einzelner C-hgBC-Proteinvarianten. Während sich mit steigender Anzahl an randomisierten Positionen die Funktionalität der Bibliotheken nur geringfügig änderte, nahm der Anteil löslicher Proteinvarianten dagegen mit zunehmender Anzahl an Substitutionen signifikant ab. Insbesondere die Bibliotheken Lib7.1A und Lib8.1B verzeichneten einen drastischen Rückgang an löslich exprimierten Varianten (vgl. 2.1.2 Tab. 2 und 2.1.3 Abb. 10). Da die C-hgBC *per se* eine geringere intrinsische Stabilität aufweist als ihr N-terminales Pendant (Rudolph et al., 1990; Mayr et al., 1994; Palme et al., 1997) wird die Struktur (Faltung) und damit letztlich die Löslichkeit der Domäne demnach durch die Zahl an Substitutionen bestimmt. Auf die thermische Stabilität einzelner Varianten nahm die Anzahl mutierter Aminosäuren hingegen nur moderaten Einfluss (vgl. 2.1.3 Abb. 11 und Tab. 3). Die über DSF (vgl. 5.15.9) analysierten löslichen Bibliotheksvertreter wurden zwar allesamt destabilisiert und zeigten verminderte apparente Schmelztemperaturen, jedoch sank der T_m -Wert im Mittel nur um 8 K

im Vergleich zum Wildtyp. Die untersuchten Varianten blieben weiterhin thermostabile Proteine.

Der fünfründige Selektionsprozess gegen das humane regulatorische Zytokin TNF α führte nicht zum gewünschten Erfolg. Weder die *panning*-Runden selbst, noch die zusätzliche Analyse der *outputs* der Runden mittels Einzelphagen-ELISA zeigten eine Anreicherung TNF α -bindender C-hgBC-Varianten (vgl. 2.1.3). Als ursächlich hierfür kann einerseits die geringe Funktionalität der naiven Bibliothek angesehen werden (vgl. 2.1.2), die wiederum den relativen Anteil gewünschter Varianten reduzierte. Die nur zweiprozentige Abdeckung der theoretisch erzielbaren Komplexität der Bibliothek nach finaler Transformation in *E. coli* kam noch als additiver Effekt hinzu und reduzierte diesen Anteil noch weiter (2.1.3). Als Optimierung hierzu kann die Verwendung von vorsynthetisierten Trinukleotidbausteinen in der Oligodesoxynukleotid-Synthese zum Aufbau der DNA-Bibliothek angesehen werden (vgl. 2.2, Virnekäs *et al.*, 1994). Durch verbesserte Transformationseffizienzen (z.B. kommerzielle kompetente Zellen) oder Verwendung von *in vitro*-Selektionssystemen (z.B. Ribosomen-*display*) kann die reale Komplexität der Bibliothek entscheidend erhöht werden.

Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass die C-hgBC-Bibliothek in ihrer erstellten Komplexität *per se* nur Binder mit begrenzter Affinität zulässt. Nach den Berechnungen von Houk und Mitarbeitern ($90 \text{ \AA}^2 = 1 \text{ Einheit } \lg K_A$) wäre, bei einer Lösungsmittel-exponierten Fläche von 428 \AA^2 (vgl. 2.1.3 Tab. 3), eine Assoziationskonstante (K_A) von ca. 10^5 zu erreichen, wenn alle Reste der Bindungsfläche an der Interaktion mit dem *target* beteiligt sind (Houk *et al.*, 2003). Dies entspricht Dissoziationskonstanten (K_D) im zweistelligen mikromolaren Bereich. Sind nicht alle Aminosäuren in die Bindung involviert so kann dieser Wert sogar bis in den millimolaren Bereich ansteigen. Die im *panning* anfänglich eingesetzte TNF α -Konzentration lag im hohen nanomolaren Bereich, vermutlich zu gering um Binder im Ansatz zu halten (vgl. 5.14.2 Tab. 22). Mitunter kann hier ein verminderter Selektionsdruck während des *pannings*, in Form von erhöhter TNF α -Konzentration und einer geringeren Anzahl an Waschschritten, Abhilfe schaffen und zur Isolierung spezifischer Binder führen.

Das Hauptdefizit der C-hgBC-Bibliothek lag also in ihrer unzureichenden Funktionalität aufgrund eines sehr hohen Anteils an zusätzlichen Mutationen rund um die Randomisierungspositionen (vgl. 2.2.2 Tab. 4). Zudem führte die Randomisierung von mehr als sechs Resten innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche zu erheblichen Löslichkeitsverlusten (vgl. 2.1.3 Abb. 10). Dieser Umstand begrenzte wiederum die maximal zu generierende Paratopfläche auf 428 \AA^2 (sechs Aminosäureresten entsprechend), was letzten Endes in zu geringen Affinitäten resultierte, als dass unter den gewählten Selektionsbedingungen Binder hätten

isoliert werden können. Die geringe Funktionalität in Kombination mit der nur begrenzt variablen Bindefläche ließ die Einzeldomänen-Bibliothek für weitere Optimierungen hinsichtlich neuer Selektionsversuche als ungeeignet erscheinen. Stattdessen wurde das zweite als Arbeitsziel gesetzte Konzept verfolgt: die Generierung eines Paratops im Volllängenprotein mit einer mehr als 2,5-fach größeren Bindefläche unter Verwendung von Methoden die die Funktionalität der Bibliothek erhöhen. Der Hauptvorteil lag klar auf der Hand: eine größere Paratopfläche resultiert in einer höheren Anzahl putativer Kontaktmöglichkeiten zur Zielstruktur und führt letztlich zu höheren Affinitäten.

3.2 Qualität der hgBC-Volllängen-Bibliothek

Die Selektion stellt den ersten und entscheidenden Schritt zur Isolierung spezifischer Bindeproteine dar. Dabei sind Qualität und Quantität der Bibliotheksmitglieder zu Beginn des *panning*-Prozesses überaus wichtige Kriterien (Ebersbach, 2004; Steiner *et al.*, 2008). Rein statistisch steigt mit größeren und qualitativ besseren DNA-Bibliotheken die Wahrscheinlichkeit qualitativ bessere und affinere Bindemoleküle zu isolieren (Griffiths *et al.*, 1994; Ling, 2003; Ebersbach, 2004). Da die Funktionalitäten der C-hgBC-Einzeldomänen-DNA-Bibliotheken mit 33 % bis 74 % vergleichsweise gering ausfielen (vgl. 2.1.2 Tab. 2; Hoffmann, 2012; Zhang, 2013; Stordeur, 2013; Weber *et al.*, 2014), galt es nun für das Volllängen-Pendant die Qualität der präselektiven DNA-Bibliothek entscheidend zu verbessern. Sequenzanalysen der naiven C-hgBC-DNA-Bibliothek ergaben, dass viele Varianten Leserahmenverschiebungen in Form von Nukleotiddeletionen bzw. – insertionen aufwiesen (vgl. 2.1.2). Der Einsatz Trinucleotid-randomisierter Oligodesoxynucleotide für den Aufbau der Volllängen-Bibliothek gekoppelt an ein Leserahmenselektionssystem (vgl. 1.2) sollte dem entgegenwirken (Schneider, 2010).

Mit Hilfe dieser methodischen Konzeption konnte die Funktionalität der hgBC-Bibliothek im Vergleich zu Lib6.1A um nahezu das 3-fache auf einen Wert von 97 % gesteigert (2.2.2 Tab. 4), aber gleichzeitig der Anteil an Einzeldelationen von 58 % (Lib6.1A) auf 1,5 % (Lib13.1A) reduziert werden. Eine nicht zu 100 % funktionierende Leserahmenselektion wird von den Begründern der Methode in diesem Zusammenhang mit fortgeschrittener Antibiotika-hydrolyse diskutiert (Gerth *et al.*, 2004). Der Anteil an Leserahmenverschiebungen ist vergleichbar mit bisher ermittelten Daten (Schneider, 2010). Auffällig ist allerdings der erhöhte Anteil an Nukleotidsubstitutionen (7,5 %). Er liegt mehr als doppelt so hoch wie in der Bibliothek Lib6.1A. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die höhere Anzahl an PCR-Schritten zur Zusammensetzung der Module der Volllängen-Bibliothek im Vergleich zur

Assemblierung der Einzeldomänen-Bibliothek (vgl. 5.14.1). Dies muss aber nicht zwangsläufig einen negativen Effekt nach sich ziehen. Unter der Voraussetzung, dass das Protein noch in seine native Struktur faltet können Substitutionen, je nach Lokalisierung im Molekül, zusätzliche Diversität und letztlich Affinität bedeuten (Hanes und Plückthun, 1997; Zahnd *et al.*, 2007). Die *performance* des neuen Bibliotheksdesigns konnte somit eindeutig unter Beweis gestellt werden. Die Funktionalität der hgBC-Bibliothek übertrifft damit sogar die Funktionalität vergleichbarer Bibliotheksformate die ebenfalls über Trinukleotidphosphoramidit-randomisierte Oligodesoxynukleotide aufgebaut wurden (Binz *et al.*, 2003; Lipovsek *et al.*, 2007; Garcia-Ibilcieta *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2008; Song, 2012; Lorey *et al.*, 2014).

Trotz der deutlich verbesserten Funktionalität der hgBC- gegenüber der C-hgBC-Bibliothek entsprach die beobachtete Aminosäureverteilung statistisch betrachtet nicht der erwarteten (vgl. 2.2.2 Abb. 14 und Anhang Tab. A1). Sie bildet vielmehr die momentanen Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren in der Trinukleotidmischung ab. So sollten unterschiedliche Reaktivitäten in der Festphasensynthese ausgeglichen und eine Gleichverteilung aller erwünschten Aminosäuren realisiert werden. Der eigentliche Vorteil der Trinukleotid- gegenüber der NNK-basierten Randomisierung, nämlich dass die Komplexität auf Proteinebene durch eine geringere Komplexität auf DNA-Ebene abgedeckt werden kann, wird durch die Abweichung von der Gleichverteilung gemindert (Schneider, 2010). Trotzallem war die hgBC- der C-hgBC-Bibliothek in Punkto Funktionalität weit überlegen.

Die Löslichkeiten der naiven Bibliotheksvertreter waren mit 40-52 %, je nach Bestimmungsmethode, vier bis sechs Mal höher als die der Einzeldomänen-Bibliotheken (vgl. 2.1.3 Abb. 10 und 2.2.3 Abb. 15). Vermutlich stabilisiert hier die Gegenwart der anderen Domäne das gesamte Protein und hält es in Lösung (Rudolph *et al.*, 1990; Mayr *et al.*, 1994; Palme *et al.*, 1997). Obwohl Cystein in der Synthesestrategie der N-hgBC und Prolin als auch Cystein in der C-hgBC ausgelassen wurden, konnte Cystein (N-hgBC) ein und Prolin (C-hgBC) zwei Mal gefunden werden. Dieser Fakt ist vermutlich mit Fehlern in der PCR im Zuge des Zusammenbaus der Gesamtbibliothek zu erklären. Für Prolin zeichnete sich eine Präferenz für die Positionen 43, 54 und 56 ab (vgl. 2.2.1 Abb. 12; nicht gezeigte Daten). An diesen Positionen trat die Aminosäure mehr als doppelt so häufig auf wie an den anderen. Dies bedeutete allerdings nicht, dass Varianten die Prolin in ihrer N-terminalen Domäne enthielten automatisch in der unlöslichen Fraktion zu finden waren. Vielmehr war deren Löslichkeit

immer im Kontext mit den Aminosäuren an den restlichen Randomisierungspositionen zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Um den Anteil an löslich exprimierten Varianten in einer Proteinbibliothek auch automatisiert im Hochdurchsatz ermitteln zu können, wurde die Bibliothek genetisch mit sfGFP als Reporter gen fusioniert und das exprimierte Fusionsprotein fluorometrisch analysiert. Verglichen wurden die Werte mit densitometrisch ermittelten Löslichkeiten (SDS-PAGE) des nicht fusionierten Pendants. Lediglich bei Varianten deren Löslichkeit nahe dem definierten Schwellenwert lag, in diesem Fall 50 % des löslichen Proteinanteil, kam es zu geringen Diskrepanzen zwischen densitometrisch und fluorometrisch ermittelten relativen Löslichkeiten (vgl. 2.2.3 Abb. 15). Der Grund hierfür ist vermutlich in der guten Löslichkeit des sfGFP zu suchen, dass dadurch auch die Löslichkeit des Fusionspartners erhöhte. Als Fazit lässt sich also formulieren, dass das verwendete Reportersystem mit automatisierten Hochdurchsatz Löslichkeits-*screenings* kompatibel ist und eine effektive und kostengünstige Möglichkeit darstellt, Löslichkeiten von Proteinen zu ermitteln.

3.3 Selektion der hgBC-Vollängen-Bibliothek gegen TNF α

Die Selektion der hgBC-Bibliothek erfolgte über insgesamt fünf Runden im TAT-abhängigen Phagen-*display* mit dem Ziel TNF α -bindende Varianten zu isolieren. Die in ein *phagemid* subklonierte Teilbibliothek von $6,7 \times 10^{12}$ DNA-Molekülen resultierte nach Transformation in *E. coli* in einer finalen präselektiven Komplexität von $3,1 \times 10^7$. Dieser Wert entspricht zwar nur einem tausendstel des als maximal möglich erachteten von 10^{10} (Jacobs *et al.*, 1990) und ist im direkten Vergleich zu anderen Phagen-*display* Bibliotheken um ein bis zwei Größenordnungen geringer (Ebersbach, 2004; Mirecka *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Song, 2012; Zhang, 2013), dennoch konnten nach vier *display*-Zyklen TNF α -bindende hgBC-Varianten angereichert werden (vgl. 2.2.4 Tab. 5).

Nach fünf Runden TAT Phagen-*display* haben sich gegenüber der ersten Runde 274-Mal mehr bindende Phagen in der Population angereichert (vgl. 2.2.4 Tab. 5 und 2.2.5 Abb. 16). Für Phagen-Bibliotheken von vergleichbarer Komplexität (4×10^7) konnten ähnliche Anreicherungsfaktoren gegen bestimmte Zielproteine erzielt werden (Nord *et al.*, 1997). Die Analyse der einzelnen Selektionsrunden im Einzelphagen-ELISA offenbarte eine Anreicherung von TNF α -bindenden Phagen ab der dritten Runde mit dem höchsten Anteil (62 %) in Runde vier (vgl. 2.2.5 Abb. 16). Die anschließende Sequenzierung aller Binder offenbarte die Anreicherung bestimmter Varianten mit nur sieben unterschiedlichen DNA-Sequenzen. Die geringe Diversität an Bindern nach der Selektion könnte zum einen bedeuten,

dass auf dem TNF α -Molekül nur eine limitierte Anzahl an dominanten Epitopen für das γ B-Kristallin existiert und/oder dass diese Binderspezies effektiver auf der Phagenoberfläche präsentiert werden als andere. Ebenso spielt eine entsprechend hohe Affinität dieser Binder zum *target* eine Rolle (Steiner *et al.*, 2008).

Die dominante Variante R4-B12, die zu 79 % unter den putativen TNF α -Bindern vertreten war, zeigte sich im Nachhinein als unlöslich. Da der Phagenpartikel an den die Variante fusioniert ist wesentlich größer ist als sie selbst, nimmt ihr Faltungszustand keinen Einfluss auf die eigentliche Präsentation und den Selektionsprozess. Sobald sie etwas im Reaktionsansatz spezifisch oder unspezifisch bindet verbleibt sie weiterhin in der selektierbaren Population, auch wenn ihre Konformation nicht der nativen entspricht. Allerdings sollte das verwendete TAT-Translokationssystem nicht oder falsch gefaltete Proteine an der Translokation ins Periplasma hindern (DeLisa *et al.*, 2003). Eine Translokations-kompatible Konformation der dominanten Spezies wäre daher zu vermuten. Szenarien, dass die Variante eine Faltung aufweist die ihrer nativen Struktur ähnelt, oder aber eine der beiden Domänen im entfalteten Zustand vorliegt, wären ebenfalls denkbar. Dabei könnte die weniger stabile C-terminale Domäne entfaltet vorliegen, die Variante aber dennoch hochaffin und spezifisch an das *target* binden. Durch die Immobilisierung auf der Phagenoberfläche und dem fehlenden Kontakt zu anderen teilentfalteten Molekülen wird deren Aggregation verhindert. Erst die Expression der nicht fusionierten Variante führt zur Aggregation, da nun die räumliche Nähe zwischen den Molekülen zustande kommen kann. Die im Vergleich zum Wildtyp gestiegene Hydrophobizität innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche ist wahrscheinlich als Hauptgrund für die Unlöslichkeit der dominanten Variante im nicht Phagen-fusionierten Zustand anzusehen (vgl. 2.2.5 Abb. 17B). TNF α mit seiner relativ hydrophoben Oberfläche könnte demzufolge ein geeignetes Epitop für diese Variante darstellen. Ob die Interaktion zwischen beiden Molekülen wirklich spezifisch ist, oder die Variante irgendeine andere Struktur im Reaktionsansatz bindet, bleibt offen.

Neben der unlöslichen dominanten Spezies war auch acht Mal die lösliche Variante R3-B11 in der selektierten Population vertreten, was etwa 12 % der gefundenen Binder ausmachte (vgl. 2.2.4 Tab. 5 und 2.2.5 Abb. 17). Dabei war sie zwei Mal in Runde drei und sechs Mal in Runde vier zu finden. Unter den Bindern der Selektionsrunde fünf konnte sie allerdings nicht mehr detektiert werden. R3-B11 wurde daraufhin für weiterführende Charakterisierungen isoliert. Sie verdankt ihre Bezeichnung der Selektionsrunde und der 96-*well*-Kavität in der sie gefunden wurde. Neben den erwarteten 13 Aminosäureaustauschen (S41L, M43I, Q54R, F56L, R58W, S79H, I81W, S135, I137Y, Q148S, L150T, R152S, V174A) traten keine

weiteren zusätzlichen Mutationen im Proteingerüst auf. Die Reduktion der TNF α -Binder von 62 % in der vierten auf 26 % in der fünften Runde, bei gleichzeitiger Erhöhung des generellen *output* an bindenden Phagen (vgl. 2.2.4 Tab. 4 und 2.2.5 Abb. 16) bedeutete demnach die Anreicherung unspezifischer Varianten. Ob dies mit der Beibehaltung der Anzahl an Waschschritten im Vergleich zur Vorrunde zusammenhängt bleibt zunächst offen (vgl. 5.14.2 Tab. 22). Mit der generellen Reduktion an TNF α -Bindern in Runde fünf ging auch die Variante R3-B11 verloren. Scheinbar war der angesetzte Selektionsdruck zu hoch und ihre Affinität dementsprechend zu gering um weiterhin in der Population zu verbleiben.

Eine Anreicherung putativer TNF α -Binder war in der vorliegenden Selektion im Vergleich zu anderen Literaturdaten (Nord *et al.*, 1997; Song, 2012) erst ab Runde drei festzustellen. Anzunehmen wäre, dass die Bedingungen in Runde eins und zwei die Anreicherung unspezifischer Binder begünstigten. Für spätere Selektionen könnten daher gleich von Beginn an nanomolare *target*-Konzentrationen eingesetzt und ggf. häufiger gewaschen werden (vgl. 5.14.2 Tab. 22). Mitunter lässt sich auch durch kompetitive Phagenelution (freies TNF α im Überschuss) ein höherer Prozentsatz an spezifisch bindenden Varianten mit gleichzeitig schnellerer Anreicherung erzielen (Song, 2012), als durch die verwendete Säureelution möglich war (vgl. 5.14.2). Durch die Elution mittels Säure wird alles auf der Matrix befindliche abgewaschen, auch unspezifische Binder die alle bisherigen Waschschriffe überstanden haben und somit weiter im Selektionsprozess verbleiben. Hingegen werden bei der Elution bzw. Konkurrenz mittels freiem TNF α vorrangig Varianten-tragende Phagenpartikel vom immobilisierten *target* abgelöst und die unspezifischen Binder bleiben auf der Matrix.

Eine weitere Möglichkeit das Phagen-*display* dahingehend zu optimieren nicht gefaltete bzw. falsch gefaltete Varianten auszusortieren ist in Verbindung mit einem proteolytischen Schritt, durch Trypsin- oder Chymotrypsinbehandlung, zu sehen (Imoto *et al.*, 1986; Sieber *et al.*, 1998). Nicht gefaltete Varianten sind dabei anfälliger gegenüber proteolytischen Reaktionen und werden demzufolge leichter degradiert.

3.4 Charakterisierung der TNF α -bindenden hgBC-Variante R3-B11

Nachdem die hochfunktionale hgBC-Bibliothek den Selektionsprozess im TAT-Phagen-*display* gegen TNF α erfolgreich durchlaufen hatte galt es nun die einzige isolierte lösliche hgBC-Variante R3-B11 näher zu analysieren. Sie wurde daraufhin fusioniert mit einem N-terminalen Hexahistidinpeptid (vgl. Anhang Abb. A1) im Schüttelkolben exprimiert und anschließend über Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt (vgl. 2.3.1 Abb. 18).

Die Ausbeuten an löslichen Proteinanteilen lagen allerdings nur bei 10-12 % der Ausbeuten des Wildtypproteins. Bei den detektierten Nebenprodukten in der Gelfiltration könnte es sich um Abbauprodukte in Form der beiden Einzeldomänen handeln (vgl. 2.3.1 Abb. 18, Spalte 5). Das um fünf Aminosäuren verlängerte *linker*-Peptid und die dadurch bedingte, und natürlich durchaus gewollte, verminderte Domäneninteraktion (vgl. 2.2.1 Abb. 12) könnte womöglich ursächlich für eine erhöhte Protease-Sensitivität sein und so die Abspaltung einer Domäne hervorrufen.

Die Anzahl an Aminosäuresubstitutionen im Proteingerüst, um die nötige Affinität zum TNF α zu gewährleisten, ließ Auswirkungen auf Struktur und Stabilität von R3-B11 erwarten. Daher wurden Sekundärstruktur und thermische Stabilität des gereinigten Proteins bestimmt. Messungen per Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigten ein gefaltetes Protein mit ausgeprägtem β -Faltblattanteil, jedoch mit deutlichen spektralen Abweichungen zum Gerüstprotein hgBC bzw. hgBC-SG4 (vgl. 2.3.2 Abb. 19 und Tab. 6). Die Veränderung der chemischen Umgebung innerhalb der Interdomänen-Kontaktfläche, hervorgerufen durch das verlängerte *linker*-Peptid, führte auch zu Veränderungen der chiroptischen Eigenschaften der hier lokalisierten Aminosäuren. Daher rühren vermutlich die spektralen Unterschiede zwischen hgBC und hgBC-SG4. Die Schulter bei etwa 230-235 nm wird bei γ -Kristallinen dem Einfluss aromatischer Reste zugeschrieben. Der deutliche *peak* bei 230 nm wird dabei mutmaßlich durch die Interaktion von Tyrosinseitenketten hervorgerufen (Rajini *et al.*, 2003). Bei der Variante R3-B11 ist das Plateau bei 230 nm deutlich ausgeprägter zu beobachten als bei den beiden Wildtypen. Die Substitutionen von insgesamt drei aromatischen Resten, d.h. nur zwei kamen neu hinzu (Trp81, Tyr137) der andere hat lediglich seine Position verändert (Trp58) könnten für diesen Effekt verantwortlich sein (vgl. 2.2.5 Abb. 17B; Vuilleumier *et al.*, 1993). Die spektralen Regionen unterhalb von 225 nm reflektieren Unterschiede in der Sekundärstruktur (Evans *et al.*, 2007) von R3-B11 im Vergleich zu den beiden anderen Proteinen. Die Zunahme an ungefalteten Anteilen (um 50 %) und die Reduktion an β -Strukturen (um 28 %) im R3-B11-Molekül im Vergleich zum Wildtyp hgBC-SG4 (vgl. 2.3.2 Tab. 6) könnten zudem auf ein partiell entfaltetes Protein hindeuten. Denkbar wäre hier eine partiell (ein oder mehrere β -Faltblätter) oder unter Umständen komplett entfaltete C-terminale Domäne, da diese die instabilere von beiden ist und unter nicht nativen Bedingungen als erstes entfaltet (Rudolph *et al.*, 1990; Mayr *et al.*, 1994; Palme *et al.*, 1997). Dies könnten womöglich die Ursachen für das deutlich verbreiterte Minimum zwischen 212 nm und 220 nm sein. Ein partiell entfaltetes Protein bedeutet wiederum eine erhöhte Anfälligkeit

gegenüber Protease-Abbaureaktionen, was die Nebenbanden in der Gelfiltration der Reinigung von R3-B11 erklären könnte (vgl. 2.3.1 Abb. 18).

