

Lehrstuhl für Biologische Chemie  
Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen

# **Engineering von Bindungsproteinen gegen Hsp70 als Werkzeuge zur Visualisierung und Therapie von Tumoren**

**Dipl.-Biol. Lars Friedrich**

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Michael Schemann

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arne Skerra

2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff

3. Prof. Dr. Iris Antes

Die Dissertation wurde am 16.03.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.01.2018 angenommen.



## Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das 70 kDa Heat Shock Protein HSPA1A/B als Zielstruktur auf Tumorzellen.....	1
1.2	Antikörperfragmente und alternative Protein-Scaffolds für Tumor-Imaging und -Therapie.....	5
1.3	Mikrobielles <i>Surface Display</i> für die Selektion von Bindungsproteinen .....	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Bakterienstämme und Phagen.....	19
2.1.2	Zelllinien und Versuchstiere .....	19
2.1.3	Plasmide.....	20
2.1.4	Oligodesoxynukleotide .....	20
2.1.5	Antikörper und sonstige Proteinreagenzien.....	21
2.1.6	Chemikalien .....	22
2.1.7	Standards und Kits .....	24
2.1.8	Geräte.....	25
2.1.9	Sonstiges Material.....	27
2.1.10	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen.....	28
2.1.11	Software .....	32
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	33
2.2.2	Transformation nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode .....	33
2.2.3	Transformation mittels Elektroporation.....	34
2.2.4	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	35
2.2.5	Isolierung von RNA aus Säugerzellen.....	35
2.2.6	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA.....	36
2.2.7	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA.....	36
2.3	Anticalin-Präsentation und -Selektion .....	39
2.3.1	Herstellung von Anticalin-Bibliotheken zur Präsentation auf <i>E. coli</i> .....	39
2.3.2	Affinitätsanreicherung durch Adsorption an paramagnetische Partikel .....	40
2.3.3	Affinitätsanreicherung mittels <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS).....	41
2.3.4	Cytofluorimetrische Einzelklonanalyse .....	42

2.4	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	42
2.4.1	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben .....	42
2.4.2	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter .....	43
2.5	Proteinchemische Methoden.....	45
2.5.1	Chromatographische Verfahren.....	45
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	47
2.5.3	N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau).....	47
2.5.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	48
2.5.5	Amino-selektive chemische Modifizierung von Proteinen.....	48
2.5.6	Chemische Modifizierung von Cystein-Seitenketten .....	51
2.5.7	Herstellung von Proteinkonjugaten mit Zirkonium und Lutetium .....	52
2.6	Immunologische Methoden und Zytotoxizitätstests .....	53
2.6.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	53
2.6.2	Epitop-Kartierung mit dem SPOT-Verfahren.....	55
2.6.3	Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	56
2.6.4	Durchfluss-Cytofluorimetrie von Zelllinien .....	57
2.6.5	Zytotoxizitätstest.....	58
2.7	Biophysikalische Methoden.....	58
2.7.1	Circulardichroismus-Spektroskopie (CD) .....	58
2.7.2	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) .....	59
2.7.3	Massenspektrometrie .....	60
2.8	Tierexperimentelle Methoden.....	61
2.8.1	Tumor-Xenotransplantation.....	61
2.8.2	Positronenemissions-Tomographie (PET) und Computer-Tomographie (CT) .....	61
2.8.3	Szintillationsradiometrische Biodistributionsuntersuchung .....	61
2.8.4	Autoradiographie von Tumor-Dünnschnitten.....	62
3	Ergebnisse.....	63
3.1	Herstellung eines Fab-Fragments gegen Hsp70 in <i>E. coli</i> und dessen funktionelle Analyse .....	63
3.1.1	Subklonierung der V-Regionen eines Hsp70-spezifischen Antikörpers und Versuche zur Produktion des entsprechenden Fab-Fragments in <i>E. coli</i> .....	63
3.1.2	<i>De novo</i> -Sequenzierung der V <sub>H</sub> - und V <sub>L</sub> -kodierenden Bereiche des cmHsp70.1-Transkripts.....	66

3.1.3	Versuche zur Verbesserung der funktionellen Proteinausbeute in <i>E. coli</i> .....	68
3.1.4	Untersuchung der Antigenbindung mittels ELISA und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie.....	73
3.1.5	Epitop-Bestimmung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 im Vergleich zum rekombinanten Fab-Fragment $\alpha$ Hsp70ch/m durch SPOT-Analyse.....	75
3.1.6	Nachweis der Bindung von Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen.....	78
3.2	Herstellung und Reinigung von humanem HSP70.1, dessen Substrat-Bindedomäne (SBD) sowie der SBD von humanem BiP in <i>E. coli</i> .....	79
3.2.1	Konstruktion eines Expressionsvektors, Produktion und Reinigung von humanem Hsp70.1 .....	79
3.2.2	Konstruktion von Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung der Substrat-Bindedomänen von humanem Hsp70.1 und BiP .....	80
3.2.3	Konstruktion eines Expressionsvektors, Produktion und Reinigung der Hsp70.1-Substrat-Bindedomäne in Fusion mit eGFP .....	84
3.3	Bakterielles <i>Surface Display</i> zur Selektion von Anticalinen gegen Hsp70 .....	86
3.3.1	Herstellung einer Anticalin-Bibliothek und Affinitätsanreicherung durch Adsorption von <i>E. coli</i> -Zellen an paramagnetische „Partikel“ .....	86
3.3.2	Selektion von hHsp70.1-bindenden Anticalinen mittels FACS.....	88
3.4	Affinitätsmaturierung des $\alpha$ Hsp70-Anticalins BBG10 .....	95
3.4.1	Erzeugung einer partiell randomisierten Anticalin-Bibliothek durch Zufallsmutagenese und FACS-Anreicherung gegen Hsp70 .....	95
3.4.2	Kombination von Mutationen sowie gerichtete Evolution der Variante BBG10I.101	
3.5	Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung des für Hsp70.1 spezifischen Anticalins BBG10C/I.....	106
3.5.1	Untersuchung der Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung.....	106
3.5.2	Epitop-Analyse mit dem SPOT-Verfahren.....	107
3.5.3	Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von BBG10C/I mit Hsp70.1-verwandten Proteinen .....	109
3.5.4	Untersuchung der Antigenbindung auf der Oberfläche von Tumorzellen.....	111
3.6	Funktionelle Charakterisierung eines Anticalin-basierten Toxin-Konjugats.....	112
3.7	Herstellung und funktionelle Charakterisierung von Anticalin-basierten Tracern für das Tumor-Imaging.....	114
3.7.1	Konstruktion von Expressionsvektoren für die Produktion von Anticalinen mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit und einem reaktiven Cysteinrest.....	114

3.7.2	Produktion, Reinigung und Kopplung von Anticalinvarianten mit Chelatbildnern und Untersuchung der Antigenaffinität.....	116
3.7.3	Untersuchung der Biodistribution von Anti-Hsp70-Anticalin-basierten Tracern am Mausmodell mit xenotransplantierten Tumoren .....	121
4	Diskussion .....	127
4.1	Heterologe Produktion und Charakterisierung des Fab-Fragments eines Anti-Hsp70-Antikörpers in <i>E. coli</i> .....	127
4.2	<i>E. coli</i> -Surface Display als Grundlage zur Selektion von Bindungsproteinen aus naiven Genbibliotheken.....	131
4.3	Affinitätsmaturierung .....	134
4.4	Der Hsp70-Interdomänenlinker: ein außergewöhnliches Epitop.....	137
4.5	Anti-Hsp70-Anticaline für das molekulare <i>In vivo</i> -Imaging und die Therapie von Tumoren.....	141
5	Zusammenfassung .....	147
6	Summary.....	149
7	Abkürzungen .....	151
8	Literatur .....	154
9	Danksagung .....	175
10	Anhang .....	176

# 1 Einleitung

## 1.1 Das 70 kDa Heat Shock Protein HSPA1A/B als Zielstruktur auf Tumorzellen

Sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten reagieren auf Temperaturerhöhungen und andere Stressbedingungen mit der Synthese sogenannter Heatshock-Proteine. Die Mitglieder der 70-kDa-Heatshock-Chaperonfamilie (Hsp70) zählen unumstritten zu den in der Phylogenese sowohl strukturell als auch funktionell am stärksten konservierten Proteinen (Gupta & Golding, 1993). In der eukaryotischen Zelle sind Hsp70-Proteine in fast allen Kompartimenten anzutreffen, wo sie essentielle Funktionen bei der Proteinsynthese/-faltung, -assemblierung/-disassemblierung und -degradation wie auch dem Transmembrantransport von Proteinen erfüllen (Bukau & Horwich, 1998; Jensen & Johnson, 1999; Lemmon, 2001; Mayer & Bukau, 2005).

Beim Menschen kodieren 17 verschiedene Gene für Hsp70-Proteine, welche sich im Hinblick auf subzelluläre Lokalisation, Substratspezifität und Gewebevorkommen unterscheiden (Brocchieri *et al.*, 2008; Daugaard *et al.*, 2007; Fourie *et al.*, 1994). Unter medizinischen Gesichtspunkten ist hierbei vor allem die selektive Lokalisierung einiger Vertreter der Hsp70-Proteinfamilie auf der Oberfläche von Tumorzellen bemerkenswert (Weidle *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2003). Am besten untersucht ist dieses Phänomen bei Hsp70.1 (UniProt-Eintrag P0DMV8), welches von den Stress-induzierbaren humanen Genen HSPA1A und HSPA1B kodiert wird, und auch beim 78 kDa-Glucose-regulierten Protein (Grp78; Li, 2012 und Multhoff, 2007), welches aufgrund seiner Rolle bei der Antikörperfaltung im Endoplasmatischen Reticulum auch als *Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein* (BiP) bezeichnet (Haas & Wabl, 1983) und vom HSPA5-Gen kodiert wird (Kampinga *et al.*, 2009).

Die Faltungshelferfunktion von Hsp70-Chaperon-Proteinen beruht auf der ATP-kontrollierten Bindung exponierter hydrophober Peptidsequenzen von Substratproteinen mit nicht-nativer Konformation und vermindert insbesondere bei der Proteinbiosynthese die Aggregatbildung durch Senkung der Konzentration freier Faltungsintermediate (kinetische Partitionierung; Chiti *et al.*, 2002; Han & Christen, 2004). Eine ebenfalls diskutierte, mehr aktive Funktion bei der Proteinfaltung besteht in der partiellen Entfaltung von Proteinsubstraten beim Durchlauf der ATP-getriebenen Hsp70-Bindungs- und Freisetzyklen („Unfoldase“-Aktivität). So kann beispielsweise das „Entwirren“ fehlgefalteter  $\beta$ -Faltblätter in nicht-nativen Faltungsintermediaten zur Überwindung von kinetischen Barrieren bei der Faltung zum nativen Protein beitragen (Mayer & Bukau, 2005; Slepnev & Witt, 2002).

Die Vielzahl von biochemischen, strukturellen und bioinformatischen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte hat die Aufstellung eines schlüssigen Modells zum Struktur-Funktions-Mechanismus dieses Chaperons ermöglicht. Hsp70.1 setzt sich aus zwei funktionellen Domänen zusammen. Die N-terminale Nukleotid-Bindedomäne (NBD) verfügt über eine schwache ATPase-Aktivität und besteht aus zwei Hemisphären, welche eine tiefe Kavität mit der Adenin-

Nukleotid-Bindungsstelle an ihrem Grund umschließen. Durch einen flexiblen hydrophoben Linker ist die NBD mit der N-terminalen Substrat-Bindedomäne (SBD) verbunden. Diese setzt sich ebenfalls aus zwei Subdomänen zusammen: einem  $\beta$ -Sandwich mit einer hydrophoben Vertiefung für die Bindung eines kurzen Peptidstrangs in gestreckter Konformation und einer  $\alpha$ -helikalen Struktur, welche quasi einen Deckel über der Substratbindungstasche bildet.

Die Bindung und Hydrolyse von ATP in der NBD hat eine Konformationsänderung des gesamten Proteins zur Folge, welche die funktionellen Eigenschaften der Substrat-Bindedomäne moduliert. So resultiert der Austausch von ADP gegen ATP in der N-terminalen Domäne in einer starken Verringerung der Substrataffinität der C-terminalen Domäne und somit in der Freisetzung des transient gebundenen Polypeptids. Umgekehrt stimuliert die SBD-seitige Bindung eines Substratproteins die ATP-Hydrolyse in der NBD (Bukau & Horwich, 1998). Eine Schlüsselrolle bei der Kommunikation zwischen den Domänen kommt dabei dem hochkonservierten Interdomänen-Linker zu (Jiang *et al.*, 2007; Smock *et al.*, 2010; Swain *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2006; Zhuravleva & Gierasch, 2011).

Es wird angenommen, dass die Bindung von ATP anstelle von ADP den Spalt zwischen den beiden „Hälften“ der NBD geringfügig erweitert und dabei eine hydrophobe Vertiefung zugänglich wird, welche den Interdomänen-Linker bindet. In Experimenten mit verkürzten Varianten des Hsp70-Proteins DnaK aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der Linker notwendig und hinreichend ist, um eine Erhöhung der ATP-Hydrolyserate auszulösen (Vogel *et al.*, 2006). NMR- und Ultrazentrifugationsuntersuchungen zeigten, dass das Einklappen des Linkers ein „Andocken“ der SBD an die NBD bewirkt (Borges & Ramos, 2009; Swain *et al.*, 2007). Die Strukturaufklärung des mit Hsp70 verwandten Hsp110-Proteins Sse1 aus *S. cerevisiae* deutet außerdem darauf hin, dass dabei der  $\alpha$ -helikale „Deckel“ von der Substrat-Bindetasche wegklappt und das  $\beta$ -Sandwich teilweise an struktureller Ordnung verliert, wodurch die Substrataffinität reduziert wird.

Die weitgreifende zytoprotektive Wirkung von Hsp70.1 geht jedoch über die Abschirmung aggregationsanfälliger Polypeptidsequenzen hinaus. So erzeugt die Überexpression von Hsp70.1 nicht nur Resistenz gegenüber Hitze, sondern kann auch den durch Tumornekrosefaktoren, Monozyten, oxidativen Stress, Ceramide, terminale Differenzierung, UV-Strahlung, Caspase-3-Überexpression und verschiedene Chemotherapeutika induzierten Zelltod verhindern. Dementsprechend überrascht es nicht, dass in Krebszellen Hsp70.1-Überexpression häufig auftritt und mit der Bösartigkeit von Tumoren assoziiert ist (Jäättelä, 1999).

Erstaunlicherweise kann Hsp70.1 trotz der eindeutig intrazellulären Wirkung und des Fehlens einer sekretorischen Signalsequenz im Serum nachgewiesen werden (Pockley *et al.*, 1998). Laut aktuellen Studien liegt der physiologische Hsp70.1-Plasmaspiegel bei gesunden Individuen im Bereich von 1,8-14 ng/ml, ist jedoch bei verschiedenen Krebserkrankungen signifikant erhöht (Abe *et al.*, 2004; Kocsis *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2010). Dabei ist das extrazellulär zirkulierende Hsp70.1 offenbar von immunologischer Relevanz. So wurde gezeigt, dass Hsp70.1 in der Lage ist, sowohl natürliche Killerzellen (NK-Zelle) als auch Makrophagen zu



aktivieren (Multhoff *et al.*, 1999; Vega *et al.*, 2008). Zudem kann durch die Aufnahme von Hsp70.1-Peptid-Komplexen durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen und die anschließende Kreuzpräsentation der Peptide über MHC-Klasse I-Rezeptoren eine antigenspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort ausgelöst werden (Binder *et al.*, 2001; Jolesch *et al.*, 2012).

Auch wenn die Hsp70.1-Freisetzung teilweise auf nekrotische Prozesse zurückzuführen sein kann (Basu *et al.*, 2000), konnte mit Hilfe von Primärkulturen mononukleärer Zellen des peripheren Bluts gezeigt werden, dass die Sekretion von Hsp70.1 auch in Abwesenheit von Zelltod stattfindet (Hunter-Lavin *et al.*, 2004). Weiter wurde gezeigt, dass es sich hierbei um einen aktiven Sekretionsprozess handelt. Nachdem bei Hsp70.1 keine Sekretionssignalsequenz identifiziert werden konnte, muss ein nicht-klassischer Sekretionsweg für die Translokation von Hsp70.1 ins Blut verantwortlich sein. Mit Krebszellkulturen wurde gezeigt, dass bei der Sekretion das lyso-endosomale Kompartiment involviert ist. Dies und die Abhängigkeit von einem ABC-Transportersystem deuten auf eine Ähnlichkeit mit dem Sekretionsweg von Interleukin-1 $\beta$  hin, dem ebenfalls ein Signalpeptid fehlt. Andererseits zeigt Hsp70.1 mit seiner nachweislichen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin (PS) Parallelen zum alternativen Sekretionsweg von FGF-1 und IL-1 $\alpha$  (Arispe *et al.*, 2002; Arispe *et al.*, 2004). Die Hitzeschock-induzierte Sekretion dieser Proteine, welche ebenfalls mit hoher Affinität das an der Innenseite der Zellmembran lokalisierte PS binden, ist von der Auflösung dieser Lipid-Asymmetrie unter Stress-Bedingungen begleitet (Jensen *et al.*, 2009; Kirov *et al.*, 2012; Mambula & Calderwood, 2006; Riedl *et al.*, 2011).

Die Affinität von Hsp70.1 zu bestimmten Lipiden wird auch als Erklärung für ein Phänomen angenommen, welches bereits 1992 von zwei Forschergruppen unabhängig voneinander beschrieben wurde: Krebszellen präsentieren nach einem nicht-letalen Hitzeschock Hsp70.1 auf der Zelloberfläche (Di Cesare *et al.*, 1992; Ferrarini *et al.*, 1992). Bei verschiedenen Tumorzelllinien lässt sich Zelloberflächen-Hsp70.1 sogar ohne Temperaturerhöhung nachweisen. Seit dem hat sich insbesondere die Arbeitsgruppe um Prof. Gabriele Multhoff der Erforschung dieses Phänomens gewidmet. So wurde gezeigt, dass die Hsp70.1-Oberflächenexpression durch radioaktive Bestrahlung oder den Einsatz von Chemotherapeutika verstärkt wird, dass aber auch vor allem metastasierende Tumore erhöhte Mengen von Hsp70.1 auf der Zelloberfläche präsentieren (Botzler *et al.*, 1998b; Gehrman *et al.*, 2005; Gehrman *et al.*, 2002; Multhoff *et al.*, 1995).

Einhergehend mit der Hsp70.1-Oberflächenexpression wurde eine gesteigerte Stressresistenz der Zellen festgestellt. Daher ist es kaum verwunderlich, dass Oberflächen-Hsp70.1 (oHsp70) bei verschiedenen Krebsarten wie dem rektalen Karzinom oder Lungenkrebs als negativer prognostischer Marker gilt (Pfister *et al.*, 2007). Andererseits stellt oHsp70 ein Ziel für die angeborene Immunantwort dar: Offenbar besitzt Hsp70.1 neben der oben beschriebenen Funktion, NK-Zellen zu aktivieren, in seiner Zelloberflächen-lokalisierten Form auch noch die Fähigkeit, das von diesen Zellen sekretierte Granzym B zu binden und zu internalisieren und somit die Auslösung der Apoptose zu begünstigen (Gross *et al.*, 2003).

Auch wenn die genaue Art der Assoziation von Hsp70 mit der Zelloberfläche noch nicht bekannt ist, konnte gezeigt werden, dass sich oHsp70 weder durch Hochsalz-Bedingungen noch durch pH-Erhöhung/-Absenkung von der Zellmembran entfernen lässt. Damit ist eine einfache Assoziation von oHsp70 mit Transmembranproteinen unwahrscheinlich (Gehrmann *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2008). Die Beobachtung, dass Hsp70.1 in der Lage ist, stabile Kationen-leitende Kanäle in PS-haltigen künstlichen Lipidmembranen zu erzeugen, lässt trotz des Fehlens offensichtlicher Transmembransequenzen auf eine Insertion von Hsp70.1 in die Plasmamembran schließen (Arispe *et al.*, 2002; De Maio, 2011). In der Zellmembran ist Hsp70.1 in Detergens-resistenten Mikrodomänen, sogenannten *Lipid Rafts*, lokalisiert (Broquet *et al.*, 2003; Hunter-Lavin *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2008).

Unter einer Vielzahl von verfügbaren Hsp70.1-spezifischen Antikörpern finden sich nur wenige, welche Hsp70.1 auch in seiner Membran-assoziierten Form zu binden vermögen. Diesen Antikörpern ist gemein, dass ihre Epitope in der C-terminalen SBD liegen. Die Erklärung hierfür liegt entweder in der Unzugänglichkeit der anderen Proteindomänen durch die Art der Insertion von Hsp70.1 in der Plasmamembran oder in der Maskierung der Epitope NBD-spezifischer Antikörper durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Botzler *et al.*, 1998a; Multhoff & Hightower, 2011). Ein Protein, von dem gezeigt wurde, dass es im Bereich der NBD mit oHsp70 interagiert, ist *Bcl-2-Associated Athanogene-4* (BAG-4). BAG-4 ist ein Regulator von Caspase-abhängiger Apoptose, und dementsprechend wird ein Zusammenhang dieser Interaktion mit der verminderten Empfindlichkeit von oHsp70-positiven Tumorzellen gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika diskutiert (Gehrmann *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 1999). Ein weiteres Molekül, welches unabhängig von der Chaperonfunktion Bindungsaffinität zu Hsp70.1 aufweist, ist das Enzym Tissue-Transglutaminase (tTG). tTG spielt eine essentielle Rolle bei der Krebszellmigration und ist im Leitsaum (*Leading Edge*) der Zellen mit Hsp70.1 kolokalisiert. Die gezielte Inhibition der ATP-Hydrolyseaktivität von Hsp70 verhindert dies und unterbindet somit auch die Zellmigration (Boroughs *et al.*, 2011). Die Rolle von Hsp70 bei diesem Vorgang muss möglicherweise auch im Zusammenhang mit der oben erwähnten verstärkten Zelloberflächenexpression von Hsp70.1 bei Metastasen betrachtet werden. Die Entwicklung einer übermäßigen zellulären Motilität ist ein Hauptkriterium für die Entstehung des metastasierenden Phänotyps bei Krebs im fortgeschrittenen Stadium (Boroughs *et al.*, 2011; Sahai, 2007).

Insgesamt stellt sich die Rolle von Hsp70.1 bei der Entwicklung von Krebs ambivalent dar (Horvath & Vigh, 2010; Multhoff *et al.*, 2012): Einerseits ist die verstärkte Oberflächenexpression von Hsp70.1 mit der erhöhten Aggressivität von Tumoren und einer zusätzlichen Resistenz gegenüber antineoplastischer Chemotherapie und Bestrahlung korreliert. Andererseits bildet oHsp70 eine Erkennungsstruktur für das angeborene Immunsystem (Multhoff *et al.*, 1997) und kann bei manchen Krebsarten, vermutlich in Abhängigkeit von der Metastasierungsroute, sogar als positiver prognostischer Marker betrachtet werden (Pfister *et al.*, 2007).

Die Verstärkung dieses natürlichen Mechanismus zur Bekämpfung entarteter Zellen ist der Ausgangspunkt für verschiedene experimentelle Ansätze zur Tumorthherapie. So wurde in Krebsmodellen mit xenotransplantierten Mäusen gezeigt, dass die Injektion von NK-Zellen,

welche mit IL-2 und einer 14-mer Peptidsequenz aus Hsp70.1 („TKD-Peptid“, Aminosäurepositionen 450-463) aktiviert wurden, zu verringerter Tumormasse, verzögerter Metastasierung und verlängerter Lebenserwartung führt (Moser *et al.*, 2002; Multhoff *et al.*, 2001; Stangl *et al.*, 2006). Ein monoklonaler Antikörper, der durch Immunisierung von Mäusen mit dem „TKD-Peptid“ generiert wurde (Multhoff, 2007), ist in der Lage, oHsp70 auf der Tumorzelloberfläche zu binden und in Mäusen mit oHsp70<sup>+</sup>-Tumoren antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) auszulösen (Stangl *et al.*, 2010). Die Kombination der Anwendung dieses Antikörpers mit der beschriebenen NK-Zelltherapie führte im Tiermodell zu einer effektiven Tumorsuppression (Gehrmann *et al.*, 2012).

## 1.2 Antikörperfragmente und alternative Protein-Scaffolds für Tumor-Imaging und -Therapie

Mit der Entwicklung Protein-basierter Arzneimittel (auch Biopharmazeutika/Biologics), wobei insbesondere die Gruppe der monoklonalen Antikörper zu nennen ist, ist heute die greifbare Hoffnung verknüpft, eine Antwort auf die gravierendsten Krankheiten der Menschheit zu schaffen (Skerra, 2015). Unter den zehn verkaufstärksten rezeptpflichtigen Arzneimitteln befinden sich drei Antikörperpräparate zur Bekämpfung von Krebs (News, 2013). Antikörperbasierte Strategien zur Krebsbehandlung beruhen auf verschiedenen Wirkmechanismen, wobei sich grundsätzlich zwei Prinzipien unterscheiden lassen: Zum einen können die Antikörper hemmend in biologische Prozesse eingreifen, welche für das Überleben bzw. die Vermehrung der malignen Zellen notwendig sind.

So wirkt das Darmkrebstherapeutikum Cetuximab direkt durch die Bindung an den tumorspezifisch überexprimierten oder mutierten Zelloberflächenrezeptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) und greift dabei hemmend in einen außer Kontrolle geratenen Signalweg mit proliferativer Wirkung ein (Friedländer *et al.*, 2008). Eine indirekte Wirkung findet sich bei Tumorangiogenese-Hemmern, wie beispielsweise Bevacizumab. Dieser Antikörper verhindert durch Blockierung des von Krebszellen sekretierten Wachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) die Gefäßneubildung, welche für das Wachstum des Tumors ab etwa einem Durchmesser von 1 mm essentiell wird (Kim *et al.*, 1993).

In einem unterschiedlichen Ansatz macht man sich die immunologischen Effektorfunktionen von Antikörpern zu Nutze. Der Wirkstoff Rituximab (Manches *et al.*, 2003) beispielsweise ist in der Lage, durch die Bindung von Antigenen auf der Tumor-Zelloberfläche das körpereigene Immunsystem zu rekrutieren (Opsonierung). Die Eliminierung einer auf diese Weise opsonierten Krebszelle kann über den klassischen Weg der Komplementaktivierung (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) oder durch die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) erfolgen. Für beide Wirkmechanismen sind die C<sub>H2</sub>-Domänen des Fc-Teils der IgG-Antikörper essentiell (Albanesi & Daëron, 2012).

Ein potentiell noch effektiveres Konzept zur Antikörper-basierten Krebstherapie macht sich die Bestückung mit zytotoxischen „Waffen“ zunutze und funktioniert unabhängig von einem intakten Immunsystem des Patienten. Durch die Fähigkeit von Antikörpern, mit hoher Selektivität und Affinität an Zelloberflächenstrukturen zu binden, welche ausschließlich oder in übermäßig starker Zahl auf der Oberfläche von Krebszellen ausgebildet werden, können diese gezielt mit der Zytotoxizität „beliefert“ werden (*Drug Targeting*). Einerseits kann es sich hierbei um chemotherapeutische Giftstoffe handeln, welche durch spaltbare Linker mit dem Antikörper verknüpft sind (*Antibody Drug Conjugate*, ADC) und nach der Aufnahme in die Krebszellen (Endozytose) freigesetzt werden, wo sie ihren intrazellulären Wirkort erreichen. Ein Beispiel hierfür ist die Bewaffnung des zur Brustkrebstherapie eingesetzten Antikörpers Trastuzumab mit einem als Tubulinpolymerisationshemmer wirkenden Maytensinderivat (DM1; Burris *et al.*, 2011). In den USA erfolgte die Zulassung dieses Wirkstoffs mit der Bezeichnung Trastuzumab-Emtansine im Februar 2013.

Darüber hinaus ist es auch möglich, Antikörper mit Radioisotopen zu konjugieren. Die Radioimmuntherapie (RIT) bietet im Vergleich zu den oben erwähnten Wirkmechanismen den Vorteil eines erweiterten physiologischen Wirkradius (Kenanova & Wu, 2006). Das heißt, dass die Zytotoxizität nicht nur auf die Zelle, welche den Antikörper direkt gebunden hat, beschränkt bleibt sondern auch auf die umgebenden Zellen übergreift (Bystander-Effekt). Angesichts der bei Krebs häufig beobachtbaren Heterogenität von Oberflächenantigenen, bietet eine solche „regionale“ Wirkung Vorteile, um den Effektradius auf die Gesamtheit des Tumors oder der Metastasen auszuweiten (Fidler, 2012). Gegenwärtig befinden sich zwei zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) zugelassene Radioimmuntherapeutika auf dem Markt: der radiohalogenierte Antikörper <sup>131</sup>I-Tositumomab und der mit dem Chelatbildner Tiuxetan konjugierte und mit Yttrium-90 beladene Antikörper Ibritumomab. Beide erkennen ein integrales Membranprotein (CD20), das von B-Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien einschließlich Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) exprimiert wird (Illidge & Morschhauser, 2011).

Ein weiteres Anwendungsgebiet radioaktiver Antikörperkonjugate ist die Tumor-Radioimmun-diagnostik (RID), ein nicht-invasives Verfahren zur Detektion, Klassifizierung und zum Monitoring von Krebserkrankungen. Die hierfür bislang zugelassenen Antikörperpräparate verwenden ausschließlich  $\gamma$ -Strahler wie <sup>111</sup>In und <sup>99m</sup>Tc und sind somit für die Nutzung in der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (kurz SPECT von englisch *Single Photon Emission Computed Tomography*) konzipiert. Aufgrund der geringen Sensitivität und des niedrigen räumlichen Auflösungsvermögens dieser Technologie werden zurzeit jedoch vermehrt Tracer entwickelt, welche sich zum Gebrauch mit der hochauflösenden Positronen-Emissionstomographie (PET) eignen. Hierfür gebräuchliche Radionuklide sind unter anderem <sup>64</sup>Cu, <sup>86</sup>Y, <sup>89</sup>Zr und <sup>124</sup>I (James & Gambhir, 2012).

Eine Alternative zu radioaktiven Tracern bietet die Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen. Licht im Nah-Infrarotbereich ( $\lambda = 600 - 1000$  nm) ist in der Lage, Gewebe über eine Stärke von mehr als 10 cm zu durchdringen. Molekulares Imaging mit entsprechenden Fluorophoren zeichnet sich

durch eine einfache und gefahrlose Handhabung sowie die Nebenwirkungsarmut aus. Leider wird das Licht beim Durchdringen von Gewebe schon nach wenigen Millimetern diffus, was eine Verminderung der Bildauflösung zur Folge hat (Ntziachristos, 2006). Somit wird sich die zukünftige Anwendung dieser Technologie wohl auf bestimmte Nischen, wie z. B. endoskopische Untersuchungen, beschränken.

Zusammen genommen verdeutlichen diese Errungenschaften der letzten Jahre und Jahrzehnte die Verwirklichung eines seit über hundert Jahren gehegten Ziels der pharmazeutischen Forschung, nämlich des von Paul Ehrlich postulierten Konzepts der Zauberkugel: eines Wirkstoffs, der selektiv den Weg zur zellulären Zielstruktur findet, wobei gesundes Gewebe jedoch unbeschadet bleibt (Strebhardt & Ullrich, 2008).

In Anbetracht dieser Entwicklungen müsste man also annehmen, dass Krebserkrankungen ihren Schrecken verloren hätten. Das Gegenteil ist jedoch der Fall; nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Krebs eine der Haupttodesursachen: 2008 wurden 13% aller Todesfälle durch Krebs verursacht, Tendenz steigend (WHO, 2013). Somit stellt sich die Frage, welche Defizite der zur Verfügung stehenden Präparate einer größeren Durchschlagskraft im Wege stehen.

Zum einen hängt dies sicherlich mit der Verfügbarkeit von geeigneten Antigenen zusammen, welche tatsächlich auf Tumorgewebe beschränkt sind. So kann beispielsweise die Kardiotoxizität von Antikörperpräparaten wie Trastuzumab, deren Zielstrukturen Wachstumshormonrezeptoren der Erb-Familie darstellen, auf die Rolle eben jener Rezeptoren für die Entwicklung und das Überleben von Herzmuskelzellen zurückgeführt werden (Hervent & De Keulenaer, 2012). Eine weitere Form der Unverträglichkeit, welche Präparate murinen Ursprungs begleitet, ist die *Human Anti-Mouse Antibody* (HAMA)-Immunantwort. Eine Reihe von methodischen Entwicklungen hat es mittlerweile jedoch möglich gemacht, human-identische Antikörper herzustellen bzw. murine Antikörper zu humanisieren und somit das Risiko derartiger unerwünschter Immunantworten zu minimieren (Safdari *et al.*, 2013).

Das entscheidende Problem, mit dem sich Antikörper-basierte Strategien zur Krebsbekämpfung konfrontiert sehen, ist allerdings die Penetration solider Tumoren (Jang *et al.*, 2003). Die Herausforderung besteht dabei in der Gewährleistung des Transportes bis in die inneren Schichten des Tumors im Wettlauf sowohl mit der systemischen als auch der Antigen-vermittelten Eliminierung des Wirkstoffs. Eine detaillierte Darstellung dieser Problematik mit relevanten mathematischen Modellen findet sich in einem aktuellen Übersichtsartikel (Thurber *et al.*, 2008). Um vor diesem Hintergrund nachzuvollziehen, welche Bedeutung der Entwicklung von Antikörperfragmenten und alternativen Bindungsproteinen zukommt, sollen hier kurz die wichtigsten Faktoren im Hinblick auf das Tumor-*Targeting* beleuchtet werden.

Zunächst erschwert eine Reihe von anatomischen Besonderheiten von Tumoren das Eindringen von Wirkstoffen aus dem Blut. So ist das Gefäßsystem des Tumors deutlich stärker gewunden und permeabler als bei normalen Organen (Jain, 1990). Dies führt, auch als Folge des vermehrten Austritts von Makromolekülen aus dem Tumorinterstitium (*Enhanced Permeation and Retention*-

Effekt; Maeda *et al.*, 2000) zu einem erhöhten Fließwiderstand und so zu vermindertem Blutfluss im Vergleich mit normalem Gewebe (Beckman *et al.*, 2007).

Eine weitere anatomische Besonderheit von Tumoren ist ein erhöhter hydrostatischer Druck im Interstitium. Ursache hierfür ist ein Anstieg des kolloidosmotischen Drucks durch das vermehrte Eindringen von Makromolekülen durch die undichten Gefäße und ein mangelnder Abfluss durch eine Knappheit von ableitenden Lymphgefäßen bzw. durch die Verstopfung solcher Gefäße mit losen Zellen. Konvektion, welche bei normalem Gewebe die Hauptrolle für die Versorgung mit gelösten Stoffen spielt, findet demzufolge bei Tumoren nur noch vom Interstitium in Richtung der Blutgefäße statt (Baxter & Jain, 1989). Für den Transport von Molekülen gegen diesen Druckgradienten in den Tumor hinein spielt Diffusion die Hauptrolle. Angesichts der Tatsache, dass die Diffusionsgeschwindigkeit von Makromolekülen indirekt proportional zum Molekülradius ist, wird der Nachteil sehr großer Moleküle, wie im Fall von IgG-Antikörpern mit einer Molekülmasse von 150 kDa, für den Einsatz beim Tumor-Targeting offensichtlich.

Da für die Antigenbindung lediglich die N-terminalen Domänen von leichter und schwerer Kette (auch als Fv-Fragment bezeichnet) notwendig sind, liegt es auf der Hand, für Anwendungen, welche nicht der vom Fc-Teil vermittelten Effektorfunktionen bedürfen, auch nur diesen Teil als Basis von Wirkstoffen zu verwenden. In der Tat wurde gezeigt, dass die mit einem Linker zu sogenannten Single Chain Fv (scFv)-Fragmenten verbundenen variablen Domänen mit ihrer geringen Molekülmasse (26 kDa) im Vergleich zu IgGs eine sechsfach schnellere Penetration ermöglichen (Graff & Wittrup, 2003). Ein Nachteil von scFv-Fragmenten ist jedoch ihre verringerte Faltungsstabilität. Biophysikalische Untersuchungen ergaben, dass die aus durch Disulfid-verbrückten Ketten bestehenden Fab-Fragmente (47 kDa) deutlich höhere Stabilität aufweisen (Röthlisberger *et al.*, 2005).

Einen potentiellen Nachteil vieler Antikörperfragmente stellt deren fehlende Fähigkeit zur bivalenten Antigenbindung dar. IgG-Antikörper zeigen durch die Synergie ihrer beiden Antigenbindungsstellen eine apparente Affinitätserhöhung im Fall von an Oberflächen präsentierten Antigenen (Avidität). Um diesen Nachteil zu vermeiden, wurde eine Vielzahl von bivalenten Formaten für Antikörperfragmente entwickelt. Alternativ ist es allerdings auch möglich, den fehlenden Aviditätseffekt durch eine erhöhte Affinität des monovalenten Fragments zu kompensieren.

Affinität ist auch einer der entscheidenden Faktoren für die Verteilung von Antikörper-basierten Wirkstoffen im Tumor. Sowohl mathematische Berechnungen als auch experimentelle Studien haben gezeigt, dass eine hochaffine Bindung des Antikörperfragments an das Antigen die gleichmäßige Verteilung des Therapeutikums im Tumor erschwert (Fujimori *et al.*, 1990; Wenning & Murphy, 1999). Ist die Dissoziation eines Bindeproteins von seinem Antigen auf der Zelloberfläche langsamer als die endozytotische Eliminierung des Komplexes, so wird die Antikörperfront nur soweit in den Tumor einwandern, wie eine Sättigung aller erreichbaren Antigene bei der entsprechenden Antikörperkonzentration es möglich macht (*Binding Site Barrier*). Bindeproteine mit niedrigerer Affinität ermöglichen eine homogenere Verteilung im

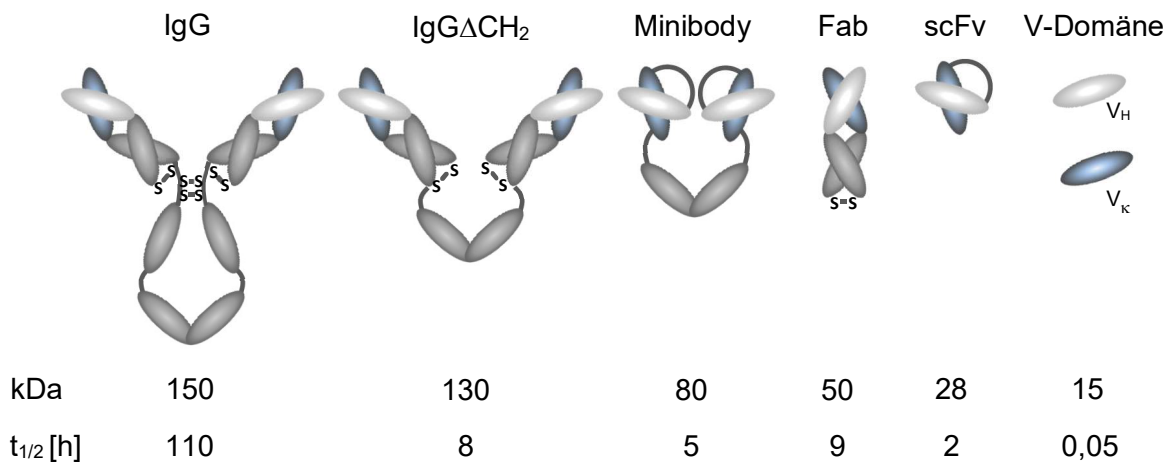
Tumor, werden allerdings auch schneller wieder ausgespült. Mit Fokus auf den praktischen Nutzen von neuartigen Antikörpertherapeutika wurde in einer anwendungsbezogenen Studie jedoch dargestellt, dass die Aufnahme der Bindeproteine in den Tumor mit steigender Affinität zunimmt, da es möglich ist, die bindungsbedingt begrenzte Penetrationstiefe mit einer Erhöhung der Dosis zu kompensieren. Bei Affinitäten ( $K_D$ ) von  $10^{-9}$  –  $10^{-10}$  M wird dagegen ein Plateau der Tumorakkumulation erreicht (Adams *et al.*, 2001).

Neben der Diffusionsgeschwindigkeit, der Affinität und der Antigenbindungs-vermittelten Eliminierung ist vor allem die Geschwindigkeit der systemischen Eliminierung für eine ausreichende Aufnahme des Wirkstoffs in den Tumor ausschlaggebend. Die Pharmakokinetik eines intravenös injizierten Antikörperpräparates lässt sich mit einem klassischen Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben. Der Plasmaspiegel des Wirkstoffes zeigt einen zweiphasigen Verlauf: Erst kommt es zu einem schnellen Abfall, danach verlangsamt sich die Konzentrationsänderung. Die erste Phase ( $\alpha$ -Phase) erklärt sich durch die Verteilung des Wirkstoffes zwischen einem zentralen Kompartiment, welches das Blut und gut durchblutete Organe umfasst, und dem interstitiellen Volumen weniger stark durchbluteter Organe (peripheres Kompartiment). Die zweite Phase ( $\beta$ -Phase) wird mit der terminalen Eliminierung des Antikörpers, also dessen Verstoffwechslung und Ausscheidung, erklärt.

Die Halbwertszeit von IgG-Molekülen der Isotypklassen  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  oder  $\gamma_4$  in der menschlichen Zirkulation ist mit 18-22 h für die  $\alpha$ -Phase und 21-23 Tagen für die  $\beta$ -Phase sehr lang (King, 1998). Dies beruht auf zwei Ursachen: zum einen ist die renale Ausscheidung vernachlässigbar, da Antikörpermoleküle die Ausschlussgröße des glomerulären Filters (ca. 50 - 70 kDa) weit überschreiten (Klinke & Baumann, 2010). Die zweite Ursache liegt in der zeitweiligen Evasion eines beträchtlichen Teils der IgG-Moleküle von der Zirkulation in das Innere von Endothelzellen, was auch Schutz vor Degradation bietet. Hierfür verantwortlich ist die Interaktion des Fc-Teils der mittels Pinozytose aufgenommenen IgG-Moleküle mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn). Diese im sauren Milieu des endosomalen Lumens stattfindende Interaktion verhindert den Abbau des Antikörpers im Lysosom. Nach einer gewissen Zeit verschmilzt das Endosom wieder mit der Zellmembran (Exocytose). Die Interaktion des FcRn mit dem IgG-Molekül ist beim neutralen pH des Blutes schwächer als im Endosom, was die Dissoziation des Antikörpers in das Blut ermöglicht (Kim, 2012; Ward & Ober, 2012). Die hauptsächliche Metabolisierung von IgG-Antikörpern findet letzten Endes in der Leber statt.

Wenngleich sich die lange Verweildauer von IgG-Molekülen im Blut vorteilhaft hinsichtlich einer gleichmäßigen Aufnahme in den Tumor auswirkt, so stellt sie für verschiedene Anwendungen ein erhebliches Problem dar. Für bildgebende Verfahren ist das Erreichen eines möglichst hohen Tumor-zu-Blut-Kontrasts innerhalb einer bestimmten Zeitspanne wünschenswert. Dies wiederum lässt sich nur dann erreichen, wenn der Tracer rascher aus dem Blutkreislauf eliminiert wird, als er in Folge der Antigenbindung im Tumor metabolisiert wird. Abgesehen hiervon ist die Persistenz einer Strahlungsquelle im Blut relevant für die Toxizität und Dosis-Begrenzung bei sowohl RID als auch RIT (Kenanova & Wu, 2006).

Um eine optimale Aufnahme des Radioimmunkonjugats in den Tumor bei möglichst kurzer Verweilzeit in der Zirkulation zu erreichen, wird derzeit versucht aus der Vielzahl von beschriebenen Antikörperfragmenten bestimmte besonders geeignete Formate auszuwählen (Abbildung 1.1). Die Schwierigkeit, diesbezügliche Vorhersagen zu treffen, macht es allerdings notwendig, je nach Zielstruktur, Anwendung und verwendetem Radionuklid in aufwendigen experimentellen Studien verschiedene Antikörperformate zu testen.



**Abbildung 1.1:** Antikörperformate zum *In-vivo*-Imaging (modifiziert nach Holliger & Hudson, 2005). Die schematische Übersicht enthält die interchainen Disulfidbrücken (S-S). Molekülmassen und durchschnittliche Serum-Halbwertszeiten ( $\beta$ -Phase im Menschen) sind angegeben.

Um die zusätzlichen Komplikationen zu vermeiden, welche mit den sehr unterschiedlichen Ansprüchen der einzelnen Formate bezüglich Produktion und Reinigung einhergehen, bietet es sich anstelle dessen an, ein faltungsstabiles und leicht produzierbares Format, wie das des Fab-Fragments, mit justierbaren Technologien zur Plasma-Halbwertszeitverlängerung zu kombinieren. Das bekannteste Verfahren hierzu ist die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens von therapeutischen Proteinen durch die chemische Kopplung mit Polyethylenglycol (PEG), was die glomeruläre Filtration in den Nieren verzögert (Kontermann, 2012; Veronese, 2009). Je nach Länge des verwendeten Polymers ändern sich der hydrodynamische Molekülradius und somit auch der Siebkoeffizient des Proteins, das heißt das Verhältnis der Konzentration im Nierenfiltrat zu der im Plasma. Nachteile der PEGylierung sind die Gewebeakkumulation, welche auf das Fehlen von entsprechenden Abbauwegen im Organismus zurückzuführen ist und histologische Veränderungen vor allem der Niere verursacht (Bendele *et al.*, 1998), sowie die Produktheterogenität als Folge der Polydispersität der verwendeten synthetischen Polymere wie auch als Folge der ggf. ungerichteten Kopplungsstrategie.

Eine vergleichsweise neue Alternative zur chemischen Kopplung mit konformationell ungeordneten Polymeren stellt die genetische Fusion mit nicht-faltenden Aminosäuresequenzen dar. Ein Beispiel hierfür sind aus den Aminosäuren L-Prolin, Alanin und Serin (PAS) zusammengesetzte Polypeptide, welche die Plasma-Halbwertszeit von therapeutischen Proteinen



auf die gleiche Weise verlängern wie PEG, dabei jedoch die Produktion von monodispersen Fusionsproteinen in rein biotechnologischen Prozessen ermöglichen (Schlapschy *et al.*, 2013).

Die Möglichkeit zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in heterologen Expressionssystemen hat nicht nur die pharmakokinetischen/-dynamischen Grundlagen für RIT und RID fundamental verändert; zusammen mit anderen biotechnologischen Entwicklungen wie der Synthese großer Genbibliotheken und der funktionellen Selektion hieraus hat sie auch die Techniken zur Generierung neuer Antikörper grundlegend erweitert. Wenngleich praktisch alle derzeit zugelassenen Antikörperpräparate noch auf Immunisierung von Säugetieren zurückgehen (Köhler & Milstein, 1975), so sind die Vorteile der *In-vitro*-Generierung von Antikörpern doch überdeutlich. Abgesehen von der Umgehung von Tierversuchen kann durch das Design der Antikörperbibliotheken sichergestellt werden, dass hauptsächlich Antikörper mit hohen Produktionsausbeuten ohne Tendenz zur Aggregation bzw. Oligomerisierung selektiert werden (Tiller *et al.*, 2013).

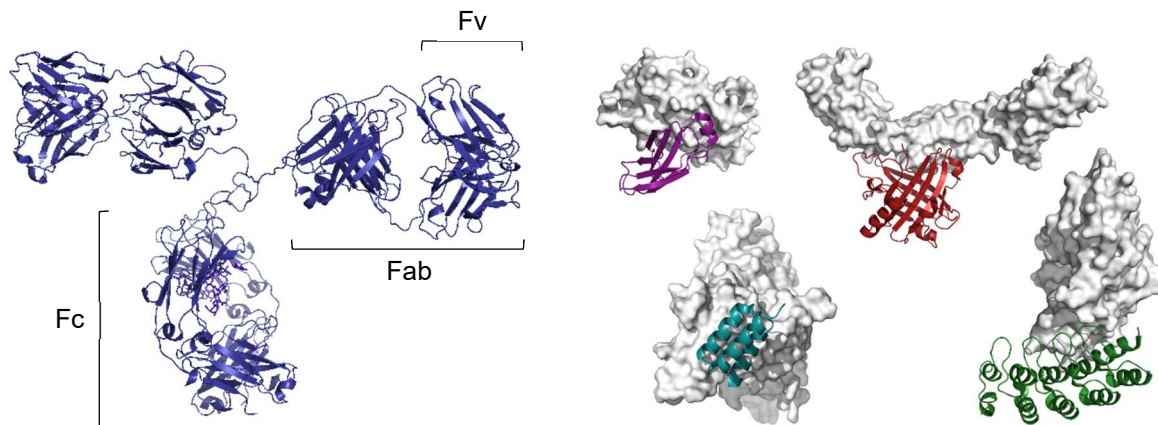
Eine weitere fundamentale Neuerung ist die Entwicklung von Proteingerüststrukturen (*Scaffolds*) als Alternative zu Antikörpern (Skerra, 2000). Dabei handelt es sich in der Regel um faltungsstabile Eindomänen-Proteine, welche sich im Gegensatz zu den komplexen, aus mehreren Ketten aufgebauten Antikörpermolekülen einfach in großen Mengen (z.B. durch Nutzung bakterieller Expressionssysteme) herstellen lassen.

Grundvoraussetzung für das Umfunktionieren dieser *Scaffolds* ist die Toleranz ihrer Proteinfaltung gegenüber dem Austausch von Aminosäuren an mehreren Positionen oder sogar von ganzen Sequenzbereichen. Bislang sind mehr als 50 Proteine beschrieben, denen mittels kombinatorischer Strategien oder rationellem Design eine neue Funktion – in der Regel eine Bindungsspezifität – zugeteilt werden konnte (Binz *et al.*, 2005). Die Anzahl der *Scaffolds*, die tatsächlich Vorteile für die universelle Generierung von Bindeproteinen mit einer effizienteren Produktion und Verbesserungen in der biomedizinischen Anwendung bieten, ist jedoch vermutlich deutlich geringer (Gebauer & Skerra, 2009) und wird in den kommenden Jahren voraussichtlich einer strengen Auslese unterliegen.

Vier der populärsten *Scaffolds* sind in Abbildung 1.2 gezeigt. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit sind die Anticaline. Hierbei handelt es sich um kelchförmige  $\beta$ -Barrel-Proteine mit einer Größe von ca. 20 kDa, welche sich von der ubiquitären Proteinfamilie der Lipocaline ableiten (Flower *et al.*, 2000; Schiefner & Skerra, 2015). Da Lipocaline natürliche Bindeproteine für verschiedenste hydrophobe organische Liganden wie u.a. Steroide, Retinoide, Biline und Lipide sind, verwundert es nicht, dass sich ihre Spezifität für die Bindung anderer organischer Moleküle wie Fluorescein, Digoxigenin und Phthaleinsäureester verändern lässt (Korndörfer *et al.*, 2003; Mercader & Skerra, 2002; Schlehuber *et al.*, 2000).

Weniger auf der Hand liegt ihr Einsatz für die Bindung proteinogener Liganden. Wie jedoch die Selektion einer Reihe von hochaffinen Peptid- und Proteinbindern in den letzten Jahren gezeigt hat (Richter *et al.*, 2013), erlauben die Lipocaline große Veränderungen in der Sequenz ihrer ausladenden Peptidschleifen am offenen Ende des Kelchs und ermöglichen so ein

außergewöhnlich breites Spektrum von Zielstrukturen (Skerra, 2008). Wie die ausgezeichneten Ergebnisse der ersten klinischen Studie (Phase I) eines Anticalins mit Bindungsaktivität für VEGF unterstreichen, führt die Nutzung von Lipocalinen humanen Ursprungs als Gerüststruktur zu guter Verträglichkeit und niedriger Immunogenität im Patienten (Mross *et al.*, 2013) – was im Hinblick auf klinische Anwendungen einen klaren Vorzug im Vergleich zu *Scaffolds* bakteriellen oder auch synthetischen Ursprungs darstellt.



**Abbildung 1.2:** Proteinstrukturen klassischer und alternativer Bindungsproteine. Die dreidimensionale Struktur eines IgG-Antikörpers (links, PDB-Code: 1IGT) zeigt die Unterteilung in das Fab-Fragment (*Fragment Antigen Binding*), welche die leichte Kette sowie die ersten beiden Domänen der schweren Kette umfasst, sowie das Fc-Fragment (*Fragment Crystallizable*) mit den gepaarten carboxyterminalen Domänen der schweren Ketten. Als Fv-Fragment (*Fragment Variable Regions*) bezeichnet man die gepaarten variablen Domänen von schwerer und leichter Kette mit der Antigenbindungsstelle. Dem Antikörpermolekül sind beispielhaft alternative Bindungsproteine verschiedener Scaffolds gegenübergestellt (rechts). Adnectine leiten sich von der  $\beta$ -Sandwich-Struktur der Fibronectindomäne  $^{10}$ Fn3 ab (Koide *et al.*, 1998). Das hier gezeigte Adnectin (violett) bildet einen Komplex mit der Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptor- $\alpha$  (PDB: 2OCF). Ein Anticalin (Skerra, 2008) mit der typischen  $\beta$ -Barrel-Faltung, hier basierend auf dem humanen Lipocalin-2 (rot), ist im Komplex mit einem Fragment des onkofötalen Fibronectins abgebildet (PDB: 4GH7). Die aus drei  $\alpha$ -Helices aufgebauten Affibodies gehen aus der Ig-Bindungsdomäne des *Staphylococcus aureus*-Protein A hervor (Nord *et al.*, 1997). Der hier gezeigte Affibody (türkis) bindet den extrazellulären Teil des Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu (PDB: 3MZW). Ein DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein, grün), das auf einer synthetischen, den Ankyrin-Repeat-Proteinen nachempfundenen Grundstruktur beruht (Binz *et al.*, 2003), ist im Komplex mit einer bakteriellen Aminoglykosid-Phosphotransferase dargestellt (PDB: 2BKK).

### 1.3 Mikrobielles *Surface Display* für die Selektion von Bindungsproteinen

Beim Versuch, das humorale Immunsystem von Säugern für die Generierung von Antikörpern oder alternativen Bindungsproteinen zu imitieren (Skerra, 2003), sind es vor allem zwei außergewöhnliche Leistungen des Immunsystems, welche es zumindest annähernd zu erreichen gilt; zum einen die Fähigkeit, ein Repertoire von etwa  $10^{11}$  individuellen Antikörpern zu

generieren (Glanville *et al.*, 2009), eine Zahl, welche die Anzahl der Gene im menschlichen Genom um viele Größenordnungen überschreitet und nur durch somatische Rekombination der Antikörperegene in den B-Lymphozyten möglich ist (Nossal, 2002).