Die Veränderungen auf struktureller Ebene wirkten sich auch auf die Stabilität von R3-B11 aus. Der durch DSF ermittelte Übergangsmittelpunkt für die thermische Entfaltung lag mit 57 °C immerhin 9 K unter dem Wert des Wildtyps hgBC-SG4, der wiederum rund 9 K unterhalb des ursprünglichen Gerüstproteins hgBC lag (vgl. 2.3.2 Abb. 20). Die höhere Anfangsfluoreszenz im Vergleich zu den beiden Wildtypen deutet, wie schon die Ergebnisse der Gelfiltration (vgl. 2.3.1 Abb. 18) und CD-Messung (vgl. 2.3.2 Abb. 19), auf partiell entfaltete Bereiche im Protein hin. An die nun zugänglichen Bereiche bindet der Farbstoff, was letztlich in einer Signalerhöhung resultiert. Die apparente Schmelztemperatur von R3-B11 ist vergleichbar mit der anderer künstlicher Bindeproteine wie etwa den Antikalinen (62-73 °C; Schlehuber und Skerra, 2002), Affibodies (53-78 °C; Kronqvist *et al.*, 2008), γ B-Kristallinen (56-72 °C; Ebersbach *et al.*, 2007) oder Ankyrinen (66-85 °C; Binz *et al.*, 2003). Für Antikörper bzw. deren Fragmente konnten Übergangsmittelpunkte zwischen 43 °C und 92 °C bestimmt werden (Dumoulin *et al.*, 2002; Orr *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005; Demarest *et al.*, 2006). Dies zeigt noch einmal die außergewöhnliche thermodynamische Stabilität des Kristallins, welche diverse Austausche von Oberflächenresten zur Generierung von Bindungsepitopen erlaubt. Die thermische Stabilität und Entfaltung der Variante konnte lediglich qualitativ betrachtet werden, da schon von anderen γ B-Kristallinen bekannt war, dass sie bei thermisch und chemisch induzierter Entfaltung bzw. Rückfaltung zur Aggregation neigten (Mayr *et al.*, 1997; Palme *et al.*, 1997; Ebersbach, 2004). Die CD- und DSF-Messdaten deuteten auf weitreichendere strukturelle Veränderungen im R3-B11-Molekül hin, zeigten aber dennoch eine durch β -Faltblätter geprägte thermostabile hgBC-Variante.

Nach Abschätzung der strukturellen Integrität und Bestimmung der thermischen Stabilität galt es die Interaktion zwischen beiden Bindungspartnern intensiver zu betrachten. Nach den Berechnungen von Houk und Mitarbeitern ($90 \text{ \AA}^2 = 1 \text{ Einheit } \lg K_A$) wäre für hgBC-Varianten, bei einer Lösungsmittel-exponierten Paratopfläche von 1080 \AA^2 (vgl. 2.2.1 Abb. 12), eine Assoziationskonstante (K_A) von ca. 10^{12} zu erreichen, wenn alle Reste der Bindungsfläche an der Interaktion mit dem *target* beteiligt wären (Houk *et al.*, 2003). Dies entspräche demnach Dissoziationskonstanten (K_D) im einstelligen picomolaren Bereich. Erzielt werden konnte hingegen ein K_D von 9,5 nM für die Bindung der hgBC-Variante R3-B11 an TNF α (vgl. 2.3.3 Abb. 22). Im Vergleich zu bisher publizierten TNF α -Bindern befindet sich diese Interaktion am unteren Ende der Affinitätenskala, die meisten von ihnen

weisen einstellig nanomolare bis zweistellig picomolare Affinitäten auf (vgl. 1.5 Tab. 1). Die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen kann als spezifisch eingeordnet werden, da lediglich ein weiterer TNF α -Verwandter, das murine TNF α mit 78 % Sequenzidentität, von R3-B11 erkannt und gebunden wird. Alle anderen TNF α -Verwandten mit geringerer Sequenzidentität als auch sequenzfremde Proteine lieferten keine signifikanten Bindungssignale (vgl. 2.3.3 Abb. 21A). Ebenso war es möglich die Bindung von R3-B11 an TNF α mittels des Rezeptor-Fusionsproteins Etanercept und der TNF α -bindenden Ubiquitin-Variante 10F zu kompetieren (vgl. 2.3.3 Abb. 21B). Zusätzliche Daten aus der analytischen Gelfiltration (vgl. 2.3.4 Abb. 23) und der Ultrazentrifugation (vgl. 2.3.4 Abb. 24) sprachen für die Bindung von R3-B11 an das freie Monomer. Hierbei deutete das per Ultrazentrifugation ermittelte Molekulargewicht des Komplexes auf eine 1:1 Stöchiometrie zwischen R3-B11 und dem TNF α -Monomer hin. Welchen Einfluss die Variante auf das Dissoziationsverhalten des TNF α -Trimers nahm wurde kinetisch anhand Fluorescein-markierter TNF α -Untereinheiten und Zugabe verschiedener Interaktoren analysiert. Dabei zeigte sich eine deutliche dissoziationsfördernde Tendenz von R3-B11 (vgl. 2.3.5 Abb. 25). Experimentelle Untersuchungen mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie untermauerten die aufgestellte Monomer-These (nicht gezeigte Daten). Die Aufnahme einer Bindungsisotherme war nicht möglich, da vermutlich die eingesetzten mikromolaren TNF α -Konzentrationen (Trimer-bezogen) die Konzentration an freiem TNF α -Monomer im Reaktionsansatz gegen null tendieren ließen, sodass keine adäquaten Bindungswärmen detektiert werden konnten.

TNF α -Binder, welche die monomere Spezies erkennen, wurden in der Literatur schon mehrfach beschrieben (Jonsson *et al.*, 2009; Byla *et al.*, 2010), allerdings mit einem Bindungsverhalten das den natürlichen TNF-Rezeptoren ähnelt (Banner *et al.*, 1993). Ihr Epitop ist somit im Kontext des Trimers drei-Mal vorhanden (3:1 Stöchiometrie bezüglich TNF α -Trimer), während das von R3-B11 nicht vorhanden bzw. nicht zugänglich zu sein scheint. Vielmehr scheint dessen Epitop im Inneren des Trimers, in der hydrophoben Kontaktfläche der Untereinheiten, verborgen zu sein und wird erst nach Dissoziation der Untereinheiten erreichbar. Die überwiegend apolaren, hydrophoben Reste in der Randomisierungsfläche der N-terminalen Domäne von R3-B11 würden zumindest für die Interaktion mit einem hydrophoben Epitop sprechen (vgl. 2.2.5 Abb. 17B). Denkbar wäre allerdings auch die Interaktion der partiell entfalteten C-terminalen Domäne mit dem TNF α -Monomer. Kleine chemische Verbindungen die bis zur Kontaktfläche der Monomere tief im Inneren des TNF α -Trimers vordringen können und so dessen Dissoziation vorantreiben wurden bereits beschrieben (Alzani *et al.*, 1995; He *et al.*, 2005). Das R3-B11 aktiv zur

TNF α -Dissoziation Beitrag konnte allerdings nicht beobachtet werden. Erst die Anwesenheit bzw. Zugabe dissoziationfördernder Substanzen, wie z.B. Tween-20 (Smith und Baglioni, 1987), führte zur Bindung an ein TNF α -Monomer (vgl. 2.3.4 Abb. 23).

Die Assoziationskonstante für das TNF α -Trimer liegt im niedrigen picomolaren Bereich (Poiesi *et al.*, 1993; Grell *et al.*, 1998) mit entsprechend geringen Dissoziationsraten (Kunitani *et al.*, 1988; Poiesi *et al.*, 1993; Alzani *et al.*, 1995). Es wird vermutet, dass der Dissoziation eine konformationelle Umlagerung im Molekül vorausgeht (Alzani *et al.*, 1995). Solche lokalen Strukturänderungen können z.B. durch Detergenzien wie Tween-20 ausgelöst werden, wobei ein dissoziationfördernder Übergangszustand postuliert wird der zudem durch Tween-20 stabilisiert werden könnte (Hoffmann *et al.*, 2012). Davon ausgehend wären theoretisch zwei Bindungsmodi für R3-B11 vorstellbar. Zum Einen die Bindung des Monomers nach vollständiger Tween-20-vermittelter Dissoziation des Trimers und zum Anderen die Bindung der dissoziationssensitiven Konformation mit anschließendem Übergang auf ein Monomer. Fluoreszenz-Homoquenchingexperimente (He *et al.*, 2005), die auf eine erhöhte Monomeraustauschrate zwischen den Trimeren hinwiesen, unterstützten die Monomer-Hypothese (vgl. 2.3.5 Abb. 25). Das anfängliche Absinken des Fluoreszenzsignals in den ersten 25 Minuten könnte mit der Bindung zweier freier Monomere erklärbar sein. Dabei bindet jede Domäne ein TNF α -Monomer was zum Quenching der Fluoreszenz durch die räumliche Nähe der Fluorophore und letztlich zum Absinken des Signals führt. Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten beider Domänen zum TNF α löst sich ein Monomer nach gewisser Zeit wieder ab und führt zum langsamen Anstieg der Fluoreszenz.

Warum dennoch eine schnelle Bindung im konzentrationsabhängigen ELISA (vgl. 2.3.3 Abb. 22) erfolgte lässt sich wie folgt erklären. Nach Immobilisierung von TNF α auf einer Mikrotiterplatte wurde diese mit Tween-20-haltigem Puffer gewaschen, um ungebundenes TNF α zu entfernen. Tween-20 führte zur Dissoziation der immobilisierten Trimere, sodass am Ende ein großer Anteil monomeres TNF α auf der Platte vorlag. Die einstündige Inkubationszeit von Variante und TNF α war also ausreichend, um eine Bindungskurve aufzunehmen. Das Gleiche galt auch für den qualitativen ELISA in Abbildung 21A (2.3.3). Dies erklärt wiederum die Diskrepanz zwischen ELISA und analytischer SEC in der nach einstündiger Inkubation beider Bindungspartner ohne Tween-20 noch kein R3-B11 im Komplex-*peak* zu beobachten war (vgl. 2.3.4 Abb. 23C). Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen lag zu diesem Zeitpunkt noch kein freies Monomer vor, was hätte durch die Variante gebunden werden können.

Aus den zuvor geschilderten experimentellen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Bindung der hgBC-Variante an TNF α unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Detergenz Tween-20 stattfindet, die Assoziationsgeschwindigkeit der Bindungspartner allerdings signifikant durch das Detergenz erhöht wird (vgl. 2.3.4 Abb. 23). Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für zwei TNF α -bindende Moleküle beschrieben, für ein DARPin und ein Affilin (Steiner *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2012). Der kontinuierliche Einsatz von Tween-20 während der Selektion hat vermutlich die Isolation eines Detergenz-abhängigen Monomer-Binders begünstigt (Steiner *et al.*, 2008), denn Bindemoleküle die aus Selektionen ohne Detergenzeinsatz isoliert wurden zeigten dieses Verhalten nicht (Jonsson *et al.*, 2009; Byla *et al.*, 2010). Obwohl die Affinität zwischen den TNF α -Untereinheiten höher ist als zwischen TNF α und der hgBC-Variante R3-B11 scheint die Variante in der Lage zu sein das Komplextgleichgewicht zu stören und während der Dissoziationsphase Monomere daraus abzuziehen. Zumindest lassen die zeitabhängigen SEC-Experimente in Abwesenheit von Tween-20 diesen Schluss zu (vgl. 2.3.4 Abb. 23).

Die in dieser Arbeit isolierte hgBC-Variante R3-B11 zeigte sowohl in der Affinität als auch in ihrem Bindungsverhalten deutliche Unterschiede zu den bisher untersuchten TNF α -bindenden Molekülen (vgl. 1.5 Tab. 1). Mehr als die Hälfte der hier aufgeführten Binder basiert auf Antikörper-Gerüsten und deren Derivaten. Durch strukturbedingte Aviditätseffekte liegen die Affinitäten der Antikörper größtenteils im picomolaren Bereich. Dabei erkennen die meisten bereits zugelassenen monoklonalen Antikörper sowohl die trimere als auch die monomere Form des Proteins (Petyovka *et al.*, 1995; Saijo *et al.*, 1995; Scallon *et al.*, 2002). Zusammen mit 10F ist R3-B11 das einzige *scaffold* in dem β -Faltblätter zur Erzeugung eines Paratops herangezogen wurden, in allen anderen wurden entweder Schleifenstrukturen (Silverman *et al.*, 2005; Kaymakcalan *et al.*, 2009) oder α -helikale Bereiche (Steiner *et al.*, 2008; Löfdahl und Nygren, 2010) randomisiert. Die Affinität von R3-B11 liegt im niedrigen nanomolaren Bereich (vgl. 2.3.3 Abb. 22) und damit am unteren Ende der hier aufgestellten Skala. Sie ist aber dennoch als hoch einzustufen, da einige der anderen nicht Ig-basierten Binder erst im Zuge einer Affinitätsmaturierung und nicht schon aus dem Primär-*screening* isoliert werden konnten (Byla *et al.*, 2010; Löfdahl und Nygren, 2010). Der Großteil der TNF α -Binder interagiert mit den im Trimerzustand Lösungsmittel-zugewandten bzw. -zugänglichen Flächen des Proteins und erkennt somit das intakte Trimer (Enbrel, 10F), oder aber die monomere und trimere Assoziationsform (Remicade, Humira).

Der mit der hier isolierten Variante R3-B11 einhergehende Bindungsmechanismus scheint hingegen bisher einzigartig zu sein. Ihre Bindung stellt einen dissoziationsabhängigen Prozess dar an dessen Ende ein TNF α -Monomer gebunden wird. Offenbar interagiert R3-B11 mit einem Epitop auf der Lösungsmittel-abgewandten und ihm somit nicht zugänglichen Seite des Moleküls. Seine Affinität scheint allerdings nicht hoch genug zu sein um das Trimer aktiv zur Dissoziation zu bringen. Dies gelingt nur in Anwesenheit von Detergenzien oder aber durch die begrenzte Halbwertszeit des Trimers selbst.

4 Ausblick

Die Selektion der TNF α -bindenden Variante R3-B11 aus einer hgBC-Proteinbibliothek und deren primäre Charakterisierung bezüglich Affinität, Spezifität und Komplexbildung mit dem Zielmolekül konnte gezeigt werden. Dies stellt eindeutig unter Beweis, dass sich die Interdomänen-Kontaktfläche als alternatives Paratop im hgBC-Molekül eignet und hiermit hochaffine Bindeproteine generiert werden können. Um beispielsweise den genauen molekularen Bindungsmechanismus zu ergründen, oder gar Aussagen zur Struktur des Komplexes zu machen, bedarf es jedoch noch weiterer Analysen.

Als eine wichtige, noch ausstehende, Untersuchung wäre eine zweite Methode zur Verifizierung der Dissoziationskonstante von R3-B11 zu nennen. Hierzu bietet sich die Ausnutzung des Phänomens der Oberflächenplasmonresonanz an. Durch gezielte Immobilisierung des monomeren TNF α auf einer Trägermatrix und anschließendes Umspülen mit einer R3-B11-Lösung kann die Bindungskinetik direkt verfolgt werden. Zudem empfiehlt es sich die Struktur des Komplexes aus beiden Proteinen über NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallografie zu bestimmen. Anhand derer lassen sich sowohl konkrete Aussagen zur Lokalisierung des Epitops auf der Zielstruktur machen als auch die Reste innerhalb des *scaffolds* bestimmen, die an der Interaktion beider Partner beteiligt sind.

Ein neuer Selektionsversuch ist im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung einer Affinitätsmaturierung von R3-B11 vorzuziehen, da auch mit einem höher affinen Monomerbinder wahrscheinlich keine *in vivo* Aktivität zu erwarten ist. Zumindest zeigte R3-B11 in ersten L929-Zellassays keine Aktivität (nicht gezeigte Daten). Hierbei wurde die Fähigkeit des Bindungspartners TNF α -induzierte Apoptose zu inhibieren untersucht. Mit einem neuen Selektionsversuch besteht jedoch die Chance einen Trimerbinder zu finden, der das Potential besitzt die TNF α -Signalkaskade *in vivo* zu blockieren. Hierzu ist es sicherlich von Vorteil Detergenzien während des gesamten Selektionsprozesses zu vermeiden. Für ein Tetranectin mit ähnlicher Affinität wie R3-B11 konnte TNF α -induzierte Apoptoseinhibierung nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Trimerbinder (Byla *et al.*, 2010). Zur Bestimmung der *in vivo* Aktivität im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung müsste zusätzlich noch die Verweildauer im Humanserum per ELISA ermittelt werden.

Die theoretische Komplexität der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten DNA-Bibliothek liegt bei 3×10^{16} individuellen Varianten. In der praktischen Handhabung ist dies allerdings nicht umzusetzen, da wir hier von DNA-Mengen im Milligramm-Bereich sprechen.

Nach Transformation der die Bibliothek tragenden *phagemide* in *E. coli* konnte letztlich eine reale Komplexität von $3,1 \times 10^7$ erzielt werden (vgl. 2.2.4 S.36). In *in vivo* Methoden, wie dem Phagen-*display*, können maximale Komplexitäten von 10^{10} individuellen Varianten abgebildet werden. Der limitierende Schritt liegt hierbei in der natürlichen Transformations-effizienz der Bakterienzellen, die bei diesem Wert an ihre Grenzen stößt (Jacobs *et al.*, 1990). Die Anwendung von transformationsunabhängigen *in vitro* Selektionsmethoden, wie dem Ribosomen-*display*, kann die theoretische Diversität deutlich erhöhen (Schmidt *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2001). Allein die Anzahl verfügbarer Ribosomen in der Lösung bestimmt die Bibliotheksgröße – finale Komplexitäten von 10^{12-13} sind realistische experimentelle Werte. Eine größere Komplexität erhöht die Chance auf hochaffine Bindemoleküle (Griffiths *et al.*, 1994; Ling, 2003). Da alle bisherigen Kristallin-basierenden Bindeproteine mittels Phagen-*display* selektiert wurden gilt es in diesem Zusammenhang zu testen, ob das hgBC mit einem zellfreien System kompatibel ist.

5 Material und Methoden

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit herangezogenen Materialien und Methoden aufgeführt bzw. kurz erläutert werden.

5.1 Chemikalien

Eine Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien findet sich in Tabelle 7. Sofern nicht anders vermerkt wurden die hier aufgeführten Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.A. verwendet.

Tab. 7: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Agarose, LE GP	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Agarose, Sieve GP	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumacetat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto Casitone	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto Soytone	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto Tryptone	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Bromphenolblau	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Carbenicillin (Di-Natriumsalz)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester (NHS-Fluorescein)	Pierce Biotechnology (Rockford, IL)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Coomassie R250	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Difco Select Soytone	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
dNTP-Set (100 mM je Nukleotid)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA; für Molekularbiologie)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (96 %), vergällt	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (99 %), reinst	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Chemikalie	Bezugsquelle
Ethidiumbromid (1%)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
6-(Fluorescein-5-carboxamido)-hexansäure-succinimidylester	Life Technologies (Carlsbad, CA)
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
D(+)-Glukose	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glycin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Glykogen	Roche Applied Science (Mannheim)
Harnstoff	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Imidazol	Merck KGaA (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumacetat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
α -Laktose-Monohydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Magnesiumacetat-Tetrahydrat (für Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
MES-Monohydrat (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdisulfit	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 %	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriummolybdat-Dihydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumselenit	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ni ²⁺ -Sepharose™ High Performance (HP)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Pierce Protein-Free (PBS) Blocker	Pierce Biotechnology (Rockford, IL)
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Schwefelsäure (96 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Casein Blocking-Lösung (10-fach)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Silbernitrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology (Rockford, IL)

Chemikalie	Bezugsquelle
SYPRO [®] Orange (5000-fach)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TMB One (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
TMB Xtra (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
Trichloressigsäure (TCA)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (für Molekularbiologie)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tween-20	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Wasser, Nuklease-frei	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Zinksulfat-Heptahydrat	AppliChem GmbH (Darmstadt)

5.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von entionisiertem Wasser hergestellt und im Anschluss sterilfiltriert (Tab. 8). Puffer für die Chromatographie wurden zusätzlich unter Vakuum für mindestens 20 Minuten entgast und bei Raumtemperatur gelagert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte je nach Bedarf mittels HCl, NaOH, KOH oder Essigsäure.

Tab. 8: Liste verwendeter Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
<i>Chromatographische Reinigung</i>	
NPI-40	20 mM Na ₂ HPO ₄ ; 150 mM NaCl; 40 mM Imidazol (pH 8,0)
NPI-500	20 mM NaH ₂ PO ₄ ; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazol (pH 8,0)
GF-Puffer	PBS mit und ohne 1 mM EDTA verwendet (pH 7,4)
<i>Elektrophoresepuffer</i>	
5 x SDS-Probenpuffer (red.)	250 mM Tris/HCl; 5 % (w/v) SDS; 50 % Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol (pH 8,0)
MES-Laufpuffer (NuPAGE [®] Gele)	50 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäure); 50 mM Tris/HCl; 3,5 mM SDS; 1 mM EDTA (pH 7,3)
Tris / Glycin-Laufpuffer (Criterion [™] Gele)	495 mM Tris/HCl; 1,9 M Glycin/HCl; 1 % (w/v) SDS (pH 8,3)
PageBlue [™] Protein Staining Solution	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
DNA Gel Loading Dye (6-fach)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Orange Loading Dye (6-fach)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
TAE-Laufpuffer	40 mM Tris/HCl; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8,3)
<i>Silberfärbung (nach Shevchenko)</i>	
Fixierer	50 % (v/v) Methanol; 5 % (v/v) Essigsäure
Pretreat	0,02 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
Imprägnierer	0,2 % (w/v) AgNO ₃

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Entwickler	0,04 % (v/v) Formaldehyd; 3 % (w/v) Na ₂ CO ₃
Stopp-Lösung	5 % (v/v) Essigsäure
<i>ELISA-Puffer</i>	
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PBST0,05	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
Casein Blocking-Lösung (10-fach)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Pierce Protein-Free (PBS) Blocker	Pierce Biotechnology (Rockford, IL)
<i>Kompetente Zellen</i>	
Waschpuffer (ek)	10 % (v/v) Glycerin
TB-Puffer (ck)	10 mM HEPES; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl; 55 mM MnCl ₂ (pH 6,7)
<i>Phagen-display</i>	
Elutionspuffer	200 mM Glycin; 2,7 mM KCl; 8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ (pH 2,2)
Neutralisierer	1 M Tris/HCl (pH 9,1)
PEG/NaCl	20 % (w/v) PEG 8000; 2,5 M NaCl
<i>Sonstiges</i>	
Zellaufschlusspuffer I	NPI-20 mit 200 µg/ml Lysozym; 2 mM MgSO ₄ ; 10 U/ml Benzonase; 400 µM PMSF
Zellaufschlusspuffer II	PBS mit 100 µg/ml Lysozym; 2 mM MgSO ₄ ; 5 U/ml Benzonase; 400 µM PMSF
Pellet-Resuspensionspuffer	8 M Harnstoff; 100 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA (pH 8,0)

5.3 Kulturmedien und Antibiotika

Für die Kultivierung von Mikroorganismen wurden die unten stehenden Nährmedien benutzt (Tab. 9). Diese wurden vor ihrem Einsatz 20 min bei 121 °C autoklaviert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur hitzesensitive Substanzen, wie etwa Antibiotika (Tab. 10), zugesetzt.

Tab. 9: Liste der Nährmedien für Mikroorganismen.

Medium/Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l BD Bacto TM Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl (pH 7,2)
LB-Agar-Medium	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
SOC-Medium	20 g/l BD Bacto TM Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 20 mM Glukose
SOC-Agar-Medium	SOC-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
2YT-Medium	16 g/l BD Bacto TM Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl (pH 7,2)
NZY ⁺	10g/l BD Bacto TM Casiton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; 12,5 mM MgCl ₂ ; 12,5 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose
TOP-Agarose	2YT mit 0,6 % (w/v) Biozym LE-Agarose

Medium/Lösung	Zusammensetzung
ZY-Medium	10 g/l Difco™ Select Soytone; 5 g/l Hefeextrakt
50 x M-Lösung	1,25 M Na ₂ PO ₄ ; 1,25 M KH ₂ PO ₄ ; 2,5 M NH ₄ Cl; 0,25 M Na ₂ SO ₄
50 x 5052-Lösung	25 % Glycerin; 25 g/l Glukose; 100 g/l α-Lactose-Monohydrat
1000 x Spurenelementelösung	60 mM HCl; 50 mM FeCl ₃ ; 20 mM CaCl ₂ ; 10 mM MnCl ₂ ; 10 mM ZnSO ₄ ; 2 mM CoCl ₂ ; 2 mM CuCl ₂ ; 2 mM NiCl ₂ ; 2 mM Na ₂ MoO ₄ ; 2 mM Na ₂ SeO ₃ ; 2 mM H ₃ BO ₃
ZYM-5052 (Autoinduktionsmedium)	1 x ZY-Medium; 1 x M-Lösung; 1 x 5052-Lösung; 2 mM MgSO ₄ ; 0,2 x Spurenelementelösung
EnBase Flo (Kit)	EnBase Flo; 2 ml/l Thiamin; 2 ml/l Mg; 500 µl/l EnZ I'm Booster (10x): Booster; 100 µM IPTG; 10 ml/l EnZ I'm

Zur Selektion bestimmter genetischer Eigenschaften von *E. coli*-Stämmen wurden den Kulturmedien entsprechende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen (Tab. 10) beigemischt.

Tab. 10: Übersicht der eingesetzten Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100 (in ddH ₂ O)	100
Carbenicillin	50 (in Ethanol)	50
Chloramphenicol	34 (in Ethanol)	34
Kanamycin	50 (in ddH ₂ O)	50 / 100*
Tetracyclin	5 (in Ethanol)	5

*In Autoinduktionsmedien wurde die doppelte Kanamycinkonzentration (100 µg / ml) eingesetzt

5.4 Enzyme und andere Proteine

In Tabelle 11 sind die verwendeten Enzyme, Antikörper und weitere Standardproteine gelistet.

Tab. 11: Auflistung verwendeter Enzyme und Standardproteine.