Der zweite Aspekt ist die Selektion derjenigen wenigen Antikörper aus diesem enormen Repertoire, die Bindungsaktivität gegenüber einer bestimmten Pathogen-assoziierten Struktur (Antigen) aufweisen, sowie deren anschließende Biosynthese in ausreichenden Mengen. Der Schlüssel hierzu ist die physikalische Kopplung von Antikörpern an die Oberfläche von B-Zellen in Form des B-Zellrezeptors. Wird der Organismus mit exogenen Strukturen konfrontiert, so werden ihre antigenen Determinanten von jenen B-Lymphozyten mit entsprechend komplementären B-Zellrezeptoren selektiv gebunden (klonale Selektion), und das Zusammenwirken der durch das Clustering ausgelösten Signale mit kostimulatorischen Signalen anderer Komponenten des Immunsystems führt zur Aktivierung und Proliferation des B-Lymphozyten (Antigen-spezifische klonale Expansion). Bei der im weiteren Verlauf der Immunantwort in den Keimzentren stattfindenden Affinitätsmaturierung gestattet die somatische Hypermutation der Antikörperegene im Kontext der gegenseitigen Konkurrenz der B-Zellklone um die sich verknappenden Antigenmoleküle zur Selektion von Klonen mit verbesserter Affinität (Victoria & Nussenzweig, 2012).

Die Entwicklung ausgeklügelter Techniken zur Synthese von positionsgenau randomisierten Genen ermöglicht die Umgehung des tierischen Immunsystems zur Herstellung von Genbibliotheken, wobei die Diversität von Immunrepertoires sogar noch übertroffen werden kann (Van den Brulle *et al.*, 2008). Auch zur funktionellen Selektion von Antikörpern bzw. alternativen Bindeproteinen aus diesen Bibliotheken steht mittlerweile eine Reihe von Technologien zur Verfügung. Die Grundlage bildet hierbei – in Analogie zur B-Zelle – die Kopplung von Genotyp und Phänotyp. Beim *Phage Display*, der zur Zeit verbreitetsten Selektionsmethode, wird dies durch die Verankerung des Bindeproteins (herkömmlicherweise scFv- oder Fab-Fragmente) auf der Oberfläche von Phagenpartikeln, welche gleichzeitig die entsprechende genetische Information verpackt haben, realisiert (Sidhu & Geyer, 2005). Der *In-vitro*-Selektionsprozess selbst unterscheidet sich jedoch grundlegend vom *In-vivo*-Prozess. Das Zielmolekül der Selektion („Antigen“) wird an einer Oberfläche adsorbiert (Mikrotiterplatten oder paramagnetische Partikel), woraufhin rekombinante Phagen mit „Antigen“-Bindungsaktivität in einer als *Panning* (von der englischen Bezeichnung für Goldwäscherei) bezeichneten Prozedur angereichert werden. Die *Panning*-Prozedur wird in iterativer Weise wiederholt, meist unterbrochen von einer klonalen Expansion zwischen den Zyklen. Da die Phagen jedoch nicht die Fähigkeit zur autonomen Replikation besitzen, bringt dies aufwändige und zeitintensive Infektionsschritte mit *E. coli*-Kulturen mit sich.

Die Nutzung lebensfähiger Mikroorganismen anstelle viraler Partikel zur Präsentation von Bindungsproteinen führt zu einer weiteren Annäherung solcher Selektionsstrategien an den Prozess der Immunantwort; insbesondere kann die Vermehrung der angereicherten Klone einfach durch Zellteilung erfolgen. Neben der Zeitersparnis liegt der Hauptvorteil des mikrobiellen *Surface Display* in der Möglichkeit, die FACS-Technologie zur phänotypischen Charakteri-

sierung der Bibliothek auf Einzelzellebene zu nutzen (Binder *et al.*, 2010). Dies ermöglicht neben der dynamischen Anpassung des Selektionsdrucks durch Wahl der eingesetzten Target-Konzentration eine Feinjustierung der Stringenz in Echtzeit durch die Festlegung der Sortier-Fenster (Binder *et al.*, 2010).

*Yeast Display*, also die Präsentation von Proteinen auf der Zelloberfläche von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), ist zurzeit das vorherrschende mikrobielle *Surface Display*-System und hat mit einer Vielzahl erfolgreich selektierter Antikörper gegen therapeutisch relevante Zielstrukturen eine über die rein akademische Forschung hinausreichende Bedeutung erlangt (Boder *et al.*, 2012). Trotz der naheliegenden Vorteile sind bakterielle *Surface Display*-Systeme bislang weniger weit verbreitet. Gram-positive Bakterien sind aufgrund ihres einfachen Zellaufbaus mit nur einer Zellmembran und einer robusten Zellwand naheliegende Kandidaten für bakterielle *Surface Display*-Systeme. So wurden mit einem auf *Staphylococcus carnosus* basierenden System Affibody-Bibliotheken, nach vorangegangener Affinitäts-Anreicherung mittels *Phage Display*, auf der Zelloberfläche präsentiert und ermöglichten die Isolierung von Bindeproteinen gegen die beiden klinisch relevanten Targets TNF- $\alpha$  und ErbB3 (Kronqvist *et al.*, 2008; Kronqvist *et al.*, 2011). Zudem wurde mit der Selektion von GFP-bindenden Eindomänen-Kamelidantikörpern mit subnanomolarer Affinität aus einer Immunbibliothek ein Nachweis für die Anwendungsbreite dieser *Surface Display*-Plattform erbracht (Fleetwood *et al.*, 2013). Ein sich abzeichnendes Problem für die Präsentation von Bibliotheken mit sehr hoher Diversität, welches sowohl Eukaryoten wie Hefe als auch *S. carnosus* betrifft, ist die eingeschränkte Transformationseffizienz. Eine Zahl von  $10^7$  individuellen Klonen lässt sich hierbei mit experimentell vertretbarem Aufwand kaum übertreffen.

In dieser Hinsicht treten die Vorzüge des Gram-negativen Bakteriums *E. coli*, welches sich neben der leichten Kultivierbarkeit, dem schnellen Wachstum und der effizienten Expression vieler rekombinanter Proteine auch durch eine einzigartig hohe Transformationseffizienz auszeichnet, klar zum Vorschein. Mit *E. coli* lassen sich ohne großen Aufwand *Surface Display*-Bibliotheken mit mehr als  $10^9$  individuellen Klonen herstellen. Eine Schwierigkeit für die Entwicklung effizienter *Surface Display*-Systeme stellt allerdings der komplexe Aufbau von *E. coli* mit seinen zwei Zellmembranen und dem dazwischenliegenden periplasmatischen Raum dar. Damit lässt sich erklären, warum nur ein Bruchteil der bislang entwickelten Systeme zur Oberflächenpräsentation rekombinanter Proteine auf *E. coli* Anwendung zur Selektion von Bindungsproteinen gefunden hat (van Bloois *et al.*, 2011).

Die bekannteste Methode nutzt eine verkürzte Version des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) als Fusionspartner für scFv-Fragmente und ermöglicht so deren Translokation über den periplasmatischen Raum hinweg und ihre Verankerung auf der Zelloberfläche (Daugherty *et al.*, 1998). Trotz des vielversprechenden *Proof-of-Principle* finden sich in der aktuellen Literatur allerdings keine weiteren Beispiele für die Anwendung dieses Systems zur Generierung von Antikörper-Bibliotheken. Das weitere Engineering von OmpA oder anderen Omps führte jedoch

zur Entwicklung effizienter *Surface Display*-Technologien zum Screening von Peptid-Bibliotheken (Bessette *et al.*, 2004; Getz *et al.*, 2012).

Betrachtet man die Biologie von *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien, wird deutlich, dass es bei diesen Mikroorganismen auch natürliche Systeme zur Proteinpräsentation oder -sekretion über die äußere Membran gibt. Insgesamt sind bei Gram-negativen Bakterien sieben Klassen von Sekretionssystemen für die Translokation von Proteinen in das extrazelluläre Medium bekannt (Costa *et al.*, 2015). Die Sekretion von proteinogenen Virulenzfaktoren, also für Adhäsion, Evasion des Immunsystems, Eintritt in Zellen oder Gewinnung von Nährstoffen im Wirtsorganismus, erfolgt hauptsächlich durch den Sekretionsweg V(a), bekannt auch als Autotransporter-Sekretionsweg (Mross *et al.*, 2013).

Autotransporter bestehen aus einer C-terminalen  $\beta$ -Barrel-Domäne (Translokator), welche in die äußere Membran des Bakteriums integriert und essentiell für die Sekretion der N-terminalen Passagierdomäne ist. Beide Domänen sind durch einen Linker miteinander verbunden, welcher das Lumen des  $\beta$ -Barrels durchquert (vgl. Abbildung 1.3). In vielen Fällen erfolgt anschließend eine Freisetzung der Passagierdomäne – meist handelt es sich hierbei um Exotoxine oder Proteasen – autokatalytisch oder mit Hilfe der *Outer Membrane Protease T* (OmpT). Autotransporter erreichen die – verglichen mit anderen Sekretionssystemen – auffällige Simplizität ihres Aufbaus, indem sie offenbar bei universellen Systemen der bakteriellen Physiologie „parasitieren“. Sie nutzen das Sec-Translokon für den Transport ins Periplasma und den Bam-Komplex, welcher in der normalen Bakterienphysiologie die Assemblierung von Porinen bewerkstelligt, für ihre Insertion in die äußere Membran (Grijpstra *et al.*, 2013). Am Beispiel der IgA1-Protease von *Neisseria gonorrhoeae*, eines prototypischen Autotransporters, wurde gezeigt, dass dessen Übertragung auf verschiedene Spezies (u.a. *E. coli*) mit gentechnischen Verfahren möglich ist und dass durch Ersetzen der Passagierdomäne eine Reihe von Fremdproteinen (einschließlich scFv-Fragmente) korrekt gefaltet und funktionell auf der bakteriellen Zelloberfläche präsentiert werden können. Mittlerweile konnte dieses Prinzip auch auf eine Reihe weiterer Autotransporter angewandt werden (Jose & Meyer, 2007). Beim Versuch, ein IgA1-Protease-basiertes *Surface Display*-System zur FACS-Selektion einer Bibliothek von Trypsininhibitor-Varianten zu benutzen, hat sich jedoch herausgestellt, dass die Expression der speziesfremden Translokator-domäne – die rekombinante Passagierdomäne war hierbei nicht ausschlaggebend – die zelluläre Integrität soweit beeinträchtigt, dass eine Vermehrung der sortierten Zellen durch einfache Kultivierung nicht mehr möglich ist (Wentzel *et al.*, 1999).

In einer aktuellen Studie wurden fünf verschiedene Translokator-domänen im Hinblick auf die funktionelle Präsentation eines Anticalins untersucht (Binder *et al.*, 2010). Hier zeigte sich, dass nicht alle Translokatoren in der Lage waren, das Anticalin funktionell zu präsentieren und dass auch in diesen Fällen die Integrität der Zellen durch die Expression der Autotransporter beeinträchtigt wird. Lediglich eine der analysierten Translokator-Domänen – die der Serinprotease EspP des enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 (EHEC) – eignete sich zur effizienten Zelloberflächenverankerung des Anticalins bei zugleich kaum verringerter Lebens-

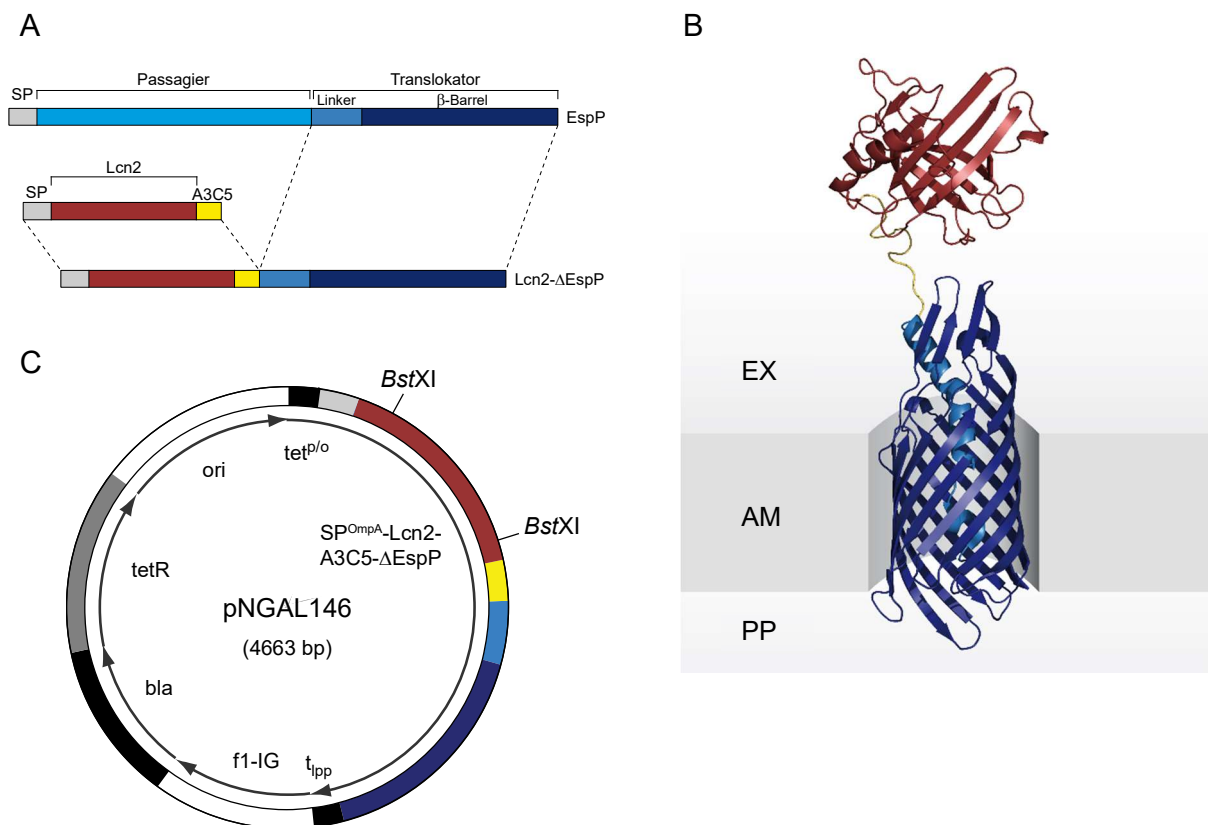
fähigkeit der Bakterien. Durch Verwendung dieses *Surface Display*-Systems gelang mittels FACS die Isolierung einer affinitätsverbesserten Variante eines Anticalins mit Bindungsspezifität für das Rezeptorprotein CTLA-4 aus einer partiell randomisierten Bibliothek.

Zur Realisierung einer Anticalin-Bibliothek durch Proteinpräsentation auf *E. coli* muss das *Surface Display*-System eine Reihe von Kriterien erfüllen. Zum einen sollte das Sekretionssystem robust sein, also die Anticaline unabhängig von ihren variierten Aminosäuresequenzen mit vergleichbarer Effizienz auf die Zelloberfläche transportieren. Von besonderer Bedeutung ist eine hohe Toleranz der Wirtszellen gegenüber der Produktion rekombinanter Bindungsproteine und gegenüber dem heterologen Transportsystem.

In einer umfassenden experimentellen Studie wurde gezeigt, dass der EspP-Autotransporter diese Anforderungen erfüllt (Binder *et al.*, 2010). Der hierzu verwendete Vektor pNGAL146 ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Präsentation des Anticalins wird durch die translationale Fusion mit der C-terminalen Translokatorodomäne von EspP einschließlich des Linkers gewährleistet. Um die Präsentationsausbeute (*Display-Level*) der jeweiligen Varianten messen zu können, wurde die Linkersequenz durch das A3C5-Epitop verlängert, welches mithilfe eines hochaffinen Fab-Fragments nachgewiesen werden kann (Alexander *et al.*, 1994). Um die autokatalytische Abspaltung des Anticalins durch eine EspP-vermittelte Proteasefunktion zu unterbinden, wurde der katalytisch aktive EspP-Rest Asp1120 zudem durch Asn ersetzt (Dautin *et al.*, 2007). Der Transport des Anticalin-Autotransporters vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum wird vom Sec-Transportsystem bewerkstelligt; das hierfür notwendige Transportsignal stellt das N-terminal fusionierte, 21 Aminosäuren umfassende Signalpeptid des *E. coli*-Proteins OmpA dar, das sich für die Sekretion von Anticalinen in *E. coli* bewährt hat (Gebauer & Skerra, 2012). Im Periplasma erfolgt die Abspaltung des Signalpeptides durch die Signal-Peptidase I (Fekkes & Driessen, 1999).

Ein kritischer Punkt bei der Verwendung eines *Surface Display*-Systems zur Selektion mit der FACS-Methode ist die Balance zwischen hohem *Display-Level*, was sich positiv auf die FACS-Sensitivität auswirkt, und hoher Überlebensrate der Zellen im Verlauf der physisch anspruchsvollen FACS-Prozedur trotz Überexpression des potentiell toxischen heterologen Proteins (Daugherty *et al.*, 1999). Hierfür ist ein fein justierbares System zur Regulation der Genexpression notwendig, wie es auf pNGAL146 mit dem tet-Promotor/Operator-System ( $tet^{p/o}$ ) realisiert ist (Skerra, 1994b). Die hohe Sensitivität dieses ursprünglich vom Transposon Tn10 stammenden Regulationssystems für seinen Induktor in Verbindung mit seiner Unabhängigkeit vom bakteriellen Metabolismus und auch vom verwendeten *E. coli*-Stamm prädestinieren es für die Nutzung zur Produktion rekombinanter Proteine. Durch die sehr starke Bindung des ebenfalls auf pNGAL146 kodierten und konstitutiv exprimierten Repressors (TetR) an die Operatorsequenz mit einer Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) von 10 pM zeichnet sich das  $tet^{p/o}$ -System durch sehr niedrige Basalexpression verglichen z.B. mit dem häufig verwendeten  $lac^{p/o}$ -System aus. Der Induktor Anhydrotetracyclin (aTc) bindet ebenfalls außergewöhnlich stark an den Repressor ( $K_D = 10$  pM) und verringert hierbei dessen Affinität zum Operator um mehrere Zehnerpotenzen (Orth *et al.*, 2000). Somit ist auch die enorme Sensitivität dieses Systems zu erklären, bei dem die

Genexpression die Sättigung schon bei einer aTc-Konzentration unter 20 ng/ml erreicht. Weitere Vorteile des  $tet^{p/o}$  für die Verwendung zum *Surface Display* sind die geringe Zell-zu-Zell-Diversität sowie die unimodale Verteilung der Genexpression, besonders im Vergleich zu anderen Regulationssystemen mit niedriger Basalexpression, wie dem araBAD-Promotor (Muthukrishnan *et al.*, 2012; Siegele & Hu, 1997). Zur Plasmidselektion trägt pNGAL146 ein  $\beta$ -Lactamase-Gen, welches die Resistenz für das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Dies besitzt durch seinen Wirkmechanismus keine nennenswerte Toxizität für die Plasmid-tragenden Zellen (Tuomanen *et al.*, 1986) und sollte hierdurch auch zum Erhalt der Lebensfähigkeit nach dem FACS beitragen.



**Abbildung 1.3:** *E. coli*-Surface Display mit dem Expressionsvektor pNGAL146.

(A)  $\beta$ -Barrel und helikaler Linker der Translokator-domäne des episomal bei enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen kodierten Autotransporters EspP (Brunder *et al.*, 1997) wurden mit einem Lipocalin-2-Gen (Lcn2) fusioniert. Zusätzlich wurde das Konstrukt mit einem A3C5-Epitoptag und dem Signalpeptid (SP) des *E. coli* OmpA für die Sekretion in das Periplasma ausgestattet. (B) Modell der Anticalinpräsentation auf der Zelloberfläche basierend auf zwei Kristallstrukturen (PDB: 3SLT und 1DFV). Lcn2 ist hierbei rot, der A3C5-tag gelb,  $\beta$ -Barrel und Linker der Translokator-domäne sind dunkelblau bzw. hellblau dargestellt. Abkürzungen: EX, extrazellulärer Raum; AM, äußere Membran; PP, Periplasmatischer Raum. (C) Der Vektor pNGAL146 basiert auf pASK75 (Skerra, 1994b).  $tet^{p/o}$ ,  $t_{pp}$ , ori und f1-IG bezeichnen den tetA-Promotor/Operator (Tn10), den Lipoprotein-Transkriptionsterminator, den verkürzten Replikationsursprung des Plasmids ColE1 sowie die intergenische Region des Bakteriophagen f1. Die  $\beta$ -Lactamase (bla), welche die Resistenz für Ampicillin vermittelt, und der Tet-Repressor (tetR) werden in einem dicistronischen Gen konstitutiv exprimiert.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Begriff der „Targeted Therapy“, was als „zielgerichtete Therapie“ übersetzt werden kann, ist die Idee verbunden, Wirkstoffe selektiv zu erkrankten Zellen und Geweben zu dirigieren und so die Nebenwirkungen auf nicht-betroffene gesunde Zellen zu minimieren (Zhukov & Tjulandin, 2008). Besonders auf dem Gebiet der Onkologie, wo die klassische Behandlungsstrategie eine relativ pauschal wirkende und mit vielen Nebenwirkungen verbundene Chemotherapie (Dy & Adjei, 2008) im Anschluss an die Beseitigung größerer Tumormassen durch chirurgische Eingriffe oder externe Bestrahlung vorsieht (Fisher *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 1998), werden große Hoffnungen auf die (Weiter-)Entwicklung zielgerichtet wirkender Therapeutika gesetzt (Russo *et al.*, 2015). Wenngleich die in den letzten Jahren etablierte zielgerichtete Behandlung leukämischer Erkrankungen mit radioaktiv markierten monoklonalen Anti-CD20-Antikörpern gute Resultate, d.h. hohe Vollremissions-Raten und lange Remissionszeiten sogar bei refraktären Lymphomen (Davies, 2007) erreicht, steht ein derartiger Erfolg bei der Behandlung solider Tumoren noch aus (Navarro-Teulon *et al.*, 2013). Forschungsschwerpunkte für die Schaffung wirksamerer Biopharmazeutika sind deshalb zum einen die Entdeckung neuer Tumor-assoziiertes Zielstrukturen und zum anderen die Entwicklung von effektiven Immunkonjugaten, welche sich im Vergleich zu mAk-basierten Wirkstoffen durch bessere Tumorpenetration und schnellere Pharmakodynamik auszeichnen.

Ziel dieser Arbeit war daher die Generierung von Bindungsproteinen, welche das in Proteomanalysen identifizierte, neuartige Tumor-Zelloberflächenantigen Hsp70.1 erkennen und für die zielgerichtete Therapie wie auch das molekulare *in vivo*-Imaging von Tumorerkrankungen geeignet sind. Hierfür wurden zwei Ansätze verfolgt:

(1) Ausgehend von einem bereits charakterisierten murinen monoklonalen Antikörper mit Bindungsaktivität für Tumorzelloberflächen-assoziiertes Hsp70.1 sollte ein rekombinantes Fab-Fragment kloniert, dessen Produktion in *E. coli* optimiert und eine funktionelle Charakterisierung vorgenommen werden.

(2) Basierend auf der zu Antikörpern alternativen Gerüststruktur des humanen Lipocalin-2 sollte ein neuartiges Bindungsprotein (Anticalin) gegen Hsp70.1 generiert und für die Verwendung als zielgerichtet wirkendes Immunkonjugat bei der Therapie und Diagnostik von Krebserkrankungen evaluiert werden. Hierzu sollte ein bereits für die Affinitätsmaturierung von Anticalinen beschriebenes *E. coli*-*Surface Display*-Verfahren dahingehend weiterentwickelt werden, dass die Selektion gänzlich neuer Anticaline aus einer „naiven“ synthetischen Bibliothek möglich wird.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Phagen

##### E. coli K12-Stämme

CJ236i	<i>dut-1, ung-1, thiE1, relA1</i> [F': <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i> ] (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987; Fiedler & Skerra, 1999)
JK321	$\Delta$ <i>ompT, proC, leu-6, trpE38, entA, zih12::Tn10 dsbA::kan</i> (Jose <i>et al.</i> , 1996)
JM83	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
MC4100	F <sup>-</sup> , [ <i>araD139</i> ] <sub>B/r</sub> , $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )169, $\lambda^-$ , e14 <sup>-</sup> , <i>flhD5301, Δ(fruK-yeiR)725(fruA25), relA1, rpsL150(Str<sup>R</sup>), rbsR22, Δ(fimB-fimE)632(::IS1), deoC1</i> (Casadaban, 1976)
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96 (Nal<sup>R</sup>), thi-1, hsdR17, glnV44, relA1, lac, F'</i> [ <i>proAB+</i> , <i>lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)</i> ] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

##### E. coli B-Stämme

BL21	F- <i>fhuA2 [lon] [dcm] ompT hsdS(rB- mB-) gal [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>)</i> (Studier & Moffatt, 1986)
------	---

##### Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphagen, Stratagene, Heidelberg
---------	--------------------------------------

Alle *E. coli*-Stämme und Bakteriophagen stammten aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München.

#### 2.1.2 Zelllinien und Versuchstiere

**Tabelle 2-1:** Zelllinien

	Organismus	Krankheit	Zelltyp	Kultivierung	Publikation
Caco-2	human	Kolorektales Adenokarzinom	Epithelzellen	adherent	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
FaDu	human	Hypopharynxkarzinom	Epithelzellen	adherent	(Rangan, 1972)
SU-DHL-4	human	Non-Hodgkin-Lymphom	lymphoblastoide B-Zellen	in Suspension	(Epstein <i>et al.</i> , 1976)
cmHsp70.1	murin	-	Hybridom	in Suspension	(Multhoff, 2007)

**Tabelle 2-2:** Versuchstiere

	Nomenklatur	Immunsystem	Vertrieb
CD1-Nackmäuse	Cr1:CD1- <i>Foxn1</i> <sup>mu</sup>	Immundefizient (athymisch)	Charles River, Wilmington, USA

### 2.1.3 Plasmide

pGEM-3Zf(+)	Promega, Mannheim
pTUM4	Schlapschy et al. (2006) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK88-hu4D5	Schlapschy <i>et al.</i> (2007) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK85-76E6	Irmgard Neumaier aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pAB1-scFv-Tumex	Prof. Dr. R. Kontermann, Universität Stuttgart
pNGAL98	Gebauer & Skerra (2012) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pNGAL98-BBG10ISR-LPETGA-His6	Alois Bräuer, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München
pNGAL98-Lcn2-LPETGA-His6	Dr. Petra Kornberger, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München
pNGAL146	Gebauer & Skerra (2012) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK-IBA35plus	IBA, Göttingen
pASK75-mBiP-StrepII	Skerra (1989) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pASK37-eGFP	Kuhn et al. (2010) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München
pXL1-PAS#1.2(200)	Schlapschy et al. (2013) XL-protein, Freising

### 2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

D20	5'-CCACTCCCTATCAGTGAT-3'
PR1	5'-CGTTTACCGCTACTGCG-3'
J08_f	5'-CAGGACTCCACCTCAGAC-3'
M13(-21)	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
M13RP1	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
F55	5'-CACTGGCACTCTTACCG-3'
D11	5'-TGGAGGAGGGTGCCAGG-3'
Ck2-Wang	5'-TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGG-3'

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

BSTXI_for	5'-CAGGACAACCAATTCCATGGG-3'
BSTXI_rev	5'-GGAGGCCAGAGATTTGG-3'
Vλ_for	5'-CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGC-3'
Cλ1_mu_rev	5'-GACCTAGGAACAGTCAGC-3'
Cλ_HindIII	5'-CTCGGTAAGCTTATTAGGAACAGTCAGCACGG-3'

VH1_for	5'-CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACC-3'
RMG	5'-GGTGTGCACACCGCTGGA-3'
LF2_for	5'-CTCACTCAGGAATCTGCACTCA-3'
LF2_Rev_XhoI	5'-TAGGACCTCGAGTTTGGTTCCTCCACCGAAC-3'
Kunkel_Hsp70_VH_N	5'-GTCCTGACTCCTTCAGTTGAACTTGGGCCTGCGCTACG-3'
Kunkel_Hsp70_VH_C	5'-GGAGACGGTGACCAGGGTCCCTTGGCCC-3'
Kunkel_Hsp70_VL-N	5'-GTGCAGATTCCTGAGTGACCACGGCCTGGGCTTTTGTC ACAGGGG-3'
Kunkel_Hsp70_VL_M	5'-CGGTTGTTGGTACCACCAATCAGACCAGTGAATAAATG-3'
hHsp70_for	5'-GCCATGGCCAAAGCCGCGGCG-3'
hHsp70_rev_HindIII	5'-TTGGAAAAGCTTCTAATCTACCTCCTCAATGGTGGG-3'
hHsp70_SBD_for	5'-GCCGACAAGTCCGAGAACGTG-3'
hHsp70_SBD_rev	5'-CACGGCAAGCTTCTAGTTGAAGGCGTAGGACTC-3'
SBD_BiP_for	5'-GCCGATCAGGATACAGGTGATC-3'
SBD_BiP_rev	5'-AATCTGAAGCTTCTAAGAATAAGCATAGCTTTCC-3'
eGFP_for	5'-GGTACCTCTAAAGGTGAAGAACTTTTC-3'
eGFP_rev	5'-GCCTTGGTACAGTTCATCCATG-3'
Lcn2-SapI-Cys	5'-GCTGCAGGCAGAAGAGCTGCCGTCGATACTG-3'
QC-PAS200-His_f	5'-CACCGGCGGCCAGCGCTCACCATC-3'
QC-PAS200-His_r	5'-GATGGTGAGCGCTGGCCGCCGGTG-3'
(dT) <sub>18</sub>	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

## 2.1.5 Antikörper und sonstige Proteinreagenzien

Alkalische Phosphatase aus Eismeergarnelen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Anti-Hsp70-IgG cmHsp70.1	Prof. Multhoff, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, TU München
Anti-Kaninchen-IgG (aus Schweinen)-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Dako, Hamburg
Anti-Maus-C <sub>λ</sub> -IgG (aus Kaninchen)	Advanced Chemtech, Louiseville, USA
Anti-Maus (Fab-spezifisch)-IgG (aus Ziegen)- Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Anti-Maus (Fc-spezifisch)-IgG (aus Ziegen)- Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Maus-(IgG-spezifisch)-Fab <sub>2</sub> - AlexaFluor 488-Konjugat	Life Technologies, Darmstadt
Anti- <i>Strep</i> -tag II-IgG (aus Mäusen) (StrepMAB- Immo)	IBA, Göttingen
BSA, Rinderserumalbumin (Fraktion V, pH 7)	Applichem, Darmstadt
Herculase II Fusion DNA-Polymerase	Agilent, Böblingen
Lysozym aus Hühnereiweiß	Applichem, Darmstadt
Humanes Hsp70.1, rekombinant aus <i>SF9</i> - Insektenzellen	Prof. Multhoff, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, TU München
Murines BiP, rekombinant aus <i>E. coli</i>	Irmgard Neumaier, AG Prof. Dr. Skerra, TU

	München
Neutravidin-Paramagnetische Partikel	Seradyn, Indianapolis, USA
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Pfu Pyroglutamylaminopeptidase	Takara, Otsu, Japan
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNase A aus Rinderpankreas (89 U/mg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Strep</i> -Tactin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat	IBA, Göttingen
Streptavin, Reinheit > 98 % (SDS-PAGE), rekombinant	Ina Theobald, AG Prof. Dr. Skerra, TU München
Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim New England Biolabs, Schwalbach
Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Streptavidin-Paramagnetische Partikel	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4-Polynukleotidkinase (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<b>2.1.6 Chemikalien</b>	
Acrylamid-Stammlösung (30 % w/v mit 0,8 % w/v Bisacrylamid)	Serva electrophoresis, Heidelberg
Adenosindiphosphat	Applichem, Darmstadt
Agarose, Typ GTQ	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose (Low Melting Point; „UltraPure“)	Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Aminosäurederivate für die Peptidsynthese: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Ammoniumacetat (Gesamt-Metallverunreinigung < 100 ppm)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	ForMedium, Hunstanton, United Kingdom
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam Y-30-Emulsion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA

Bacto Tryptone	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
D-Biotinyl- $\epsilon$ -aminocapronsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester (Biotin-LC-NHS)	Roche Diagnostics, Mannheim
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Biomol, Hamburg
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid (DIC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylformamid (DMF, zur Synthese)	Merck, Darmstadt
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DY-634- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester	Dyomics, Jena
Ethanolamin/HCl, 1 M Lösung, pH 8,5	Biacore, Uppsala, Schweden
6-(Fluorescein-5-carboxamido)-capronsäure- <i>N</i> -hydroxysuccinimidester (Fluorescein-LC-NHS)	Invitrogen, Darmstadt
Fluoresceinisothiocyanat, Isomer I (FITC)	Fluka, Buchs, Schweiz
Fluorescein-5-maleimid	Molecular Probes, Eugene, USA
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
<i>p</i> -Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin (Bz-Dfo-NCS)	Macrocyclics, Dallas, USA
Kanamycin A Monosulfat (Kan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luthetium-177 (III)-chlorid	IBA, Louvain-la-Neuve, Belgien
<i>N</i> -(3-Maleimidopropionyl)- <i>p</i> -aminobenzyl-CHX-A"-DTPA	Dr. Martin Dauner, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon (NMP); >99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Terbium(III)-chlorid, Hexahydrat; 99,999 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thiaminhydrochlorid	Applichem, Darmstadt
tRNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Roche, Karlsruhe
Triisopropylsilan; 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim

Zirconium-89 (IV)-oxalat in 1 M  
Oxalsäurelösung

IBA, Louvain-la-Neuve, Belgien

Weitere gebräuchliche Chemikalien wurden in den laborüblichen Reinheitsgraden von Sigma-Aldrich (Steinheim), AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) sowie Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.7 Standards und Kits

#### DNA-Größenstandard

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

#### DNA-Auftragspuffer

6x DNA Loading Dye MBI Fermentas, St. Leon-Roth

#### Kits zur DNA-Isolierung

Wizard SV Gel- und PCR Reinigungssystem Promega, Mannheim

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit Quiagen, Hilden

QIAprep Plasmid Midiprep Kit Quiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit Quiagen, Hilden

ZR DNA Sequencing Clean-up-Kit Zymo Research Europe, Freiburg

#### Kit zur DNA-Sequenzierung

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

#### Kit zur Isolierung von RNA

RNeasy Mini Kit Quiagen, Hilden

#### Kit zur cDNA-Synthese

First Strand cDNA Synthesis Kit MBI Fermentas, St. Leon-Roth

#### Mutagenese-Kits

QuickChange II Site Directed Mutagenesis  
Kit Agilent Technologies Deutschland,  
Böblingen

GeneMorph II Random Mutagenesis Kit Agilent Technologies Deutschland,  
Böblingen

#### Protein-Größenstandards

*Unstained* SDS-PAGE Standard, #SM0431 MBI Fermentas, St. Leon-Roth

*Prestained* SDS-PAGE Standard  
(PageRuler), #SM0671 MBI Fermentas, St. Leon-Roth

### 2.1.8 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
CD-Spektropolarimeter J-810	Jasco, Gross-Umstadt
FACSAria II-Zellsortierer	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Elektroblot-Apparatur ( <i>Semi-Dry Blot</i> )	Eigenbau
Elektroporator Typ „MicroPulser“	Bio-Rad Laboratories, München
Fluoreszenzmikroskop:	
Inversmikroskop Axiovert 40 mit Universal-Digitalkameraadapter	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Mikroskopbeleuchtung HBO50	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Digitalkamera PowerShot A640	Canon, Krefeld
Fluoreszenzscanner Ettan DIGE Imager	GE Healthcare Europe, Freiburg
Fluoreszenzspektrophotometer:	
FluoroMax-3	Jobin Yvon, Grasbrunn
LS 50 B	Perkin-Elmer GmbH, Langen
FPLC:	
Äkta Explorer	GE Healthcare Europe, Freiburg
Äkta Prime	GE Healthcare Europe, Freiburg
Äkta Purifier	GE Healthcare Europe, Freiburg
French Press-Hochdruckhomogenisator	SLM Instruments, Urbana, USA
Laborchromatographieanlagen:	
Durchflussphotometer Uvicord 2138 S und SII (mit 276 nm-Bandpass)	LKB Instrument, Gräfelfing
Durchflussphotometer UVis-920 (mit 280 nm-Bandpass)	GE Healthcare Europe, Freiburg
Fraktionssammler Redi Frac	GE Healthcare Europe, Freiburg
Peristaltikpumpe P1	GE Healthcare Europe, Freiburg
Schreiber REC 112	GE Healthcare Europe, Freiburg
Schreiber SE 120	ABB Goerz, Wien, Österreich
Inveon PET-CT-Kleintierscanner	Siemens Healthcare, Erlangen
Kryostat-Mikrotom HM-500	Microm International, Walldorf
Laborfermenter:	
10 Liter-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluß-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO <sub>2</sub> Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen

C Pump D Schlauchpumpen Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O <sub>2</sub> -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach
Umwälzthermostat DC30/K20	Thermo Haake, Karlsruhe
Massenspektrometer:	
LTQ Orbitrap-MS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
maXis micrOTOF ESI-MS	Bruker Daltonik, Bremen
Nano-HPLC-Anlage nanoLC Ultra	Eksigent Technologies, USA
Oberflächenplasmonresonanzspektrometer:	
Biacore 2000	Biacore, Uppsala, Schweden
Biacore X	Biacore, Uppsala, Schweden
Peptidsyntheseroboter MultiPep RS	INTAVIS Bioanalytical Instruments, Köln
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore, Eschborn
Reinstwasser-Anlagen:	
Millipore Synergy 185	Millipore, Eschborn
ELGA PURELAB Classic	VWS Deutschland, Celle
Taumelrollenmischer Stuart SRT1	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Thermocycler:	
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
TPersonal	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Vis-Photometer:	
NanoDrop 2000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
UltroSpec 2000 und 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SpectraMax 250 ELISA-Photometer	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Radiometer:	
γ-Counter 1480 Wallac Wizard	PerkinElmer, Turku, Finnland
Bildplattenscanner CR 35 BIO	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Dosiskalibrator CRC-15R	Capintec, Ramsey, USA
Mini-Scan TLC Imaging Scanner	BIOSCAN Analytical Instruments, Washington D.C., USA
Zentrifugen:	
Sigma 4K15C mit Rotoren 11156 und 11118	Sigma, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H6000A/HBB6	Kendro Laboratory Products, München
Sorvall RC 5C Plus und RC 6 Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000, F10-4x1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Auf die Aufzählung weiterer zur Grundausstattung eines biotechnologischen/biochemischen Labors gehörender Geräte wurde hier verzichtet.



### 2.1.9 Sonstiges Material

#### Affinitätschromatographie-Materialien:

<i>Strep</i> -Tactin Superflow	IBA, Göttingen
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Europe, Freiburg
Ni Sepharose High Performance	GE Healthcare Europe, Freiburg
BD FACS Accudrop Beads (Kalibrierpartikel)	BD Biosciences, Heidelberg
Bildplatten "General Purpose Screen"	GE Healthcare Europe, Freiburg
Cell Scraper, 39 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Dialysemembranen und -schläuche	
Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Type 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol, Hamburg
Slide-A-Lyzer, MWCO: 10 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Filterdisk "V"-Serie; 0,025 µm	Millipore, Eschborn
Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 0,2 cm	Bio-Rad Laboratories, München
Glasmikrofaser-Chromatographiepapier iTLC-SA	Agilent, Böblingen
Größenausschlusschromatographie-Säulen:	
PD-10	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>	GE Healthcare Europe, Freiburg
Ionenaustauschchromatographie-Säulen:	
Resource S, 1 und 6 ml	GE Healthcare Europe, Freiburg
Resource Q, 1 und 6 ml	GE Healthcare Europe, Freiburg
Konzentratoren:	
Vivaspin 500, MWCO: 10 kDa	Sartorius, Göttingen
Amicon Ultra-4, MWCO: 10 kDa	Millipore, Eschborn
Amicon Ultra-15, MWCO: 10 kDa	Millipore, Eschborn
Kryoeinbettmedium Tissue-Tek O.C.T.	Sakura Finetek, Staufen im Breisgau
Membran für die SPOT-Synthese: Amino-PEG <sub>500</sub> -UC540; 100×150 mm	INTAVIS Bioanalytical Instruments, Köln
Mikrotiterplatten:	
Immuno Plate F96-Maxisorp	Nunc, Roskilde, Dänemark
U96 PP-0,5 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
96-Well PS-Mikrotestplatte, flachbödige	Sarstedt, Nümbrecht

**Petrischalen:**

Quadratisch, 120x120x7 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rund, 94x16mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

**Quarzküvetten:**

108.002-QS (Absorption), 10 mm	Hellma, Mühlheim
105.250-QS (Fluoreszenz), 10 mm	Hellma, Mühlheim
110-QS (CD), 10 mm	Hellma, Mühlheim

**SPR Sensorchip CMD 200m**

XanTec, Münster

**Sterilfilter:**

Microsart CN-Filter (Cellulosenitrat); 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
NC20 (Cellulosenitrat); 0,45 µm	Whatman, Dassel
Ultrafree Centrifugal Filters (PVDF); 0,22 und 0,45 µm	Merck, Darmstadt
Filtropur S Spritzenfilter; 0,2 und 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht

**Reprosil Umkehrphasensäule für die Nano-HPLC**

Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen

**Zellkulturgefäße:**

Zellkulturflasche Cellstar mit 25 oder 75 mm <sup>2</sup> Wachstumsfläche, Filterdeckel 0,2 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kammerobjektträger Lab-Tech II	Nunc, Roskilde, Dänemark
Tissue Culture Plate (96 Wells), PS-Flachboden, steril	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

**Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren:**

SS-34, SLA-1500, SLA-3000 und F10-4x1000 Nalgene Company, New York, USA

**ZipTip Reverse Phase-Pipettenspitzen**

Millipore, Eschborn

**2.1.10 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen**

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden alle Lösungen mit Reinstwasser (Typ I, 18,2 MΩ·cm) hergestellt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte bei Festmedien vor dem Gießen nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C und bei Flüssigmedien erst unmittelbar vor der Verwendung.

**Antibiotika-Stammlösungen**

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert.

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)

Kanamycin (Kan)	35 mg/ml in H <sub>2</sub> O (1:500)
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)

#### Induktor-Stammlösung

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

Lagerung bei -20 °C

#### LB-Medium

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

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

#### TB-Medium

TB-Puffer-Stammlösung (10x)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M

TB-Medium

Bacto Tryptone	12 g/l
Bacto Yeast Extract	24 g/l
Glycerin	4 ml/l

Die Zugabe der autoklavierten Pufferstammlösung erfolgte nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums im Verhältnis 1:10.

#### SOC-Medium

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

Der pH wurde vor dem Autoklavieren mit NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend je Liter folgende Volumina steriler Lösungen zugegeben:

20 % Glucose	20 ml
1 M MgCl <sub>2</sub>	10 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	10 ml

#### GYT-Medium

Bacto Tryptone	0,25 % (w/v)
Bacto Yeast Extract	0,125 % (w/v)

Glycerin 10 % (v/v)

### Lösungen für die Fermentation

#### Mineralsalzlösung

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  5,51 g/l (31 mM)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,58 g/l (19 mM)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  1,33 g/l (25 mM)

$\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,47 g/l (5 mM)

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

#### Glucoselösung

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

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

#### $\text{MgSO}_4$ -Stammlösung

1 M  $\text{MgSO}_4$  (separat autoklaviert)

#### Thiamin-Stammlösung

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

#### $\text{FeCl}_3$ -Stammlösung

35,0 g/l  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)

#### Zn-Acetat-Stammlösung

8,0 g/l Zn-Acetat  $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (sterilfiltriert)

#### Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert)

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  3,0 g/l

$\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,3 g/l

$\text{H}_3\text{BO}_3$  0,6 g/l

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  1,2 g/l

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  4 mM

#### Weitere Lösungen für die Fermentation

12,5 % (w/v)  $\text{NH}_3$  zur pH-Regulierung

### Medien, Medienzusätze und Puffer für die Zellkultur

Medium RPMI-1640 Invitrogen, Paisley, Scotland, UK

DME-Medium, *high glucose* PAA, Pasching, Österreich

ME-Medium PAA, Pasching, Österreich

MEM-nicht-essentielle Aminosäuren (100x) PAA, Pasching, Österreich

Fötales Kälberserum (FCS) PAA, Pasching, Österreich

Pen/Strep-Stammlösung (100x): Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10 mg/ml PAA, Pasching, Österreich

Dulbecco's PBS mit  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PBS}_M$ ) PAA, Pasching, Österreich

Dulbecco's PBS ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  (PBS<sub>0</sub>)  
 Accutase in Dulbecco's PBS mit 0,5 mM EDTA  
 Trypsin 0,05 % (w/v)/EDTA 0,02 % (w/v) in  
 Dulbecco's PBS

PAA, Pasching, Österreich  
 Sigma-Aldrich, Steinheim  
 PAA, Pasching, Österreich

Puffer für die SDS-PAGE (Fling & Gregerson, 1986)

1x SDS-Laufpuffer

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

4x Lower-Tris

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

4x Upper-Tris

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

5x Auftragspuffer

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

Färbelösung

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

AP-Puffer

Tris/HCl pH 8,8	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

HBS/T-Puffer

HEPES/NaOH pH 7,5	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	130 mM
KCl	5 mM

PBS

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
NaHPO <sub>4</sub>	15 mM
NaCl	115 mM

Der pH dieses Puffers liegt bei 7,4. PBS wurde auch in Kombination mit 0,1 oder 0,005 % (v/v) Tween 20 (PBS/T<sub>0,1</sub> bzw. PBS/T<sub>0,005</sub>) sowie mit 0,5 % (w/v) Rinderserumalbumin (PBS/BSA) eingesetzt.

Periplasma-Aufschlusspuffer

Saccharose	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer)

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC-Laufpuffer)

NaP <sub>i</sub> pH 7,5	40 mM
NaCl	500 mM

TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

TE-Puffer

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

**2.1.11 Software**

AIDA-Image Analyzer	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Compass 1.3	Bruker Daltonics, Bremen
FlowJo 10.0.7	Tree Star, Ashland, USA
ImageJ 1.47	National Institute of Health, Bethesda, USA
Inveon Research Workplace	Siemens Healthcare, Erlangen
Kaleidagraph 4.1	Synergy Software, Reading, USA
Mascot Distiller 2.2.1.0	Matrix Science, London, UK
PEAKS online 2.0	Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canada
PyMOL 1.6	Schrödinger, New York, USA
UCSF Chimera 1.8.1	University of California, San Francisco, USA

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Zum Erhalt von Einzelkolonien aus *E. coli*-Suspensionen wurden die Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz entsprechender Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert und waren für bis zu 4 Wochen zur Inokulation von Flüssigmedien verwendbar.

Flüssigkulturen in LB- oder TB-Medium wurden nach Zugabe der benötigten Antibiotika entweder direkt mit einer Bakterienkolonie oder mit einer vorhandenen Flüssigkultur in der stationären Wachstumsphase inokuliert. Für 2 ml-Kulturen wurden 13 ml-Kulturröhrchen verwendet, ansonsten wurden Erlenmeyer-Kolben mit 2,5-fachem Nennvolumen bezogen auf das Kulturvolumen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Kultivierung im Schüttelinkubator bei 30 oder 37 °C und 180 rpm.

Zur dauerhaften Konservierung von mit Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämmen wurden 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 ml hitzesterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2 Transformation nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen nach der klassischen CaCl<sub>2</sub>-Methode (Cohen *et al.*, 1972). Hierbei wurden 50 ml LB-Medium ohne Antibiotikum im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stamms angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung kompetenter Zellen des Stamms CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.4.2) wurde dem LB-Medium das Antibiotikum Tetracyclin im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>550</sub> = 0,5 wurde die Kultur in ein 50 ml-PP-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µl entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt. Zur Transformation wurden 200 µl Zellsuspension mit typischerweise 1 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligierungsansatzes gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 45 s auf 42 °C erwärmt, 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend in 2 ml LB-Medium überführt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Klonierung von cDNAs auf dem generischen Vektor pGEM-3fZ(+) wurde zur vereinfachten Unterscheidung von Klonen, welche das entsprechende Insert enthielten, von insertfreien Plasmidreliganden eine „Blau-Weiß-Selektion“ nach dem Prinzip der  $\alpha$ -Komplementation durchgeführt (Koenen *et al.*, 1982). Hierzu wurde dem autoklavierten LB-Agar vor dem Gießen der Kulturplatten bei einer Temperatur von  $< 60$  °C je 10  $\mu$ l einer sterilen IPTG-Stammlösung (0,5 M in H<sub>2</sub>O) und einer X-Gal-Stammlösung (240 mM in DMF) zugesetzt. Nach Inkubation der Agarplatten unter Standardbedingungen waren *E. coli*-Kolonien, welche Plasmide ohne ein „Insert“ trugen, anhand ihrer Blaufärbung erkennbar.

### 2.2.3 Transformation mittels Elektroporation

Zur Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen mit einer Transformationseffizienz von mehr als  $10^9$  Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA, wurde eine auf den Protokollen von Tung & Chow (1995) und Sambrook & Russell (2001) basierende Methode angewandt.

Hierbei wurden 50 ml TB-Medium mit einer frischen Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms JK321 inokuliert und über Nacht bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 2 l auf 26 °C temperiertes TB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 26 °C bis zu einer  $OD_{550} = 0,8-1,0$  inkubiert. Der Kulturkolben wurde anschließend für 20 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln abgekühlt. Dann wurde die Kultur auf vier sterile SLA-3000 Becher verteilt und abzentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Zellsediment in jedem der beiden Becher mit 500 ml 10 % (v/v) Glycerin auf Eis resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (4500 rpm, 15 min, 4 °C), der Überstand vollständig abgenommen und das Zellsediment ein zweites Mal mit je 500 ml 10 % (v/v) Glycerin „gewaschen“. Nach einer letzten Zentrifugation (4500 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand sorgfältig abgezogen und das Zellsediment in 400  $\mu$ l GYT-Medium resuspendiert und bis zum Einsatz für die anschließende Transformation auf Eis gelagert.

Zur Transformation wurde die Plasmid-DNA mittels Tropfendialyse gegen Reinstwasser mit Hilfe einer 0,025 $\mu$ m Filterdisk entsprechend der Herstellerangaben (Millipor) entsalzen (Sambrook & Russell, 2001) und in Aliquots zu je 5  $\mu$ l in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Suspension elektrokompenter Zellen gründlich mit der Plasmid-DNA vermischt und in eiskalte Elektroporationsküvetten überführt. Nach einer Minute auf Eis wurden die Zellen einem elektrischen Puls ausgesetzt; hierfür wurde der Elektroporator „MicroPulser“ (Bio-Rad) im Programm „Ec2“ verwendet und Pulslängen von 4,8-5 ms erreicht. Um die Regenerierung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension möglichst zügig in 2 ml vortemperiertes SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden je 2 ml der Zellsuspensionen auf einer quadratischen Petrischale mit Selektionsantibiotikum-haltigem LB-Agar ausgestrichen und für 13-15 h bei 37 °C bebrütet. Nach dem Ablösen des Bakterienrasens mithilfe eines *Cell-Scrapers* wurden die Zellen in Flüssigmedium aufgenommen, wobei ein Volumen von mindestens 100 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium pro Kulturplatte benutzt wurde. Nach einstündiger Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C wurde



die Kultur zur Inokulation weiterer Flüssigmedien für Selektionsexperimente und für die Präparation der Plasmid-DNA (Plasmid-Midiprep) verwendet.

## 2.2.4 DNA-Isolierung aus *E. coli*

### 2.2.4.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Präparation doppelsträngiger Plasmid-DNA aus *E. coli* im analytischen Maßstab („Miniprep“, 10-20 µg) und im präparativen Maßstab („Midiprep“, ca. 100 µg) wurden die entsprechenden Kits der Firma Qiagen unter Befolgung der vom Hersteller vorgegebenen Protokolle verwendet. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Zur Kontrolle der isolierten Plasmid-DNA nach einfachen Subklonierungen wurde ein Restriktionsverdau mit geeigneten Endonukleasen durchgeführt, worauf die Länge der Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurde. Bei der Klonierung von PCR-Produkten sowie der Verwendung ortsgerichteter Mutagenese-Verfahren erfolgte die Überprüfung der Sequenz nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit und des ABI PRISM 310-Sequenzierautomaten entsprechend den Angaben des Herstellers und unter Verwendung geeigneter Sequenzier-Primer (siehe Abschnitt 2.1.4).

### 2.2.4.2 Isolierung von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Die für die Mutagenese nach Kunkel *et al.* (1987) benötigte zirkuläre einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des filamentösen Phagen  $\phi$ 1 trugen, präpariert. Hierfür wurde eine mit einem entsprechenden Plasmid transformierte *E. coli*-Kultur mit VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen infiziert. Dies bewirkt die Verpackung und Sezernierung einzelsträngiger Plasmid-DNA in Form von Phagemid-Partikeln (Vieira & Messing, 1987). Der dabei verwendete *E. coli*-Stamm CJ236i trägt ein F'-Plasmid, wodurch die Ausbildung der zur Infektion benötigten Sex-Pili gewährleistet wird. Darüber hinaus bewirken die chromosomalen Mutationen *dut-1* und *ung-1* den partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA (Geisselsoder *et al.*, 1987; siehe Abschnitt 2.2.7.3). Für ein detailliertes Protokoll der hier verwendeten Vorgehensweise sei an dieser Stelle auf die Veröffentlichung von Schlapschy (2004) verwiesen.

## 2.2.5 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Zelllinien SU-DHL-4 und cmHsp70.1 wurden in 75 mm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit RPMI1640-Medium (10 % v/v FCS, Pen/Strep) über mehrere Passagen kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und durch Zentrifugation (5 min, 300 g, 4°C) in 50 ml-PP-Röhrchen (Greiner) geerntet. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini-Kit (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Qualität der Präparation wurde mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die RNA-Konzentration wurde durch Photometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit einem Extinktionskoeffizienten von 0,025 (µg/ml)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bestimmt. Die Ausbeuten betragen jeweils über 50 µg RNA aus jeweils etwa 5×10<sup>6</sup> Zellen.