Enzym*/Protein	Bezugsquelle
10F (modifiziertes humanes Ubiquitin)	NWG Künstliche Bindeproteine
Agarase (0,5 U/µl)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>AgeI</i> (<i>BshTI</i>), FD <i>AgeI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
BAFF, human (TNFSF13B)	NEB (Frankfurt/Main)
<i>BamHI</i> , FD <i>BamHI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Benzonase (25 U/µl)	Novagen (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
<i>Eco31I</i> (<i>BsaI</i>), FD <i>Eco31I</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

Enzym*/Protein	Bezugsquelle
<i>Esp3I</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Etanercept (Enbrel)	Scil Proteins GmbH (Halle/Saale)
FastAP™ (Alkaline Phosphatase, 1 U/μl)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Humanes Serum (AB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Lymphotoxin-α, human (TNFSF1)	NEB (Frankfurt/Main)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
<i>MluI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>NcoI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>NdeI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
NeutrAvidin	Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm)
Phusion® DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>ScaI</i> (FD)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>SfiI</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
Streptavidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
SUMO-Protease	NWG Künstliche Bindeproteine
T4 DNA-Ligase (5 bzw. 30 U/μl)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
TNF α, human (TNFSF2)	NWG Künstliche Bindeproteine
TNF α, Maus (TNFSF2)	Scil Proteins GmbH (Halle/Saale)
<i>XhoI</i>	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>Antikörper und Immunkonjugate</i>	
anti-c-Myc Antikörper (9E10)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO/USA)
anti-hgC Antikörper (hgC_4_1_9)	Scil Proteins GmbH (Halle/Saale)
anti-hgC-Peroxidase-Konjugat (hgC98_4_1_9)	Scil Proteins GmbH (Halle/Saale)
anti-His6-Peroxidase-Konjugat (BMG-His-1)	Roche Applied Science (Mannheim)
anti-M13-Peroxidase-Konjugat	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Pierce Biotechnology (Rockford, IL / USA)

*Alle Restriktionsendonukleasen besitzen eine Aktivität von 10 U/μl. Fast Digest Restriktionsendonukleasen (FD) haben eine Aktivität von 1 FDU/μl (FDU = *fast digest unit*).

5.5 Standards und Kits

Nachfolgend findet sich die Zusammenstellung aller genutzten Kits und Standards (Tab. 12).

Tab. 12: Liste der verwendeten Kits und Standards.

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Kits</i>	
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega GmbH (Mannheim)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH (Mannheim)
PureYield Plasmid Mediprep System	Promega GmbH (Mannheim)
PureYield Plasmid Maxiprep System	Promega GmbH (Mannheim)
<i>Standards</i>	
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

Bezeichnung	Bezugsquelle
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
<i>Molekularmassenstandard</i>	
Conalbumin (75 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuklease A (13,7 kDa), Aprotinin (6,5 kDa)	GE Healthcare (Uppsala, S)

5.6 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide (Tab. 13) sind standardmäßig HPLC-gereinigt von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) bezogen. **Mix** steht für ein degeneriertes Triplet mit der Zusammensetzung gemäß Tab. 15. Die für die Randomisierung eingesetzte Trinukleotid-phosphoramiditmischung stammt von Glen Research Corporation (Sterling, VA/USA; N-hgBC) bzw. Ella Biotech (München; C-hgBC). Eine Übersicht über den reduzierten genetischen Code bei Verwendung von NNK-Motiven findet sich in Tab. 14.

Tab. 13: Liste der Oligodesoxynukleotide.

Bezeichnung	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')
C-hgBC_lib_fwBsa	35	TAGTCAGGTCTCCCATGGCGTATCGTATGAAAATC
C-hgBC_lib_fwSfi	40	TAGTAAGGCCAGCAGGCCATGGCGTATCGTATGAAATC
C-hgBC_lib_rvBsa	34	TCACTAGGTCTCCTCGAGAGAGCCATACAGATCC
C-hgBC_lib_rvSfi	37	TCACTAGGCCACCGAGGCCGAAGAGCCATACAGATCC
C-hgBC_p1lib41Ato 71A_rv	57	TGACATGGTCTCTGATAGTTCGGCATTTCATACAG MNNCCAMNNGCCTTCCAGCACG
C-hgBC_p1lib_rv	57	TGACATGGTCTCTGATAGTTCGGCATTTC MNN CAG MNNCCAMNNGCCTTCCAGCACG
C-hgBC_p2lib41A 51A_fw	54	AGACGTGGTCTCATATCGTGGCCGCCAGTAT NNK CTG NNK CCGGGTGAATATCG
C-hgBC_p2lib_fw	54	AGACGTGGTCTCATATCGTGGCCGC NNK TAT NNK CTG NNK CCGGGTGAATATCG
C-hgBC_p3lib51A 61A_rv	39	AGAGCCATACAGATCCAT MNN ACGACGCAGGCTGCC CAC
C-hgBC_p3lib_rv	39	AGAGCCATACAGATCCAT MNN ACG MNN CAGGCTGCC CAC
C-hgBC_i-EF_fwd	30	CCGGTCTCATGGATCTGTATGGATCCGAGA
C-hgBC_i-EF_rev	30	CGCGTCTCGGATCCATACAGATCCATGAGA
C-hgBC_i-IF1_fwd	36	CCGGTCTCGAAATGCCGAAGTATCGTGGCCGCGAGA
C-hgBC_i-IF1_rev	36	CGCGTCTCGCGGCCACGATAGTTCGGCATTTCGAGA
C-hgBC_i-IF2_fwd	66	CCGGTCTCCCGGTGAATATCGTCTGTTTCTGGATTG GGGTGCGCCGAACGCGAAAGTGGGCGAGA
C-hgBC_i-IF2_rev	66	CGCGTCTCGCCACTTTCGCGTTCGGCGCACCCCAAT CCAGAAAACGACGATATTCACCCGGGAGA
C-hgBC_i-RB1_ 2.3A_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGAAGGC mix TGG mix TTAT ATGAAATGGAGACGCGTGATT

Bezeichnung	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')
C-hgBC_i-RB1_nr_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGAAGGCAGCTGGATTTTAT ATGAAATGGAGACGCGTGGTATT
C-hgBC_i-RB2_3.1A_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGGCCG Cmix TAT mix CTG mix CCGGGTGAGACGCGTGGTATT
C-hgBC_i-RB2_nr_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGGCCGCCAGTATCTGCTG CGTCCGGGTGAGACGCGTGGTATT
C-hgBC_i-RB3_1.3A_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGTGGGCAGCCTGCGTCGT mix ATGGATGAGACGCGTGGTATT
C-hgBC_i-RB3_nr_fwd	60	AGCCTACATACCGGTCTCGTGGGCAGCCTGCGTCGT GTGATGGATGAGACGCGTGGTATT
C-hgBC_i-SF_fwd	37	ACGACCACCGGTCTCGCGTATCGTATGAAAATCTATG
C-hgBC_i-SF_rev	33	TGATACACGCGTCTCGCCTTCCAGCACGTTTCAG
hgBC_i-lib_rev	18	GTGAATACCACGCGTCTC
hgBC_LF-SG4_fwd	48	CCGGTCTCCCGCCGCATAGCGGTTTCAGGCGGCGGTGG CGCGTATGAGA
hgBC_LF-SG4_rev	48	CGCGTCTCATAACGCGCCACCGCCGCCTGAACCGCTAT GCGGCGGGAGA
hgBC_LF-wt_fwd	33	CCGGTCTCCCGCCGCATAGCGGTGCGTATGAGA
hgBC_LF-wt_rev	33	CGCGTCTCATAACGCGCCGCTATGCGGCGGGAGA
ModLibs_fwd	20	CCAGACTTACGCTCCAATTC
ModLibs_rev	20	TCTGCGTTAACCGAGACTAC
N-hgBC_i-EF_fwd	33	CCGGTCTCCCGCCGCATAGCGGTGCGTATGAGA
N-hgBC_i-EF_rev	33	CGCGTCTCATAACGCGCCGCTATGCGGCGGGAGA
N-hgBC_i-IF1_fwd	36	CCGGTCTCGAACGTCCGAACATCAGGGCCATGAGA
N-hgBC_i-IF1_rev	36	CGCGTCTCATGGCCCTGATAGTTTCGGACGTTTCGAGA
N-hgBC_i-IF2_fwd	66	CCGGTCTCCGCGGCGAATATCCGGATTATCAGCAGTGG ATGGGCCTGAGCGATAGCATTTCGTGAGA
N-hgBC_i-IF2_rev	66	CGCGTCTCACGAATGCTATCGCTCAGGCCCATCCACT GCTGATAATCCGGATATTTCGCCGCGGAGA
N-hgBC_i-RB1_2.3A_fwd	63	AGCCTACATACCGGTCTCAGCGGC Cmix TGG mix ATT TATGAACGTGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-RB1_nr_fwd	63	AGCCTACATACCGGTCTCAGCGGCAGCTGGATGATT TATGAACGTGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-RB2_3.1A_fwd	63	AGCCATCATACCGGTCTCGGCCAT mix TAT mix TTA mix CGCGGCGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-RB2_nr_fwd	63	AGCCATCATACCGGTCTCGGCCATCAGTATTTCTTA CGTCGCGGCGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-RB3_2.3A_fwd	63	AGCCATCATACCGGTCTCATTCG Cmix GCC mix TTA ATTCCGCCGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-RB3_nr_fwd	63	AGCCATCATACCGGTCTCATTCGCAGCGCCAGCTTA ATTCCGCCGAGACGCGTGGTATTCAC
N-hgBC_i-SF_fwd	40	GCTGCACCGGTCTCGGCAAATCACCTTTTATGAA GATCG
N-hgBC_i-SF_rev	34	GTGACTACGCGTCTCGCCGCTTTCACACGAATG

Tab. 14: Codonverteilung bei der Verwendung von NNK-Motiven (vgl. Tab. 13). Einbuchstabencode in Klammern.

		2. Position				
		A	C	G	T	
1. Position	A	Asn (N)	Thr (T)	Ser (S)	Ile (I)	T
		Lys (K)	Thr (T)	Arg (R)	Met (M)	G
	C	His (H)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	T
		Gln (Q)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	G
	G	Asp (D)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	T
		Glu (E)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	G
	T	Tyr (Y)	Ser (S)	Cys (C)	Phe (F)	T
		Stopp	Ser (S)	Trp (W)	Leu (L)	G

Tab. 15: Codonverteilung an den degenerierten Positionen (**mix**) der gelisteten Oligodesoxynukleotide in Tabelle 13.

Codon	kodierte Aminosäure*
AAA	Lys (K)
AAC	Asn (N)
ACT	Thr (T)
ATC	Ile (I)
ATG	Met (M)
CAG	Gln (Q)
CAT	His (H)
CCG**	Pro (P)**
CGT	Arg (R)
CTG	Leu (L)
GAA	Glu (E)
GAC	Asp (D)
GCT	Ala (A)
GGT	Gly (G)
GTT	Val (V)
TAC	Tyr (Y)
TCT	Ser (S)
TGG	Trp (W)
TTC	Phe (F)

* Einbuchstabencode in Klammern

**In der Synthese der Oligonukleotide für die C-terminale Domäne des hgBC wurde Prolin ausgelassen.

5.7 Plasmide

Für Klonierungen und Expressionen fanden folgende Plasmide Verwendung (Tab. 16).

Tab. 16: Liste der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCD87SA	Phagemid für TAT-Translokationsweg, Tet-Promotor, enthält GFP24-Gen, Jun-Fos, Leucin Zipper, Cam ^R	Dr. Matthias Paschke
pCD87SA_Lib6.1A	pCD87SA mit C-hgBC-Bibliothek 6.1A	diese Arbeit
pCD87AB	pCD87SA mit modifizierter MCS, Cam ^R	diese Arbeit
pCD87AB_Lib13.1A2	pCD87AB mit hgBC-Bibliothek	diese Arbeit
pET23SP	Expressionsplasmid auf pET23d(+)-Basis mit modifizierter MCS, Kan ^R	NWG
pET23SP_Lib4.1A bis 8.1B	pET23SP mit C-hgBC-Bibliotheken (4-8 Positionen randomisiert)	diese Arbeit
pETSoSc1.2T7lac	Expressionsplasmid auf pET23d(+)-Basis zum Löslichkeitsscreen, T7 lac Promotor C-term. sfGFP-Fusion (Amber-Stop), Kan ^R	diese Arbeit
pETSoSc1.2T7lac_Lib13.1A2	pETSoSc1.2T7lac mit hgBC-Bibliothek	diese Arbeit
pET-SUMO-TNF	Expressionsplasmid mit SUMO-Fusion des humanen TNFa, Kan ^R	Hoffmann et al. (2010)
pInSALect_fs-1	Plasmid zur Leserahmenselektion, Amp ^R /Cam ^R	Schneider (2010)
pUC57_hgC-TG	Klonierungsvektor mit synthetischem hgBC-Gen, Amp ^R	TopGeneTechnology (Montreal, CND)

5.8 Mikroorganismen und Phagen

Für die Plasmidpropagierung und rekombinante Proteinherstellung wurden die in Tabelle 17 angeführten Mikroorganismen verwendet.

Tab. 17: Liste verwendeter Mikroorganismen und Phagen.

Stamm/Phage	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	<i>F ompT gal dcm lon hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5 -T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier und Moffatt (1986)
DH5 α	<i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)UI69, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	Institut für Genetik (Halle/Saale)
ElectroTen-Blue	<i>D(mcrA)183 (mcrB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r Hee [F' proABlacIq ZDM15::Tn10(Tet^R)]</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)
ER2738	<i>F' proA⁺ B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	NEB (Frankfurt/Main)

Stamm/Phage	Genotyp	Referenz
M13K07 (Phage)	M13 Phage mit der Mutation M40I in GenII, P15A Ori, Kan ^R	NEB (Frankfurt/Main)
NovaBlue(DE3)	<i>endA1 hsdR17(rK12–mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (DE3)F' [proA+B+ lacI qZΔ M15::Tn10] (Tet^R)</i>	Novagen GmbH
RosettaBlue 2(DE3) pLysS	<i>F – ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3) pLysSRARE 26(Cam^R)</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)
XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15::Tn10] (Tet^R)</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
XL10-Gold Kan ^R	<i>Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIq ZDM15::Tn10 (Tet^R) Tn5 (Kan^R) Amy Cam^R]</i>	Agilent Technologies (Waldbronn)

5.9 Geräte und Zubehör

Neben der Standardlaborausstattung wurden für die experimentellen Arbeiten nachfolgend aufgeführte Geräte verwendet (Tab. 18).

Tab. 18: Geräte- und Zubehörliste.

Gerät/Zubehör	Hersteller
<i>Absorptions-Spektrophotometer</i>	
UV-Vis Spektrophotometer DU 730	Beckman Coulter (Krefeld)
Präzisionsküvetten	Hellma (Müllheim)
<i>Autoklav</i>	
Systec V75	Systec (Wettenberg)
<i>CD-Spektrophotometer</i>	
Jasco J-810 Spekropolarimeter	Jasco (Groß-Umstadt)
Jasco PTC-423S Peltierelement	Jasco (Groß-Umstadt)
<i>Chromatographie</i>	
ÄKTA TM explorer	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ÄKTA TM xpress	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HisTrap TM HP (1 ml/5 ml)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiLoad [®] 16/60 Superdex [®] 75 prep grade	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiPrep TM 26/10 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
PD-10 Sephadex TM G25 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superloop TM 500 µl/10 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)

Gerät/Zubehör	Hersteller
Superose [®] 12 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<i>Elektroporation</i>	
Elektroporator ECM 630	BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA)
Elektroporationsküvetten (1 mm)	BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA), VWR International (Darmstadt)
<i>Geldokumentationseinheit</i>	
Bio-Vision 3000	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
<i>Gelelektrophorese</i>	
Electrophoresis Power Supply Consort EV261	Camlab (Cambridge, UK)
Electrophoresis Power Pack 200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Owl B1A-3 EasyCast Mini Gel (DNA)	Thermo Scientific (Langenselbold)
Xcell SureLock Novex Mini-Cell (Protein)	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Novex 4-12 % Bis-Tris Gradientengel (1 mm)	Invitrogen (Carlsbad, CA)
ClearPAGE [™] 16 % SDS-Gele	C.B.S Scientific (Del Mar, CA)
Criterion [™] 4-20 % Tris/HCl Gradientengel	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Gel Doc [™] EZ System (stain-free)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Criterion [™] Dodeca [™] Cell (Protein)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
<i>Inkubatoren</i>	
Binder Brutschrank Serie B	BINDER GmbH (Tuttlingen)
Heraeus BK 5060E-S (Inkubator)	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Innova 42R, 44R, 4230 (Schüttelinkubator)	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Memmert INB 400 (Inkubator)	Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach)
TiMix Control mit TH15 Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
<i>Laborroboter</i>	
Biomek 3000	Beckman Coulter (Krefeld)
Biomek FX	Beckman Coulter (Krefeld)
QPix2 (Colony Picker)	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
QTray Petrischalen (X6023)	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
<i>Mischgeräte</i>	
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Rollenmischer Stuart SRT9	Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
Rotationsschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Überkopfschüttler GFL 3025	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY)
<i>pH-Messgerät</i>	
inoLab pH720 (Elektrode: SenTix 81)	WTW GmbH (Weilheim)

Gerät/Zubehör	Hersteller
<i>Plattenlesegeräte/Plate Washer</i>	
Biomek Paradigm Multimode Reader	Beckman Coulter (Krefeld)
BioTek ELx405 Select (MTP washer)	Beckman Coulter (Krefeld)
DTX880 Multimode Reader	Beckman Coulter (Krefeld)
Fluorescence Intensity Detection Cartridge	Beckman Coulter (Krefeld)
<i>Sicherheitswerkbank</i>	
HeraSafe (Typ KS 12)	Thermo Scientific (Langenselbold)
<i>Thermocycler</i>	
Tpersonal	Biometra GmbH (Göttingen)
Lab Cycler Gradient 96	SensoQuest GmbH (Göttingen)
LightCycler 480	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
<i>Ultraschallgeräte</i>	
Vibra Cell VC750	Sonics & Materials (Newton, CT)
Sonotrode (3 & 6,5 mm)	Zinsser Analytic (Frankfurt/Main)
<i>Vakuumfiltrationseinheit</i>	
Ganz Glas-Vakuumfiltrationsgerät Pumpe Model Nr. 2522Z-02	Sartorius AG (Göttingen) Welch-Ilmvac (Sheboygan, WI)
<i>Waagen</i>	
Analysenwaage SI-234	Denver Instrument (Bohemia, NY)
Präzisionswaage SI-2002	Denver Instrument (Bohemia, NY)
MXX-412	Denver Instrument (Bohemia, NY)
MXX-2001	Denver Instrument (Bohemia, NY)
<i>Wasseraufbereitungsanlagen</i>	
Eismaschine Scotsman AF80	Cramer Gastronomie Systeme GmbH (Fuhlendorf)
TKA TM Micropure (Filteranlage)	Thermo Electron LED GmbH (Niederelbert)
Wasserbad Haake N3	HAAKE
<i>Zentrifugen</i>	
Allegra X-15R (Rotoren: FX-6100; SX-4750A)	Beckman Coulter (Krefeld)
Avanti J-26XP (Rotoren: JA-25.50; JA-8.100; JS-5.3)	Beckman Coulter (Krefeld)
Heraeus Biofuge Fresco 21	Thermo Scientific (Langenselbold)
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific (Langenselbold)
Galaxy Mini Mikrozentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Optima TM XL-I analytische Ultrazentrifuge (Rotor: An50Ti)	Beckman Coulter (Palo Alto, CA)

5.10 Sonstige Materialien

Alle zusätzlich benötigten Materialien sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Liste sonstiger Materialien.

Artikel	Bezugsquelle
96-deep well-Platten (PP, 2 ml)	Treff AG (Degersheim, CH)
96-well-Fluoreszenzplatten (PS, non-binding)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well MTP (PS)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well MTP (PP 0,5 ml; protein low bind)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well half deep MTP (PP)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well PD MultiTrap™ G-25 (PP, PE)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
96-well MTP (PP)	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
96-well MTP (PP, MediSorp™)	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
96-well Filterplatten (PET)	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
96-well LightCycler® 480 Platte (weiß)	Roche Applied Science (Mannheim)
96-well Immobilizer Streptavidin F96 clear	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
348-well MTP (PS)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
348-well Fluoreszenzplatten (PS, non-binding)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Abdeckfolien BREATHseal™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Abdeckfolien EASYseal™	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Aluminium Seal Tape	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
Dialysekapseln QuixSep®	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Dialyseschlauch Spectra/Por®7 (MWCO: 1 kDa)	Spectrum Laboratories (Ranch Dominguez, CA)
DNA-Exitus (+)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Dynabeads® M-270 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Einmalküvetten (PS)	VWR International (Darmstadt)
Immuno Tubes (MaxiSorp™)	Nalgene®Nunc™ (Rochester, NY)
Injektionskanülen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Kryogefäße (2 ml)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche Applied Science (Mannheim)
MagneSphere® Magnetic Separation Stand	Promega GmbH (Mannheim)
Membranfilter (PES; 0,22 µm)	PALL Corp. (Port Washington, NY)
Ni ²⁺ -NTA Sepharose™ HP	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Parafilm Pechinery	Plastic Packaging (Chicago, IL)
PD SpinTrap G-25	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Petrischalen (90/245 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
pH-Indikatorstäbchen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Pipettenfilter (10 µl) Millex LCR (0,2 µm)	Merck KGaA (Darmstadt)

Artikel	Bezugsquelle
Reagenz-Reservoir 25 ml (steril)	VWR (Dresden)
Reagenz-Reservoir 100 ml (steril)	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
Reaktionsgefäße ProteinLowBind (0,5 / 1,5 / 2ml)	Eppendorf AG (Hamburg)
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	TPP AG (Trasadingen, CH)
Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Unit (MWCO: 3,5 kDa)	Thermo Scientific (Langenselbold)
Spritzen BD Plastipak (1-50 ml)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Spritzenvorsatzfilter (0,44 µm)	TPP AG (Trasadingen, CH)
Vivaspin 20-Zentrifugalfilter (MWCO: 3 kDa)	Sartorius AG (Göttingen)
Vivaspin 4-Zentrifugalfilter (MWCO: 5 kDa)	Sartorius AG (Göttingen)
Vivaspin 500-Zentrifugalfilter (MWCO: 3 kDa)	Sartorius AG (Göttingen)
Wägebapier (90 x 115 mm)	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
Wägeschalen (PS)	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
Zellkulturröhrchen (14 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	TPP AG (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen blau (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen margenta (50 ml)	VWR International (Darmstadt)
ZipTip (Entsalzung)	Merck KGaA (Darmstadt)

5.11 Software

Die zur Auswertung bzw. experimentellen Planung herangezogene Software findet sich in Tabelle 20.

Tab. 20: Liste der verwendeten Software.

Programm	Quelle
BioEdit 7.0.9.0	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
BIO-ID 5.1.26	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Biomek Software/DART 3.3.14	Beckman Coulter (Krefeld)
Clone Manager™ 9	Scientific and Educational Software (Cary, NC)
Chromas Lite 2.01	http://www.technelysium.com.au
Image Lab (Release Candidate 2)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
LightCycler® 480 Software 1.5.0.39	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Multimode Analysis Software	Beckman Coulter (Krefeld)
ProtParam	http://www.expasy.org
PyMOL 0.99rc6	DeLano Scientific (South San Francisco, CA)
Qsoft XP Build 6600 rev2	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
SigmaPlot 11.0	Systat Software (Erkrath)
UNICORN™ 4.11 Control-Software	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Vector NTI Suite 10	Invitrogen (Carlsbad, CA)

5.12 Molekularbiologische Methoden

Dieser Abschnitt umfasst die wichtigsten molekularbiologischen Standardmethoden die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden.

5.12.1 DNA-Isolierung aus *E. coli* und Agarosegelen

Die Isolierung von Plasmiden aus Mikroorganismen erfolgte unter Verwendung der Silikamatrix-basierten Aufreinigungssysteme von Promega (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System; PureYield Plasmid Midiprep/Maxiprep System) in Kombination mit einer Mikrozentrifuge jeweils nach Herstellerangaben. Zur DNA-Elution wurden 35 µl bis 50 µl (Miniprep) bzw. 600 µl (Midi/Maxiprep) Nuklease-freies Wasser eingesetzt.

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelstücken (vgl. 5.12.4) kam ebenfalls ein Promega-Kit zum Einsatz (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System). Auch hierbei wurde den Herstellerangaben weitestgehend Folge geleistet. Abweichend zum Protokoll wurde der Durchlauf nach DNA-Bindung erneut aufgetragen (insgesamt drei Mal) und am Ende in 35 µl bis 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde das Eluat nochmals auf die Säule gegeben. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

DNA-Isolierung aus Agarosegelen durch Agaraseabbau

Sollten sehr kleine DNA-Fragmente (< 100 bp) aus Agarosegelstücken isoliert werden (vgl. 5.12.4), hierbei wurde eine *low melting point* Agarose (5,5 % Sieve GP) verwendet, so wurde Agarase (0,28 U pro 10 mg Gelstück) direkt zur verflüssigten Agarose (62 °C) gegeben und für gut 2,5 h unter wiederholtem Mischen bei 42 °C inkubiert (Thermomixer). Nach Zugabe von einem Drittel Volumen 10 M Ammoniumacetat wurde für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser mit 2,5 Vol. auf -20 °C vorgekühltem Ethanol (reinst) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz bei 21000 × g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen und das erhaltene Pellet mit 70 % (v/v) auf -20 °C vorgekühltem Ethanol (reinst) gewaschen. Es folgten ein erneuter Zentrifugationsschritt, wie oben beschrieben, Abnahme des Überstandes und Trocknung des Pellets bei 37 °C (Thermomixer). Dieses wurde zum Schluss in 10 bis 20 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

5.12.2 DNA-Spaltung und -Dephosphorylierung

Zu analytischen als auch präparativen Zwecken wurde DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt (vgl. Tab. 11). Es wurde hierbei stets nach Herstellerangaben verfahren, jedoch mit folgenden Abänderungen. Bei zirkulärer Plasmid-DNA wurde die doppelte der empfohlenen Menge an Enzym eingesetzt und im Falle von DNA-Fragmenten die vierfache Menge. Die Reaktion erfolgte für die meisten Enzyme bei 37 °C (z.B. SfiI von Roche 50 °C) im Thermocycler, anschließend wurden sie für 20 min bei 65 °C bzw. 80 °C (je nach Enzym) inaktiviert.