## 2.2.6 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Sowohl für präparative als auch für analytische Zwecke wurde eine größenabhängige Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Methodik ist ausführlich in den Protokollen von Sambrook & Russell (2001) beschrieben. Abhängig vom Größenbereich der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit Konzentrationen von 0,8-1,2 % Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde dem Gel bei der Herstellung 1/10.000 Volumen einer 1 % (w/v) Ethidiumbromid-Stammlösung zugesetzt. Für Gelelektrophoresen mit dem Ziel der präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde *Low-Melting-Point*-Agarose („UltraPure“, Invitrogen) mit einem erhöhten Reinheitsgrad verwendet. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit einem 6x-DNA-Auftragspuffer versehen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90 V, im Fall von niedrig-schmelzenden, präparativen Gelen bei 70 V, durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente anhand der Fluoreszenz des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids bei einer Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Präparation von DNA-Fragmenten wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, wobei zur Vermeidung von Strahlungsschäden UV-Licht verminderter Intensität verwendet wurde. Bei der Isolierung von DNA-Fragmenten für die Klonierung von Anticalin-Bibliotheken wurde gänzlich auf die Verwendung von UV-Licht verzichtet und Weißlicht zur Sichtbarbachtung des interkalierten Ethidiumbromids genutzt, was aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen dieser Präparationen möglich war.

Zur Reinigung der isolierten DNA für anschließende Klonierungsarbeiten wurde das Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem (Promega) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte anhand der UV-Lichtabsorption bei 260 nm unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes. Der entsprechende Extinktionskoeffizient wurde ausgehend von einem Durchschnittswert von  $660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  pro Basenpaar berechnet (Sambrook & Russell, 2001).

## 2.2.7 *In vitro*-Modifizierung von DNA

### 2.2.7.1 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die Amplifizierung von DNA-Abschnitten zur Verwendung bei anschließenden Klonierungsarbeiten wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung des Herculase II Fusion-PCR-Kits (Agilent) nach den Gebrauchshinweisen des Herstellers durchgeführt. Die hierin enthaltene rekombinante DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine mittels *Proofreading*-Aktivität reduzierte Fehlerrate bei dennoch sehr hoher Synthesegeschwindigkeit aus.

Als Matrize wurden 10-100 ng DNA einer Plasmid-Miniprep bzw. -Midiprep oder cDNA verwendet. Als Primer wurden jeweils zwei synthetische Oligodesoxynukleotide eingesetzt, welche komplementäre Sequenzen zu den beiden flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Segments aufwiesen. Neben diesen komplementären Bereichen, welche nach Möglichkeit so gewählt wurden, dass sie bei einer Länge von ca. 18 Nukleotiden etwa 10 GC-

Basen enthielten, konnten die Primer nach außen hin mit nicht-komplementären Sequenzen verlängert werden, um neue genetische Elemente, wie etwa Restriktionsschnittstellen in das PCR-Produkt einzuführen. Zur Reinigung der isolierten DNA für anschließende Klonierungsarbeiten wurden das Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem oder das QiaQuick PCR-Reinigungskit nach den Gebrauchsanweisungen der Hersteller verwendet.

#### 2.2.7.2 Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription

Die reverse Transkription eukaryontischer mRNA erfolgte ausgehend von Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 2.2.5) mit dem *First Strand cDNA Synthesis*-Kit nach den Anweisungen des Herstellers (Fermentas). Für die Reaktion mit *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV)-Reverser Transkriptase wurden 2-4 µg der Gesamt-RNA als Matrize und ein (dT)<sub>18</sub>-Oligodesoxynukleotid als Primer verwendet. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.7.3 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

Für die simultane ortsgerichtete Mutagenese an verschiedenen Positionen eines Gens wurde die Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) entsprechend der Methode von Kunkel *et al.* (1987) angewandt. Hierbei werden Oligodesoxynukleotide, welche die gewünschten Substitutionen enthalten, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert und dienen so bei einer DNA-Polymerase-reaktion als Primer für die Synthese des Komplementärstrangs. Der neu-synthetisierte Strang wird anschließend in einer Ligase-Reaktion kovalent zirkularisiert.

Der parentale Strang für das Heteroduplex enthält aufgrund seiner Herkunft aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i teilweise Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin (vgl. Abschnitt 2.2.4.2). Bei der Transformation eines *ung*<sup>+</sup> Stamms (hier JM83) mit der Hybrid-DNA bewirkt ein durch die Uracil-DNA-Glycosylase vermitteltes zelleigenes DNA-Reparatursystem die bevorzugte Replikation des synthetischen Strangs mit den enthaltenen Mutationen. Für ein detailliertes Protokoll der hier verwendeten Vorgehensweise sei an dieser Stelle auf die Beschreibung von Schlapschy (2004) verwiesen.

#### 2.2.7.4 Ortsspezifische Mutagenese mittels QuickChange PCR

Für die ortsgerichtete Mutagenese in nur einem kleineren Bereich des Plasmids (<100 bp) wurde das QuickChange II-Mutagenesekit nach den Anweisungen des Herstellers (Agilent) verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Synthese vollständiger Plasmide in einer PCR mit dem zu mutierenden, aus einem *dam*<sup>+</sup>-*E. coli*-Stamm (wie z. B. XL1-Blue oder JM83) präparierten Plasmid als Matrize und zwei komplementären Primern, welche die entsprechende Substitution, Insertion oder Deletion enthalten. Durch den Zusatz der *dam*-methylierungsspezifischen Restriktionsendonuklease *DpnI* zum Reaktionsansatz nach Abschluss der PCR und der dadurch verursachten partiellen Degradation des Ausgangsplasmids erhalten die synthetischen unmethylierten Plasmide einen Selektionsvorteil bei der Transformation von *E. coli*-Zellen.

#### 2.2.7.5 Zufallsmutagenese mittels Error Prone-PCR

Für die Zufallsmutagenese eines definierten Genabschnitts zur Herstellung von Gen-Bibliotheken wurde eine PCR mit einem Gemisch aus zwei rekombinanten fehlerhaft synthetisierenden DNA-

Polymerasen (*Error Prone-PCR*) unter Verwendung des GeneMorph II-Mutagenesekits (Agilent) eingesetzt. Die Reaktion wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt. Als Matrize diente gereinigtes PCR-Produkt des zu mutierenden Genabschnittes (Abschnitt 2.2.7.1). Um die gewünschte Mutationsrate zu erreichen, wurde die Menge der eingesetzten Matrizen-DNA zwischen 50 pg (0,2 fmol) und 1 ng (4 fmol) variiert; die Zyklenanzahl wurde konstant bei 30 belassen. Das PCR-Produkt wurde mit dem Wizard SV-Gel- und PCR-Reinigungssystem (Promega) gereinigt, mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und schließlich mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

#### 2.2.7.6 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten für Klonierungsarbeiten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Typ-II-Restriktionsendonukleasen gespalten. Reaktionsbedingungen und Puffersysteme wurden nach den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller gewählt. Analytische Restriktionsspaltungen erfolgten in einem Volumen von 20 µl mit ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und je 5 Units der Restriktionsendonukleasen für die Dauer einer Stunde. Präparative Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten erfolgten ebenfalls in einem Volumen von 20 µl mit 1-2 µg DNA und 10 Units Restriktionsenzym je 1 µg DNA für die Dauer von 2 h.

Beim Verdau von DNA für die Erstellung hochkomplexer Lipocalin-Bibliotheken (Abschnitt 2.3.1) wurde ein optimiertes Protokoll verwendet. Hierbei betrug das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 10 µl pro 1 µg Plasmid-DNA oder gereinigtem PCR-Produkt (Abschnitte 2.2.7.1 und 2.2.7.5). Der Verdau erfolgte mit 5 Units *Bst*XI (New England Biosciences) pro 1 µg DNA für die Dauer von 1 h bei 37 °C. In der Regel wurden ca. 200 µg Plasmid-DNA und 10 µg PCR-Produkt verdaut.

Analyse und Präparation der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben.

#### 2.2.7.7 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von gereinigten DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsverdau oder PCR erzeugt wurden, erfolgte mit der T4-DNA-Ligase nach Vorschrift des Herstellers (Fermentas) entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C. PCR-Produkte, bei denen mindestens ein Ende nicht durch Restriktionsendonukleasen prozessiert wurde und welche somit mindestens an einem Strang ein 5'-Ende ohne Phosphatgruppe trugen, wurden zuvor einer Phosphorylierungsreaktion unterzogen. Hierfür wurde T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) nach einem entsprechenden Protokoll des Herstellers benutzt. Nach der Reinigung mit dem Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem konnte die DNA für die Ligase-Reaktion verwendet werden.

In der Regel wurde die Ligierung in einem Volumen von 20 µl mit 100-200 ng Vektor-Rückgrat und einer dreifachen molaren Menge des Insert-Fragments durchgeführt. Nach Hitzeinaktivierung der DNA-Ligase für 10 min bei 65 °C wurden 5 µl des Ansatzes für die Transformation  $\text{CaCl}_2$ -kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet (Abschnitt 2.2.2).

Die Ligierung von Lipocalin-Bibliotheken mit dem *Surface Display*-Vektor pNGAL146 erfolgte in einem Volumen von 1 µl pro 10 ng DNA mit einer Ligase-Konzentration von 0,1 Weiss-Unit/µl und äquimolarer Menge des DNA-Fragments. Die Reaktion wurde für 48-72 h bei 16 °C durchgeführt. Vor der Transformation elektrokompetenter Zellen wurde das Ligierungsprodukt mittels Ethanolfällung gereinigt (Abschnitte 2.2.7.8 und 2.2.3).

#### 2.2.7.8 Fällung mit Ethanol

Zur Fällung von DNA aus wässriger Lösung wurden das gleiche Volumen 5 M Ammoniumacetatlösung, 1/40 Volumen einer tRNA-Stammlösung (10 mg/ml in TE-Puffer) und 4 Volumen Ethanol (p. A.) zugesetzt. Die Präzipitation erfolgte für die Dauer einer Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Fällungsansatz zentrifugiert (15.800 g, 4 °C, 1 h). Der Überstand wurde restlos abgenommen und das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15.800 g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand entfernt und das sedimentierte Präzipitat für mindestens 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem Volumen von 4 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 pro 1 µg DNA sorgfältig gelöst und durch Zentrifugation (15.800 g, 4 °C, 15 min) von unlöslichen Verunreinigungen getrennt.

## 2.3 Anticalin-Präsentation und -Selektion

### 2.3.1 Herstellung von Anticalin-Bibliotheken zur Präsentation auf *E. coli*

Die Darstellung sowohl von positionsspezifisch randomisierten Lipocalinbibliotheken als auch von mittels Zufallsmutagenese erzeugten Anticalin-Bibliotheken auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen erfolgte nach einer von Binder *et al.* (2010) beschriebenen Methode. Hierbei ermöglicht der *Display*-Vektor pNGAL146 die Sekretion und Verankerung der Anticaline auf der Zelloberfläche durch Expression in Fusion mit einem Sekretionssignal (OmpA) für das Sec-Translokon und einer modifizierten Translokator-Domäne des Autotransporter-Proteins EspP (vgl. Abschnitt 1.3).

Zur Klonierung der naiven Lcn2-basierten Bibliothek Slo3004-2 (Sloning BioTechnology, Puchheim; Gebauer *et al.*, 2013) auf pNGAL146 war eine vorangehende Reamplifizierung der von der Pieris AG freundlicherweise zur Verfügung gestellten DNA notwendig. Hierfür wurde eine PCR mit 56,25 ng der DNA-Bibliothek (entspricht etwa  $10^{11}$  Molekülen), verteilt auf neun Ansätze, nach dem Schema in Tabelle 2-3 durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde abweichend von den Vorgaben des DNA-Polymerase-Herstellers von 30 auf 15 Zyklen reduziert, um einem Diversitätsverlust durch die übermäßige Amplifikation einzelner DNA-Moleküle im Laufe der Kettenreaktion entgegenzuwirken.

Nach dem Verdau des gereinigten PCR-Produkts mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI wurde die mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigte DNA als Insert für die Ligierung mit dem Vektorrückgrat von pNGAL146 eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.7.7).

**Tabelle 2-3:** Parameter für die Reamplifikation der Lipocalin-Bibliothek Slo3004-2

Pipettierschema		PCR-Parameter		
Matrize (AB3004-2, 10 ng/μl)	0,625 μl	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
dNTPs (je 2,5 mM)	10 μl	1	95 °C	2 min
5x Puffer-Stammlösung	10 μl	15	{ 95 °C 57 °C 72 °C	20 sec
Primer BstXI_for (10 μM)	1,25 μl			20 sec
Primer BstXI_rev (10 μM)	1,25 μl			1 min
Herculase II Fusion-Polymerase	0,5 μl	1	72 °C	3 min
H <sub>2</sub> O	26,375 μl			
Gesamtvolumen	50 μl			

Die zur Herstellung der Zufallsmutagenese-Bibliotheken notwendigen PCR-Reaktionen wurden wie in den Abschnitten 2.2.7.1 und 2.2.7.5 beschrieben mit den Primern BstXI\_for und BstXI\_rev durchgeführt. Für beide Reaktionen wurde eine Hybridisierungstemperatur von 57 °C gewählt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit *BstXI* verdaut und das relevante DNA-Fragment wurde jeweils mittels Agarosegelelektrophorese isoliert. Nach dessen Isolierung mit dem Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem wurde das Fragment mit dem Vektorrückgrat pNGAL146 ligiert (vgl. Abschnitt 2.2.7.7).

Die mit den Lipocalin-Bibliotheken transformierten *E. coli* JK321-Kulturen (vgl. Abschnitt 2.2.3) wurden anschließend für Selektionsexperimente eingesetzt.

### 2.3.2 Affinitätsanreicherung durch Adsorption an paramagnetische Partikel

Die nach der Elektrotransformation gewonnene *E. coli*-Kultur wurde zur Inokulation von 200 ml auf 30 °C temperiertem LB/Amp-Medium verwendet. Dies führte zu einer OD<sub>550</sub> von 0,200, was einer Gesamtzellzahl von etwa  $8 \times 10^{10}$  entspricht. Beim Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,500 im Laufe der Inkubation (30 °C, 180 rpm) erfolgte die Induktion der Lipocalin-EspP-Expression durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 10 ng/ml. Nach 1,5 h hatte die Kultur eine OD<sub>550</sub> von ~1,2 erreicht, und 50 ml hiervon (~ $10^{11}$  Zellen) wurden auf zwei 50 ml-PP-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (10 min, 5.000 g, 4 °C). Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS/BSA gewaschen und anschließend, soweit nicht anders angegeben, für 1 h in einem 15 ml-PP-Röhrchen in 10 ml PBS/BSA mit einer definierten Konzentration an biotinylierter rekombinanter Hsp70-Substrat-Bindedomäne (SBD<sub>Hsp70</sub>) bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wie oben beschrieben abzentrifugiert und gewaschen, bevor sie in einem Volumen von 10 ml PBS/BSA mit 1 mg NeutrAvidin- oder Streptavidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln vermischt und wie oben inkubiert wurden. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die Partikel mit den adsorbierten Zellen am Rand des 15 ml-PP-Röhrchens gesammelt, vom Überstand befreit und in 10 ml PBS/BSA resuspendiert. Diese Waschprozedur wurde noch zweimal in einem Volumen von 5 ml wiederholt bevor, das Sediment letztendlich in 2 ml LB-Medium resuspendiert und auf vier quadratischen LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen wurde. Nach Inkubation der Zellen

für 13-15 h bei 37 °C wurde der entstandene Bakterienrasen abgeschabt, in 200 ml LB/Amp-Medium resuspendiert und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

### 2.3.3 Affinitätsanreicherung mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)

Eine dichte *E. coli*-Kultur mit der Lipocalin-Bibliothek wurde zur Inokulation von 50 ml vorgewärmtem LB/Amp-Medium verwendet. Diese Kultur, welche eine Start-OD<sub>550</sub> von 0,150 aufwies, wurde im Schüttelinkubator bei 30 °C inkubiert. Nach Induktion der Genexpression bei einer OD<sub>550</sub> von 0,500 mit aTc (10 ng/ml) wurde die Kultur für weitere 1,5 h geschüttelt, bevor 100 µl abgenommen und zentrifugiert wurden (3 min, 9.300 g, 4 °C). Das Sediment (~2×10<sup>8</sup> Zellen) wurde in 500 µl PBS/BSA resuspendiert, erneut abzentrifugiert und, soweit nicht anders angegeben, in 500 µl PBS/BSA mit einer definierten Konzentration der biotinylierten SBD<sub>Hsp70</sub> in PBS/BSA aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation auf dem Taumelrollenmischer bei 4 °C wurden die Zellen wie oben abzentrifugiert, in PBS/BSA gewaschen und erneut abzentrifugiert. Bei der Affinitätsmaturierung von Anticalinen mit dem Ziel verlangsamter Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) wurde das Zellsediment hierauf in 500 µl PBS/BSA mit 10 µM unmarkiertem SBD<sub>Hsp70</sub>-Protein zur Kompetitor für einen definierten Zeitraum weiter inkubiert. Um die Zellen hierbei in Suspension zu halten und eine konstante Temperatur von 12 °C zu erreichen, erfolgte die Inkubation unter ständigem Schütteln bei 800 rpm im Thermomixer (Eppendorf). Die Fluoreszenzmarkierung der Zellen erfolgte (soweit nicht anders angegeben) durch Aufnehmen des Zellsediments in 500 µl PBS mit Streptavidin-PE (25 µg/ml), DY634-A3C5-Fab-Konjugat (3 µM) sowie FITC-konjugiertem Ovalbumin (370 µg/ml). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit den in Tabelle 2-4 aufgeführten Parametern im FACSaria II-Zellsortierer. Das Probenröhrchen wurde dabei konstant auf 4 °C gekühlt und durch schütteln (300 rpm) in Suspension gehalten.

**Tabelle 2-4:** Fluoreszenzfarbstoffe im FACS

Farbstoff	Anregung	Emissionsfilter
Fluorescein (FITC)	488 nm-Laserdiode	530/30 nm
Phycoerythrin (PE)	488 nm-Laserdiode	585/42 nm
DY634	633 nm-HeNe-Laser	660/20 nm

Vor jeder Zellsortierung wurde die Distanz zwischen dem Fluoreszenzsignal in der Messküvette und dem Abreißen des Flüssigkeitsstrahls zur Bildung des ersten Tropfens (*Drop Delay*) mithilfe von Accudrop-Partikeln (BD Biosciences) ermittelt und entsprechend der Bedienungsanleitung des Herstellers zur Kalibrierung des FACS-Systems verwendet. Die Flussgeschwindigkeit wurde so gewählt, dass die Messereignisdichte (*Event Rate*) zwischen 10.000 und 20.000 s<sup>-1</sup> lag. Die Zellen wurden in 15 ml-PP-Röhrchen mit 500 µl vorgelegtem LB-Medium gesammelt, welche konstant auf 10 °C temperiert wurden. Die Zellsuspension wurde auf einer quadratischen Agarplatte (LB-Medium mit Ampicillin) ausplattiert, für 13-15 h bei 37 °C inkubiert und

anschließend abgeschabt, um als Inokulum für eine neue Flüssigkultur und einen weiteren Selektionszyklus zu dienen. Alternativ konnte auch ein Teil des gesammelten Volumens auf einer gesonderten Agarplatte ausgestrichen werden, um das Wachstum diskreter Kolonien und die Isolierung von Einzelklonen zu ermöglichen. Zur Auswertung der Cytofluorometrie-Daten wurde die FlowJo-Software benutzt.

### 2.3.4 Cytofluorimetrische Einzelklonanalyse

Zum Durchmustern der mittels FACS isolierten Einzelklone im Hinblick auf Antigenbindungsaktivität wurde im Prinzip wie bei der FACS-basierten Affinitätsanreicherung vorgegangen (vgl. vorheriger Abschnitt). Einzelkolonien wurden zur Inokulation von 50 ml LB/Amp-Medium verwendet; diese wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert, um damit anschließend LB/Amp-Flüssigmedium (50 ml) zu einer OD<sub>550</sub> von 0,150 anzuimpfen. Inkubation, Induktion und Ernte erfolgten wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben. Die Zentrifugation von je zweimal 100 µl der Kulturen wurde in PP-96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt (5 min, 3.000 g, 4 °C). Die Zellen wurden mit 100 µl PBS/BSA gewaschen und entweder in 50 µl PBS/BSA mit biotinylierter SBD<sub>Hsp70</sub> oder in 50 µl PBS/BSA ohne weitere Zusätze (Kontrolle) aufgenommen. Es folgte eine Inkubation für 1 h im Thermomixer (800 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und mit PBS/BSA gewaschen. Die Sedimente wurden daraufhin in 20 µl PBS mit 25 µg/ml Streptavidin-PE und 3 µM DY634-A3C5-Fab resuspendiert und für 30 min auf Eis belassen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Verdünnung (Verhältnis 20:3) in PBS wurden die Zellen mit den im vorigen Abschnitt beschriebenen Parametern analysiert. Zur Auswertung der Cytofluorometrie-Daten wurde die FlowJo-Software benutzt.

## 2.4 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Verwendung von Expressionsvektoren mit dem chemisch induzierbaren tet-Promotor/Operator-System (Skerra, 1994b) ermöglicht die Anzucht einer Bakterienkultur ohne Belastung einer heterologen Genexpression und erlaubt in einer zweiten Phase bei ausreichender Zelldichte das Umschalten auf die Überexpression des Fremdgens. Proteine, welche für ihre funktionelle Faltung auf die Bildung intra- oder intermolekularer Disulfidbrücken angewiesen waren, wurden mit Hilfe von Expressionsvektoren produziert, welche die Sec-abhängige Sekretion des Proteins in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli* durch die translationale Fusion mit der OmpA-Signalsequenz ermöglichten (Skerra & Plückthun, 1988). Alle sonstigen rekombinanten Proteine wurden in löslicher Form im Cytoplasma der Wirtszellen produziert.

### 2.4.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

#### 2.4.1.1 Periplasmatische Proteinproduktion

Ein Volumen von 50 ml LB-Medium mit den benötigten Antibiotika wurde mit einer entsprechend transformierten Einzelkolonie des *E. coli* K12-Stamms JM83 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert, um anschließend die Inokulation von 2 L des gleichen



Mediums im Verhältnis 1:50 zu ermöglichen. Diese Hauptkultur wurde bei 22 °C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0.5-0.6 wurde die Genexpression durch Zugabe von aTc (Endkonzentration 200 µg/l) induziert. Nach 2,5 h wurden die Kulturkolben für 15 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (F10-4x1000-Rotor, 15 min, 5.000 rpm, 4 °C). Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 20 ml PPA-Puffer resuspendiert und in einem 50 ml-PP-Röhrchen für 30 min bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte bei 4 °C abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 15 min sowie SS-34, 15.000 rpm, 15 min). Der periplasmatische Extrakt wurde für die nachfolgende Reinigung des rekombinanten Proteins über Nacht gegen einen entsprechenden Chromatographie-Puffer dialysiert.

#### 2.4.1.2 Cytoplasmatische Proteinproduktion

Ein Volumen von 50 ml TB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum wurde mit einer entsprechend transformierten Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms BL21 angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert, um anschließend die Inokulation von 2 L des gleichen Mediums im Verhältnis 1:50 zu ermöglichen. Diese Hauptkultur wurde bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>550</sub> von 0.8-1.0 wurde die Genexpression durch Zugabe von aTc (Endkonzentration 200 µg/l) induziert. Nach 2,5 h wurden die Kulturkolben für 15 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (F10-4x1000-Rotor, 15 min, 5.000 rpm, 4 °C). Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 10-20 ml 40 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer (pH 7.5) aufgenommen und nach Zugabe von Lysozym (Endkonzentration: 200 µg/ml) für 30 min in einem 50 ml-PP-Röhrchen bei 4 °C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Zur Verminderung von Oxidationsschäden wurde der Zellsuspension β-Mercaptoethanol zugegeben (20 mM), bevor der Zellaufschluss in der French-Press bei einem Druck von 6,9 Pa durchgeführt wurde. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt (SS-34, 15.000 rpm, 4 °C). Der Rohextrakt wurde sterilfiltriert und für die weitere Aufarbeitung gegen einen entsprechenden Chromatographie-Puffer dialysiert oder in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.4.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Für die periplasmatische Produktion rekombinanter Proteine im Laborfermenter wurde ein auf der Methode von Schiweck & Skerra (1995) beruhendes Protokoll verwendet; das hier wiedergegebene Protokoll wurde der Arbeit von Schlapschy (2004) entnommen. Der *E. coli*-Stamm MC4100 wurde hierbei in einem 10 l-Fermentergefäß in Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurde. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet.

Als Vorvorkultur wurden 2 ml mit entsprechenden Antibiotika versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie inokuliert und für 6-8 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 360 ml Mineralsalzlösung, denen 40 ml 20 %

(w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 400 µl Antibiotikum-Stammlösung sowie 400 µl Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD<sub>550</sub> = 1,5-2,0.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 L Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor der Inokulation der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 30 °C temperiert und es wurden 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, je 8 ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl<sub>3</sub>- und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung sowie 800 µl Antifoam Y-30-Emulsion hinzugegeben. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, bei dem im begasten sterilen Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert  $\geq 30$  % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm. Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur inokuliert und für 2 h auf 30 °C temperiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt.

Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zugefüttert:

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

Weiterhin wurden der Kultur bei OD<sub>550</sub> = 13 nochmals je 4 ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD<sub>550</sub>  $\approx$  20 durch Einstellen einer aTc-Konzentration von 0,5 mg/L induziert, die Kultivierung wurde für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, 4 °C, 20 min, 5.000 rpm) in einem Schritt geerntet.

Die sedimentierte Zellpaste wurde in ein kaltes 1 l-Becherglas überführt und in vorgekühltem PPA-Puffer für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2 ml·OD<sup>-1</sup>. Der Zellsuspension wurden anschließend Na<sub>2</sub>EDTA (Endkonzentration: 15 mM) und Lysozym (Endkonzentration: 250 µg/ml) zugesetzt. Um einen vollständigen Periplasmaaufschluß zu erreichen, wurde die Suspension für 20 min auf Eis gerührt. Der Periplasmaextrakt wurde in mehreren Zentrifugationsschritten (SLA-1500-Rotor, 4 °C, 20 min, 11.500 rpm) geklärt und durch Dialyse (3x gegen 5 l für jeweils mehr als 12 h) für die anschließende IMAC-Reinigung mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert.

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 Chromatographische Verfahren

#### 2.5.1.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Rekombinante Proteine, welche C-terminal mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel fusioniert waren, wurden in einem Chromatographieschritt mit einer Reinheit von für gewöhnlich  $\geq 95\%$  aus dem Periplasmaextrakt isoliert. Hierzu wurde der Periplasmaextrakt gegen SA-Puffer dialysiert,  $0,45\ \mu\text{m}$ -sterilfiltriert und an einer Laborchromatographieranlage auf eine mit SA-Puffer äquilibrierte *Strep*-Tactin-Chromatographiesäule aufgetragen. Für 30 ml Periplasmaextrakt (Schüttelkolben-Kultur) wurden üblicherweise Säulen mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Nach dem Auftragen wurde solange mit SA-Puffer gewaschen, bis das UV-Absorptionssignal die Basislinie erreichte. Das selektiv über das *Strep*-tag II gebundene rekombinante Protein wurden mit D-Desthiobiotin (2,5 mM in SA-Puffer) kompetitiv eluiert, und die Hauptfraktionen wurden gesammelt. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 5 mM HABA in SA-Puffer gespült, um das D-Desthiobiotin zu verdrängen. Nachdem die Säule anschließend solange wieder mit SA-Puffer gespült wurde, bis die Säule die orange-rote Färbung des HABA-*Strep*-Tactin-Komplexes verloren hatte, konnte die Säule für weitere Chromatographieläufe verwendet werden.