Zur Reduktion der Religandenzahl bei Ligationen wurden linearisierte Plasmide an den 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden dem Restriktionssansatz nach einer initialen Inkubationszeit von ca. 1 h bei 37 °C 0,25 U FastAP pro µg DNA zugesetzt und für mindestens 1 h bei 37 °C weiter inkubiert. Inaktiviert wurde die Phosphatase für 20 min bei 80 °C. Verdaut DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt (vgl. 5.12.4).

5.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnittene und elektrophoretisch gereinigte DNA-Fragmente wurden in Konzentrationen gemäß Herstellerempfehlung für Ligationen eingesetzt. Die molaren Verhältnisse von Vektor zu Insert variierten dabei zwischen 1:1 (für Klonierung der Bibliotheksfragmente) bis 1:3 (Standard-Ligationen), zudem wurde jedem Ansatz zusätzlich 1 mM ATP zugesetzt. Inkubationen erfolgten in der Regel bei 16 °C über Nacht, gefolgt von einer 20 minütigen Inaktivierung der Ligase bei 65 °C.

5.12.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Separation zur Analyse und Reinigung von Nukleinsäuren geschah mit Hilfe von Agarosegelen. Für präparative Gele wurde *genetic pure* Agarose (GP) verwendet. Je nach Trennleistung wurden unterschiedliche Konzentrationen des Polysaccharids eingesetzt: für Fragmente kleiner 100 bp 5,5 % (w/v), zwischen 100 bp bis 1000 bp 3 % (w/v) und größer 1000 bp 1 % (w/v) der für diesen Zweck geeigneten Agarose. Der Gellauf erfolgte in TAE-Puffer bei 95-120 V Ausgangsleistung für 50 bis 180 min. Vor ihrer Analyse mit dem BioVision 3000 Geldokumentationssystem wurden die Gele mindestens 30 min in frisch hergestellter Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) geschwenkt.

5.12.5 DNA-Fällung mittels Ethanol

Um DNA bei Bedarf einem zusätzlichen Reinigungsschritt zu unterziehen, oder gegebenenfalls zu konzentrieren, wurde eine Ethanol-basierte Fällung vorgenommen. Hierbei wurden der DNA-Lösung 2,5 Volumen vorgekühlter Ethanol (-20 °C; reinst) und 5 % (v/v) Glykogen zugesetzt, der Ansatz gemischt und für mindestens 1 h bei -80 °C inkubiert (für bessere Effizienz über Nacht). Anschließend wurde fortgefahren wie unter 5.12.1 (Abschnitt Agaraseabbau) bereits beschrieben. Je nach Bedarf wurde das DNA-Pellet in 10-50 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

5.12.6 Konzentrationsbestimmung von DNA- und Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von gereinigten DNA- und Proteinlösungen wurde die UV/Vis-Absorptionsspektroskopie angewandt (Layne, 1957). Für die Messungen wurden Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL (VWR, Darmstadt) verwendet. Basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 1) wurde die Konzentration der DNA ausgehend vom Extinktionswert bei 260 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der DNA-Präparation abgeschätzt werden. Durch Abzug des Wertes bei 320 nm erfolgte die Korrektur der eigentlichen Messwerte bezüglich der Lichtstreuung durch Aggregate, die bei dieser Wellenlänge nachzuweisen sind. Alle Werte sind zudem Puffer-korrigiert. Für doppelsträngige DNA wurde dabei als molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ein Wert von 0,02 µl / (ng · cm) eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989).

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 1})$$

E_{λ}	Extinktion bei Wellenlänge λ
ε_{λ}	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Analyten bei Wellenlänge λ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
c	Konzentration des Analyten (mol/l)
d	Schichtdicke (cm)

Sollte die Konzentration von Proteinlösungen ermittelt werden, so wurde ein Absorptionsspektrum von 220 nm bis 330 nm aufgenommen. Da aromatische Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) in diesem Bereich absorbieren, das Absorptionsmaximum für Tryptophan liegt dabei bei 280 nm, konnte die Konzentration basierend auf dem 280 nm-Wert berechnet werden. Der molare Extinktionskoeffizient der Proteine wurde über das *tool* ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>; Gasteiger *et al.*, 2005; Gill und von Hippel,

1989) berechnet. Es wurde ansonsten vorgegangen wie zuvor für DNA-Lösungen beschrieben.

5.12.7 DNA-Sequenzierung und Analyse

Einzelproben-Sequenzierungen von Plasmiden oder PCR-Produkten wurden bei der Firma Qiagen (Hilden) in Auftrag gegeben. Für Sequenzierungen im MTP-Format (96-well) wurden Agar-Stichkulturen entsprechender Klone angelegt und diese zu GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte über die Programme Clone Manager 9, BioEdit und Chromas Lite (vgl. Tab. 20).

5.12.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, sowie deren Modifikation, wurde die PCR angewendet (Mullis *et al.*, 1986). Je nach Zielsetzung kamen unterschiedliche Polymerasen (*Taq*-, *Pfu*- und *Phusion*-DNA-Polymerase) zum Einsatz, deren Reaktionsbedingungen individuell auf DNA-*template* und Primer ausgerichtet wurden. Die Konzentrationen der Einzelkomponenten der PCR-Reaktion entsprachen dabei den jeweiligen Herstellerangaben. Als anschauliches Beispiel soll hier eine PCR mit *Phusion*-DNA-Polymerase dienen.

Initiale Denaturierung:	30 s bei 98 °C		20-30 Zyklen
Denaturierung:	10 s bei 98 °C		
Annealing:	30 s bei 55-65 °C		
DNA-Synthese:	10-20 s pro 1 kb bei 72 °C		
Finale DNA-Synthese:	5 min bei 72 °C		

Das Amplifikat wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls gereinigt. Bei einer Kolonie-PCR wurde eine Kolonie mittels Zahnstocher von einer Agar-Platte in einen vorbereiteten PCR-Ansatz überführt und parallel eine Übernachtskultur angeimpft.

5.13 Mikrobiologische Methoden

Mikrobielle Techniken zur Erzeugung und Propagierung transgener Organismen sollen nachfolgend beschrieben werden.

5.13.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*

Für kurzzeitige Arbeiten (4 bis 6 Wochen) wurden *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika vermehrt. Bei längerer Lagerung wurden ausgehend von Einzelkolonien Kryokulturen angelegt. Hierfür wurden Aliquote von Übernachtskulturen mit

18-20 % (v/v) Glycerin (Endkonzentration) versetzt und bei -80 °C gelagert. Aus Kryokulturen oder von LB-Agarplatten wurden 3-5 ml LB-Medium (14 ml-Kulturröhrchen), adäquates Antibiotikum enthaltend, mit Einzelklonen inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm für 7-14 Stunden im Schüttelinkubator angezogen. Diese Flüssigkulturen dienten sowohl als Vorkultur für Expressionskulturen, als auch zur Plasmidisolation.

5.13.2 Herstellung kompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen

Ein Liter antibiotikahaltiges 2 x YT-Medium wurde mit 10 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm in einem 3 l-Schikanekolben bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$ wachsen gelassen. Danach wurde die Kultur für mindestens 1 h auf Eis abgekühlt. Alle nachfolgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen ebenfalls auf Eis statt. Nach Abkühlung wurde für 10 min bei $3000 \times g$ und 4 °C pelletiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die Zellen in 0,4 Volumen eiskaltem bidestillierten Wasser unter langsamem Schwenken des Zentrifugenbechers resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wiederholt in 0,4 Volumen eiskaltem 10 %igen Glycerin unter Schwenken resolubilisiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit 10 %igem Glycerin (0,2 und 0,04 Volumen), letztlich wurde das Pellet in 0,001 Vol. eiskaltem 10 %igen Glycerin aufgenommen, die OD_{600} gemessen und die Zellen zu je 40 µl aliquotiert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden sie bei -80 °C gelagert.

Chemisch kompetente Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Inoue *et al.* (1990). 100 ml LB-Medium (500 ml-Schikanekolben), versetzt mit entsprechendem Antibiotikum, wurde mit 1-2 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 25 °C und 200 rpm bis zu einer maximalen OD_{600} von 0,6 angezogen. Sogleich wurde die Kultur auf Eis abgekühlt - alle nachfolgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen ebenfalls auf Eis statt. Nach Zentrifugation für 10 min bei $2500 \times g$ und 4 °C, gefolgt vom Abtrennen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 20 ml eiskaltem TB-Puffer, erfolgte die Inkubation der Suspension für 10 min auf Eis. Der obige Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, das Pellet in 4 ml eiskaltem TB-Puffer gelöst, mit final 7 % (v/v) DMSO vermischt und für erneute 10 min auf Eis inkubiert. Schlussendlich wurden die Zellen zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.13.3 Transformation von *E. coli*

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein gemäß Abschnitt 5.13.2 präpariertes Aliquot wurde auf Eis aufgetaut, mit 5-10 ng Plasmid-DNA oder 2-5 µl Ligationsreaktion vermischt und für mindestens 10 min auf Eis belassen. Es folgten ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C (Thermomixer), eine mindestens 10-minütige Inkubation auf Eis und das Vermengen dieser Suspension mit 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium (37 °C). Dieses Gemisch wurde daraufhin für 45 min bei 37 °C und 220 rpm im Inkubator geschüttelt. Je nach Anwendung wurden 100-1000 µl der Zellsuspension auf Selektivmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Für die Transformation der einzelnen Genmodule des hgBC (vgl. 5.14.1.2) wurden kommerziell erworbene XL10-Gold-Zellen verwendet (vgl. Tab. 17). Zellaliquote wurden auf Eis aufgetaut, zu je 40 µl subaliquotiert, dann je 1,6 µl mitgelieferte β-Mercaptoethanol-Mischung hinzugesetzt und alle 2 min mischend für insgesamt 10 min inkubiert. Danach wurden 2 µl Ligationsansatz zugegeben, für 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C durchgeführt. Nach zweiminütiger Inkubationszeit auf Eis wurden 900 µl vorgewärmtes NZY⁺ (42 °C) zugemischt und der Ansatz für 50 min bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Abschließend wurde die gesamte Suspension auf Carbenicillin-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden mit 5-7 ml LB-Carbenicillin von der Platte geschwemmt und die Plasmide daraus isoliert.

Transformation elektrokompenter Zellen

Ein gemäß Abschnitt 5.13.2 präpariertes Aliquot wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 ng Plasmid-DNA bzw. 14,5 ng Ligationsansatz (für Bibliothekserstellung) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) überführt. Am Gerät wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

Spannung: 1800 V (Standard) / 2250 V (ElektroTen-Blue)

Widerstand: 200 Ω

Kapazität: 25µF.

Nach der Elektroporation wurden die Zellen umgehend in 960 µl vorgewärmtes SOC-Medium (37 °C) gebracht und für 50 min bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Auf Selektivmedium plattiert wurden hierbei jeweils 100 µl bei Plasmid-DNA bzw. 1 ml bei Ligationsreaktionen mit anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C.

5.13.4 Transgenexpression im Schüttelkolben

Zur Proteinherstellung diente das T7-RNA-Polymerase-basierte pET-Expressionssystem (Studier und Moffatt, 1986) in Kombination mit den Stämmen BL21(DE3), RosettaBlue 2(DE3) und NovaBlue(DE3). Hierfür wurden Schikanekolben (1 l, 3 l, 5 l) mit maximal 10 % ihres Totalvolumens mit antibiotikahaltigem ZYM-5052-Medium (Studier, 2005) befüllt und 1:100 mit der entsprechenden Vorkultur beimpft. Nach Inkubation für 20-24 h bei 37 °C und 220-250 rpm folgten OD₆₀₀-Bestimmung und Zellernte bei 3500 × g und 4 °C für 10 min. Die Biofeuchtmasse wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die chromatographische Reinigung wurden die aufgetauten Zellen in 5 ml NPI-20 pro g Biofeuchtmasse resuspendiert und mit 200 µg/ml Lysozym und 400 µM PMSF versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf dem Rollenmischer bei Raumtemperatur und anschließend eine Ultraschallbehandlung (bei 4 °C) bei der 5 x für 30 s bei einer Amplitude von 40 % beschallt und zwischendurch je 30 s pausiert wurde. Als bald wurden 2 mM MgSO₄ und 10 U/ml Benzonase hinzugefügt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Mit dem abschließenden Zentrifugationsschritt (50000 × g, 30 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer und Aggregate vom löslichen Überstand abgetrennt und dieser für die spätere chromatographische Reinigung eingesetzt.

5.13.5 Transgenexpression in 96-well-Platten

Zur parallelen Analyse einer Vielzahl an Varianten diente das 96-well-Expressionsformat. Mittels eines Colony Pickers (QPix2) wurde die gewünschte Anzahl an Varianten von Selektiv-Agarplatten (1 % Glukose enthaltend) gepickt und in eine 150 µl pro well LB-Medium (mit Antibiotikum und 1 % Glukose) enthaltende MTP (Nunc, Dänemark) überführt. Die MTP wurde mit einer luftdurchlässigen Folie (BREATHseal, Sigma-Aldrich) versiegelt. Je nach Stamm vermehrten sich die Zellen für 7-12 h bei 37 °C und 760 rpm (Bühler Schüttler) und dienten damit durch Überführung von 2 µl zum Animpfen der Hauptkultur (200 µl pro well ZYM-5052-Medium plus adäquatem Antibiotikum in Nunc-MTP), oder durch Zugabe von 18-20 % Glycerin (Endkonzentration) zur Herstellung von Kryokulturen. Die Hauptkultur schüttelte für 20-24 h bei 37 °C und 760 rpm (ggf. OD-Bestimmung) und wurde schließlich durch Zentrifugation für 30 min bei 4500 × g und 4 °C geerntet, der Überstand abgegossen und die Platten auf Zellstoffpapier ausgeklopft. Die Platten wurden mit Alufolie (Nunc, Dänemark) versiegelt und bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Bei Varianten die sich mit der zuvor erwähnten Methode nicht, bzw. nur in unzureichenden Mengen, herstellen ließen kam das sogenannte EnBase Flo-Medium (Panula-Perälä *et al.*, 2008), das als komplettes Kit durch die Firma BioSilta Oy (Uulu, Finnland) vertrieben wird, zum Einsatz. In diesem Medium werden durch kontrollierte, enzymatische Glukosefreisetzung stabile Wachstumsbedingungen erzeugt mit denen höhere Proteinausbeuten zu realisieren sind. Ausgehend von Kryokulturen wurde hierfür eine Vorkultur zu 150 µl LB-Medium (plus 1 % Glukose und adäquaten Antibiotika) je Kavität beimpft und für 7-8 h bei 37 °C und 750 rpm, verschlossen mit einer luftdurchlässigen Folie, inkubiert (Bühler Schüttler). Für die Hauptkultur wurden 100 ml EnBase Flo-Medium mit 0,2 ml Thiamin, 0,2 ml Magnesium und 50 µl EnZ I'm versetzt und zu 200 µl je Kavität in der Platte verteilt (MTP von Nunc). Das Medium wurde daraufhin mit 2 µl der Vorkultur inokuliert, wieder mit einer Luft-permeablen Folie versehen und für 20 h bei 30 °C und 1000 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein 10-fach konzentrierter Booster-Mix hergestellt für den zur fertigen Booster-Lösung (9 ml) 100 µM IPTG und 100 µl EnZ I'm gegeben wurden. 20 µl dieser Lösung wurden in jede Kavität der Hauptkultur gegeben, die Platte erneut versiegelt und für weitere 24 h bei 30 °C und 1000 rpm inkubiert. Die Zellernte und Lagerung der Pellets erfolgte analog der Beschreibung im vorherigen Abschnitt.

Je nach Anzahl der Platten erfolgte der Zellaufschluss manuell, oder per Laborroboter (Biomek 3000, Biomek FX). Für ELISA- und SDS-PAGE-Analysen wurden die aufgetauten Zellen in 160 µl Zellaufschlusspuffer II (vgl. 5.2 Tab. 8) pro Kavität resolubilisiert, die Platten mit einer dichten Alufolie verschlossen und für 30 min bei 25 °C und 750 rpm im Thermomixer geschüttelt. Danach folgten insgesamt drei Frier-Tau-Zyklen bei denen die Platte zuerst für ca. 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann für ca. 20 min bei 37 °C und 750 rpm wieder aufgetaut wurde. Nun wurde für 45 min bei 4500 × g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand (lösliches Lysat) in eine *half deep* MTP (Greiner, 1 ml) überführt und wie unter 5.15.2.1 dargestellt weiter verarbeitet. Das Sediment (unlösliches Lysat) wurde mit 150 µl/Kavität PBS gewaschen und abschließend in 150 µl/Kavität PBS (bei Expressionen mit sfGFP-Fusion) oder Pelletresuspensionspuffer (bei Expressionen ohne Fusion; vgl. 5.2 Tab. 8) aufgenommen. Für den Hit-ELISA wurden 50 µl der löslichen Fraktion verwendet.

Bei Proteinreinigungen im 96-*well*-Format wurde der Zellaufschlusspuffer I (vgl. 5.2 Tab. 8) verwendet, da hier noch die spezifische Bindung an die Sepharose gewährleistet sein muss. Die restlichen Schritte sind äquivalent zu den im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen, lediglich die Aufarbeitung der unlöslichen Fraktion entfiel.

5.14 Evolutionäre Selektion durch TAT-Phagen-*display*

Die Durchmusterung von Proteinbibliotheken nach Varianten mit gewünschten Eigenschaften kann u. a. durch die Nutzung evolutionärer *in vivo* oder *in vitro* Selektionsmethoden, wie dem Ribosomen- oder Phagen-*display*, realisiert werden. Entscheidend hierfür ist die Kopplung von Geno- und Phänotyp, um die selektierte Eigenschaft weiter nutzbar zu machen. Beim Phagen-*display* werden Proteinvarianten auf der Phagenoberfläche präsentiert, wobei die dazugehörige genetische Information im Inneren des Phagen vorliegt (Smith, 1985). Die Selektion von Varianten wird durch Affinität zur immobilisierten Zielstruktur gewährleistet. Durch geeignete Elutionsverfahren werden die Phagen abgelöst und mit ihnen *E. coli*-Zellen für eine neue Selektionsrunde infiziert. Nach jeder Runde kann die evolvierte DNA-Bibliothek zur weiteren Analyse in einen Expressionsvektor subkloniert werden.

5.14.1 Erstellung von Kristallin-DNA-Bibliotheken für das Phagen-*display*

Um zu untersuchen inwieweit sich die Interdomänen-Kontaktfläche des hgBC als Paratop eignet, wurden Einzeldomänen-DNA-Bibliotheken für die N-terminale (Schneider, 2010) und C-terminale Domäne (vgl. 5.14.1.1) des Proteins erstellt, deren Selektion der sequenziellen Multimerisierung und damit putativer Affinitätserhöhung dienen sollte. Eine einfache Kombination zweier unterschiedlicher Einzeldomänen-Bibliotheken kann dabei schon über das natürliche *linker*-Peptid gewährleistet werden. Computergestützte Modellierung (PyMOL) und BLAST-Analysen (konservierte Reste) führten zur Auswahl geeigneter randomisierbarer Reste in räumlicher Nähe zur natürlichen Bindestelle, welche in der Einzeldomäne eine zusammenhängende, lösungsmittlexponierte Fläche darstellen sollten.

Als zweiter Ansatz wurde die parallele Multimerisierung verfolgt, bei der das Volllängen-hgBC als Startpunkt diente und nunmehr die inneren Faltblätter beider Domänen randomisiert wurden (vgl. 5.14.1.2). Um eine bessere Zugänglichkeit des Paratops zu gewährleisten, wurde zudem ein verlängertes *linker*-Peptid zwischen beide Domänen eingefügt. Die Randomisierungspositionen korrespondieren mit denen der Einzeldomänen.

5.14.1.1 NNK-basierte Bibliotheken der C-terminalen Domäne

Wie bereits für die N-hgBC (Schneider, 2010) sollte auch für die C-hgBC getestet werden, wieviel Aminosäureaustausche das *scaffold* ohne nennenswerte Einbußen in Stabilität und Löslichkeit verträgt. Hierzu wurden fünf DNA-Bibliotheken generiert, die an vier bis acht Aminosäurepositionen mutiert waren. Als Ausgangspunkt diente ein synthetisches Gen der

Firma TOP Gene Technologies (Kanada), dessen DNA-Sequenz für die Expression in *E. coli* optimiert wurde (Geneart, Regensburg). Die Erstellung der C-hgBC-Bibliotheken und somit die Einführung von zufälligen Mutationen erfolgte PCR-basiert über NNK-enthaltende Oligodesoxynukleotide. Die Nutzung von NNK-Motiven reduziert dabei die abzudeckende DNA-Variabilität (von 64 auf 32 Codone), bei gleichzeitigem Erhalt der Aminosäure-Variabilität und dem Wegfall zweier Stopp-Codone (vgl. 5.6 Tab. 13 und 14).

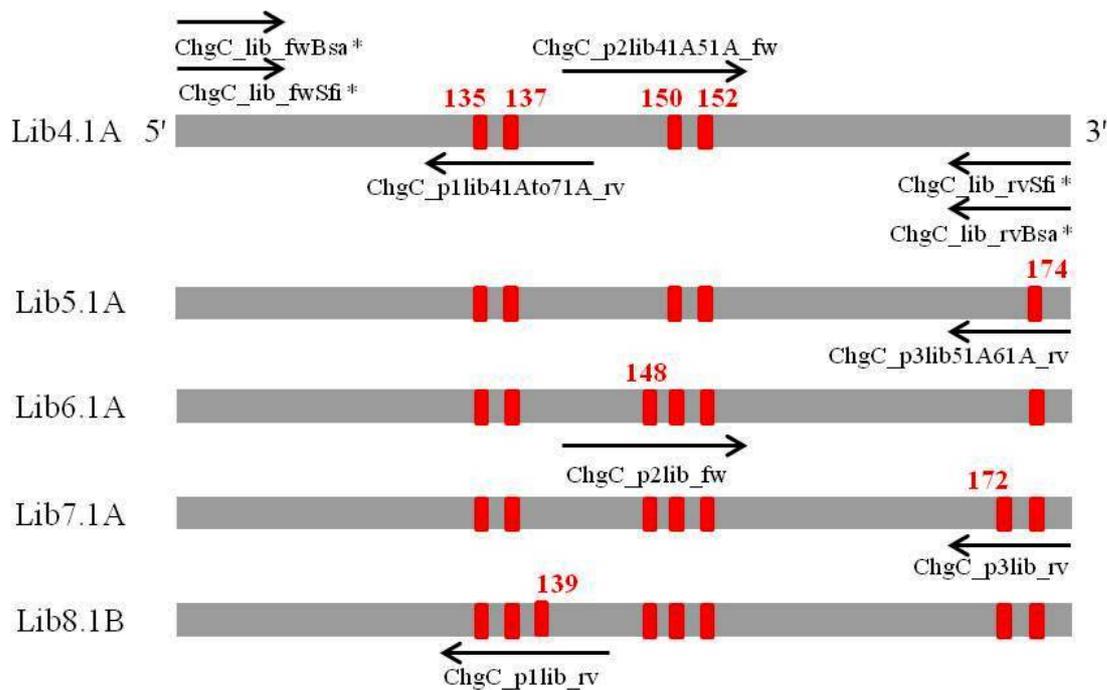


Abb. 26: Generierung der C-hgBC-DNA-Bibliotheken. Das C-hgBC-Gen ist als blauer Balken dargestellt, die über entsprechende Primer (schwarze Pfeile) eingebrachten NNK-Motive in rot, jeweils mit entsprechender Nummerierung (auf Position im modularen Vollängenprotein bezogen) für die kodierte Aminosäure. Die inneren Primer enthalten je eine *BsaI*-Schnittstelle, über welche die beiden entstehenden PCR-Fragmente per simultaner Restriktions-Ligations-Reaktion verbunden werden. Die äußeren Primer, die keine NNK-Motive enthalten (mit * gekennzeichnet), sind zusätzlich mit Restriktionsschnittstellen (*SfiI* und *BsaI*) für die Subklonierung des Gens versehen. Der Verdau des mit C-hgBC_lib_fwBsa und C-hgBC_lib_rvBsa amplifizierten Produktes mit *BsaI* führt dabei zu *NcoI/XhoI*-kompatiblen Überhängen.

Der Aufbau des teilrandomisierten Gens geschah durch zwei überlappende PCR-Reaktionen mit *Pfu*-DNA-Polymerase (Abb. 26), wobei die Produkte mittels präparativer Agarosegelelektrophorese (vgl. 5.12.1 und 5.12.4) gereinigt wurden. Die Verknüpfung beider Fragmente geschah über die *TypIIS*-Restriktionsendonuklease *BsaI*, deren Schnittstelle an den 5'-Enden der jeweiligen inneren Primer lokalisiert war, als simultane Restriktions-Ligations-Reaktion. Die Reaktionsbedingungen der Assemblierungs-PCR richteten sich stets nach den Angaben des Herstellers der Polymerase (*hot start*-PCR durchgeführt) und standen unter der Prämisse, dass die eingesetzten Primer-Mengen, und in allen nachfolgenden Schritten auch dsDNA-Mengen, eine mindestens 100-fache Abdeckung der theoretisch möglichen Bibliotheksgröße

sicherstellten. Für spätere Analysen bezüglich Funktionalität (DNA/Protein), Löslichkeit und Stabilität wurden die Bibliotheken über die eingebrachten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pET23SP subkloniert (vgl. 5.7 und Tab. 16). Die anhand dieser Voruntersuchungen ausgewählte Bibliothek Lib6.1A wurde zur Selektion im TAT-Phagen-*display* über *Sfi*I in das *phagemid* pCD87SA kloniert (vgl. 5.7 Tab. 16 und 5.14.2).

5.14.1.2 Trinukleotid-basierte Vollängenbibliothek

Mit den Ergebnissen der vorangegangenen Analysen der N-hgBC- (Schneider, 2010) und C-hgBC-Bibliotheken wurde nun eine Vollängen-Bibliothek konstruiert, mit sieben randomisierten Positionen innerhalb der N-terminalen und sechs in der C-terminalen Domäne. Um die Funktionalität dieser Bibliothek nochmals deutlich zu erhöhen sollte eine gekoppelte Methode aus der Verwendung von Oligodesoxynukleotiden mit vorsynthetisierten Trinukleotidbausteinen und anschließender Leserahmenselektion zum Tragen kommen. Der hieraus resultierende modulare Aufbau der Vollängen-hgBC-Bibliothek folgte den ausführlichen Darstellungen der Arbeiten von Marian Schneider (2010) und soll hier aus diesem Grund nur kurz zusammengefasst werden.

Die Domänen wurden erst einzeln modular assembliert, bevor sie im Anschluss über das Linker-Peptid (hgBC_LF-SG4) zusammengeführt wurden. Da immer jeweils drei der zu mutierenden Reste auf einem β -Strang liegen, erfolgte die Unterteilung jeder Domäne in je drei die Randomisierungspositionen tragenden Fragmente, folglich RB-Fragmente 1-3 genannt (*randomized β -sheets*), und die sie verbindenden IF-Fragmente (*intermediate fragments*). Den 5'- und 3'-*cap*-Bereich des Gens bildeten das Start- (SF) und Endfragment (EF) (vgl. 2.2.2 Abb. 13). Im Falle der N-terminalen Domäne stellte das Endfragment das Linker-Fragment (hgBC_LF-SG4) dar, durch das beide Domänen am Ende verbunden wurden. Tabelle 21 fasst die einzelnen Genabschnitte noch einmal zusammen. Um alle Fragmente untereinander verknüpfen, sowie in den Leserahmenselektions-Vektor (pInSAlect-fs_-1) klonieren zu können, erhielten sie zusätzliche 5'- und 3'-DNA-Sequenzen. Die Schnittstellen für *Age*I und *Mlu*I wurden dabei zur Klonierung in pInSAlect_fs_-1 verwendet (vgl. Abb. 27). Durch die Überlappung benachbarter Fragmente (sechs Basenpaare) und den Einsatz der *Typ*II-S-Restriktionsschnittstellen für *Bsa*I und *Esp*3I konnten die Moduleinheiten untereinander ligiert werden. Ausgehend von den Oligodesoxynukleotiden (vgl. 5.6) wurden die Einzelfragmente beider Domänen zusammengesetzt. Dabei konnten die nicht randomisierten Fragmente (IFs, EFs, Linker-Peptid), nebst entsprechender Einzelstrangüberhänge für ihre Subklonierung in den

Leserahmenselektions-Vektor, durch direkte Hybridisierung ihrer komplementären Oligodesoxynukleotide („fw“ und „rv“) gewonnen werden. Die Start-Fragmente wurden über PCR aus Vektoren reamplifiziert die das entsprechende Wildtypgen für die Domäne trugen. Doppelsträngige randomisierte Fragmente (N/C-hgBC_i-RB1-RB3_fwd) entstanden aus einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment (exo⁻), mit den Oligodesoxynukleotiden N-hgBC_i-lib_rev bzw. C-hgBC_i-lib_rev als Startpunkt (vgl. 5.6).

Tab. 21: Sequenzfragmente für die Assemblierung der hgBC-Bibliothek. Die angegebene Nummerierung der Sequenzabschnitte bzw. Positionen bezieht sich auf die Aminosäuresequenz ohne Start-Methionin. Die Abkürzungen der Fragmente finden sich im Text.

Sequenzfragment	Sequenzabschnitt	Anzahl randomisierter Positionen
N-hgBC_SF	1-40	-
N-hgBC_RB1	39-47	2 (Ser41, Met43)
N-hgBC_IF1	46-53	-
N-hgBC_RB2	52-60	3 (Gln54, Phe56, Arg58)
N-hgBC_IF2	59-76	-
N-hgBC_RB3	75-83	2 (Ser79, Ile81)
hgBC_LF-SG4	82-93	-
C-hgBC_SF	92-134	-
C-hgBC_RB1	133-141	2 (Ser135, Ile137)
C-hgBC_IF1	140-147	-
C-hgBC_RB2	146-153	3 (Gln148, Leu150, Arg152)
C-hgBC_IF2	152-169	-
C-hgBC_RB3	168-176	1 (Val174)
C-hgBC_EF	175-181	-

Amplifizierte Startfragmente und aufgefüllte randomisierte Fragmente konnten über *AgeI/MluI* in den entsprechend geschnittenen Vektor pInSAlect_fs-1 integriert werden. Die Selektion auf den korrekten Leserahmen der *inserts* erfolgte durch Transformation der Vektoren in XL10Gold Kan^R-Zellen (vgl. 1.2, Schneider 2010, Gerth *et al.* 2004). Die entsprechenden Plasmide wurden aus abgeschwemmten Zellen isoliert und die *inserts* (Einzelmodule) über PCR (ModLibs_fwd/ModLibs_rev) reamplifiziert. Die Zusammensetzung der Gesamtbibliothek, als auch des dazugehörigen Wildtyp-Pendants, ausgehend von diesen PCR-Produkten ist in Abbildung 27 dargestellt.

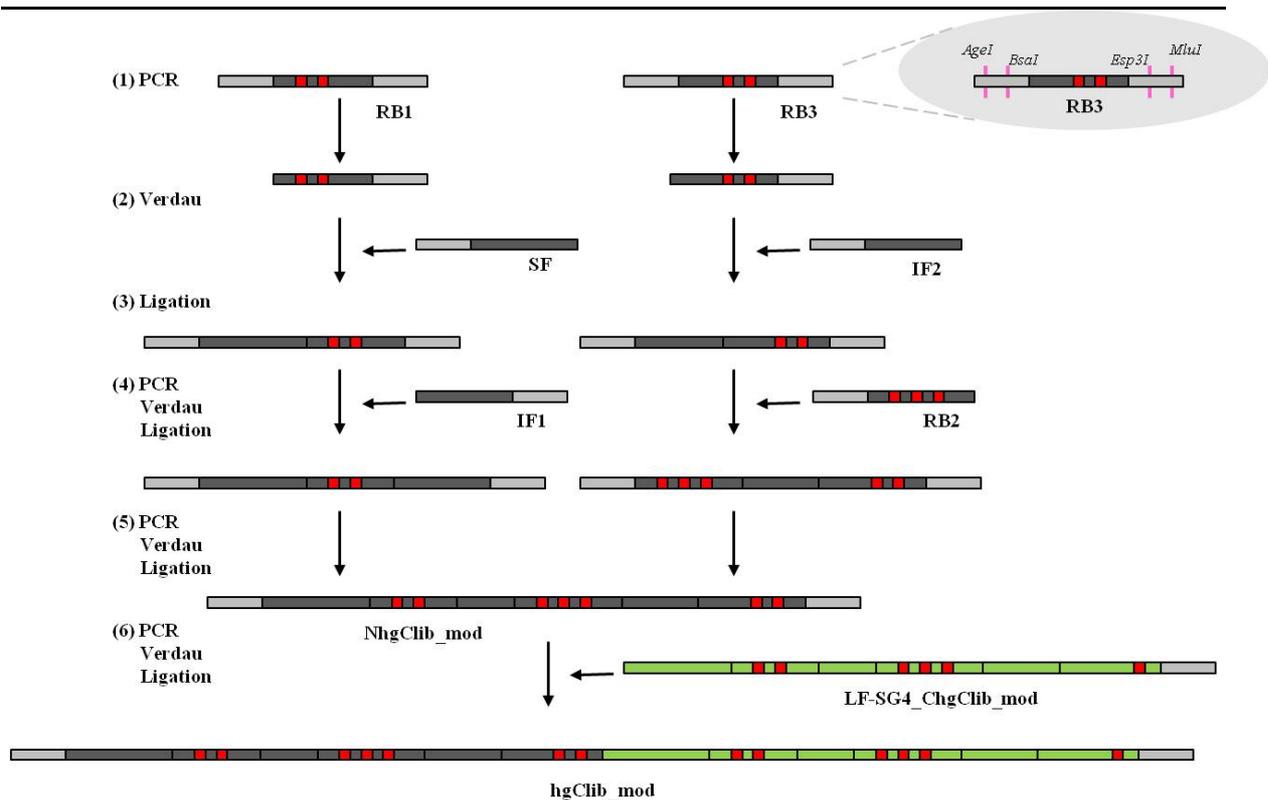


Abb. 27: Zusammensetzung der Module zur Vollängen-hgBC-Bibliothek. Aus den auf korrekten Leserahmen selektierten Plasmiden wurden die *inserts* reamplifiziert (1), 5' mit *BsaI* oder 3' mit *Esp3I* geschnitten (2) und mit den in der kodierenden Sequenz benachbarten DNA-Abschnitten ligiert (3). Zwei weitere Zyklen aus PCR, Verdau und Ligation (4, 5) führten schließlich zu vollständig assemblierten Varianten der N-terminalen Domäne (N-hgBClib_mod) (5). Die analog zusammengesetzte C-terminale Domäne (LF-SG4_C-hgBClib_mod, enthält schon das Linker-Peptid) wurde abschließend mit der N-hgBC-Bibliothek ligiert (6). Vereinfacht sind die RB-Fragmente nur als einzelne Balken dargestellt, symbolisieren jedoch eine Mischung verschiedener Varianten. hellgrau: Vektor-komplementäre DNA-Sequenzen (pInSAlect) die Schnittstellen für die Klonierung enthalten (siehe kleines Bild oben rechts) und Bindestellen für die *primer* aller PCR-Schritte; dunkelgrau: kodierende Sequenz der N-hgBC; grün: kodierende Sequenz der C-hgBC; rot: randomisierte Codone.

Die eingesetzten DNA-Mengen für jeden Teilschritt der Assemblierung stellten immer die mindestens 100-fache Abdeckung der zu erreichenden theoretischen Bibliotheksgröße sicher. Als Ausnahme konnte im finalen Schritt der Ligation von modularer N-hgBC und C-hgBC kein vollständiges Abbild der Bibliothek erzielt werden (nur 0,022 % abgedeckt), da die theoretisch mögliche Bibliotheksgröße DNA-Mengen im Milligramm-Bereich entspräche (vgl. 2.2.4). Über die angefügten *AgeI*- und *BamHI*-Schnittstellen konnte die Vollängen-hgBC-Bibliothek für die Selektion in den *display*-Vektor pCD87AB und für Expressionsanalysen in pETSoScT7lac1.2 kloniert werden (vgl. 5.7 Tab. 16 und Anhang Abb. A1).

5.14.2 Selektion der Bibliothek(en) gegen humanes TNF α

Die assemblierte Einzeldomänen- (5.14.1.1) bzw. Vollängen-Bibliothek (5.14.1.2) wurde für die Selektion gegen das Zielmolekül humanes TNF α in das *phagemid* pCD87SA (C-hgBC-Lib6.1A) bzw. pCD87AB (hgBC_Lib13.1A) kloniert (vgl. 5.7 und Anhang Abb. A1). Dabei wurden 1 μg ($3,2 \times 10^{12}$ Varianten entsprechend) Bibliotheksfragment mit 5,25 μg pCD87SA, respektive 4 μg ($6,7 \times 10^{12}$ Varianten) mit 10,6 μg pCD87AB bei 16 °C über Nacht ligiert und die gereinigten Ansätze in zwei Schritten transformiert. Zuerst in elektrokompetente ElectroTen-Blue (vgl. 5.13.3), da diese eine höhere Transformationseffizienz bezüglich Ligationsprodukten aufweisen als andere Stämme, im Gegenzug aber keinen F'-Pilus zur Phageninfektion tragen. Nach Abschwemmen der Zellen und Isolation der Plasmide erfolgte im zweiten Schritt die Transformation in zur Phagenpropagierung geeignete elektrokompetente ER2738 (tragen F'-Pilus). Die erhaltenen Kolonien wurden erneut von den Q-Trays mit LB_{Cam} abgeschwemmt und davon Kryokulturen (vgl. 5.13.1) in Aliquoten zu je 1 ml angelegt. Die nachfolgend beschriebenen Phagen-*Display*-Zyklen verliefen, sofern nicht anders erwähnt, für beide Bibliotheken analog und sollen hier nur für die Vollängen-Bibliothek dokumentiert werden. Eine Übersicht zu den Zyklen und etwaige Unterschiede sind in Tabelle 22 zusammenfassend dargestellt.

Runde 1 Phagen-Display

Ausgehend von den Kryokulturen der naiven Bibliothek (hgBCLib13.1A_pCD87AB in ER2738) wurden 1 l 2 x YT_{Cam} mit $1,2 \times 10^{11}$ Zellen (Zellzahl sollte rund 100-Mal höher sein als reale Bibliotheksgröße, vgl. 2.2.4) auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin auf Eis auf 26 °C zur Infektion mit $2,4 \times 10^{12}$ Helferphagen (M13K07, MOI = 20) abgekühlt und danach für 30 min bei 26 °C und 50 rpm weiter inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Kanamycin (1000-fach konzentriert) folgte eine erneute Inkubationszeit von 30 min bei nun 26 °C und 220 rpm. Durch Zentrifugieren für 20 min bei $3500 \times g$ und 4 °C wurden die überschüssigen Phagen abgetrennt und das Bakterienpellet in 1 l auf 26 °C temperiertes 2 x YT_{Cam,Kan,Tet} ($C_{\text{end Tet}} = 0,1 \mu\text{g/ml}$) resuspendiert. Die anschließende Phagenproduktion erfolgte für 16-18 h bei 26 °C und 220 rpm. Die Zellen wurden für 15 min bei $12200 \times g$ und 4 °C geerntet und der Überstand, der die Phagenpartikel enthält, in neue Zentrifugenbecher überführt und wie zuvor zentrifugiert. Zum Überstand aus dem letzten Zentrifugationsschritt

wurden anschließend $\frac{1}{4}$ Vol. eiskaltes PEG/NaCl gegeben, gut gemischt und das Ganze für mindestens 1 h bei 4 °C ruhen gelassen.

Tab. 22: Selektionsstrategie der Vollängen- (hgBC_Lib13.1A) und der Einzeldomänen-Bibliothek (C-hgBC_Lib6.1A) gegen TNF α .

Rd	Konz. Zielmolekül [nM]	Präsentation	Vol. beads [μ l]	Pre-panning	Waschen
Lib13.1A					
1	1000	Dynabeads M280	328	30 min gegen beads	2x PBST(0,05) / 1x PBS
2	1000	Dynabeads M270	328	30 min gegen beads	2x PBST(0,05) / 1x PBS
3	250	Dynabeads M270	81	30 min gegen beads	2x PBST(0,05) / 1x PBS
4	250	Dynabeads M270	81	30 min gegen beads	3x PBST(0,05) / 1x PBS
5	50	Dynabeads M270	16,4	30 min gegen beads	3x PBST(0,05) / 1x PBS
Lib6.1A					
Rd	Konz. Zielmolekül [nM]	Präsentation	Vol. beads [μ l]	Pre-panning	Waschen
1	320,4 nM	Immuno Tube (Maxi)	-	nein	5x PBST(0,05) / 2x PBS
2	192,2 nM	Immuno Tube (Maxi)	-	nein	10x PBST(0,05) / 2x PBS
3	384,5 nM	Strep-Platte	-	nein	10x PBST(0,05) / 10x PBS
4	50,5 nM	Dynabeads M720	80	1 h gegen beads	15x PBST(0,05) / 10x PBS

Anschließend wurde erneut zentrifugiert, die resultierenden Phagenpellets in 50 ml eiskaltem PBS resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Filtration der Suspension in 50 ml-Greiner-Röhrchen folgte ein zweiter Präzipitationsschritt durch Zusatz von $\frac{1}{4}$ Volumen eiskaltem PEG/NaCl und Inkubation bei 4 °C für mindestens 1 h. Es wurde wiederholt zentrifugiert, diesmal für 15 min bei $11400 \times g$ und 4 °C, und das Phagenpellet in insgesamt 1-2 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Nach Resuspension wurde die Lösung in *protein low bind tubes* überführt, mit 1/10 Volumen Sigma Blocker (10 x) versetzt und dann bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Der Gesamtphagentiter (funktionale + nicht funktionale Phagenpartikel) zur Bestimmung der *Input*-Phagen wurde über UV/Vis-Spektroskopie nach folgender Gleichung ermittelt (Day, 1969; Thomas und Smith, 2010):

$$\frac{\text{Phagen}}{\text{ml}} = \frac{(E_{269 \text{ nm}} - E_{320 \text{ nm}}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot (6,083 \cdot 10^{16})}{\text{Anzahl Nukleotide pro Phage}} \quad (\text{Gl.2})$$

$E_{269\text{nm}/320\text{nm}}$ = Extinktion bei einer Wellenlänge von 269 nm bzw. 320 nm

Der Titer an funktionalen Phagen, die für das *panning* eingesetzt werden, wurde durch Plattieren einer Phagen-Verdünnungsreihe (10^{-6} bis 10^{-11}) auf SOC_{Cam} ermittelt. Dazu wurden je 900 µl exponentiell wachsende ER2738 mit je 100 µl der entsprechenden Phagenverdünnung gemischt, für 30 min bei 50-90 rpm und 37 °C inkubiert und je 100 µl dieser Suspensionen auf SOC_{Cam} plattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 32 °C. Solche Verdünnungsreihen wurden vor und nach dem *pre-panning* (siehe unten) angefertigt.

Bereits am Vortag wurden 660 µl M280 Streptavidin *beads* drei Mal mit je 1 ml PBST gewaschen (nach jedem Einzelschritt erfolgte Fokussierung der *beads* für 2 min im Magnetständer) und durch Zugabe von 1,5 ml PBST/Sigma Blocker im 2 ml *protein low bind tube* über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert (= *blocking* der *beads*). Die Hälfte der geblockten *beads* (750 µl) wurde am Folgetag entnommen und in eine neues *protein low bind tube* überführt, wo sie nach 2-minütiger Fokussierung im Magnetständer und Abnahme des Überstandes zwei Mal mit je 1 ml PBST gewaschen wurden. Anhand der ermittelten Phagentiter wurden 10^{11} bis 10^{12} Phagen mit den geblockten *beads* vermischt und für 30 min bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert (*pre-panning*). Im Anschluss wurden die *beads* wieder für 2 min im Magneten fixiert und der Überstand für das eigentliche *panning* verwendet. Dieser Schritt sollte lediglich dazu dienen unspezifische Binder abzureichern. Der Phagenüberstand aus dem *pre-panning* wurde mit 5,25 µg biotinyliertem TNF α versetzt und für 1 h bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert (*panning*). Kurz vor dem Ende des *panning* wurde die zweite Hälfte der geblockten *beads* wie zuvor beschrieben gewaschen, dann mit der *panning*-Lösung vermischt und für weitere 30 min auf dem Rotationsschüttler (4 °C) belassen (*capture*). Wieder wurden die *beads* im Magneten fixiert und der Überstand abgenommen (ungebundene Phagen), gefolgt von diversen Waschschritten mit PBST bzw. PBS (vgl. Tab. 22), um niedrig affine und unspezifische Binder zu entfernen. Durch Zugabe von 500 µl Glycin/HCl (pH 2,2), Inkubation für 5 min bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler und anschließender Abnahme des Überstandes der zuvor magnetisch fixierten *beads* erfolgte die Elution gebundener Phagen. Der Überstand wurde sofort zu 75 µl Tris/HCl (pH 9,1) gegeben und neutralisiert. Das Ganze wurde noch ein Mal wiederholt, beide Eluate vereinigt und mit 10 ml exponentiell gewachsenen ER2738 vermischt im 100 ml-Schikanekolben für 30 min bei 50-90 rpm und 37 °C inkubiert. Für die Bestimmung des *output*-Titers wurden wieder 10 µl der infizierten *E. coli*-Zellen entnommen und davon Verdünnungsreihen, wie oben beschrieben, auf SOC_{Cam} plattiert. Die restlichen 10 ml reinfizierter ER2738 wurden auf 2-3 Q-Trays verteilt ebenfalls auf SOC_{Cam} plattiert. Inkubiert wurde über Nacht bei 32 °C.

Am nächsten Tag wurden die Zellen von den Q-Trays mit einem adäquaten Vol. an SOC_{Cam} abgeschwemmt, deren optische Dichte bestimmt und Kryokulturen angelegt (vgl. 5.13.1), die wiederum für die nächste *display*-Runde oder die Reisolation von Plasmiden für Sequenzierungen eingesetzt werden konnten.

Runde 2-5 Phagen-Display

In den Runden zwei bis fünf wurde das Kulturvolumen für die Propagierung der Phagen auf 100 ml reduziert und alle anderen Volumina (PEG/NaCl, PBS, PBST/Sigma Blocker), die zum ersten Teil einer *Display*-Runde gehören (Phagenernte), entsprechend angepasst. Von Runde 2 zu 5 wurde jeweils nur ein Parameter verändert, um auf der einen Seite zwar die Stringenz zu erhöhen, aber dennoch den Selektionsdruck nicht allzu groß werden zu lassen (vgl. Tab. 22), da die zu erwartenden Affinitäten der Bibliotheksvarianten nicht abgeschätzt werden konnten.

5.14.3 Durchmusterung und Subklonierung erhaltener Varianten

Der Erfolg bzw. Fortschritt der Selektion wurde nach jeder Runde überprüft. Dazu wurden ausgehend von Einzelvarianten oder Mischpopulationen ELISAs durchgeführt und der Anteil TNF α -bindender Varianten ermittelt. Nach deren Sequenzierung wurden sie zur näheren Charakterisierung in einen Expressionsvektor kloniert.

Einzelphagen-ELISA

Für den Einzelphagen-ELISA mussten, wie auch schon während der *display*-Zyklen, zunächst Phagen angereichert werden. Hierzu wurden je 96 *phagemid*-tragende ER2738 pro Selektionsrunde von Vereinzlungsausstrichen (aus den Kryokulturen der Runden) gepickt und mit ihnen MTPs zu je 100 μl pro Kavität 2 x YT_{Cam} beimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 750 rpm im Bühler-Schüttler wachsen gelassen, um mit ihnen am nächsten Tag 600 μl pro Kavität einer *deep-well*-Platte anzuimpfen (mit 15 μl). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,5$. Die Kulturen wurden alsbald auf 26 °C abgekühlt und 10 μl pro Kavität M13K07-Helferphagen zugegeben (entspricht $2,1 \times 10^{11}$ Phagen), gut gemischt und danach für 30 min bei 26 °C und 100 rpm inkubiert. Es folgte der Zusatz von 10 μl pro Kavität Kanamycin (60-fach konzentriert) und die Fortsetzung der Inkubation für 30 min bei 26 °C und 250 rpm. Der Medienwechsel erfolgte durch Zentrifugieren für 20 min bei $3500 \times g$ und 4 °C, Dekantieren des Überstandes und vorsichtiges Ausklopfen der Platte auf Papiertüchern. Die Pellets wurden

im Anschluss in 600 µl je Kavität vorgewärmtem 2 x YT_{Cam, Kan, Tet} (c_{end Tet}: 0,1 µg/ml) resuspendiert und für 16-18 h bei 26 °C und 250 rpm inkubiert. Für den ELISA am darauffolgenden Tag wurden Nunc Medisorp-MTPs mit 500 ng je Kavität TNF α und anti-hgBC (vgl. 5.4 Tab. 11) beschichtet und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Während die MTPs für den ELISA bei 22 °C und 300 rpm im Thermomixer für 2 h mit Sigma Blocker geblockt wurden, erfolgte die Phagenernte mittels einmaliger Zentrifugation für 20 min bei 4000 × g und 4 °C. 180 µl Phagenüberstand wurden mit 20 µl 10 x Sigma Blocker (mit 0,05 % Tween-20) versetzt und davon jeweils 80 µl auf eine mit TNF α und anti-hgBC beschichtete und nach dem Blocken drei Mal mit 300 µl pro Kavität PBST gewaschene MTP gegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog dem Standard-ELISA (vgl. 5.15.6). Die Verweildauer der Phagen auf den MTPs betrug 2 h und der konjugierte Antikörper pVIII-POD wurde 5000-fach verdünnt eingesetzt.