#### 2.5.1.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Produktion rekombinanter Proteine als Fusion mit einem N- oder C-terminalen Hexahistidinanhängsel ( $\text{His}_6$ -tag) ermöglicht deren Isolierung/Reinigung mithilfe der IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*; Skerra *et al.*, 1991). Diese beruht auf der Wechselwirkung der Histidin-Seitenketten mit Übergangsmetallionen, welche im Komplex mit dem Liganden Iminodiessigsäure (IDA) oder Nitrilotriessigsäure (NTA) an der Säulenmatrix immobilisiert werden.

Zur Isolierung eines rekombinanten nicht-PASylierten Proteins aus 20-30 ml Periplasmaextrakt wurde eine *Chelating Sepharose Fast Flow*-Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet; die Reinigung wurde an einer Laborchromatographieranlage durchgeführt. Zur Reinigung cytoplasmatisch produzierter Proteine wurde dieses Säulenmaterial in einem Bettvolumen von 6 ml verwendet. Die Säule wurde vor Beginn der chromatographischen Reinigung bis zum Erreichen der Basislinie mit Wasser gespült und anschließend mit fünf Säulenvolumen einer 10 mM  $\text{ZnSO}_4$ -Lösung bzw. im Fall von rhHsp70.1 mit 100 mM  $\text{NiSO}_4$  beladen. PASylierte Proteine wurden mit einer (ebenfalls mit 100 mM  $\text{NiSO}_4$  beladenen) 6 ml-*Ni Sepharose High Performance*-Säule (GE Healthcare) gereinigt. Diese Reinigungen wurden am Äkta Prime-FPLC-System durchgeführt.

Nachdem die Säule erneut mit Wasser (zehn Säulenvolumen) gespült worden war, wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit IMAC-Laufpuffer äquilibriert. Für die Reinigung des  $\alpha\text{Hsp70}$ -Fab-Fragments wurde ein stabilisierender Betain-Laufpuffer (40 mM  $\text{NaP}_i$  pH 7,5; 500 mM Betain) verwendet (Essen & Skerra, 1993). Anschließend wurde der sterilfiltrierte Proteinrohextrakt

aufgetragen, und es wurde bis zum Erreichen der Basislinie mit Laufpuffer nachgespült. Die Elution erfolgte im Verlauf eines linearen Konzentrationsgradienten bis 300 mM Imidazol/HCl im Laufpuffer. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und mit Na<sub>2</sub>EDTA zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt, um Schwermetall-vermittelte Proteinpräzipitation zu vermeiden. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und entsprechend der gewünschten Reinheit vereint. Die erhaltene Proteinlösung konnte bis zur weiteren Feinreinigung bei 4 °C oder schockgefroren bei -20 °C gelagert werden.

#### 2.5.1.3 Ionenaustausch-Chromatographie

Für die chromatographische Trennung von Proteinen gemäß ihrer spezifischen pH-abhängigen Oberflächenladung wurden starke Ionenaustauscherharze eingesetzt. Zur Reinigung von rhHsp70.1 wurde eine Resource S-Kationenaustauschersäule (1 ml Bettvolumen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Polystyrol-Divinylbenzol-Matrix mit einer Partikelgröße von 15 µm, welche mit Methylsulfonat-Gruppen funktionalisiert ist. Nach Äquilibrierung der Säule im CEX-Laufpuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,0, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM DTT) wurde die sterilfiltrierte Proteinprobe, welche zuvor ausgiebig gegen diesen Puffer dialysiert worden war, mit einer Flussrate von 1 ml/min an einer Äkta FPLC-Anlage aufgetragen. Anschließend wurde mit CEX-Laufpuffer bis zum Erreichen der Basislinie gespült und durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten bis 500 mM NaCl in CEX-Laufpuffer fraktioniert eluiert.

Für die Reinigung von SBD<sub>BIP</sub> wurde eine Resource Q-Anionenaustauschersäule verwendet. Die Säulenmatrix entspricht der oben beschriebenen Kationenaustauschersäule, ist jedoch mit quartären Ammoniumionen funktionalisiert. Die Chromatographie wurde analog durchgeführt, wobei als Laufpuffer 20 mM Tris/HCl pH 9,0 mit 1 mM DTT verwendet wurde.

#### 2.5.1.4 Größenausschlusschromatographie

Zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen, zur Entfernung überschüssiger Kopplungsreagenzien und niedermolekularer Nebenprodukte bei Kopplungsreaktionen sowie zur Charakterisierung des Aggregations- bzw. Oligomerisierungsgrades der Proteine wurde die Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) angewendet. Als Chromatographiemedium wurde Superdex verwendet, wobei es sich um ein Agarose-Dextran-Mischpolymer handelt. Je nach kalkulierter Molekülgröße, wurde entweder das kleinporige S75-Material (Proteine < 50 kDa) oder das großporige S200-Material (Proteine > 50 kDa) benutzt. Die verwendeten Chromatographiesäulen besaßen die Dimensionen 10×300 mm (Bettvolumen 24 ml) und 16×60 mm (Bettvolumen 120 ml) und wurden mit Flussraten von 0,5 ml/min bzw. 1,0 ml/min betrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurde als Laufpuffer PBS verwendet. Die Proteinproben wurden zunächst mit Hilfe einer Ultrafiltrationseinheit nach Angaben des Herstellers auf ein Volumen ≤ 2 % des Bettvolumens der verwendeten Säule konzentriert und vor der Injektion in die Probenschleife durch Zentrifugation von partikulären Verunreinigungen befreit (5 min, 13.000 rpm, 4 °C).

Zur Ermittlung der apparenten Molekülmassen mittels nicht-linearer Regression wurden die Chromatographiesäulen bezüglich ihres Elutionsvolumens mit folgenden Proteinen kalibriert:

Carboanhydrase (29,0 kDa; aus Rindererythrocyten), Bovines Serumalbumin (66,0 kDa), Ovalbumin (43,0 kDa), Apomyoglobin (17,6 kDa; Pferdeskelettmuskel), Cytochrom C (12,4 kDa; aus Pferdeherzen), Alkoholdehydrogenase (150 kDa, Bäckerhefe),  $\beta$ -Amylase (200 kDa; aus Süßkartoffel) und Apoferritin (443 kDa, aus Pferdemicke). Alle Kalibrierproteine wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen.

### 2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die größenabhängige Trennung von Proteingemischen zu analytischen Zwecken erfolgte mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) und Verwendung des Hochsalz-Puffersystems von Fling & Gregerson (1986). Schloss sich an die Gelelektrophorese die N-terminale Proteinsequenzierung mittels Edman-Abbau an, wurde ein Glycin-freier Laufpuffer (100 mM Borsäure, 100 mM Tris-Base, 0,1 % w/v SDS) verwendet (Zander *et al.*, 2007).

Die aus Sammel- (7 % Polyacrylamid) und Trenngel (12 % Polyacrylamid) bestehenden Gele besaßen die Dimensionen 55×85×0,75 mm. Jeweils 16  $\mu$ l der zu analysierenden Proteinproben (üblicherweise 5-10  $\mu$ g von gereinigten Proteinen bzw. 25  $\mu$ g von Proteinrohextrakten) wurden mit 4  $\mu$ l 5x-Auftragspuffer versetzt und vor dem Befüllen der Geltaschen für 5 min bei 95 °C erhitzt. Sollten die Proteine mit ihren natürlichen Disulfidbrücken analysiert werden, fand diese Probenvorbereitung in einem nicht-reduzierenden,  $\beta$ -Mercaptoethanol-freien Auftragspuffer statt. Um die näherungsweise Bestimmung der Proteingröße zu ermöglichen, wurde ein Protein-Größenstandard mitgeführt.

Zur Färbung der Proteine wurden die Gele für 30 min in Färbelösung (0,25 % w/v Coomassie Brilliantblau R-250, 40 % v/v Methanol, 10 % v/v Essigsäure) inkubiert. Die Proteinbanden wurden anschließend durch 20-minütiges Schwenken in Entfärbelösung (Färbelösung ohne Coomassie Brilliantblau R-250) sichtbar gemacht. Bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure geschwenkt.

### 2.5.3 N-terminale Proteinsequenzierung (Edman-Abbau)

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Aminosäuresequenz von Proteinen stellt der Edman-Abbau dar (Laursen, 1966). Hierbei wird ein beispielsweise mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting auf einer Membran isoliertes Protein mit einem Phenyl-Isothiocyanat-Derivat (Edman-Reagenz) versetzt. Dies führt zur Abspaltung der N-terminalen Aminosäure unter Bildung eines Phenylthiohydantoin-Derivats, welches sich chromatographisch identifizieren lässt und somit den Rückschluss auf die ursprüngliche Aminosäure erlaubt. Durch die automatisierte Wiederholung dieses Vorgangs wurde die N-terminale Sequenz von bis zu 12 Aminosäuren der hier untersuchten Proteine identifiziert.

Zur Entfernung von blockierenden Pyroglutamyl-Modifikationen am N-Terminus von IgG-Polypeptidketten wurde nach einem Protokoll von Werner *et al.* (2005) verfahren. Hierbei wurden 10  $\mu$ g des Proteins für 6 h bei 75 °C mit 2 mU der *Pfu*-Pyroglutamylaminopeptidase im

vom Hersteller (Takara) mitgelieferten Puffer inkubiert. Um unter diesen Bedingungen eine verbesserte Zugänglichkeit des N-Terminus zu erreichen, wurde dem Ansatz Tween-20 mit einer Endkonzentration von 0,06 % (v/v) zugesetzt.

Die in solcher Weise behandelten Proteine wurden einer glycinfreien SDS-PAGE unterzogen und anschließend im halbtrockenen Elektrolot-Verfahren (*Semi-Dry Blot*) unter Verwendung eines glycinfreien Transferpuffers (100 mM Borsäure, 100 mM Tris-Base, 0,1 % w/v SDS, 20 % v/v Methanol) auf eine PVDF-Membran transferiert (Blotdauer 1 h bei 80 mA). Nach beendetem Transfer wurden die Proteinbanden durch Inkubation der Membran in Färbelösung (Abschnitt 2.5.2) für 5 min und Entfärben des Hintergrundes durch schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht. Die Membran wurde mit Reinstwasser gespült und auf Filterpapier getrocknet. Die Banden, welche 10 – 50 pmol Protein enthielten, wurden ausgeschnitten und mit Hilfe des Procise 492-Gasphasensequenzators (Applied Biosystems Instruments, Weiterstadt) im *PVDF Pulsed-Liquid*-Modus sequenziert (mit freundlicher Unterstützung von Prof. Peter Köhler, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Freising).

#### 2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration gereinigter Proteinlösungen wurde anhand der UV-Absorption bei 280 nm ermittelt. Die zur Konzentrationsbestimmung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Summe der Absorptionsbeiträge aller in der Polypeptidkette enthaltenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cystinseitenketten berechnet (Gill & von Hippel, 1989). Hierfür wurde das ProtParam-Tool des ExpASY-Servers<sup>1</sup> benutzt.

#### 2.5.5 Amino-selektive chemische Modifizierung von Proteinen

##### 2.5.5.1 Biotinylierung

Zur Modifizierung von Proteinen mit Biotin wurde das Kopplungsreagenz Biotin-LC-NHS verwendet, welches die Verknüpfung des Biotin-Moleküls mit Amino-Funktionen des Proteins über einen *N*-Hexansäure-*Spacer* ermöglicht. So wird die Zugänglichkeit dieser Gruppe für die von Streptavidin- bzw. Avidinreagenzien sichergestellt.

Für die Kopplungsreaktion wurde das Protein gegen 100 mM Natriumbicarbonatpuffer pH 8.6 dialysiert und auf eine Konzentration von ~5 mg/ml eingestellt. Nach Zugabe der dreifachen molaren Menge des Kopplungsreagenz (20 mM in DMF) fand die Reaktion für 1 h bei Raumtemperatur statt. Überschüssiges Kopplungsreagenz und freigesetztes *N*-Hydroxysuccinimid wurden anschließend mittels Gelfiltration über eine in PBS äquilibrierte PD-10-Säule entfernt.

Die Quantifizierung des Biotinylierungsgrades erfolgte mit dem HABA-Farbnachweis (Green, 1965). Der Farbstoff 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) bildet nicht-kovalente Komplexe mit den Bindungstaschen von Avidin und Streptavidin, welche durch ein spezifisches Absorptionsmaximum bei 500 nm ( $\epsilon = 34.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) charakterisiert sind. Da der Komplex

---

<sup>1</sup> <http://web.expasy.org/protparam>

von Avidin/Streptavidin mit HABA ( $K_D \approx 10^{-6}$ ) deutlich instabiler ist als der mit Biotin ( $K_D \approx 10^{-15}$ ), ist es möglich, die Biotinkonzentration einer Lösung durch Verdrängung von HABA anhand der Absorptionsabnahme bei 500 nm zu ermitteln. Unter der Annahme, dass an ein Protein gekoppeltes Biotin immer noch hohe Affinität zu Avidin/Streptavidin aufweist, kann nach Kalibrierung mit verschiedenen Biotinkonzentrationen die Konzentration/Menge gekoppelten Biotins und somit auch der Kopplungsgrad des Proteins bestimmt werden.

In die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotestplatte wurde hierzu 100  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe von Biotin in Testpuffer (50 mM NaPi pH 6,0, 150 mM NaCl) im Konzentrationsbereich 0,5-7,5  $\mu$ M vorgelegt und jeweils 100  $\mu$ l einer Komplexlösung (250  $\mu$ M HABA und 9,4  $\mu$ M Streptavidin in Testpuffer) zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Absorptionen bei 490 nm bestimmt und graphisch gegen die Biotinkonzentrationen aufgetragen. Mittels einer durch lineare Regression bestimmten Ausgleichsgerade konnte der Biotinylierungsgrad einer parallel gemessenen Proteinprobe (Proteinkonzentration: 2,175  $\mu$ M) ermittelt werden.

#### 2.5.5.2 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen

Das Protokoll zur Modifizierung der Lysinreste von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen entspricht der Verfahrensweise bei der Proteinbiotinylierung (Abschnitt 2.5.5.1). Die Kopplung wurde in 100 mM Na-Bicarbonatpuffer pH 8,6 für die Dauer einer Stunde durchgeführt. Die weiteren Parameter der Kopplungsansätze lassen sich

**Tabelle 2-5** entnehmen. Überschüssiges Kopplungsreagenz und niedermolekulare Nebenprodukte wurden mittels Größenausschlusschromatographie (Abschnitt 2.5.1.4), Dialyse oder Verwendung von PD-10-Säulen nach Vorschrift des Herstellers entfernt, wobei in PBS umgepuffert wurde.

**Tabelle 2-5:** Parameter für die Kopplung von Lysinresten mit Fluoreszenzfarbstoffen

Kopplungsreagenz	Proteinkonzentration	Molares Mengenverhältnis Reagenz	Stammlösung Kopplungsreagenz
Fluorescein-LC-NHS	~1 mg/ml	3	20 mM in DMF
FITC	5 mg/ml	8	20 mM in DMF
Cy5.5-NHS	1-2 mg/ml	4,4	10 mM in DMF
Dy634-NHS	~2 mg/ml	6	20 mM in DMF

Die Berechnung des Kopplungsgrades der markierten Proteine (F/P) erfolgte anhand der absorptionsphotometrischen Konzentrationsbestimmung von Farbstoff und Protein. Zur Berechnung der Farbstoffkonzentration konnte das Lambert-Beer-Gesetz direkt angewandt werden,

$$c(\text{Farbstoff}) = \frac{A_{F1} \times d}{\epsilon_{F1}} \quad (1)$$

wobei  $d$  der Schichtdicke der Küvette (in cm),  $\epsilon_{\text{FI}}$  dem molaren Extinktionskoeffizienten des Farbstoffs beim Absorptionsmaximum  $\lambda_{\text{FI}}$  und  $A_{\text{FI}}$  der Absorption bei  $\lambda_{\text{FI}}$  entspricht.

Für die Berechnung der Proteinkonzentration nach der Kopplung musste der Absorptionsbeitrag der gekoppelten Farbstoffmoleküle bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  ( $A_{280}$ ) berücksichtigt werden. Dies wird durch das als Korrekturfaktor (KF) angegebene Verhältnis der Absorption des Farbstoffs bei  $\lambda_{\text{FI}}$  und  $280 \text{ nm}$  möglich (vgl.

Tabelle 2-6):

$$c(\text{Protein}) = \frac{(A_{280} - \text{KF} \times A_{\text{FI}}) \times d}{\epsilon_{\text{Pr}}} \quad (2)$$

wobei  $\epsilon_{\text{Pr}}$  dem molaren Extinktionskoeffizienten des ungekoppelten Proteins bei  $280 \text{ nm}$  entspricht (vgl. 2.5.4).

Der Kopplungsgrad F/P ergibt sich demzufolge aus:

$$F/P = \frac{c(\text{Farbstoff})}{c(\text{Protein})} \quad (3)$$

**Tabelle 2-6:** Absorptionscharakteristika aminoreaktiver Fluoreszenzfarbstoffe

Kopplungsreagenz	$\epsilon_{\text{FI}}$ [nm]	$\epsilon_{\text{FI}}$ [ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	KF
Fluorescein-LC-NHS	495	72.000	0,30
FITC	495	76.000	0,35
Cy5.5-NHS	675	250.000	0,18
Dy634-NHS	625	200.000	0,13

### 2.5.5.3 Kopplung von Metall-Chelatoren

Für die Kopplung des mit einer Isothiocyanat-Funktion aktivierten Chelatbildners Desferrioxamin (Bz-Dfo-NCS, vgl. Abbildung 2.2) mit Lysyl-Gruppen von Proteinen wurde eine Proteinkonzentration von  $2,4 \text{ mg/ml}$  in  $100 \text{ mM}$  Na-Bicarbonatpuffer  $\text{pH } 8,6$  eingestellt. Nach Zugabe der 6-fachen molaren Menge *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin ( $5 \text{ mM}$  in DMSO) fand die Reaktion über Nacht bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  statt. Überschüssiges Kopplungsreagenz wurde durch Gelfiltration mittels PD-10-Säulen in  $0,5 \text{ M}$  HEPES nach den Vorgaben des Herstellers entfernt.

Die Bestimmung der Kopplungseffizienz erfolgte durch Fluoreszenztitration mit Terbium(III). Die Komplexierung von Lanthanidionen durch Chelatoren mit einem aromatischen Ring in Nähe der Koordinationssphäre führt zu sensibilisierter Fluoreszenz, wobei Lichtenergie vom aromatischen System des Liganden absorbiert und auf das Metall übertragen wird. Die hieraus resultierende Lichtemission des Metalls ist durch eine große Stokes-Verschiebung und eine relativ lange Fluoreszenzlebensdauer von bis zu einigen Sekunden gekennzeichnet (Brandt *et al.*, 1991).



Zur Messung wurden 2 ml einer 0,5  $\mu\text{M}$  Dfo-Protein-Lösung in 50 mM HEPES/NaOH pH 6,8 in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt. Die Lanthanidlösung (200  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$  in 50 mM HEPES/NaOH pH 6,8) wurde in Portionen von 0,5 bis 4  $\mu\text{l}$  zupipettiert. Nach einer Wartezeit von 1 min, in der sich unter Rühren ein Bindungsgleichgewicht eingestellt haben sollte, wurde die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm (Spaltbreite 4 nm) und einer Emissionswellenlänge von 545 nm (Spaltbreite 6 nm) gemessen.

Die Fluoreszenzwerte wurden gegen die Terbiumkonzentration aufgetragen und unter Annahme des Gleichgewichtszustandes wurde eine vom Massenwirkungsgesetz abgeleitete Gleichung zur nicht-linearen Regression der Daten verwendet (Vogt & Skerra, 2001),

$$F = ([L]_t - [M]_t - K_D) \frac{f_L}{2} + ([M]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_M}{2} + ([L]_t + [M]_t + K_D) \frac{f_{ML}}{2} + (f_L + f_M - f_{ML}) \sqrt{\frac{([L]_t + [M]_t + K_D)^2 - 4[L]_t[M]_t}{4}} \quad (4)$$

wobei  $f_L$ ,  $f_M$  und  $f_{ML}$  die molaren Fluoreszenzoeffizienten des Liganden (Dfo), des Metallions ( $\text{Tb}^{3+}$ ) und des Chelatkomplexes darstellen.  $[L]_t$  steht für die konstante Gesamtkonzentration des Chelat-bildenden Liganden Dfo,  $[M]_t$  steht für die variierende Gesamtkonzentration des zugegebenen Metallions. Die Volumenzunahme durch Zugabe der Lanthanidlösung betrug weniger als 1,5 % und wurde bei der Auswertung vernachlässigt. Die mit der KaleidaGraph-Software durchgeführte nicht-lineare Regression ermöglicht die numerische Ermittlung der Gesamt-Dfo-Konzentration  $[L]_t$  in der Lösung. Anhand der mittels Absorptionsphotometrie bestimmten Proteinkonzentration konnte damit die Anzahl gekoppelter Chelatliganden pro Proteinmolekül berechnet werden.

## 2.5.6 Chemische Modifizierung von Cystein-Seitenketten

Die ortsgerichtete Modifizierung von rekombinanten Proteinen über zusätzlich eingeführte freie Cysteinreste erfolgte durch Michael-Addition von Maleimiden. Um sicherzustellen, dass die zusätzlichen Cysteinreste der im *E. coli*-Periplasma produzierten Proteine in Form freier Thiole und nicht als gemischte Disulfide mit niedermolekularen Verbindungen vorliegen, wurde eine milde Reduktion durchgeführt. Hierbei wurde der Proteinlösung ( $\sim 100 \mu\text{M}$  in PBS) 2-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte die Entfernung des Reduktionsmittels mit Hilfe einer PD-10-Säule, welche in 50 mM  $\text{NaP}_i$  pH 5,6, 100 mM NaCl; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  äquilibriert worden war. Durch den sauren pH-Wert und die Anwesenheit des Chelatbildners EDTA sollte die freie Thiol-Gruppe im protonierten Zustand gehalten und eine metallkatalysierte Oxidation verhindert werden.

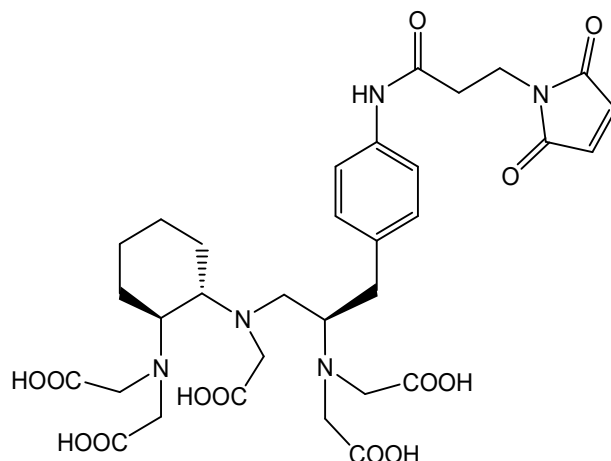
### 2.5.6.1 Kopplung an Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Fluoreszenzmarkierung eines so vorbereiteten Proteins wurde eine Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  in 50 mM  $\text{NaP}_i$  pH 5,6, 100 mM NaCl; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  eingestellt. Die Lösung wurde mit der 25-fachen molaren Menge an Fluorescein-Maleimid versetzt, und die Reaktion wurde durch Erhöhung des pH-Werts auf 7,5 mit Zugabe von  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (0,5 M Stammlösung) gestartet.

Nach 2 h wurde überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe einer in PBS äquilibrierten PD-10-Säule entfernt. Die Bestimmung der Kopplungseffizienz erfolgte wie in Abschnitt 2.5.5.2 beschrieben unter Verwendung folgender Parameter:  $\lambda_{F1} = 497 \text{ nm}$ ;  $\epsilon_{F1} = 80.000$ ;  $KF = 0,3$ .

### 2.5.6.2 Kopplung an Metall-Chelatbildner

Die Konzentration der Proteinlösung wurde auf 35-95  $\mu\text{M}$  in 50 mM  $\text{NaPi}$  pH 5,6; 100 mM  $\text{NaCl}$ ; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  eingestellt. Ein Maleimid-funktionalisiertes Derivat der Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA-Bz-Maleimid, Abbildung 2.1) wurde im 25-fachen molaren Verhältnis zugesetzt (Stammlösung 40 mM in DMF). Die Reaktion lief bei 4 °C nach der Erhöhung des pH-Werts auf 7,5 durch Zugabe von  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (0,5 M Stammlösung) über Nacht ab. Mit Hilfe einer PD-10-Säule wurde überschüssiges Kopplungsreagenz entfernt und gegen 0,1 M Natriumacetat pH 5 umgepuffert. Die Kopplungseffizienz wurde analog der in Abschnitt 2.5.5.3 beschriebenen Vorgehensweise durch Fluoreszenztitration mit  $\text{Tb}^{3+}$  bestimmt. Hierbei wurden 2 ml einer 1  $\mu\text{M}$  Proteinkonjugat-Lösung in 0,1 M hochreinem Ammoniumacetat pH 5 vorgelegt, und eine 200  $\mu\text{M}$   $\text{TbCl}_3$ -Lösung (in 0,1 M Ammoniumacetat pH 5) wurde in Schritten von 1-4  $\mu\text{l}$  unter Rühren hinzugefügt. Das weitere Vorgehen entsprach dem in Abschnitt 2.5.5.3.



**Abbildung 2.1:** Der bifunktionelle Ligand *N*-(3-Maleimidopropionyl)-*p*-aminobenzyl-CHX-A''-DTPA (DTPA-Bz-Maleimid).

### 2.5.7 Herstellung von Proteinkonjugaten mit Zirkonium und Lutetium

Mit DTPA-Derivaten gekoppelte Proteine wurden im molaren Verhältnis 1:1 bis 1:3 mit  $^{177}\text{Lu}$  (spezifische Aktivität 168 MBq/nmol) markiert. Ein Kopplungsansatz mit einem Volumen von 40  $\mu\text{l}$  enthielt folgende Komponenten:  $\sim 0,13 \text{ nmol } ^{177}\text{LuCl}_3$  (entsprechend 22,2 MBq; Stammlösung in  $\text{HCl}$ ), 750 mM  $\text{NaOAc}$ , 125 mM Gentsinsäure (zum Schutz der Proteine vor freien Radikalen) und DTPA-konjugiertes Protein im entsprechenden molaren Verhältnis. Die Komplexbildung erfolgte bei Raumtemperatur für eine Dauer von 10 bis 60 min. Die Komplexbildung wurde durch Dünnschichtchromatographie auf Glasmikrofaserpapier mit 0,1 M Citronensäure als Laufmittel überprüft, wobei das am Protein komplexierte  $^{177}\text{Lu}$  einen  $R_f = 0$  und freies  $^{177}\text{Lu}$  einen  $R_f = 1$  aufweist. Die Detektion erfolgte durch  $\gamma$ -Szintillationszählung (Mini-Scan TLC Imaging Scanner). Zur Entfernung von freiem  $^{177}\text{Lu}$  wurde der Kopplungsansatz

über eine in PBS äquilibrierte PD-10-Säule gereinigt. Die radiochemische Reinheit des Eluats wurde erneut mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt und betrug typischerweise > 95 %. Die Erfassung der Proteinkonzentrationen erfolgte von hier an szintillationsradiometrisch unter Berücksichtigung der Halbwertszeit des  $^{177}\text{Lu}$ -Zerfalls von 211,2 h.