Subklonierung putativer Binder in Expressionsvektoren

Die durch Einzelphagen-ELISA und Sequenzierung identifizierte putativen Binder wurden für ihre anschließende Reinigung in pETSoSc1.2T7lac kloniert (vgl. 5.7 Tab. 16) und in NovaBlue(DE3) exprimiert. Als zusätzliche Tests auf Bindung dienten ELISAs mit dem löslichen Lysat jener Expressionskulturen (vgl. 5.13.4 und 5.15.6), wobei 50 µl des unverdünnten Lysats für 1 h mit dem Zielmolekül inkubiert wurden. Geeignete Kandidaten wurden folglich in größerem Maßstab exprimiert (vgl. 5.13.4) und deren Translationsprodukte in zwei Schritten über ein ÄKTExpress-System gereinigt (vgl. 5.15.2). Das gereinigte Protein wurde wiederum für konzentrationsabhängige ELISAs verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen finden sich in der jeweiligen Bildunterschrift im Ergebnisteil (vgl. 2.3.3 Abb. 22).

5.15 Proteinbiochemische Methoden

Auf verschiedene Methoden der Proteinanalyse soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

5.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine, unter vorheriger Angleichung ihrer Nettoladung, bezüglich ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Zu diesem Zweck wurden kommerzielle NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele mit 12 bzw. 17 Probenaschen verwendet. Eine adäquate Menge an Proteinprobe wurde dazu mit einem

Fünftel Volumen SDS-Probenpuffer (5-fach) verdünnt und für 5-10 min bei 95 °C erhitzt und aufgetragen (5-20 µl Probe). Als Protein-Standard diente 5 µl *PageRuler Unstained Protein Ladder* (Fermentas). Aufgetrennt wurde 50 min bei 200 V in MES-Laufpuffer. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels *PageBlue Protein Staining Solution* (Fermentas) nach Herstellerangaben. Zum Nachweis sehr geringer Proteinmengen kam die Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996) zur Anwendung. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem BioVision 3000-System und die densitometrische Auswertung mit der dazugehörigen Software Bio1D (Vilber Lourmat).

Für die Löslichkeitsanalyse der naiven Vollängen-Bibliothek (hgBC-SG4_Lib13.1A) wurden Criterion 4-20 % Tris-HCl Gele mit 26 Probenaschen eingesetzt. Die Probenvorbereitung stimmte mit der im obigen Absatz beschriebenen überein, lediglich der Gellauf erfolgte stattdessen 40-45 min bei 200 V in Tris-Glycin-Laufpuffer. Analyse und Auswertung der Gele erfolgten ohne vorherige Färbung mittels Gel Doc EZ-System und Image Lab (Bio-Rad, München).

5.15.2 Proteinreinigung

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Klärung von Zellextrakten kann u.a. über das Verfahren der IMAC (Porath *et al.*, 1975) erfolgen, bei dem vorrangig Histidinseitenketten reversibel mit immobilisierten Schwermetallionen interagieren. Die genetische Fusion eines Poly-Histidin tags (His₄, His₆, His₁₀) an das Zielgen ermöglicht so die Reinigung des entsprechenden Translationsproduktes. Die Elution des Fusionsproteins vom Trägermaterial kann u.a. durch kompetitive Verdrängung mit hohen Imidazolkonzentrationen erreicht werden.

Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography, SEC)

Bei der SEC wird die Probe durch ein poröses, inertes Trägermaterial transportiert, je nach hydrodynamischem Radius der Moleküle zeigen sie unterschiedliche Verweilzeiten. Kleine Moleküle dringen in die Poren ein, größere bleiben jedoch in der mobilen Phase und eluieren vorzeitig. Diese Methode kann sowohl zur Trennung von Proteingemischen, als auch zum Pufferaustausch bzw. Entsalzen eingesetzt werden. Neben präparativen wurden auch analytische SEC-Läufe durchgeführt (vgl. 5.15.4).

5.15.2.1 Reinigung von hgBC und dessen Varianten

Reinigung von Einzelvarianten

Der lösliche Überstand aus dem Zellaufschluss (vgl. 5.13.4) wurde über ein ÄKTExpress-System (GE Healthcare) mit einer Flussrate von 3 ml/min auf eine mit NPI-20 äquilibrierte 5 ml-HisTrap HP-Säule aufgetragen. Unspezifisch wechselwirkende Proteine wurden im ersten Schritt mit 20 CV NPI-20 und anschließend mit zusätzlichen 5 CV NPI-40 von der Säule entfernt. Die Elution erfolgte mit 5 ml/min über 6 CV mit NPI-500, das Eluat wurde dabei in 5 ml-Probenschleifen (*loops*) aufgefangen. Die Parameter für die Peak-Erkennung sind im Folgenden dargestellt (Tab. 23).

Tab. 23: Parameter der Peak-Erkennung für AC und SEC.

	AC	SEC
Anzahl <i>loops</i>	4	-
maximales Peakvolumen (ml)	6,5	-
UV-Startwert (mAU)	40	20
UV-Endwert (mAU)	40	15
Peak Minimalbreite (min)	0,5	0,5
UV-Anfangssteigung (mAU/min)	15	5
UV-Endsteigung (mAU/min)	15	20

In der nachfolgenden Gelfiltration wurden 5 ml des Eluats über eine mit PBS/1 mM EDTA (pH 7,4) äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex 75 pg-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1,5 ml/min. Fraktioniert wurde von 0,3 CV bis 0,9 CV. Anhand von Molekulargewichtsstandards (GE Healthcare) wurde die apparente Molekülmasse bestimmt, sowie mittels SDS-PAGE die Homogenität der Probe überprüft.

Reinigung im Hochdurchsatz (96-well)

Wurde gereinigtes Protein einer höheren Anzahl von Varianten für analytische Zwecke benötigt (DSF, Löslichkeitsanalysen) erfolgte die Reinigung im Hochdurchsatz am Laborroboter Biomek 3000 (Beckman Coulter) nach den Protokollen von Dominik Schneider (Schneider, 2009). Expression und Zellaufschluss entsprechender 96-well-Kulturen erfolgten wie unter 4.13.5 beschrieben, wobei 150 µl des löslichen Zelllysats auf mit Zellaufschlusspuffer I äquilibrierte Ni²⁺-NTA-Sepharose (in 96-well-Filterplatten (Nunc) vorgelegt) gegeben wurden. Nach Elution von der Ni²⁺-Matrix wurden die Proben über eine

PD Multitrap G-25 Platte (GE Healthcare) entsalzt und schlussendlich in *protein low bind*-Platten (Nunc) aufgefangen (in 100 μ l PBS).

5.15.2.2 Reinigung des Zielproteins TNF α

Für die Expression und Reinigung des im Selektionsprozess (TAT-Phagen Display) benötigten Zielmoleküls TNF α wurde nach den Protokollen von Herrn Andreas Hoffmann verfahren (Hoffmann *et al.*, 2010).

5.15.3 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Jede Anwendung benötigt ihre speziellen Pufferbedingungen und Analytkonzentration, hierzu musste die Proteinlösung entsprechend vorbereitet werden. Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Vivaspin Zentrifugalfilter (Sartorius) mit dem Probenvolumen entsprechenden Probenreservoirs eingesetzt (Vivaspin 4, 20, 500 mit MWCO: 3 und 5 kDa). Umpufferungen erfolgten je nach Volumen über *Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units* (Thermo Fisher Scientific, MWCO: 3,5 kDa) oder *QuixSep* Dialysekapseln (Carl Roth) versehen mit einer Spectra/Por 7-Membran (Spectrum Labs, MWCO: 1 kDa), bzw. im Spectra/Por 7 Dialyseschlauch.

5.15.4 Analytische Größenausschlusschromatographie

Für den qualitativen Nachweis des Komplexes aus TNF α und R3-B11 wurden je 13 μ M jedes Proteins (bei TNF α auf Trimer bezogen) mit Laufpuffer (PBS/1 mM EDTA pH 7,4), falls nötig mit 0,05 % Tween 20 versetzt, für 15 min bis 136 h bei 4 °C vorinkubiert und dann zu 300 μ l-Aliquoten aus einer 0,5 ml-Probenschleife oder einem 10 ml-Superloop auf eine Superose 12 10/300 GL-Säule geladen. Die Trennläufe fanden an einer ÄKTExplorer (GE Healthcare) bei 4 °C und einer Flussrate von 0,6 ml/min statt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm, 280 nm und bei Fluorescein-markiertem R3-B11 zusätzlich bei 495 nm. Als Kontrollexperimente wurden beide Proteinspezies jeweils einzeln über die Säule gegeben.

5.15.5 Amin-spezifische Modifikation von Proteinen

Um TNF α für die Selektion und die Variante R3-B11 für spätere Analysen zu markieren wurden Amin-reaktive Reagenzien eingesetzt. Diese reagieren selektiv mit primären Aminogruppen, z.B. in Lysinseitenketten und dem N-Terminus des Proteins. Unterschiedliche pK_a-Werte ermöglichen dabei die gezielte Modifikation des Aminoterminus (Selo *et al.*, 1996). Dazu wurde die Proteinprobe über PD-10 Sephadex G25-Säulen (GE Healthcare) in

PBS (pH 6,5) umgepuffert. Die verwendeten Chemikalien Sulfo-NHS-Biotin (Pierce Biotechnology), NHS-Fluorescein (Pierce Biotechnology) und 6-(Fluorescein-5-carbox-amido)-hexansäure-succinimidylester (Life Technologies) wurden nach Herstellerangaben gelöst, im 3- bis 5-fachen molaren Überschuss zu 1,2-5,6 mg gereinigtem Protein gegeben und anschließend 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rollenschüttler im Dunkeln inkubiert. Freies Reagenz wurde über Vivaspin 4-Zentrifugalfilter (MWCO: 5 kDa) entfernt. Die Effizienz der Fluoresceinylierung wurde spektrophotometrisch laut Angaben des Herstellers ermittelt.

Zum Nachweis der Biotinylierung wurde ein *pull-down*-Experiment an einer Streptavidin-Matrix durchgeführt und zusätzlich ein Massenspektrum bestimmt (vgl. 5.15.8). Biotinyliertes Protein (1,5 µg) wurde auf Streptavidin-beschichteten magnetischen Kügelchen (Life Science Technology) immobilisiert und nach drei Waschrissen mit PBST (0,05 %) gebundenes Protein durch Zugabe von 50 µl SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95 °C eluiert. Die Analyse der einzelnen Schritte erfolgte per SDS-PAGE. Zu diesem Zweck wurden die Waschfraktionen zusammengeführt und per TCA-Fällung konzentriert. Hierzu wurden zu jeder Proteinprobe 500 µl 50 %ige TCA-Lösung (Endkonzentration 25 %) gegeben und 15 min auf Eis inkubiert, gefolgt von 15 min Zentrifugation bei 21000 × g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, zum Pellet 300 µl vorgekühltes Aceton (-20 °C) gegeben und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das Aceton wurde anschließend abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und letztlich in 40 µl SDS-Probenpuffer (1 x) resuspendiert. Im Falle einer Gelbfärbung der Lösung wurde 1 µl 2 M Tris zugefügt.

5.15.6 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Wechselwirkungen von Molekülen mit dazugehörigen Bindungsstärken lassen sich mit Hilfe des ELISA bestimmen. Pro Kavität einer MTP (Nunc Medisorp) wurden dazu 100-500 ng Zielmolekül in 50 µl PBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Im Anschluss an dreimaliges Waschen mit je 300 µl PBST (0,05 %) wurden noch freie Bindestellen durch Inkubation für 2 h bei 22 °C und 300 rpm mit 300 µl je Kavität Casein Blocker (Sigma Aldrich) besetzt. Es wiederholten sich drei Waschschriffe mit 300 µl PBST (0,05 %). Dann wurden je nach Anwendung 50 µl gereinigtes Protein (Ligand), entsprechendes Zelllysate oder Phagensuspension (je nach Titer bis zu 100 µl) hinzugegeben und für 1-2 h bei 22 °C und 300 rpm inkubiert. Im Falle eines kompetitiven ELISA wurden Ligand und Kompetitor vor diesem Schritt für mindestens 1 h bei 4 °C vorinkubiert. Es wurde erneut drei Mal mit PBST (0,05 %) und ein Mal mit PBS gewaschen, 50 µl Peroxidase-Immunkonjugat zugegeben (verdünnt in

Casein Blocker) und für 1 h wie zuvor inkubiert (vgl. Tab. 24). Als Substrat für die Peroxidase wurden 50 µl/well TMB One bzw. TMB Xtra verwendet. Die Reaktion wurde nach 5-45 min mit 25 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm abzüglich des 620 nm-Wertes im Plattenlesegerät gemessen.

Tab. 24: Verdünnungen von Antikörper und Immunkonjugaten.

Immunkonjugat	Antigen	Verdünnung
anti-cmyc	cmyc-Peptid (EQKLISEEDL)	1:5000
anti-hgBC	humanes gB-Kristallin	1:1000
anti-hgBC-Peroxidase-Konjugat	humanes gB-Kristallin	1:1000
anti-His6-Peroxidase-Konjugat	Hexahistidin-Peptid	1:500
anti-M13-Peroxidase-Konjugat	pVIII-Protein	1:5000
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Biotin	1:2000

5.15.7 Analytische Ultrazentrifugation

Durch Gleichgewichtssedimentation kann die Molekülmasse von einzelnen Proteinen und deren Komplexen bestimmt werden. Hierfür wurde die Fluorescein-markierte hgBC-Variante R3-B11 mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α gemischt und die Titrationsansätze vor den Messungen 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Proteinkonzentrationen betragen für R3-B11 0,045 mg/ml und für TNF α 0 bis 0,173 mg/ml, als Puffer diente PBS/1 mM EDTA (pH 7,4) versetzt mit 0,05 % Tween-20. Die Experimente wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hauke Lilie an der Abteilung Technische Biochemie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle/Wittenberg) mittels einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-I (Beckman Coulter, Palo Alto, CA/USA) durchgeführt.

5.15.8 Massenspektrometrie

Die erfolgreiche Biotinylierung von Proteinen wurde über die Massenspektrometrie untersucht, dessen Prinzip auf der Trennung von ionisierten Molekülen nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis mit Hilfe elektromagnetischer Felder beruht. Der Analyse vorausgegangen war eine Entsalzung der Proben über ZipTips (Merck, Darmstadt); die Probenkonzentration betrug ca. 0,5 mg/ml. Die MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*)-Experimente wurden von Frau Dr. Angelika Schierhorn an der Abteilung Naturstoffbiochemie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle/Wittenberg) durchgeführt.

5.15.9 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Konformationsänderungen von Proteinen können durch ein umgebungssensitives Fluorophor (z.B. Sypro Orange) verfolgt werden (Niesen *et al.*, 2007). Änderungen der lokalen Hydrophobizität in Molekülen resultieren in einer höheren Quantenausbeute und somit in einem Anstieg der Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffs. Mit Hilfe der DSF lassen sich so u.a. apparente Schmelztemperaturen von Proteinen bestimmen. Thermische Übergänge ausgehend von 10-20 µg Protein gelöst in PBS (pH 7,4) wurden nach dem Protokoll von Dominik Schneider (2009) analysiert und ausgewertet. Alle berechneten Werte sind Puffer-korrigiert.

5.15.10 Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie

CD-Spektroskopie misst die Absorptionsunterschiede zwischen rechts und links zirkular polarisiertem Licht durch strukturell asymmetrische Stoffe (Enantiomere). So absorbiert die Peptidbindung von Proteinen Wellenlängen zwischen 170–250 nm (Fern-UV), was Aussagen über die Sekundärstruktur zulässt, während zwischen 250–300 nm (Nah-UV) aromatische Aminosäuren vorrangig absorbieren und so die Tertiärstruktur untersucht werden kann.

Die Experimente wurden an einem Jasco J-810-Spektropolarimeter (Jasco Inc., USA) mit Peltierelement bei 20 °C durchgeführt. Gemessen wurde in Quarzglasküvetten (Hellma) mit 1 mm Schichtdicke und jeweils 5 µM Protein in 10 mM KH₂PO₄ (pH 7,4) unter Nutzung folgender Parameter:

Wellenlänge:	197–260 nm	Bandbreite:	1 nm
Geschwindigkeit:	10 nm/min	Integrationszeit:	4 s
Datenabstand:	0,5 nm	Akkumulation:	20 Spektren

Alle Spektren wurden Puffer-korrigiert und nach Gl. 3 (Schmid, 1997) auf die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest normalisiert.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot n_{AS}} \quad (\text{Gl. 3})$$

$[\theta]_{MRW}$	mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest (deg / (cm ² · dmol))
θ	gemessene Elliptizität (deg)
MW	molekulare Masse des Proteins (Da)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
d	Schichtdicke (cm)
n_{AS}	Anzahl der Aminosäure

5.15.11 Dissoziationsverhalten von TNF α (Fluoreszenz-Selbstausschaltung)

Gemäß He *et al.* (2005) wurde das Dissoziationsverhalten von TNF α -Trimeren in Anwesenheit verschiedener Moleküle fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Werden TNF α -Monomere mit Fluorescein markiert, so kommt es bei der Ausbildung des Trimerzustandes zur Selbstauslöschung der Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe der Fluorophore. Der Einfluss verschiedener Zusätze auf die Trimerisierung und somit Fluoreszenz des Komplexes war Gegenstand dieses Experiments.

Dafür wurden 30 μ l pro Kavität 190 nM Fluorescein-markiertes TNF α (vgl. 5.15.5) in eine MTP (Greiner Standard 96F Black non-binding) vorgelegt und die Anfangsfluoreszenz ermittelt. Anschließend wurden 120 μ l PBS mit 0,063 % Tween-20 zugesetzt und die Fluoreszenzemission (Anregungsfilter: 485 nm, Emissionsfilter: 535 nm) mit einem Paradigm-Plattenlesegerät (Beckman Coulter) zeitlich verfolgt. Nach 12 min wurden je 5 μ l pro Kavität PBS/1 mM EDTA (pH 7,4) oder entsprechende Proteinlösungen (je 275 μ M R3-B11, wt-hgBC-SG4 und 10F; 71 μ M Etanercept) hinzugegeben, die Proben gemischt und mit der Messung fortgefahren. Die Platte war während der Messung mit einer Folie abgedeckt, um Verdunstung zu verhindern. Als Kontrolle wurden die zugesetzten Proteine allein, ohne markiertes TNF α , in PBST0,05 vermessen. Für die Auswertung wurden die Kontroll- (Proteine in PBST0,05) von den Messwerten abgezogen und die Ansätze untereinander normiert. Der letzte Datenpunkt vor Zugabe der Zusätze wurde von allen anderen abgezogen und somit für die graphische Darstellung auf null gesetzt.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. und Hass, P. E.** (1985). Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* *318*, 665-667.
- Alderson, R. F., Toki, B. E., Roberge, M., Geng, W., Basler, J., Chin, R., Liu, A., Ueda, R., Hodges, D., Escandon, E., Chen, T., Kanavarioti, T., Babe, L., Senter, P. D., Fox, J. A. und Schellenberger, V.** (2006). Characterization of a CC49-based single-chain fragment-beta-lactamase fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Bioconjugate Chem* *17*, 410-418.
- Alzani, R., Corti, A., Grazioli, L., Cozzi, E., Ghezzi, P. und Marcucci, F.** (1993). Suramin induces deoligomerization of human tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* *268*, 12526-12529.
- Alzani, R., Cozzi, E., Corti, A., Temponi, M., Trizio, D., Gigli, M. und Rizzo, V.** (1995). Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor alpha. *Biochem* *34*, 6344-6350.
- Amstutz, P., Binz, H. K., Parizek, P., Stumpp, M. T., Kohl, A., Grutter, M. G., Forrer, P. und Pluckthun, A.** (2005). Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem* *280*, 24715-24722.
- Anderson, E. I. und Spector, A.** (1978). The state of sulfhydryl groups in normal and cataractous human lens proteins. I. Nuclear region. *Expl Eye Res* *26*, 407-417.
- Ansuini, H., Cicchini, C., Nicosia, A., Tripodi, M., Cortese, R. und Luzzago, A.** (2002). Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands. *Nucl Acids Res* *30*, e78.
- Arakawa, T., Visger, J. V., McGinley, M., Rohde, M. F., Fox, G. M. und Narhi, L. O.** (1990). Alteration in folding efficiency and conformation of recombinant human tumor necrosis factor-alpha by replacing cysteines 69 and 101 with aspartic acid 69 and arginine 101. *Protein Eng Des Sel* *3*, 721-724.
- Balkwill, F.** (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* *25*, 409-416.
- Balkwill, F.** (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* *9*, 361-371.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H. und Lesslauer, W.** (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF[beta] complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* *73*, 431-445.
- Bax, B., Lapatto, R., Nalini, V., Driessen, H., Lindley, P. F., Mahadevan, D., Blundell, T. L. und Slingsby, C.** (1990). X-ray analysis of beta B2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. *Nature* *347*, 776-780.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. und Corvaia, N.** (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* *10*, 345-352.
- Beutler, B. und Cerami, A.** (1986a). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* *320*, 584-588.

-
- Beutler, B. and Cerami, A.** (1986b). Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res* 5, 281-293.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R. und Cerami, A.** (1985a). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316, 552-554.
- Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. und Cerami, A.** (1985b). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Expl Med* 161, 984-995.
- Bhol, K. C., Tracey, D. E., Lemos, B. R., Lyng, G. D., Erlich, E. C., Keane, D. M., Quesenberry, M. S., Holdorf, A. D., Schlehuber, L. D., Clark, S. A. und Fox, B. S.** (2013). AVX-470: a novel oral anti-TNF antibody with therapeutic potential in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Diseases* 19, 2273-2281.
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P. und Plückthun, A.** (2003). Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *J Mol Biol* 332, 489-503.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. und Plückthun, A.** (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22, 575-582.
- Binz, H. K., Amstutz, P. und Plückthun, A.** (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268.
- Bittker, J. A., Le, B. V., Liu, J. M. und Liu, D. R.** (2004). Directed evolution of protein enzymes using nonhomologous random recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7011-7016.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. und Cerretti, D. P.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C. und Tardieu, A.** (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress Biophys Mol Biol* 86, 407-485.
- Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B. und Wistow, G.** (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289, 771-777.
- Bork, P.** (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17, 363-374.
- Brahms, S. und Brahms, J.** (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* 138, 149-178.
- Brambilla, R., Ashbaugh, J. J., Magliozzi, R., Dellarole, A., Karmally, S., Szymkowski, D. E. und Bethea, J. R.** (2011). Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain: J Neurol* 134, 2736-2754.
-

-
- Brekke, O. H. und Sandlie, I.** (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discovery* 2, 52-62.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Burnet, F. M. und Fenner, F.** (1949). The production of antibodies. Monograph of the Walter and Eliza Hall Institute of Research in Pathology and Medicine, 2nd edn. Macmillan, Melbourne.
- Byla, P., Andersen, M. H., Holtet, T. L., Jacobsen, H., Munch, M., Gad, H. H., Thogersen, H. C. und Hartmann, R.** (2010). Selection of a novel and highly specific tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) antagonist: insight from the crystal structure of the antagonist-TNFalpha complex. *J Biol Chem* 285, 12096-12100.
- Campochiaro, P. A., Channa, R., Berger, B. B., Heier, J. S., Brown, D. M., Fiedler, U., Hepp, J. und Stumpp, M. T.** (2013). Treatment of diabetic macular edema with a designed ankyrin repeat protein that binds vascular endothelial growth factor: a phase I/II study. *American J Ophthalmol* 155, 697-704.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. und Williamson, B.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3666-3670.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnachov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klosgen, R. B. und Robinson, C.** (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J* 14, 2715-2722.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. und Baty, D.** (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British J Pharmacol* 157, 220-233.
- Chester, K. A. und Hawkins, R. E.** (1995). Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol* 13, 294-300.
- Cho, G., Keefe, A. D., Liu, R., Wilson, D. S. und Szostak, J. W.** (2000). Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection. *J Mol Biol* 297, 309-319.
- Clackson, T., und Lowman, H. B.** (2004). Phage Display. A Practical Approach (The Practical Approach Series, 266). Oxford University Press.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. und Ravetch, J. V.** (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 6, 443-446.
- Corti, A., Fassina, G., Marcucci, F., Barbanti, E. und Cassani, G.** (1992). Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem J* 284 (Pt 3), 905-910.
- Cristobal, S., de Gier, J. W., Nielsen, H. und von Heijne, G.** (1999). Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in Escherichia coli. *EMBO J* 18, 2982-2990.
- Daugelat, S. und Jacobs, W. R., Jr.** (1999). The Mycobacterium tuberculosis recA intein can be used in an ORFTRAP to select for open reading frames. *Protein Sci* 8, 644-653.
- Day, L. A.** (1969). Conformations of single-stranded DNA and coat protein in fd bacteriophage as revealed by ultraviolet absorption spectroscopy. *J Mol Biol* 39, 265-277.
-