Für die  $^{89}\text{Zr}$ -Markierung wurden 20-35 MBq  $^{89}\text{Zr(IV)}$ -Oxalat in 1 M Oxalsäure mit 150  $\mu\text{L}$  Wasser versetzt und durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung neutralisiert. Nach erfolgter  $\text{CO}_2$ -Freisetzung wurden dem Gemisch 200  $\mu\text{L}$  0,5 M HEPES/NaOH (pH 7,0), 75  $\mu\text{L}$  1 M Gentsinsäure/NaOH (pH 7,0) und 3-6 nmol des Dfo-konjugierten Proteins (vgl. Abschnitt 2.5.5.3, Abbildung 2.2) zugegeben, und der Ansatz für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Reinigung und Bestimmung der radiochemischen Reinheit entsprachen dem Vorgehen bei der Markierung DTPA-konjugierter Proteine mit  $^{177}\text{Lu}$ .

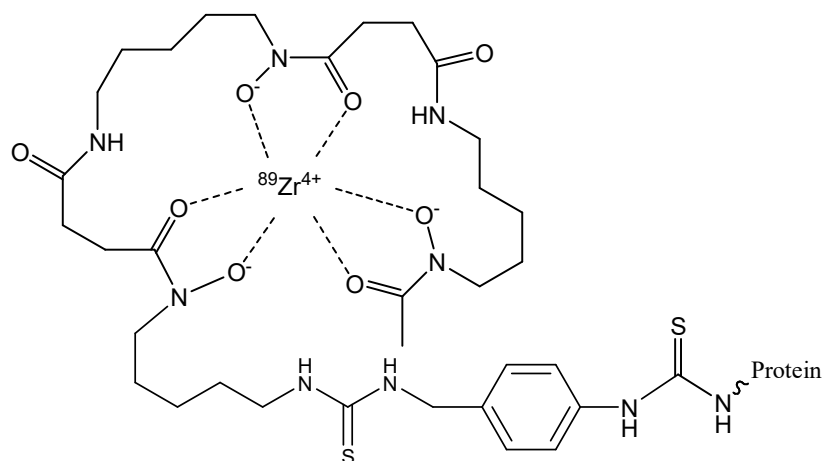


Abbildung 2.2:  $^{89}\text{Zr}$  im Komplex mit *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamin als Proteinkonjugat.

## 2.6 Immunologische Methoden und Zytotoxizitätstests

### 2.6.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Charakterisierung von Antikörperfragmenten und Anticalinen im Hinblick auf Bindungsaffinität und Spezifität wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde das Zielprotein Hsp70.1 oder dessen Substrat-Bindedomäne an die Vertiefungen einer Mikrowellplatte (Nunc MaxiSorp) adsorbiert und anschließend die Bindung der Anticaline anhand des C-terminalen *Strep*-tag II bzw. die Bindung der Fab-Fragmente anhand der konstanten Domäne ihrer leichten Kette in einer enzymatischen Reaktion mit chromogenem Substrat detektiert.

Die Immobilisierung des Zielproteins erfolgte in 50  $\mu\text{l}$  5 % (w/v) Natriumbikarbonatpuffer pro Vertiefung bei einer Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Absättigen verbliebener Bindungsstellen mit 3 % BSA in PBS/ $T_{0,1}$  (100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung, 1 h, RT) wurde eine Verdünnungsreihe des Bindeproteins angelegt, wobei in den Vertiefungen ein definiertes Volumen PBS/ $T_{0,1}$  vorgelegt wurde, und ein entsprechendes Volumen von einer

Vertiefung in die nächste pipettiert wurde, so dass ein gewünschter Verdünnungsfaktor (1:2 oder 1:4) erreicht wurde. Hierauf betrug das Volumen in jeder Vertiefung 50  $\mu\text{l}$ . Nach der Inkubation (1 h, RT) wurde dreimal mit PBS/T<sub>0,1</sub> gewaschen. Bei Anticalinen erfolgte der enzymatische Bindungsnachweis nach einem weiteren Inkubationsschritt mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (30 min, RT). Zur Detektion gebundener Antikörperfragmente war nach einem Inkubationsschritt mit Anti-Maus-C $\lambda$ -IgG (aus Kaninchen, 1:1000 in PBS/T<sub>0,1</sub> verdünnt; 30 min, RT), gefolgt von drei Waschschrritten, ein weiterer Inkubationsschritt mit Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1000 in PBS/T<sub>0,1</sub> verdünnt; 30 min, RT) durchgeführt. Für die enzymatische Nachweisreaktion wurden nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS/T<sub>0,1</sub> und einmaligem Waschen in AP-Puffer in jede Vertiefung 50  $\mu\text{l}$  einer 0,5 mg/ml-Lösung des chromogenen Substrats *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) mit AP-Puffer zugegeben. Die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Hydrolyse des Substrats zum farbigen *p*-Nitrophenolat wurde über einen Zeitraum von 30 min mit Hilfe eines ELISA-Photometers bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  als  $\Delta A/\Delta t = \dot{A}$  aufgezeichnet. Die Reaktion fand bei einer Temperatur von 37 °C statt.

Die näherungsweise Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  erfolgte nach der bei Voss & Skerra (1997) beschriebenen Vorgehensweise durch nicht-lineare Regression anhand der gegen die Bindungsproteinkonzentration  $[B]_t$  der jeweiligen Verdünnungsstufe aufgetragenen Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderung ( $\dot{A}$  in  $10^{-3}/\text{min}$ ). Unter Annahme einer monovalenten Gleichgewichtsreaktion zwischen dem immobilisierten Zielprotein (Z) und dem zugegebenen Bindeprotein (B) ist die Dissoziationskonstante als  $K_D = [B] \times [Z] / [B \cdot Z]$  definiert, wobei  $[B]$  und  $[Z]$  die Konzentrationen der freien Proteine und  $[B \cdot Z]$  die Konzentration des Komplex im Gleichgewicht darstellen. Zieht man die bekannte Gesamtkonzentration des Bindeproteins  $[B]_t$  und des immobilisierten Zielproteins  $[Z]_t$  – welche sich aus  $[B]_t = [B] + [B \cdot Z]$  bzw.  $[Z]_t = [Z] + [B \cdot Z]$  ergeben – heran und nimmt man außerdem an, dass  $[B]_t \gg [B \cdot Z]$ , ergibt sich der Zusammenhang:

$$[B \cdot Z] = [Z]_t \times \frac{[B]_t}{K_D + [B]_t} \quad (5)$$

Da der Messwert  $\dot{A}$  direkt proportional zu  $[B \cdot Z]$  ist, lässt sich unter Berücksichtigung Hintergrund-Absorptionszunahme  $\dot{A}_{\min}$  folgende, von (5) abgeleitete Gleichung zur Anpassung an die Messkurve verwenden:

$$\dot{A} = \frac{(\dot{A}_{\max} - \dot{A}_{\min}) \times [B]_t}{K_D + [B]_t} + \dot{A}_{\min} \quad (6)$$

Hierbei bezeichnet  $\dot{A}_{\max}$  den asymptotisch angenäherten Maximalwert von  $\dot{A}$  und entspricht dabei in direkter Proportionalität  $[Z]_t$ . Die nicht-lineare Regression unter Anpassung der Parameter  $K_D$ ,  $\dot{A}_{\min}$  und  $\dot{A}_{\max}$  nach der Methode der kleinsten Quadrate wurde mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph durchgeführt.

### 2.6.2 Epitop-Kartierung mit dem SPOT-Verfahren

Mit Hilfe der SPOT-Methode (Frank, 2002) wurden drei Arrays von 14-mer-Peptiden erstellt, welche die Aminosäuresequenz der Hsp70.1-Substrat-Bindedomäne einschließlich des Interdomänenlinkers (AS 382-641) sukzessive (in dreifacher Ausführung) abbilden. Die in ihrer Sequenz jeweils um zwei Aminosäuren versetzten Peptide wurden mit einer Variante der Merrifield-Festphasensynthese in Form von „Spots“ direkt auf einer Amino-PEG<sub>500</sub>-derivatisierte Cellulosemembran synthetisiert (Beutling *et al.*, 2008). Als Grundbausteine werden hierbei Aminosäuren verwendet, deren reaktive Seitenketten während der gesamten Synthesephase mit Schutzgruppen blockiert bleiben. Die freie terminale Carboxylgruppe der in *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelösten Aminosäurebausteine wird *in-situ* durch Veresterung mit *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) unter Verwendung von *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Kondensationsmittel aktiviert. Der gebildete Aktivester reagiert mit den Aminogruppen der Trägermembran bzw. mit der freien N-terminalen Aminofunktion der wachsenden Peptidkette und führt zur Ausbildung einer neuen Peptidbindung. Um die Polymerisierung der Aminosäurebausteine durch Selbstverknüpfung zu verhindern, sind deren terminale Aminogruppen temporär durch die Fmoc-Schutzgruppe blockiert (Lumry & Biltonen, 1966). Diese erlaubt das Entschützen der verlängerten immobilisierten Peptidkette vor jedem Kopplungsschritt unter relativ milden Bedingungen mit 20 % (v/v) Piperidin in DMF. Die Seitenkettenschutzgruppen werden hiervon nicht beeinträchtigt. Die Peptidkette wächst im Laufe der Synthese – entgegengesetzt zur ribosomalen Biosynthese – vom C- zum N-Terminus. Nach jedem Kopplungsschritt werden verbliebene freie Aminogruppen mit 5 % (v/v) Essigsäureanhydrid in DMF acetyliert („Capping“). Hierbei entstehen vereinzelt kürzere Fragmente der gewünschten Peptidsequenz, die fortgesetzte Synthese von Sequenzen mit fehlenden Aminosäuren wird jedoch verhindert. Die Acetylierung wird nach dem letzten Kopplungszyklus auch mit der N-terminal entschützten Peptidkette durchgeführt. So wird vermieden, dass die Peptide, welche ja jeweils nur den Ausschnitt einer langen Polypeptidsequenz imitieren sollen, eine unnatürliche terminale Ladung aufweisen.

Die gesamte Synthese wurde mit Hilfe des MultiPep RS-Roboters nach den Anweisungen des Herstellers (Intavis) durchgeführt. Die Programmierung des Syntheseroboters sowie die Berechnung der Mengen benötigter Chemikalien erfolgten mit der MultiPep-Software. Zum Entschützen der Seitenketten wurde die nach dem Waschen mit Ethanol getrocknete Membran für 2 h mit 95 % (v/v) Trifluoressigsäure, 3 % (v/v) Triisopropylsilan, 2 % (v/v) H<sub>2</sub>O behandelt. Anschließend wurde die Membran zunächst mehrere Male mit Dichlormethan, dann mit Ethanol und letztendlich mit Wasser gespült. Nach dem Trocknen wurde die Membran so in drei Teile zerschnitten, dass auf jedem Teil die komplette Sequenz der Hsp70-Substrat-Bindedomäne und zusätzlich drei N- und C-terminal verkürzte Varianten der zur Generierung von cmHsp70.1 verwendeten Peptidsequenz vorlagen (Multhoff, 2007). Die Membranabschnitte wurden bei -20 °C gelagert.

Zum Nachweis der Bindung von Hsp70-Peptidsequenzen wurden die mit PBS/T<sub>0,1</sub> äquilibrierten SPOT-Membranen mit Lösungen des zu untersuchenden Proteins bei Raumtemperatur in PBS für eine festgelegte Dauer (Tabelle 2-7) unter Bewegung inkubiert. Anschließend wurde nicht-

gebundenes Protein durch 45-minütiges Waschen mit PBS/T<sub>0,1</sub> bei zweimaligem Pufferwechsel entfernt. Im Fall des Anticalins betrug die Waschdauer 4 h. Gebundener Antikörper/Fab-Fragment wurde mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Sekundärreagenzes durch chromogene Reaktion sichtbar gemacht und die erhaltenen Signale mit einem Scanner schließlich digitalisiert (Tabelle 2-7). Die Detektion gebundener fluoreszenzmarkierter Anticaline erfolgte direkt mithilfe des DIGE-Fluoreszenzscanners mit 480/30 nm-Anregungs- und 530/40 nm-Emissionsfiltern. Zur densitometrischen Auswertung der Farbtintensitäten der Peptidspots wurde die ImageJ-Software verwendet.

Zur Subtraktion von Hintergrund-Bindungssignalen, welche durch unspezifische Wechselwirkungen der Peptidsequenzen mit den verwendeten Sekundärreagenzien bzw. mit der Lipocalin-Gerüststruktur hervorgerufen wurden, wurde die Detektionsprozedur separat ohne den Inkubationsschritt mit dem Antikörper/Fab-Fragment bzw. mit fluoreszenzmarkiertem Lcn2 anstelle des Anticalins durchgeführt. Für die Wiederverwendung der Membranen wurde ein beschriebenes „Stripping“-Protokoll angewandt (Beutling *et al.*, 2008).

**Tabelle 2-7:** Bedingungen für den SPOT-Assay

Bindungsprotein	Sekundärreagenz	Detektion
Fab Hsp70ch/m- <i>Strep</i> II (500 nM, 1 h)	Strep-Tactin-HRP (1:10.000; 30 min)	Chromogene Reaktion mit TMB
mAk cmHsp70.1 (500 nM, 1 h)	Anti-Maus-Fab-HRP (1:10.000; 30 min)	Chromogene Reaktion mit TMB
Anticalin BBG10C/I-Fluorescein- maleimid (60 nM, 2 h)	–	Fluoreszenzdetektion

### 2.6.3 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die adhärennten Epithelzellen der Linien Caco-2 (Fogh *et al.*, 1977) und FaDu (Rangan, 1972) wurden in Zellkulturflaschen mit MEM-Medium (ergänzt mit 10 % v/v FCS und nicht-essentiellen Aminosäuren) bzw. DMEM-Medium (10 % v/v FCS) bis zu einer Konfluenz von ~80 % bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA (0,05 % bzw. 0,02 % w/v in Dulbecco's PBS, PAA) wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 300 g, RT), im Verhältnis 1:3 mit dem entsprechenden Medium verdünnt und anschließend auf Kammerobjektträgern ausgesät (500 µl/1,7 cm<sup>2</sup>-Kammer). Durch die mehrtägige Inkubation der Objektträger (s. o.), ggf. mit Medienerneuerung, wurde ein adhärenntes Wachstum der Zellen auf der Glasoberfläche mit einer Konfluenz von 80-95 % erreicht.

Nach dem Waschen wurden die Caco-2-Zellen mit einer 1 µM Lösung des Fluoresceinmarkierten Fab-Fragments für 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS<sub>M</sub>/FCS (Dulbecco's PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, PAA; 10 % v/v FCS) erfolgten weitere zwei Waschschrte mit PBS<sub>M</sub>, bevor die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd in PBS<sub>M</sub> fixiert wurden. Die Reaktion wurde nach 10 min bei Raumtemperatur durch Waschen mit 100 mM Glycin/NaOH in

PBS<sub>M</sub> gestoppt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Zellen nach einem weiteren Waschschrift mit 1 µg/ml DAPI in PBS<sub>M</sub> gefärbt.

Die gewaschenen FaDu-Zellen wurden für 1 h mit einer 1 µM Anticalinlösung – entweder allein oder, als Kompetitionskontrolle, zusammen mit 10 µM SBD<sub>Hsp70</sub> – inkubiert. Nach mehreren Waschschriften folgte die Inkubation mit StrepMAB-Immo (50 µg/ml; 20 min) sowie anschließend Anti-Maus-IgG-AlexaFluor 488-Konjugat (16 µg/ml, 20 min). Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Die zum Waschen der Zellen verwendeten Puffer – wenn nicht anders angegeben PBS<sub>M</sub>/FCS – wurden ebenfalls eiskühlt eingesetzt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde für 10 min bei -20 °C mit einer permeabilisierenden DAPI-Lösung (1 µg/ml) in Aceton/Ethanol (1:1) inkubiert. Die Färbelösung wurde daraufhin durch PBS<sub>M</sub> ersetzt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden unter Verwendung eines 365/12 nm- (DAPI) und eines 470/70 nm-Bandpassfilters (Fluorescein) gemacht.

#### 2.6.4 Durchfluss-Cytofluorimetrie von Zelllinien

Zellen der FaDu- und der Caco-2-Linie wurden über mehrere Passagen in 75 mm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit DMEM-Medium (10 % v/v FCS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem Waschen der adhärennten Zellen mit PBS<sub>o</sub> (Dulbeccos's PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>, PAA) wurden die Zellen durch 10 min Inkubation in PBS<sub>o</sub> mit 0,46 mM Na<sub>2</sub>EDTA (FaDu-Zellen) bzw. Accutase-Lösung (in Dulbecco's PBS mit 0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA; Sigma-Aldrich) abgelöst und mit PBS<sub>o</sub>/FCS (PBS<sub>o</sub> mit 10 % v/v FCS) gewaschen (Zentrifugation 5 min, 300 g, 4 °C). Etwa 1×10<sup>5</sup> Zellen wurden in einem Volumen von 500 µl PBS<sub>o</sub>/FCS mit verschiedenen Konzentrationen eines zu analysierenden Anticalins oder Fluorescein-markierten Fab-Fragments für die Dauer von 1 h bei 4 °C inkubiert. In Kontrollansätzen wurde die spezifische Bindung des Anticalins an das Antigen durch den Zusatz von 10 µM SBD<sub>Hsp70</sub> kompetiert. Zum Nachweis der Anticaline wurden zwei weitere Inkubationsschritte mit 50 µg/ml StrepMAB-Immo und 16 µg/ml Anti-Maus IgG-Fluorescein-Konjugat für jeweils 30 min durchgeführt. Als Puffer für die Antikörperlösungen und die jeweiligen Waschschriften wurde eiskaltes PBS<sub>o</sub>/FCS verwendet. Letztendlich wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen, und direkt vor der Messung wurden der Suspension 5 µl einer Propidiumiodid (PI)-Stammlösung (0,1 mg/ml in PBS) zugesetzt. Die Zellen wurden daraufhin am FACSaria II-Zellsortiersystem analysiert.

Die Fluoreszenzanregung fand bei 488 nm statt; für die Detektion der Fluorescein- und PI-Signale wurden 530/30 nm- und 695/40-Bandpass-Filter verwendet. Für die Auswertung wurden lediglich PI-negative lebende Zellen berücksichtigt. Zur Ermittlung einer apparenten Dissoziationskonstante wurde die Fluoreszenzmessung mit einer Konzentrationsreihe des Bindeproteins durchgeführt, und das arithmetische Mittel der Fluoreszenzintensitäten gemessenen aller gemessenen Zellen gegen die entsprechende Bindeproteinkonzentration graphisch aufgetragen. Die Anpassung der Punkte an ein 1:1-Bindungsmodell zur Ableitung der K<sub>D</sub> wurde dabei analog zu Abschnitt 2.6.1 durchgeführt.

### 2.6.5 Zytotoxizitätstest

Versionen des Anticalins BBG10I-1 und des Lipocalins-2, welche über eine C-terminale Sortase-A-Erkennungssequenz und einen His<sub>6</sub>-tag verfügen (kloniert auf den Plasmiden pNGAL98-BBG10ISR-LPETGA-His<sub>6</sub> und pNGAL98-Lcn2-LPETGA-His<sub>6</sub>), wurden in einem beschriebenen Verfahren (Kornberger & Skerra, 2014) unter Katalyse mit Sortase-A mit dem rekombinanten Toxin Gelonin (rGel) gekoppelt und mittels SAC und SEC gereinigt.

Zur Ermittlung der zytotoxischen Aktivität der Toxin-Konjugate wurde der kolorimetrische WST-1-Vitalitätstest nach den Anweisungen des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Hierzu wurde eine sterile Mikrotiterplatte (Techno Plastic Products) mit 5000 Zellen der FaDu-Zelllinie pro Vertiefung in DME-Medium mit 10 % FCS inokuliert und für 3 h bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert, bevor die Toxin-Konjugate bzw. unkonjugiertes Anticalin in Verdünnungsreihen mit dem gleichen Medium zugesetzt wurden. Das Volumen in jeder Vertiefung betrug hierauf 100 µL. Nach einer Fortsetzung der Inkubation für 72 h wurde in jede Vertiefung 10 µL des wasserlöslichen Tetrazolium-Reagenz WST-1 zugegeben. Die kinetische Erfassung der Absorptionsänderung bei 450 nm wurde im SpectraMax 250-ELISA-Photometer durchgeführt. Die Daten dieser hauptsächlich von Dr. P. Kornberger (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) durchgeführten Experimente wurden, wie zuvor publiziert (Kornberger & Skerra, 2014), mithilfe der Kaleidagraph-Software an ein Dosis-Wirkungs-Modell angepasst, um die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) für das Protein-Toxin-Konjugat ermitteln zu können.

## 2.7 Biophysikalische Methoden

### 2.7.1 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD)

Addiert man die separierten links- bzw. rechts zirkular polarisierten Komponenten eines linear polarisierten Lichtstrahls nach dem Austritt aus einem absorbierenden, optisch aktiven Medium, zeichnet die Kontur des elektrischen Feldvektors anstelle einer Geraden eine Ellipse (elliptische Polarisation). Diese aus der unterschiedlich starken Abschwächung der beiden zirkular polarisierten Lichtkomponenten resultierende spezifische Eigenschaft eines optisch aktiven Chromophors bezeichnet man als Circular dichroismus. Bei Proteinen ist dieses Phänomen charakteristisch für die im Fern-UV-Bereich absorbierenden Peptidbindungen (180-270 nm) und die im Nah-UV-Bereich absorbierenden aromatischen Aminosäureseitenketten (250-350 nm). Die bei der Denaturierung von Proteinen hervorgerufenen Änderungen der Elliptizität  $\Theta$  bei diesen Wellenlängen können mit der Änderung der Proteinkonformation und der Umgebung aromatischer Reste in Einklang gebracht werden.

Zur Bestimmung der Faltungstabilität selektierter Anticaline wurde die Temperatur der Proteinprobe in der CD-Küvette kontinuierlich von 20 °C auf 80 °C erhöht (0,1 °C/min) und dabei in 0,1 °C-Schritten das CD-Signal bei 212 nm (Bandbreite 1 nm, Pfadlänge 0,2 mm,



Response 4 s) gemessen. Bei dieser Wellenlänge wurde zuvor in Differenzspektren von nativen (20 °C) und denaturierten (95 °C) Anticalinen die stärkste Elliptizitätsänderung festgestellt. Die Proteinproben lagen in 50 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM KP<sub>i</sub> pH 7,5 vor. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Faltungsübergänge wurden unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung (Lumry & Biltonen, 1966) mit folgender Gleichung angepasst (Schlehuber & Skerra, 2002):

$$y = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \times e^{\left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}}{1 + e^{\left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}}$$

Die abhängige Variable  $y$  bezeichnet hierbei die gemessene Elliptizität bei der Temperatur  $T$  (in K);  $T_m$  die Schmelztemperatur am Wendepunkt der Übergangskurve (50 % Protein entfaltet);  $R$  die allgemeine Gaskonstante sowie  $\Delta H_m$  die Enthalpie der Entfaltung bei  $T_m$  (in J mol<sup>-1</sup>). Die Geradenterme  $m_N T + b_N$  und  $m_U T + b_U$  drücken die linearen prä- und posttransitionellen Steigungen aus.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Faltungsübergänge verschiedener Proteine wurden der Anteil ungefalteten Proteins (definiert als  $f(u) = \frac{[U]}{[U] + [N]}$  mit den Gleichgewichtskonzentrationen von ungefaltetem Protein  $[U]$  bzw. nativem Protein  $[N]$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur mit Hilfe der aus Gleichung (7) ermittelten Parameter nach Gleichung (8) normiert graphisch dargestellt werden.

$$f(u) = \frac{e^{\left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}}{1 + e^{\left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right)\right]}} \quad (8)$$

### 2.7.2 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Zur Echtzeit-Bindungsanalyse zwischen Anticalinen oder Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten und ihren Liganden wurde ein Bindungspartner kovalent auf einer Carboxymethyl-dextran-derivatisierten Goldoberfläche immobilisiert und der andere Bindungspartner (Analyt) in einem Flüssigkeitsstrom über diese Oberfläche geleitet. Die lokale Veränderung des Brechungsindex an der Grenzschicht zwischen flüssigem Probenmedium und Metallschicht infolge der Konzentrationserhöhung bei Bindung des Analyten wurde durch die Änderung des sogenannten Resonanzwinkels verfolgt, bei welchem die Lichtintensität von an der Grenzschicht totalreflektiertem Licht aufgrund der resonanten Anregung von Oberflächenplasmonen ein Minimum zeigt.

Die Immobilisierung des stationären Proteins auf einem Flusskanal des Sensorchips CMD200m erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Xantec) mit Amin-Kopplungschemie durch vorangehende Aktivierung der carboxylierten Dextranketten auf der Goldoberfläche des Chips mit einer frisch angesetzten Lösung aus 25 mM NHS und 50 mM EDC (beides von GE Healthcare) im Biacore X- oder im Biacore 1000-System. Durch Injektion des zu immobilisierenden Proteins (~100 nM in 10 mM Natriumacetat pH 5,5) wurden Resonanzveränderungen von 2100-2500 RU für rekombinantes Hsp70.1 bzw. 1000 RU für das Anticalin

BBG10C/I erreicht. Hierbei entspricht 1 RU (*Response Unit*) einer Änderung des Resonanzwinkels um 1/3000 eines Winkelgrades, was wiederum einer immobilisierten Masse von 1 pg/mm<sup>2</sup> entspricht (Khanna, 2011). Zur kovalenten Absättigung verbliebener NHS-Funktionen wurde für 15 min mit 1 M Ethanolamin gespült. Zur Erzeugung eines Referenzkanals wurde ein zweiter Flusskanal ebenfalls aktiviert und ohne Kopplung eines Proteins mit Ethanolamin derivatisiert. Dies ermöglicht die Korrektur des Messsignals durch Subtraktion unspezifischer Wechselwirkungen des Analyten mit der Chip-Matrix.

Die Bindungsanalyse des Antikörpers cmHsp70.1 und des Fab-Fragments  $\alpha$ Hsp70ch/m wurde in PBS/T<sub>0,005</sub>-Puffer, die der Anticaline in HBS/T mit 10  $\mu$ M ADP, bei einer Flussrate von 25  $\mu$ l/min und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Nach der Injektion von 60  $\mu$ l bis 120  $\mu$ l des im identischen Puffer vorliegenden Analyten in die in Reihe geschalteten Kanäle wurde die Dissoziation des entstandenen Komplexes über einen Zeitraum von bis zu 4000 s aufgezeichnet.

Erreichte das Messsignal bis dahin nicht die Basislinie, wurde der Flusskanal durch Injektion von 5  $\mu$ l 0,5 M NaCl, 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2 für die nächste Bindungsanalyse regeneriert. Die Messsignale wurden nach Subtraktion des Referenzsignals zusätzlich gegen eine aus Puffermessungen gemittelte Basislinie korrigiert (Myszka, 1999) und zur Ermittlung der kinetischen Bindungsparameter gemäß dem Langmuir-Bindungsmodell für 1:1-Stöchiometrie mit Hilfe der BIAevaluation Software ausgewertet (Karlsson *et al.*, 1991).