-
- de Graaf, M., van der Meulen-Muileman, I. H., Pinedo, H. M. und Haisma, H. J.** (2002). Expression of scFvs and scFv fusion proteins in eukaryotic cells. *Methods Mol Biol* 178, 379-387.
- Demarest, S. J., Chen, G., Kimmel, B. E., Gustafson, D., Wu, J., Salbato, J., Poland, J., Elia, M., Tan, X., Wong, K., Short, J. und Hansen, G.** (2006). Engineering stability into *Escherichia coli* secreted Fabs leads to increased functional expression. *Protein Eng, Des Sel* 19, 325-336.
- DeMeyer, T., Muyldermans, S. und Depicker, A.** (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol* 32, 263-270.
- DeLisa, M. P., Tullman, D. und Georgiou, G.** (2003). Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6115-6120.
- Desjarlais, J. R., Lazar, G. A., Zhukovsky, E. A. und Chu, S. Y.** (2007). Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discovery Today* 12, 898-910.
- Devoogdt, N., Revets, H., Kindt, A., Liu, Y. Q., De Baetselier, P. und Ghassabeh, G. H.** (2006). The tumor-promoting effect of TNF-alpha involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol* 177, 8046-8052.
- Driessen, H. P., Herbrink, P., Bloemendal, H. und de Jong, W. W.** (1981). Primary structure of the bovine beta-crystallin Bp chain. Internal duplication and homology with gamma-crystallin. *Eur J Biochem* 121, 83-91.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G., Muyldermans, S., Wyns, L. und Matagne, A.** (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11, 500-515.
- Ebbinghaus, C., Ronca, R., Kaspar, M., Grabulovski, D., Berndt, A., Kosmehl, H., Zardi, L. und Neri, D.** (2005). Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy. *Internatl J Cancer* 116, 304-313.
- Ebersbach, H.** (2004). Neuartige Bindemoleküle für die Diagnostik auf der Grundlage eines Strukturproteins. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ebersbach, H., Fiedler, E., Scheuermann, T., Fiedler, M., Stubbs, M. T., Reimann, C., Proetzl, G., Rudolph, R. und Fiedler, U.** (2007). Affilin-novel binding molecules based on human gamma-B-crystallin, an all beta-sheet protein. *J Mol Biol* 372, 172-185.
- Eck, M. J. und Sprang, S. R.** (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-17605.
- Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. und Wallach, D.** (1989). A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 264, 11974-11980.
- Engelmann, H., Novick, D. und Wallach, D.** (1990). Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 265, 1531-1536.
- Eshhar, Z.** (2008). The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity. *Handbook Exp Pharmacol*, 329-342.
-

-
- Evans, P., Bateman, O. A., Slingsby, C. und Wallace, B. A.** (2007). A reference dataset for circular dichroism spectroscopy tailored for the betagamma-crystallin lens proteins. *Expl Eye Res* 84, 1001-1008.
- Faustman, D. und Davis, M.** (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discovery* 9, 482-493.
- Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2001). Fabrication of beta-pleated sheet proteins with specific binding properties. International Patent Application. *WO 01/04144*.
- Fiedler, E., Fiedler, M., Proetzel, G., Scheuermann, T., Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2006). Affilin™ Molecules. *Food and Bioproducts Processing* 84, 3-8.
- Fiedler, M. und Skerra, A.** (2007). Non-antibody scaffolds. *Handbook of therapeutic antibodies* (Vol. II). S. Dübel (Ed.), Weinheim, GER, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 467-499.
- Flower, D. R.** (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 (Pt 1), 1-14.
- Friedman, M., Nordberg, E., Hoiden-Guthenberg, I., Brismar, H., Adams, G. P., Nilsson, F. Y., Carlsson, J. und Stahl, S.** (2007). Phage display selection of Affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Eng, Des Sel* 20, 189-199.
- Friedman, M. und Stahl, S.** (2009). Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications. *Biotechnol Appl Biochem* 53, 1-29.
- Garcia-Ibancieta, D., Bokov, M., Cherkasov, V., Sveshnikov, P. und Hanson, S. F.** (2008). Simple method for production of randomized human tenth fibronectin domain III libraries for use in combinatorial screening procedures. *BioTechniques* 44, 559-562.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A.** (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*. J. M. Walker (Ed.), Human Press, 571-607.
- Gebauer, M. und Skerra, A.** (2009). Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Current Opin Chem Biol* 13, 245-255.
- Gerth, M. L., Patrick, W. M. und Lutz, S.** (2004). A second-generation system for unbiased reading frame selection. *Protein Eng, Des Sel* 17, 595-602.
- Getmanova, E. V., Chen, Y., Bloom, L., Gokemeijer, J., Shamah, S., Warikoo, V., Wang, J., Ling, V. und Sun, L.** (2006). Antagonists to human and mouse vascular endothelial growth factor receptor 2 generated by directed protein evolution in vitro. *Chem Biol* 13, 549-556.
- Ghezzi, P. und Cerami, A.** (2005). Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol* 31, 239-244.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analyt Biochem* 182, 319-326.
- Gogarten, J. P., Senejani, A. G., Zhaxybayeva, O., Olendzenski, L. und Hilario, E.** (2002). Inteins: structure, function, and evolution. *Ann Rev Microbiol* 56, 263-287.
-

-
- Goldstein, G., Schindler, J., Tsai, H., Cosimi, A. B., Russell, P. S., Norman, D., Barry, J., Shield, C. F., Cho, S. I., Levey, A. S., Burdick, J. F., Williams, G. M., Stuart, F. P., Alexander, J. W., First, R., Gailunas, P., Helderman, J. H., Wathen, R. L., Lorden, R. E., Sampson, D., Levin, B. S., und Monaco, A.** (1985). A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N Engl J Med* *313*, 337-342.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G. und Scheurich, P.** (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* *95*, 570-575.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J. et al.** (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* *13*, 3245-3260.
- Grönwall, C., Jonsson, A., Lindstrom, S., Gunneriusson, E., Stahl, S. und Herne, N.** (2007). Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides. *J Biotechnol* *128*, 162-183.
- Hackel, B. J., Ackerman, M. E., Howland, S. W. und Wittrup, K. D.** (2010). Stability and CDR composition biases enrich binder functionality landscapes. *J Mol Biol* *401*, 84-96.
- Hanes, J. und Plückthun, A.** (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*, 4937-4942.
- Harding, J. J. und Dilley, K. J.** (1976). Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging and cataract. *Expl Eye Res* *22*, 1-73.
- He, M. und Taussig, M. J.** (2002). Ribosome display: cell-free protein display technology. *Briefings Funct Genomics & Proteomics* *1*, 204-212.
- He, M. M., Smith, A. S., Oslob, J. D., Flanagan, W. M., Braisted, A. C., Whitty, A., Cancilla, M. T., Wang, J., Lugovskoy, A. A., Yoburn, J. C., Fung, A. D., Farrington, G., Eldredge, J. K., Day, E. S., Cruz, L. A., Cachero, T. G., Miller, S. K., Friedman, J. E., Choong, I. C. und Cunningham, B. C.** (2005). Small-molecule inhibition of TNF-alpha. *Science* *310*, 1022-1025.
- Heller, R. A., Song, K., Onasch, M. A., Fischer, W. H., Chang, D. und Ringold, G. M.** (1990). Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* *87*, 6151-6155.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. und Fiedler, M.** (2005). Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol* *23*, 514-522.
- Hoffmann, A.** (2012). Erzeugung und Charakterisierung Ubiquitin-basierter Bindeproteine. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R. und Pfeifer, S.** (2012). New binding mode to TNF-alpha revealed by ubiquitin-based artificial binding protein. *PloS one* *7*, e31298.
- Hoffmann, A., Müller, M. Q., Gloser, M., Sinz, A., Rudolph, R. und Pfeifer, S.** (2010). Recombinant production of bioactive human TNF-alpha by SUMO-fusion system--high yields from shake-flask culture. *Protein Expr Purific* *72*, 238-243.
-

-
- Hohlbaum, A. M. und Skerra, A.** (2007). Anticalins: the lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Rev Clin Immu* 3, 491-501.
- Holliger, P. und Hudson, P. J.** (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnol* 23, 1126-1136.
- Hoogenboom, H. R. und Chames, P.** (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today* 21, 371-378.
- Horwitz, M. S. und Loeb, L. A.** (1986). Promoters selected from random DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 7405-7409.
- Houk, K. N., Leach, A. G., Kim, S. P. und Zhang, X.** (2003). Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 42, 4872-4897.
- Idriss, H. T. und Naismith, J. H.** (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Res Technique* 50, 184-195.
- Imoto, T., Yamada, H. und Ueda, T.** (1986). Unfolding rates of globular proteins determined by kinetics of proteolysis. *J Mol Biol* 190, 647-649.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Jacobs, M., Wnendt, S. und Stahl, U.** (1990). High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures. *Nucl Acid Res* 18, 1653.
- Jaeger, K. E., Eggert, T., Eipper, A. und Reetz, M. T.** (2001). Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 55, 519-530.
- Jaenicke, R.** (1994). Eye-lens proteins: structure, superstructure, stability, genetics. *Die Naturwissenschaften* 81, 423-429.
- Jaenicke, R.** (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J* 10, 84-92.
- Jaenicke, R. und Slingsby, C.** (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Critical Rev Biochem Mol Biol* 36, 435-499.
- Jedziniak, J. A., Nicoli, D. F., Baram, H. und Benedek, G. B.** (1978). Quantitative verification of the existence of high molecular weight protein aggregates in the intact normal human lens by light-scattering spectroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 51-57.
- Jespers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G. und Hoogenboom, H. R.** (1994). Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnol (N Y)* 12, 899-903.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. und Winter, G.** (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- Jonsson, A., Wallberg, H., Herne, N., Stahl, S. und Frejd, F. Y.** (2009). Generation of tumour-necrosis-factor-alpha-specific affibody molecules capable of blocking receptor binding in vitro. *Biotechnol Appl Biochem* 54, 93-103.
-

-
- Kaymakcalan, Z., Sakorafas, P., Bose, S., Scesney, S., Xiong, L., Hanzatian, D. K., Salfeld, J. und Sasso, E. H.** (2009). Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* 131, 308-316.
- Kayushin, A. L., Korosteleva, M. D., Miroshnikov, A. I., Kosch, W., Zubov, D. und Piel, N.** (1996). A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucl Acid Res* 24, 3748-3755.
- Kim, H. J., Eichinger, A. und Skerra, A.** (2009). High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc* 131, 3565-3576.
- Kohler, G. und Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kohno, T., Tam, L. T., Stevens, S. R. und Louie, J. S.** (2007). Binding characteristics of tumor necrosis factor receptor-Fc fusion proteins vs anti-tumor necrosis factor mAbs. *J Invest Derm Symp Proc* 12, 5-8.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. und Koide, S.** (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141-1151.
- Kretschmar, M.** (1999). Struktur, Stabilität, Faltung und Funktion von S3a aus *Physarum polycephalum*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Korndörfer, I. P., Beste, G. und Skerra, A.** (2003). Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins* 53, 121-129.
- Kronqvist, N., Lofblom, J., Jonsson, A., Wernerus, H. und Stahl, S.** (2008). A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. *Protein Eng, Des Sel* 21, 247-255.
- Krumpe, L. R., Schumacher, K. M., McMahon, J. B., Makowski, L. und Mori, T.** (2007). Trinucleotide cassettes increase diversity of T7 phage-displayed peptide library. *BMC Biotechnol* 7, 65.
- Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C. und Glover, I. D.** (1996). An eye lens protein-water structure: 1.2 Å resolution structure of gammaB-crystallin at 150 K. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 52, 611-622.
- Kummer, L., Parizek, P., Rube, P., Millgramm, B., Prinz, A., Mittl, P. R., Kaufholz, M., Zimmermann, B., Herberg, F. W. und Plückthun, A.** (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E2248-2257.
- Kunitani, M. G., Cunico, R. L. und Staats, S. J.** (1988). Reversible subunit dissociation of tumor necrosis factor during hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatography* 443, 205-220.
- Lapatto, R., Nalini, V., Bax, B., Driessen, H., Lindley, P. F., Blundell, T. L. und Slingsby, C.** (1991). High resolution structure of an oligomeric eye lens beta-crystallin. Loops, arches, linkers and interfaces in beta B2 dimer compared to a monomeric gamma-crystallin. *J Mol Biol* 222, 1067-1083.
-

-
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Layne, E.** (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol* 3, 447-454.
- Lee, Y. C., Chen, I. C., Yu, C. M., Huang, Y. J., Hsu, H. J. und Yang, A. S.** (2011). Effects of signal sequence on phage-displayed disulfide-stabilized single chain antibody variable fragment (sc-dsFv) libraries. *Biochem Biophys Res Communications* 411, 348-353.
- Lehmann, A.** (2008). Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery. *Expert Opin Biol Therapy* 8, 1187-1199.
- Lejeune, F. J., Lienard, D., Matter, M. und Ruegg, C.** (2006). Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 6, 186-191.
- Ling, M. M.** (2003). Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Com Chem High Throughput Screen* 6, 421-432.
- Lipovsek, D.** (2010). Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Eng, Des Sel* 24, 3-9.
- Lipovsek, D., Lippow, S. M., Hackel, B. J., Gregson, M. W., Cheng, P., Kapila, A. und Wittrup, K. D.** (2007). Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies. *J Mol Biol* 368, 1024-1041.
- Liu, H., Dai, L., Hao, Z., Huang, W. und Yang, Q.** (2012). Hydrophobic cavity in C-terminus is essential for hTNF-alpha trimer conformation. *Biochimie* 94, 1001-1008.
- Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Stahl, S. und Frejd, F. Y.** (2010). Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS letters* 584, 2670-2680.
- Löfdahl, P. A., Nord, O., Janzon, L. und Nygren, P. A.** (2009). Selection of TNF-alpha binding affibody molecules using a beta-lactamase protein fragment complementation assay. *New Biotechnol* 26, 251-259.
- Löfdahl, P. A. und Nygren, P. A.** (2010). Affinity maturation of a TNFalpha-binding affibody molecule by Darwinian survival selection. *Biotechnol Appl Biochem* 55, 111-120.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. und Lesslauer, W.** (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61, 351-359.
- Lonberg, N.** (2008). Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Current Opin Immun* 20, 450-459.
- Lorey, S., Fiedler, E., Kunert, A., Nerkamp, J., Lange, C., Fiedler, M., Bosse-Doenecke, E., Meysing, M., Gloser, M., Rundfeldt, C., Rauchhaus, U., Hanssgen, I., Gottler, T., Steuernagel, A., Fiedler, U. und Haupts, U.** (2014). Novel ubiquitin-derived high affinity binding proteins with tumor targeting properties. *J Biol Chem* 289, 8493-8507.
- Lubsen, N. H., Aarts, H. J. und Schoenmakers, J. G.** (1988). The evolution of lenticular proteins: the beta- and gamma-crystallin super gene family. *Progress Biophys Mol Biol* 51, 47-76.
-

-
- Lutterotti, A. und Martin, R.** (2008). Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 7, 538-547.
- Lutz, S., Fast, W. und Benkovic, S. J.** (2002). A universal, vector-based system for nucleic acid reading-frame selection. *Protein Engin* 15, 1025-1030.
- Lutz, S., Ostermeier, M., Moore, G. L., Maranas, C. D. und Benkovic, S. J.** (2001). Creating multiple-crossover DNA libraries independent of sequence identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11248-11253.
- Mamluk, R., Carvajal, I. M., Morse, B. A., Wong, H., Abramowitz, J., Aslanian, S., Lim, A. C., Gokemeijer, J., Storek, M. J., Lee, J., Gosselin, M., Wright, M. C., Camphausen, R. T., Wang, J., Chen, Y., Miller, K., Sanders, K., Short, S., Sperinde, J., Prasad, G., Williams, S., Kerbel, R., Ebos, J., Mutsaers, A., Mendlein, J. D., Harris, A. S. und Furfine, E. S.** (2010). Anti-tumor effect of CT-322 as an adnectin inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2. *mAbs* 2, 199-208.
- Mandal, K., Bose, S. K., Chakrabarti, B. und Siezen, R. J.** (1985). Structure and stability of gamma-crystallins. I. Spectroscopic evaluation of secondary and tertiary structure in solution. *Biochim Biophys Acta* 832, 156-164.
- Mann, A., Friedrich, N., Krarup, A., Weber, J., Stiegeler, E., Dreier, B., Pugach, P., Robbiani, M., Riedel, T., Moehle, K., Robinson, J. A., Rusert, P., Plückthun, A. und Trkola, A.** (2013). Conformation-dependent recognition of HIV gp120 by designed ankyrin repeat proteins provides access to novel HIV entry inhibitors. *J Virol* 87, 5868-5881.
- Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M. J., Semon, D., Muller, R., Ruyschaert, M-R., Van Vliet, A. und Fiers, W.** (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 152, 515-522.
- Maxwell, K. L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J. D. und Davidson, A. R.** (1999). A simple in vivo assay for increased protein solubility. *Protein Sci* 8, 1908-1911.
- Mayr, E-M., Jaenicke, R. und Glockshuber, R.** (1994). Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* 235, 84-88.
- Mayr, E-M.** (1995). Domänen und Domänenwechselwirkungen in γ -Kristallinen. Dissertation, Universität Regensburg.
- Mayr, E-M., Jaenicke, R. und Glockshuber, R.** (1997). The domains in gammaB-crystallin: identical fold-different stabilities. *J Mol Biol* 269, 260-269.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. und Chiswell, D. J.** (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- Mills, D. R., Peterson, R. L. und Spiegelman, S.** (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 58, 217-224.
- Milovnik, P., Ferrari, D., Sarkar, C. A. und Plückthun, A.** (2009). Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1. *Protein Eng, Des Sel* 22, 357-366.
- Mintz, C. S. und Crea, R.** (2013). Protein scaffolds - The next generation of protein therapeutics? *BioProcess Inter* 11, 42-48.
-

-
- Mirecka, E.** (2010). Generation of novel intracellular binding reagents based on the human γ B-crystallin. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mirecka, E. A., Hey, T., Fiedler, U., Rudolph, R. und Hatzfeld, M.** (2009). Affilin molecules selected against the human papillomavirus E7 protein inhibit the proliferation of target cells. *J Mol Biol* 390, 710-721.
- Miyazaki, K. und Arnold, F. H.** (1999). Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J Mol Evol* 49, 716-720.
- Moss, M. L., White, J. M., Lambert, M. H. und Andrews, R. C.** (2001). TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discovery Today* 6, 417-426.
- Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y. und Tsutsumi, Y.** (2010). Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* 3, ra83.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 (Pt 1), 263-273.
- Mutuberrria, R., Hoogenboom, H. R., van der Linden, E., de Bruine, A. P. und Roovers, R. C.** (1999). Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens. *J Immunol Methods* 231, 65-81.
- Muyldermans, S.** (2013). Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Ann Rev Biochem* 82, 775-797.
- Naguwa, S. M.** (2005). Tumor necrosis factor inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 709-715.
- Najmudin, S., Nalini, V., Driessen, H. P., Slingsby, C., Blundell, T. L., Moss, D. S. und Lindley, P. F.** (1993). Structure of the bovine eye lens protein gammaB(gammaII)-crystallin at 1.47 Å. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 49, 223-233.
- Narachi, M. A., Davis, J. M., Hsu, Y. R. und Arakawa, T.** (1987). Role of single disulfide in recombinant human tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 262, 13107-13110.
- Nesbitt, A., Fossati, G., Bergin, M., Stephens, P., Stephens, S., Foulkes, R., Brown, D., Robinson, M. und Bourne, T.** (2007). Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Diseases* 13, 1323-1332.
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G. und Rabbitts, T. H.** (1985). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature* 314, 268-270.
- Nicaise, M., Valerio-Lepiniec, M., Minard, P. und Desmadril, M.** (2004). Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. *Protein Sci* 13, 1882-1891.
- Niesen, F. H., Berglund, H. und Vedadi, M.** (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protocols* 2, 2212-2221.
- Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. und Nygren, P. A.** (1995). A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Protein Eng* 8, 601-608.
-

-
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. und Nygren, P. A.** (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* 15, 772-777.
- Nord, K., Nord, O., Uhlen, M., Kelley, B., Ljungqvist, C. und Nygren, P. A.** (2001). Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A. *Eur J Biochem* 268, 4269-4277.
- Orlova, A., Tran, T., Widstrom, C., Engfeldt, T., Eriksson Karlstrom, A. und Tolmachev, V.** (2007). Pre-clinical evaluation of [111In]-benzyl-DOTA-Z(HER2:342), a potential agent for imaging of HER2 expression in malignant tumors. *Intern J Mol Med* 20, 397-404.
- Orr, B. A., Carr, L. M., Wittrup, K. D., Roy, E. J. und Kranz, D. M.** (2003). Rapid method for measuring ScFv thermal stability by yeast surface display. *Biotechnol Prog* 19, 631-638.
- Ottiger, M., Thiel, M. A., Feige, U., Lichtlen, P. und Urech, D. M.** (2009). Efficient intraocular penetration of topical anti-TNF-alpha single-chain antibody (ESBA105) to anterior and posterior segment without penetration enhancer. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 50, 779-786.
- Padlan, E. A.** (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immun* 31, 169-217.
- Palme, S., Slingsby, C. und Jaenicke, R.** (1997). Mutational analysis of hydrophobic domain interactions in gamma B-crystallin from bovine eye lens. *Protein Sci* 6, 1529-1536.
- Panula-Perälä, J., Siurkus, J., Vasala, A., Wilmanowski, R., Casteleijn, M. G. und Neubauer, P.** (2008). Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microbial Cell Factories* 7, 31.
- Paschke, M.** (2006). Entwicklung eines Tat-abhängigen Phagen-Display-Systems zur Selektion von Varianten des grün fluoreszierenden Proteins. Dissertation, Universität Potsdam.
- Paschke, M. und Höhne, W.** (2005). A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. *Gene* 350, 79-88.
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J. und Kreitman, R. J.** (2007). Immunotoxin treatment of cancer. *Ann Rev Med* 58, 221-237.
- Pedelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. und Waldo, G. S.** (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 24, 79-88.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. und Goeddel, D. V.** (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- Petyovka, N., Lyach, L. und Voitenok, N. N.** (1995). Homologous ELISA for detection of oligomeric human TNF: properties of the assay. *J Immunol Methods* 186, 161-170.
- Philipson, B. T. und Fagerholm, P. P.** (1973). Lens changes in senile cataract. The human lens in relation to cataract. *Ciba Fdn Symp.* 19, 45-63.
- Poiesi, C., Albertini, A., Ghielmi, S., Cassani, G. und Corti, A.** (1993). Kinetic analysis of TNF-alpha oligomer-monomer transition by surface plasmon resonance and immunochemical methods. *Cytokine* 5, 539-545.
-

-
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G.** (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Provencher, S. W. und Glockner, J.** (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochem* 20, 33-37.
- Pugsley, A. P.** (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57, 50-108.
- Rajini, B., Graham, C., Wistow, G. und Sharma, Y.** (2003). Stability, homodimerization, and calcium-binding properties of a single, variant betagamma-crystallin domain of the protein absent in melanoma 1 (AIM1). *Biochem* 42, 4552-4559.
- Reichert, J. M.** (2010). Antibodies to watch in 2010. *mAbs* 2, 84-100.
- Reichert, J. M.** (2012). Which are the antibodies to watch in 2012? *mAbs* 4, 1-3.
- Reichert, J. M.** (2013). Antibodies to watch in 2013: Mid-year update. *mAbs* 5, 513-517.
- Richardson, J. S.** (1977). Beta-sheet topology and the relatedness of proteins. *Nature* 268, 495-500.
- Rosenblum, M. G. und Donato, N. J.** (1989). Tumor necrosis factor alpha: a multifaceted peptide hormone. *Critical Rev Immu* 9, 21-44.
- Rudolph, R., Siebendritt, R., Nesslauer, G., Sharma, A. K. und Jaenicke, R.** (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4625-4629.
- Ruigrok, V. J., Levisson, M., Eppink, M. H., Smidt, H. und van der Oost, J.** (2011). Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? *Biochem J* 436, 1-13.
- Rutgeerts, P., Vermeire, S. und Van Assche, G.** (2009). Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol* 136, 1182-1197.
- Saijo, S., Watanabe, N. und Kobayashi, Y.** (1995). Comparison of reactivity of monoclonal antibody (3F2) to trimeric tumor necrosis factor (TNF-alpha) with that to monomeric TNF-alpha. *J Biochem* 118, 28-32.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition). Cold Spring Harbor New York, US, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X. Y., Shealy, D. und Wagner, C.** (2002). Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 301, 418-426.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H. et al.** (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61, 361-370.
- Schlehuber, S., Beste, G. und 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. und 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. und Skerra, A.** (2005). Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". *Drug Discovery Today* 10, 23-33.
- Schmid, F. X.** (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Protein Structure: A practical approach*. T. E. Creighton (Ed.). Oxford, UK, Oxford University Press, 261-297.
- Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A.** (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255, 753-766.
- Schneider, D.** (2010). Automatisierte Herstellung und Stabilitätscharakterisierung von γ B-Kristallin-basierten, artifiziellen Bindeproteinen im Mikrotiterplattenformat. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schneider, M.** (2010). Die N-terminale Domäne des humanen γ B-Kristallins als scaffold für artifizielle Bindeproteine. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Seckinger, P., Zhang, J. H., Hauptmann, B. und Dayer, J. M.** (1990). Characterization of a tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) inhibitor: evidence of immunological cross-reactivity with the TNF receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5188-5192.
- Seehaus, T., Breitling, F., Dubel, S., Klewinghaus, I. und Little, M.** (1992). A vector for the removal of deletion mutants from antibody libraries. *Gene* 114, 235-237.
- Selo, I., Negroni, L., Creminon, C., Grassi, J. und Wal, J. M.** (1996). Preferential labeling of alpha-amino N-terminal groups in peptides by biotin: application to the detection of specific anti-peptide antibodies by enzyme immunoassays. *J Immunol Methods* 199, 127-138.
- Sen, S., Venkata Dasu, V. und Mandal, B.** (2007). Developments in Directed Evolution for Improving Enzyme Functions. *Appl Biochem Biotechnol* 143, 212-223.
- Settles, A. M.** (1997). Sec-Independent Protein Translocation by the Maize Hcf106 Protein. *Science* 278, 1467-1470.
- Sharma, A. K., Minke-Gogl, V., Gohl, P., Siebendritt, R., Jaenicke, R. und Rudolph, R.** (1990). Limited proteolysis of gamma II-crystallin from calf eye lens. Physicochemical studies on the N-terminal domain and the intact two-domain protein. *Eur J Biochem* 194, 603-609.
- Shealy, D. J., Cai, A., Staquet, K., Baker, A., Lacy, E. R., Johns, L., Vafa, O., Gunn, G., 3rd, Tam, S., Sague, S., Wang, D., Brigham-Burke, M., Dalmonte, P., Emmell, E., Pikounis, B., Bugelski, P. J., Zhou, H., Scallon, B. J. und Giles-Komar, J.** (2010). Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor alpha. *mAbs* 2, 428-439.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analyt Chem* 68, 850-858.
- Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W. und Wallace, R. B.** (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 313, 803-806.
- Sieber, V., Plückthun, A. und Schmid, F. X.** (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat Biotechnol* 16, 955-960.
- Sieber, V., Martinez, C. A. und Arnold, F. H.** (2001). Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat Biotechnol* 19, 456-460.
-

-
- Silverman, J., Liu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., Alba, B. M., Smith, R., Rivas, A., Li, P., Le, H., Whitehorn, E., Moore, K. W., Swimmer, C., Perloth, V., Vogt, M., Kolkman, J. und Stemmer, W. P.** (2005). Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol* 23, 1556-1561.
- Skerra, A. und Plückthun, A.** (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Slingsby, C. und Wistow, G. J.** (2014). Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Progress Biophys Mol Biol* 115, 52-67.
- Smith, G. P.** (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, R. A. und Baglioni, C.** (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262, 6951-6954.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D. und Goodwin, R. G.** (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Sondek, J. und Shortle, D.** (1992). A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3581-3585.
- Song, B.** (2012). Affilin binding proteins selected against a class B GPCR ectodomain. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Spector, A. und Roy, D.** (1978). Disulfide-linked high molecular weight protein associated with human cataract. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 3244-3248.
- Spector, A., Garner, M. H., Garner, W. H., Roy, D., Farnsworth, P. und Shyne, S.** (1979). An extrinsic membrane polypeptide associated with high-molecular-weight protein aggregates in human cataract. *Science* 204, 1323-1326.
- Spohn, G., Guler, R., Johansen, P., Keller, I., Jacobs, M., Beck, M., Rohner, F., Bauer, M., Dietmeier, K., Kundig, T. M., Jennings, G. T., Brombacher, F. und Bachmann, M. F.** (2007). A Virus-Like Particle-Based Vaccine Selectively Targeting Soluble TNF- Protects from Arthritis without Inducing Reactivation of Latent Tuberculosis. *J Immunol* 178, 7450-7457.
- Steed, P. M., Tansey, M. G., Zalevsky, J., Zhukovsky, E. A., Desjarlais, J. R., Szymkowski, D. E., Abbott, C., Carmichael, D., Chan, C., Cherry, L., Cheung, P., Chirino, A. J., Chung, H. H., Doberstein, S. K., Eivazi, A., Filikov, A. V., Gao, S. X., Hubert, R. S., Hwang, M., Hyun, L., Kashi, S., Kim, A., Kim, E., Kung, J., Martinez, S. P., Muchhal, U. S., Nguyen, D. H., O'Brien, C., O'Keefe, D., Singer, K., Vafa, O., Vielmetter, J., Yoder, S. C. und Dahiyat, B. I.** (2003). Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 301, 1895-1898.
- Stefan, N., Martin-Killias, P., Wyss-Stoeckle, S., Honegger, A., Zangemeister-Wittke, U. und Plückthun, A.** (2011). DARPins recognizing the tumor-associated antigen EpCAM selected by phage and ribosome display and engineered for multivalency. *J Mol Biol* 413, 826-843.
- Steiner, D., Forrer, P. und Plückthun, A.** (2008). Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol* 382, 1211-1227.
-

-
- Stordeur, C., Dalluge, R., Birkenmeier, O., Wienk, H., Rudolph, R., Lange, C. und Lücke, C.** (2008). The NMR solution structure of the artificial protein M7 matches the computationally designed model. *Proteins* 72, 1104-1107.
- Stordeur, J. C.** (2013). Artificielle Bindeproteine auf der Basis des ultrastabilen scaffold Proteins M7. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Studier, F. W.** (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purific* 41, 207-234.
- Takemoto, L. J. und Azari, P.** (1976). Amino acid composition of normal and cataractous human lens proteins. *Expl Eye Res* 23, 1-7.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. und Plückthun, A.** (2012). Designed ankyrin repeat proteins (DARPs) from research to therapy. *Methods Enzymol* 503, 101-134.
- Thomas, W. D. und Smith, G. P.** (2010). The case for trypsin release of affinity-selected phages. *BioTechniques* 49, 651-654.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. und Tak, P. P.** (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Therapeutics* 117, 244-279.
- Truscott, R. J. und Augusteyn, R. C.** (1977). The state of sulphhydryl groups in normal and cataractous human lenses. *Expl Eye Res* 25, 139-148.
- Vaccaro, C., Zhou, J., Ober, R. J. und Ward, E. S.** (2005). Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. *Nat Biotechnol* 23, 1283-1288.
- Van Ostade, X., Tavernier, J. und Fiers, W.** (1994). Structure-activity studies of human tumour necrosis factors. *Protein Eng* 7, 5-22.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. und Rispen, T.** (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers Immunol* 5, 520.
- Virnekäs, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K. C., Wellnhofer, G. und Moroney, S. E.** (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucl Acid Res* 22, 5600-5607.
- Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. und Fersht, A. R.** (1993). Circular dichroism studies of barnase and its mutants: characterization of the contribution of aromatic side chains. *Biochem* 32, 10303-10313.
- Waldmann, T. A.** (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nature Med* 9, 269-277.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. und Terwilliger, T. C.** (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 17, 691-695.
- Waley, S. G.** (1969). *The Eye*. vol. 1, 2nd edit, H. Davson (Ed.). Academic Press London, 299-379.
- Wannemacher, C. F. und Spector, A.** (1968). Protein synthesis in the core of calf lens. *Exp Eye Res* 7, 623-625.
-

-
- Weber, M., Bujak, E., Putelli, A., Villa, A., Matasci, M., Gualandi, L., Hemmerle, T., Wulhfard, S. und Neri, D.** (2014). A highly functional synthetic phage display library containing over 40 billion human antibody clones. *PloS one* *9*, e100000.
- Weidle, U. H., Auer, J., Brinkmann, U., Georges, G. und Tiefenthaler, G.** (2013). The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer. *Cancer Genomics & Proteomics* *10*, 155-168.
- Williams, A. und Baird, L. G.** (2003). DX-88 and HAE: a developmental perspective. *Transfusion and apheresis science: J World Apheresis Association : J Eur Society Haemapheresis* *29*, 255-258.
- Williams, J. A., Day, M. und Heavner, J. E.** (2008). Ziconotide: an update and review. *Expert Opin Pharmacotherapy* *9*, 1575-1583.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D. und Szostak, J. W.** (2001). The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* *98*, 3750-3755.
- Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P. und Blundell, T.** (1983). X-ray analysis of the eye lens protein gamma-II crystallin at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* *170*, 175-202.
- Woody, R. W. und Dunker, A. K.** (1996). Side-chain CD in proteins. Circular dichroism and the conformational analysis of proteins. G. D. Fasman (Ed.), Plenum Press, NY, 109-157.
- 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. und Lipovsek, D.** (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol* *9*, 933-942.
- Yin, C. C., Ren, L. L., Zhu, L. L., Wang, X. B., Zhang, Z., Huang, H. L. und Yan, X. Y.** (2008). Construction of a fully synthetic human scFv antibody library with CDR3 regions randomized by a split-mix-split method and its application. *J Biochem* *144*, 591-598.
- Zacchi, P., Sblattero, D., Florian, F., Marzari, R. und Bradbury, A. R.** (2003). Selecting open reading frames from DNA. *Genome Res* *13*, 980-990.
- Zahnd, C., Amstutz, P. und Plückthun, A.** (2007). Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods* *4*, 269-279.
- Zhang, Q.** (2013). Selection of an artificial binding protein against the ectodomain of PTH1R. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Zhu, L., van de Lavoie, M. C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuisson, S., Deng, D. F., Deshpande, S., Diamond, J. H., Green, L., Halk, E. L., Heyer, B. S., Kay, R. M., Kerchner, A., Leighton, P. A., Mather, C. M., Morrison, S. L., Nikolov, Z. L., Passmore, D. B., Pradas-Monne, A., Preston, B. T., Rangan, V. S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S. G., Winters-Digiacinto, P., Wong, S., Zhou, W. und Etches, R. J.** (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* *23*, 1159-1169.
-

7 Anhang

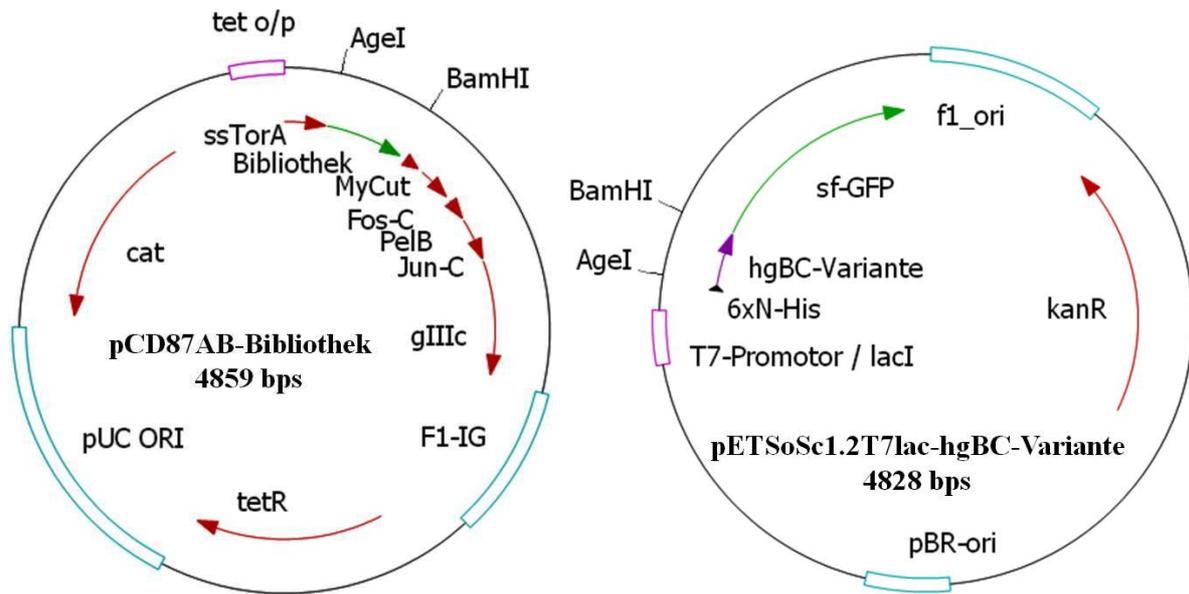


Abb. A1: Vektoren für die Selektion der hgBC-Bibliothek und die Expression einzelner Varianten. **Links:** Die DNA-Fragmente der hgBC-Bibliothek wurden über die Restriktionsendonukleasen *AgeI* und *BamHI* in das *phagemid* pCD87AB kloniert und anschließend dem Selektionsprozess im Phagen-display unterworfen. Das *phagemid* kodiert für zwei Fusionsproteine (ssTorA-Bibliothek-Fos, PelB-gIIIc-Jun) die von einem bicistronischen Operon transkribiert und über verschiedene Sekretionswege ins bakterielle Periplasma transportiert werden, wo letztlich Bibliotheksvariante und gIIIc kovalent über ihre Fusion mit Jun bzw. Fos assoziieren. Cat = Chloramphenicolresistenzgen; F1-IG = Intergen-Region des filamentösen Phagen F1; Fos-C = Cystein-modifizierte Fos Leucin-zipper-Domäne; gIIIc = C-terminale Domäne des Hüllprotein III (AS 250-406) des Phagen M13; Jun-C = Cystein-modifizierte Jun Leucin-zipper-Domäne; MyCut = Schnittstelle der Protease des myc-Epitops und der TEV-Protease; PelB = PelB Signalsequenz; pUC ORI = ColEI (pUC)-Replikationsursprung; ssTorA = TorA Signalsequenz; Tet o/p = Tet-Operator/Promotor-Sequenz; Tet^R = Tetracyclinresistenzgen.

Rechts: Für die spätere Expression selektierter Varianten wurde das *solubility screening*-Plasmid pETSoSc1.2T7lac verwendet, wobei auch hier die Klonierung des kodierenden Gens über *AgeI* und *BamHI* realisiert wurde. Der T7-Promotor kontrolliert dabei die wahlweise Expression einer hgBC-Variante mit N-terminalem Hexahistidinpeptid, oder aber einer hgBC-Variante mit zusätzlicher *superfolder* GFP-Fusion (sfGFP) am C-Terminus des Proteins. Ein *amber*-Stopp Codon zwischen hgBC- und sfGFP-Gen ermöglicht die separate Expression beider Konstrukte, je nach Wahl des Expressionsstammes. F1_ori = Replikationsursprung des filamentösen Phagen F1; Kan^R = Kanamycinresistenzgen; pBR-ori = pBR322-Replikationsursprung.

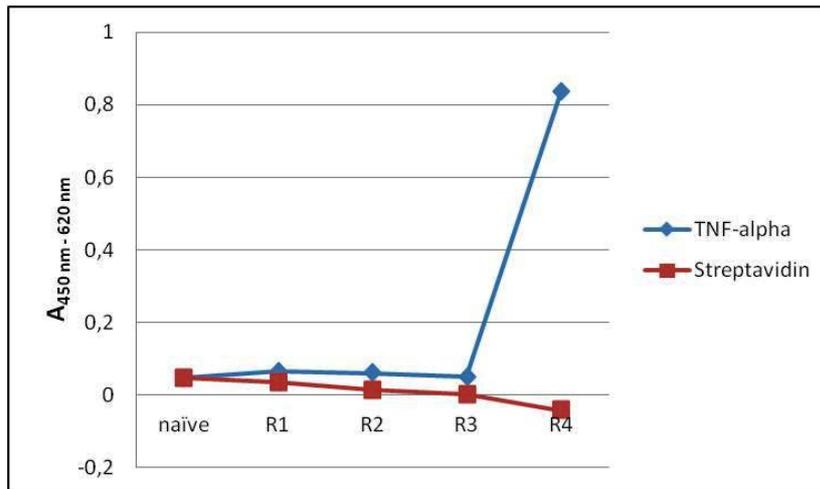


Abb. A2: Phagen-pool-ELISA. Aus den Selektionsrunden eins bis vier wurden bakterielle Klone im *pool* kultiviert, die durch sie exprimierte Phagen präpariert und jeweils 5×10^{11} Phagen mit Sigma Blocker versetzt im ELISA verwendet. 500 ng pro Kavität gereinigtes TNF α bzw. Streptavidin wurden über Nacht auf MTPs (Medisorp, Nunc) immobilisiert und die entsprechenden Phagensuspensionen am Folgetag hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation erfolgte der Nachweis der Interaktion mit Peroxidase-konjugiertem anti-pVIII-Antikörper (1:5000 verdünnt). Sämtliche Werte wurden um die Hintergrundbindung des Nachweisantikörpers an die nur mit Zielproteinen beschichtete Platte korrigiert.

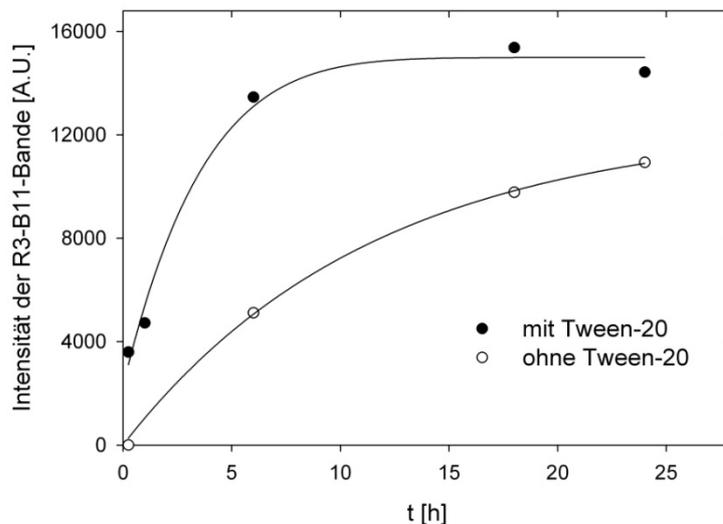


Abb. A3: Komplexassoziation mit und ohne Tween-20. Dargestellt ist der zeitabhängige Verlauf der Interaktion der Variante R3-B11 mit TNF α in An- und Abwesenheit von 0,05 % Tween-20. Hierfür wurde die markierte Fraktion aus Abb. 23C (2.3.4) zu verschiedenen Inkubationszeiten auf 4-12 %ige Gradientengele aufgetragen und die Intensität des mit Fluorescein markierten R3-B11 im Komplex densitometrisch mit der Software der Geldokumentationseinheit Bio-Vision 3000 analysiert. In Abwesenheit von Tween-20 konnte eine Halbwertszeit von $26 \text{ h} \pm 5 \text{ h}$ und in Anwesenheit von lediglich $1,7 \text{ h} \pm 0,6 \text{ h}$ für die Komplexbildung ermittelt werden.

Tab. A1: Statistische Parameter zu den Bibliotheken (χ^2 -Test). Mit diesem Test wurde überprüft inwieweit die ermittelten Werte mit den erwarteten übereinstimmen. Je niedriger der χ^2 -Wert, desto besser stimmten Erwartung und Beobachtung überein. P-Werte größer als 0,1 wurden dabei als signifikant definiert, d.h. oberhalb dieses Wertes wichen beobachtete und erwartete Verteilung nicht signifikant voneinander ab.

AS = Aminosäure; χ^2 = Chi-Quadrat Wahrscheinlichkeitsverteilung; p = Wahrscheinlichkeit mit der die beobachtete Verteilung der erwarteten entspricht; f = Freiheitsgrade

DNA- / Proteinebene	Lib4.1A	Lib5.1A	Lib6.1A	Lib7.1A	Lib8.1B	Lib13.1A
1 N	$\chi^2 = 11,09$ p = 0,0112 f = 3	$\chi^2 = 2,39$ p = 0,496 f = 3	$\chi^2 = 10,88$ p = 0,0123 f = 3	$\chi^2 = 4,41$ p = 0,220 f = 3	$\chi^2 = 7,44$ p = 0,0591 f = 3	
2 N	$\chi^2 = 2,45$ p = 0,484 f = 3	$\chi^2 = 12,41$ p = 0,0061 f = 3	$\chi^2 = 29,11$ p < 0,001 f = 3	$\chi^2 = 5,43$ p = 0,143 f = 3	$\chi^2 = 0,60$ p = 0,896 f = 3	
3 K	$\chi^2 > 1000$ p < 0,001 f = 2	$\chi^2 > 1000$ p < 0,001 f = 2	$\chi^2 > 1000$ p < 0,001 f = 2	$\chi^2 > 1000$ p < 0,001 f = 2	$\chi^2 = 2,21$ p = 0,137 f = 1	
AS	$\chi^2 = 52,40$ p < 0,001 f = 20	$\chi^2 = 43,89$ p = 0,0016 f = 20	$\chi^2 = 47,24$ p < 0,001 f = 20	$\chi^2 = 14,58$ p = 0,799 f = 20	$\chi^2 = 35,37$ p = 0,018 f = 20	$\chi^2 = 590,88$ p = < 0,001 f = 18

Danksagung

Der Person der ich als erstes meinen Dank aussprechen möchte ist Prof. Dr. Rainer Rudolph. Ihm danke ich für die Vergabe des Themas und die damit verbundene Aufnahme in seine Nachwuchsgruppe. Seine lockere, unkonventionelle Art seinen Schützlingen die Wissenschaft schmackhaft zu machen und sie zu „mehr“ zu motivieren bleiben unvergessen. Er legte die Grundsteine für die Konzeption dieser Arbeit.

Leider musste Prof. Rudolph zu früh von uns gehen. Nach seinem unerwarteten Tod übernahm freundlicherweise PD Dr. Hauke Lilie die Betreuung der Arbeit. Dafür und für die kritische Begutachtung der experimentellen Daten sowie den damit einhergehenden Denkanstößen bin ich ihm zu Dank verpflichtet. Und nicht zu vergessen für die Durchführung der Experimente an seiner analytischen Ultrazentrifuge danke ich ihm gleichermaßen.

Ein sehr großer Dank gilt zudem Herrn Dr. Sven Pfeifer für die optimale Infrastruktur in seinen Laboratorien, ohne die ich meinen Binder nicht „gefunden“ hätte und die Experimente in dieser Art nicht möglich gewesen wären. Seine Diskussionsbereitschaft und entscheidenden Ideen waren mehr als ausschlaggebend für das Gelingen dieser Arbeit. Ich habe ihm viel zu verdanken und viel von ihm gelernt.

Meinem Diplomanden Marian Schneider danke ich vielmals für die Vorarbeiten zum modularen Bibliotheksdesign, die u.a. die Grundlage für die Auswahl geeigneter Reste legten. Ich wünsche ihm noch viel Erfolg bei seiner eigenen Promotion.

Dominik Schneider sei gedankt für die unzähligen Hilfen während des *screening* am FX, sowie bei den DSF-Analysen per MatLab. Ich wünsche ihm viel Erfolg bei der hoffentlich baldigen Fertigstellung seiner Promotion.

Andi danke ich für die hilfreichen Tipps und Erklärungen in Sachen ITC, Fluoreszenzpolarisation, analytische SEC, Fluoreszenzselbstausschaltung und natürlich der Bereitstellung von gereinigtem 10F und TNF α nebst Protokollen zur Reinigung. Für die aufgebrauchte Zeit, die für das Korrekturlesen dieser Arbeit nötig war danke ich ihm gleichermaßen.

Scil Proteins GmbH (Halle/S.) danke ich für die Bereitstellung von anti-hgBC-Antikörper, Enbrel und gereinigten Proteinen der TNF α -Superfamilie. Eva-Bosse-Doenecke und Manja Gloser danke ich für die Durchführung der Zellkulturassays, auch wenn diese nicht von Erfolg gekrönt waren.

Marcus und René danke ich für die ausgelassene Stimmung im Labor und für so manch illustre WG-Party mit dem ein oder anderen durchzechten Nacht. Claudius danke ich für ein paar schöne Motorradtouren durch Harz und Erzgebirge und natürlich für's Korrekturlesen dieser Niederschrift. Anja Serve sage ich danke für ihre Tätigkeiten als „meine“ *solubility screen*-HiWi-Sklavin. Ich hoffe sie hat mittlerweile ihre eigene Promotion in der Tasche.

Dem Rest unserer Nachwuchsforschungsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ kommt ebenfalls mein ausdrücklicher Dank zuteil für das angenehme Arbeitsklima und die richtige *lab-life-balance*. Ich hoffe sie werden alle ihren Weg gehen.

Bedanken möchte ich mich auch ausdrücklich bei meiner Familie für die stete Unterstützung in sämtlichen Belangen und meinen Freunden für die Geduld die sie mit mir hatten. Nun haben ihre Fragen „Wann bist Du endlich Doktor?“ ein Ende.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mariya für Verständnis, Geduld und ihre Unterstützung, auch wenn ich es ihr während der Schreibphase nicht immer leicht gemacht habe.

Publikationen und Poster

Publikationen

Studte, P., Zink, S., Jablonowski, D., Bär, C., von der Haar, T., Tuite, M.F., Schaffrath, R. (2008). tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Mol Microbiol* 69, 1266-1277.

Poster

Studte, P., Arnold, M., Rudolph, R., Pfeifer, S. Human γ B-crystallin as a scaffold for artificial binding proteins. 19th Faltertage, Wittenberg (2008).

Studte, P. and Schaffrath, R. tRNA methylases effect *K. lactis* zymocin lethality. 1st VAAM Symposium Biology of Yeast and Filamentous Fungi, Frankfurt am Main (2006).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlich und inhaltlich entnommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturteil aufgeführt. Weiterhin versichere ich, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder einer anderen universitären Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Doktorgrades beworben habe.

Düsseldorf, 22.07.2015

Patrick Studte

Angaben zur Person

Familienname: Studte
Vorname: Patrick
vorhandener akademischer Grad: Diplom-Biologe
Geburtsdatum: 26.12.1981
Geburtsort: Haldensleben
Geschlecht: männlich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift: Sommersstraße 18, 40476 Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Fachgebiet der Promotion: Biochemie

Bildungsgang

1988 – 1992 Grundschule „Maxim-Gorki-Oberschule“, Hillersleben

1992 – 06/2000 Gymnasium „Friedrich-Ludwig-Jahn“, Haldensleben
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8)

09/2000 – 09/2001 Grundwehrdienst

10/2001 – 03/2007 Studium der Biologie an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom (Note 1,2)
Titel der Diplomarbeit: „Das *Saccharomyces cerevisiae* tRNA-
Methylasegen TRM9/KTI1 und dessen Funktion für die Letalität
der tRNAse Zymocin.“ angefertigt am Institut für Genetik der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2007 – 06/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe
„Künstliche Bindeproteine“ von Dr. Sven Pfeifer an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Anfertigung der Promotionsarbeit unter Prof. Dr. habil. Rainer
Rudolph bzw. ab 12/2009 unter PD Dr. habil. Hauke Lilie