### 2.7.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Aminosäuresequenzanalyse des Antikörpers cmHsp70.1 wurde freundlicherweise von Dr. H. Hahne und Prof. Dr. B. Küster am Lehrstuhl für Bioanalytik der TU München durchgeführt. Hierbei wurde der Antikörper mit 10 mM Dithiothreitol reduziert und mit 55 mM Iodacetamid alkyliert. Schwere und leichte Kette wurden mittels SDS-PAGE isoliert und einem tryptischen Verdau im Gel (Shevchenko *et al.*, 1996) oder über Nacht in Lösung (25 mM Triethylammonium-Bicarbonat; 0,01 % w/v SDS; 5 % v/v Acetonitril) bei 37 °C und einem Antikörper:Enzym-Verhältnis 1:20 unterzogen. Nach dem Entsalzen der Proben unter Verwendung von C18-ZipTips (nach Angaben des Herstellers Millipore), wurde 1 pmol des verdauten Proteins für die LC-MS/MS-Analyse eingesetzt. Dem LTQ Orbitrap Massenspektrometer war in dieser Anordnung eine Nano-HPLC-Anlage (nanoLC Ultra) mit Umkehrphasensäule (Reprosil) vorgeschaltet. Die Fragmentierung der eluierenden Peptide für die *De-novo*-Sequenzierung erfolgte durch kollisionsinduzierten Zerfall (CID). Die Peptidmassen wurden mit Hilfe der Mascot Distiller-Software gegen die NCBI-nr-Datenbank abgeglichen. Die Auswertung der CID-Spektren wurde mit der PEAKS online 2.0-Software durchgeführt.

Für die exakte Bestimmung der Masse von Anticalinen wurde jeweils eine 100  $\mu$ l-Probe (Proteinkonzentration 10  $\mu$ M) durch gründliches Dialysieren gegen 10 mM Ammoniumacetat umgepuffert und anschließend mit Acetonitril (LiCrosolv Hypergrade, Merckmillipore; Verhältnis 1:1) und Ameisensäure (für LC-MS, Fluka; Verhältnis 1:50) versetzt. Die Messung wurde mit freundlicher Unterstützung von A. Reichert (Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU

München) am maXis micrOTOF ESI-Massenspektrometer durchgeführt. Zur Dekonvolvierung der erhaltenen m/z-Histogramme wurde die Software Compass 1.3 verwendet.

## 2.8 Tierexperimentelle Methoden

### 2.8.1 Tumor-Xenotransplantation

Athymische weibliche CD1-Nacktmäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden subkutan  $5 \times 10^6$  Zellen der humanen FaDu-Krebszelllinie in 100  $\mu$ l DMEM-Medium in die linke Schulter injiziert. Nach vier Wochen hatten die Tumoren typischerweise ein Volumen von 300-500 mm<sup>3</sup> erreicht. Die Tierexperimente waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Antragsnummer 55.2-1-54-2532-46-12) und wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Klinikums rechts der Isar mit der freundlichen Unterstützung von Claudia T. Mendler (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) durchgeführt.

### 2.8.2 Positronenemissions-Tomographie (PET) und Computer-Tomographie (CT)

Den tumortragenden Mäusen (insgesamt vier Individuen) wurde eine Dosis von 2,0 – 4,8 MBq des mit [<sup>89</sup>Zr-Bz-Dfo] konjugierten Anticalins BBG10C/I-PAS200 bzw. des analog konjugierten Kontrollproteins Lcn2-PAS200 in die Schwanzvene injiziert. 24 h nach der Injektion wurden von der mit Isofluran narkotisierten Maus statische PET-Bilder (60 min) mit einem PET-CT-Kleintierscanner (Inveon) aufgenommen. Von beiden mit dem Anticalin behandelten Tieren wurden zusätzlich PET/CT-Aufnahmen 6 h und 72 h nach der Injektion erstellt. Keines der Versuchstiere zeigte im beobachteten Zeitraum (bis 72 h) merkliche gesundheitliche Beeinträchtigungen durch die Behandlung. Die mit 3D-OSEM rekonstruierten<sup>2</sup> Bilder wurden mit Hilfe der Inveon Research Workplace-Software analysiert und als *Maximum Intensity Projection* (MIP) dargestellt, wobei die Skalierung (bezogen auf % injizierte Dosis/ml) für die mit Anticalin bzw. Kontrollprotein behandelten Mäuse identisch gewählt wurde. Zur Quantifizierung der Aktivität in einzelnen Organen wurden sphäroide Bereiche um die in der 3D-Darstellung abgrenzbaren Organe selektiert (*Region of Interest*, ROI). Zur Verminderung des Einflusses der nicht absolut exakten Übereinstimmung des Sphäroids mit den Organabmessungen wurden von jeder ROI nur die Teile in die Berechnung einbezogen, welche mindestens 50 % der maximal in der ROI gemessenen Strahlungsintensität aufwiesen.

### 2.8.3 Szintillationsradiometrische Biodistributionsuntersuchung

Den xenotransplantierten Mäuse (n = 4) wurden intravenös 16 – 25 MBq der PASylierten oder nicht-PASylierten Version des mit [<sup>177</sup>Lu-Bz-DTPA] konjugierten Anticalins BBG10C/I bzw. des Lcn2-Kontrollproteins in die Schwanzvene injiziert. Nach 24 h wurden die Tiere in einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre eingeschläfert. Blut und Organe wurden nach der Entnahme gewogen und mit einem  $\gamma$ -Szintillationszähler analysiert ( $\gamma$ -Counter 1480 Wallac Wizard). Zur Berechnung der injizierten Aktivität wurden die Spritzen vor und nach der Injektion mit einem CRC-15R-

---

<sup>2</sup> 3D-OSEM: *Three-Dimensional Ordered-Subsets Expectation Maximum*-Algorithmus

Dosiskalibrator (Capintec) analysiert. Bei der Berechnung der je Maus injizierten Dosis wurde außerdem die im Schwanz verbliebene Aktivität berücksichtigt und abgezogen. Zur radionuklidspezifischen Kalibrierung des  $\gamma$ -Counters wurde eine der Größenordnung nach vergleichbare Aktivität in 100 ml Wasser injiziert und hiervon fünfmal 1 ml (1 %) entnommen und direkt vor der Analyse der Organe gemessen.

#### **2.8.4 Autoradiographie von Tumor-Dünnschnitten**

Die mit den [ $^{89}\text{Zr}$ -Bz-Dfo]-Konjugaten behandelten Mäuse wurden nach Abschluss der PET-Experimente (72 h nach Injektion) eingeschläfert. Hierauf wurden direkt im Anschluss die Tumoren entnommen und auf Trockeneis tiefgefroren. Nach Einbettung der Tumoren in *Tissue Tek*-Medium wurden mit dem Kryostat-Mikrotom HM500 10  $\mu\text{m}$ -Schnitte vom mittleren Teil des gefrorenen Tumors genommen und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger transferiert. Für eine Dauer von 24 h wurde eine Bildplatte (*General Purpose Screen*) mit den Objektträgern inkubiert, mit dem Bildplattenscanner CR 35 BIO ausgelesen und mit Hilfe der AIDA-Image Analyzer-Software ausgewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung eines Fab-Fragments gegen Hsp70 in *E. coli* und dessen funktionelle Analyse

Zur Herstellung eines rekombinanten Fab-Fragments des Hsp70-spezifischen murinen Antikörpers cmHsp70.1 (Multhoff, 2007) wurde eine bereits etablierte Methode angewandt, welche die Produktion funktioneller Immunglobuline in *E. coli* gestattet (Plückthun & Skerra, 1989). Hierbei werden die beiden Ketten des Fab-Fragments durch Sekretion in das oxidierende Milieu des bakteriellen Periplasmas geschleust, was die Isolierung aktiver, nativ gefalteter Antikörperfragmente mit korrekt ausgebildeten intra- sowie interchenaren Disulfidbrücken ermöglicht. Die Verfügbarkeit generalisierter Expressionsvektoren wie dem beschriebenen Plasmid pASK84 (Skerra, 1994a) und dessen Derivaten vereinfacht die standardisierte Klonierung und Expression von Fab-Fragmenten in *E. coli*. Die Fusion mit Affinitätsanhängseln (*Tag*) erlaubt darüber hinaus die Anwendung effizienter Einstufen-Reinigungsverfahren wie IMAC oder SAC (Skerra, 1994b).

#### 3.1.1 Subklonierung der V-Regionen eines Hsp70-spezifischen Antikörpers und Versuche zur Produktion des entsprechenden Fab-Fragments in *E. coli*

Die kodierenden Sequenzen der variablen Domänen des Hsp70.1-spezifischen murinen monoklonalen Antikörpers (mAk) cmHsp70.1 (Multhoff, 2007) lagen bereits kloniert auf einem scFv-Expressionsvektor (pAB1-Tumex) vor und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. R. Kontermann (Universität Stuttgart) im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. G. Multhoff bereitgestellt (Abbildung 3.1). Für die Herstellung entsprechender Antikörperfragmente im Fab-Format war es demnach lediglich notwendig, die kodierenden V-Regionen eines in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Fab-Expressionsvektors gegen die von pAB1-Tumex kodierten Sequenzen auszutauschen.

Mit Hinblick auf eine möglichst geringe Immunogenität des rekombinanten Fab-Fragments wurde die Herstellung chimärer Fab-Fragmente geplant. Zu diesem Zweck wurde das Vektorrückgrat eines Derivats von pASK88 (Schiweck & Skerra, 1995) verwendet, welches für ein Fab-Fragment mit konstanten IgG<sub>1</sub>-Domänen (C<sub>H1</sub> und C<sub>κ</sub>) humanen Ursprungs kodiert. Die variable Region der schweren Kette (V<sub>H</sub>) wurde hierbei von einer *Pst*I- und einer *Eco*91I-Restriktionsschnittstelle flankiert, welche mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pAB1-Tumex kompatibel waren. Um die V<sub>H</sub>-Region von pASK88-hu4D5 gegen die cmHsp70.1-V<sub>H</sub>-Sequenz von pAB1-Tumex zu ersetzen, wurden beide Plasmide mit *Pst*I und *Eco*91I verdaut, Vektorrückgrat und V<sub>H</sub>-Insert isoliert und miteinander ligiert. Bedingt durch die Lage der Restriktionsschnittstellen waren hierbei die äußersten drei Aminosäuren an sowohl N- als auch C-Terminus der V<sub>H</sub>-Domäne vom Vektorrückgrat determiniert. Im vorliegenden Fall kam es hierbei allerdings nicht zu Veränderungen in der auf pAB1-Tumex kodierten Aminosäuresequenz.

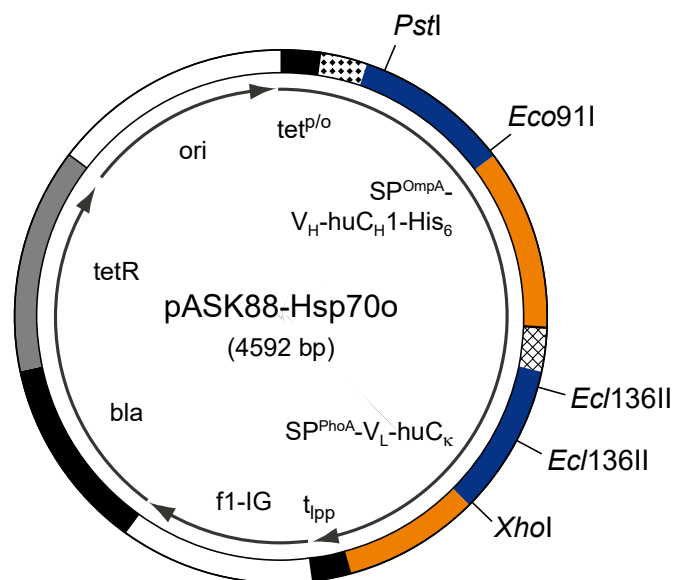
```

PstI
1  GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCCTGGTGGCACCCTCACAGAGCCCTGCTCCATGCACATGCACCTGTCTGGTTCATGTCCAGAAAATAGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCT 120
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCCACTTCGACGTCCTAGTCTGAGCCGACCGTGGAGTCTCGACAGAAAGTACGTACGACAGAGACCAAGAGTAACAGGTCTTTATCACATGTGACCCCAAGCGGTCCGGA
GluValLysLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValAlaProSerGlnSerLeuSerPheThrCysThrValSerGlyPheSerLeuSerArgAsnSerValHisTrpValArgGlnPro
+1 VH
121 CCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGTGGTGAAGCACAGACTATAATTCAGCTCTCAATCCAGACTGAACATCAGCAAGGACAGCTCCAAGAGCCAGGTTTTCCTA 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTTTCCAGACCTCACCGACCTTACTATACCCACCCTTCCGTCTGATATAAGTCGAGAGTTAGTGTGACITGTAGTCTGCTGAGGTTCTCGGTCCAAAAGGAT
ProGlyLysGlyLeuGlnTrpLeuGlyMetIleTrpGlyGlySerThrAspTyrAsnSerAlaLeuLysSerArgLeuAsnIleSerLysAspSerSerLysSerGlnValPheLeu
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Eco91I
241 AAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACCCCGCATGTACTTCTGTGCCAGAAAATGGGGGTTACGACGCTTTTCATTTACTGGGCCCAAGGACCACCGTCACTCGAGTGGTGGAGGC 360
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTACTGTGCAGACGTTGACTACTGTGGCGGTACATGAAGACACGGCTTTACCCCAATCCTGCAGAACTAATGACCCCGTCCCTGGTGCAGAGTGCACACCTCCG
LysMetAsnSerLeuGlnThrAspAspThrAlaMetTyrPheCysAlaArgAsnGlyGlyTyrAspValPheHisTyrTrpGlyGlnGlyThrValThrValSerSerGlyGlyGly
+1 VH
Primer LF2_for CTCACCTCAGGAATCTGCACTCA
361 GGTTCAGGGGAGGTGGCTTGGGGTGGAGGGAGGGTGCACAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACCTCACACATCACCTGGTGAACAAGTCACACTCACTCACTTGTCCG 480
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCAAATCCGCTCCACCGAGACCGCCACCTCCCTCAGTCCGACAACTAGCTAGCTGTAGCTGAGTGGTGTAGTGGACCACTTTGTCAAGTGTAGTGAACAACGCG
GlySerGlyGlyGlySerGlyGlyGlySerGlyGlyAlaGlnAlaValThrGlnGluSerAlaLeuThrThrSerProGlyGluThrValThrLeuThrCysArg
+1 VL
481 TCAAGTACTGGGGTGTACAACTAGTAACTATGCCAACTGGTCCCAAGAAAACCAACATCATTTATTCACCTGGTCTAATAGTGGTACCAACAACCGAGTCCAGGTTCTCTGCCAGA 600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGTTCATGACCCCGACAAATGTTGATCATGATACGGTTGACCCAGGTTCTTTTGGTCTAGTAAATAAGTACCAGATTATCCACCATGGTGTGGCTCGAGGTCACAAAGGACGGTCT
SerSerThrGlyAlaValThrThrSerAsnTyrAlaAsnTrpValGlnGluLysProAspHisLeuPheThrGlyLeuIleGlyThrGlyAlaProGlyValProAlaArg
501 TTCTCAGGTCCTCGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGCAATATATTTCTGTGCTATGGTACAGCAACCAATTTGGTTCGGTGGAGGA 720
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGATCCGAGGGACTAACCTCTGTTCCGACGGGAGTGGTAGTGTCCCGGTGCTGACTCCTACTCCGTTATATAAGACACAGAGATACCAATGCTGGTAAACCAAGCCACCTCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
PheSerGlySerLeuIleGlyAspLysAlaAlaLeuThrIleThrGlyAlaGlnThrGluAspGluAlaIleTyrPheCysAlaLeuTrpTyrSerAsnHisLeuValPheGlyGlyGly
Primer LF2_rev_XhoI CAAGCCACCTCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
721 ACCAAACTGACTGTCCTAGGC 741
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGTTTGACTGACAGGATCCG
|||||
TGGTTTGAGCTCCAGGAT
ThrLvsLeuThrValLeuGlv

```

**Abbildung 3.1:** Auf pAB1 kodierte Sequenz eines scFv-Fragments mit den variablen Regionen des anti-Hsp70-Antikörpers cmHsp70.1. Die Suklonierung der V<sub>H</sub>-Region (Translation blau) auf dem Fab-Expressionsvektor pASK88 wurde durch die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Pst*I und *Eco*91I ermöglicht. Für die Klonierung der V<sub>L</sub>-Region (Translation grün) wurde eine PCR mit den Primern LF2\_for und LF2\_rev\_XhoI durchgeführt. Das PCR-Produkt ist am 5'-Ende der kodierenden Sequenz kompatibel zur *Ecl*136II-Restriktionsschnittstelle (*Blunt End*) von pASK88 und erhält am 3'-Ende eine mit pASK88 kompatible *Xho*I-Schnittstelle

Die variable Region der leichten Kette ( $V_L$ ) von cmHsp70.1 wurde auf pAB1-Tumex nicht von kompatiblen Restriktionsschnittstellen flankiert; daher war zur Klonierung ein zusätzlicher PCR-Schritt notwendig, dessen Produkt durch Verwendung entsprechender Primer (Abbildung 3.1) am 5'-Ende der kodierenden Sequenz kompatibel mit der *Ecl136II*-Schnittstelle (*Blunt End*) von pASK88-hu4D5 war. In der Nähe des 3'-Endes wurde dabei außerdem eine mit pASK88 kompatible *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Nach Verdau des Vektors pASK88-hu4D5/ $V_{HcmHsp70.1}$  mit *Ecl136II* und *XhoI* wurde das isolierte Vektorrückgrat mit dem *XhoI*-verdauten und 5'-phosphorylierten PCR-Produkt für die  $V_L$ -Domäne ligiert, wodurch das Plasmid pASK88-Hsp70o erhalten wurde (Abbildung 3.2). Aufgrund der Veränderung der DNA-Sequenz in Folge der Einführung der Restriktionsschnittstellen und der Klonierungsstrategie mit dem Vektor pASK88 unterschied sich die von pASK88-Hsp70o kodierte  $V_L$ -Sequenz an einigen Stellen von der auf pAB1-Tumex: die Sequenz des N-Terminus der  $V_L$ -Domäne wurde zu „DIEL“ anstelle von „QAVV“ abgeändert, die Sequenz ihres C-Terminus „TVLG“ wurde durch „EIKR“ ersetzt.



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung des Vektors pASK88-Hsp70o. Flankiert vom Tetracyclin-Promotor/Operator ( $tet^{P/o}$ ) und dem Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{ipp}$ ) kodiert das Plasmid für das chimäre Hsp70o-Fab-Fragment, bestehend aus den Variablen Domänen  $V_L$  und  $V_H$  des murinen Antikörpers cmHsp70.1 und den menschlichen konstanten Domänen  $C_\kappa$  sowie  $C_{H1\gamma1}$ , die C-terminal mit einem Hexahistidin-tag ( $His_6$ ) versehen ist. Des Weiteren kodieren die offenen Leserahmen von Fd-Fragment und leichter Kette für die N-terminalen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* ( $SP^{OmpA}$ ) bzw. der Alkalischen Phosphatase ( $SP^{PhoA}$ ). Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *PstI*, *Eco91I*, *Ecl136II* und *XhoI* wurden zur Klonierung der V-Gene benutzt. Die Definitionen weiterer Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 1.3.

Bei der Sec-abhängigen Sekretion werden im Periplasma die bakteriellen Signalsequenzen proteolytisch prozessiert. Die Faltung zum nativen Fab-Fragment schließt die Knüpfung der intrachenenaren Disulfidbrücken sowie die Ausbildung der finalen Quartärstruktur unter Knüpfung

der interchenaren Disulfidbrücken ein. Mit dem Periplasma-Aufschluss durch milden osmotischen Schock und anschließender Abtrennung der Sphäroplasten und nicht-löslichen Proteinaggregate durch Zentrifugation ist bereits eine erste Anreicherung des Zielproteins verbunden, da das Periplasma nur einen kleineren Teil des zellulären Proteinspektrums enthält (Plückthun & Skerra, 1989). Die Fusion des Fd-Fragments mit einem His<sub>6</sub>-tag erlaubt zudem die Isolierung von nahezu reinem Fab-Fragment durch Metallchelate-Affinitätschromatographie (Skerra, 1994a).

Bei Versuchen, das Fab-Fragment in mit pASK88-Hsp70o-transformierten *E. coli* JM83-Zellen im Schüttelkolben zu produzieren, konnte weder im löslichen Periplasmaextrakt noch in den IMAC-Eluatfraktionen rekombinantes Protein im Coomassie-gefärbten SDS-Elektrophoresegelel nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Da Fehler in den uns zur Verfügung gestellten Gensequenzen – hervorgerufen durch zufällige Mutationen bei der reversen Transkription oder irrtümliche Amplifizierung eines Pseudogens aus der ursprünglichen Hybridom-Zelllinie – als Ursache für das Scheitern der bakteriellen Produktion nicht ausgeschlossen werden konnte, war eine Verifizierung der Antikörper-Sequenzen notwendig.

### **3.1.2 *De novo*-Sequenzierung der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-kodierenden Bereiche des cmHsp70.1-Transkripts**

Zur Verifizierung der zur Verfügung gestellten V-Gensequenzen wurden zuerst Teile der Aminosäuresequenz des in Hybridomzellkultur produzierten Vollängen-Antikörpers cmHsp70.1 ermittelt. Hierfür wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: zum einen wurden die Aminotermini von leichter und schwerer Kette des Hybridom-Proteins mittels Edman-Abbau sequenziert, zum anderen wurden Trypsinverdau-Fragmente der Ketten mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) sequenziert.

Die Edman-Sequenzierung konnte bei sowohl der leichten, als auch bei der schweren Kette erst nach Behandlung mit *Pfu*-Pyroglutamat-Amino-peptidase (PGAP) erfolgreich durchgeführt werden, woraus sich schließen lässt, dass beide Ketten N-terminal durch Pyroglutamylreste (Glp) blockiert waren. Dabei handelt es sich um eine bei IgG-Molekülen sehr verbreitete Modifikation, welche durch die spontane oder enzymatisch katalysierte Zyklisierung von N-terminalem Glutamin (sehr selten auch von Glutaminsäure) hervorgerufen wird (Liu *et al.*, 2008). Hieraus lässt sich schließen, dass es sich bei den ursprünglich translatierten N-terminalen Aminosäuren beider Ketten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Glutamin handelte. Nach der enzymatischen Entfernung von Glp konnte die verbleibende N-terminale Sequenz bis zu einer Länge von 12 Aminosäuren bei der leichten und 10 Aminosäuren bei der schweren Kette bestimmt werden (Abbildung 3.3). Diese zeigten interessanterweise einige Abweichungen zu den zuvor klonierten Sequenzen.

Zusammen mit den Sequenzinformationen aus der MS/MS-Sequenzierung war es möglich, auf die IMGT-Subgruppe der codierenden V-Gene des Antikörpers cmHsp70.1 zu schließen und



diese als funktionelle Gene der Subgruppen IGHV2 (schwere Kette) und IGLV1 (leichte Kette vom  $\lambda$ -Typ) zu identifizieren (Lefranc *et al.*, 2009).

Anhand eines Alignments aller mittels WU-Blast<sup>3</sup> identifizierten V-Gensequenzen der IMGT/LIGM-Datenbank (Giudicelli *et al.*, 2006), welche für die durch Edman-Abbau ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenzen kodieren, wurden die Oligodesoxynukleotide VH1\_for und V $\lambda$ \_for im Einklang mit den Konsensus-Sequenzen entworfen. Zusammen mit den Gegenprimern RMG und C $\lambda$ 1\_mu\_rev, welche komplementär zu Sequenzen in den konstanten Regionen C<sub>H1 $\gamma$ 1</sub> und C $\lambda$  sind, war es möglich, mittels PCR die V-Regionen direkt aus einer cDNA-Präparation des mAk cmHsp70.1 erneut zu amplifizieren. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden jeweils unter Benutzung der *Sma*I-Schnittstelle auf dem Vektor pGEM-3zf(+) kloniert und mithilfe der Primer M13(-21) und M13RP1 anschließend sequenziert (Anhang: Abbildung 10.1 und 9.2).

#### Leichte Kette:

```

      1          11          20          27abc 30          40          50
cDNA_cmHSP70.1 : QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN
pASK88-Hsp70ch/m : QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN
pASK88-Hsp70o   : DIELTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN

      60          70          80          90          100          106a
cDNA_cmHSP70.1 : RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG
pASK88-Hsp70ch/m : RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLTVLG
pASK88-Hsp70o   : RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHLVFGGGTKLEIKR

```

#### Schwere Kette:

```

      1          10          20          30          40          50
cDNA_cmHSP70.1 : QVQLKESGPGLVAPSQSLSTFTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGGGSTD
pASK88-Hsp70ch/m : QVQLKESGPGLVAPSQSLSTFTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGGGSTD
pASK88-Hsp70o   : EVKLQESGPGLVAPSQSLSTFTCTVSGFSLSRNSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGGGSTD

      60          70          82abc          90          100a          110
cDNA_cmHSP70.1 : YNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDDETAMYFCARNGGYDVPHYWGQGLTVTVS
pASK88-Hsp70ch/m : YNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDDETAMYFCARNGGYDVPHYWGQGLTVTVS
pASK88-Hsp70o   : YNSALKSRLNISKDSSKSQVFLKMNSLQTDDETAMYFCARNGGYDVPHYWGQGLTVTVS

```

**Abbildung 3.3:** Aminosäuresequenz-Alignment der V-Domänen, kodiert von der cmHsp70.1-cDNA auf dem ursprünglich klonierten Expressionsvektor pASK88-Hsp70o sowie der korrigierten Version pASK88-Hsp70ch/m. Mittels Edman-Abbau sequenzierte Sequenzabschnitte sind eingerahmt, wohingegen unterstrichene Sequenzabschnitte mittels MS/MS-Sequenzierung ermittelt wurden. Die *Complementary Determining Regions* (CDR) sind blau hervorgehoben.

Das Alignment mit den von pASK88-Hsp70o kodierten Sequenzen (Abbildung 3.3) ergab, dass die zuvor klonierten Sequenzen mit den *de novo* sequenzierten cDNA-Sequenzen auf Aminosäureebene bis auf kurze Sequenzabweichungen an den Termini beider V-Domänen übereinstimmen. Die sich auch auf die Aminosäuresequenz auswirkenden Sequenzabweichungen der leichten Kette können auf die zur Klonierung eingefügten Restriktionsschnittstellen zurückgeführt werden

<sup>3</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/>

(vgl. Abschnitt 3.1.1). Die Sequenzabweichungen an den Enden der VH-Domäne waren schon im von Prof. Kontermann bereitgestellten scFv-Konstrukt vorhanden und können ebenfalls auf die frühere Einführung von Restriktionsschnittstellen (vgl. Abbildung 3.1) zurückgeführt werden. Die Klonierung eines beschränkt funktionellen Pseudogens bei der Konstruktion von pASK88-Hsp70o als Ursache der gescheiterten Produktion in *E. coli* wurde hiermit ausgeschlossen.

Mithilfe des IMGT/V-QUEST-Servers<sup>4</sup> wurde das V-Gen der schweren Kette dem Keimbahn-Allel IGHV2-6-4\*01 (97 % Übereinstimmung) und das entsprechende J-Gen dem Allel IGHJ3\*01 (88 % Übereinstimmung) zugeordnet. V- und J-Gen der leichten Kette entsprechen zu 100 % den Keimbahnsequenzen der Allele IGLV1\*01 und IGLJ\*01 (NCBI-Kennziffer V00811).

### 3.1.3 Versuche zur Verbesserung der funktionellen Proteinausbeute in *E. coli*

Als Ursache für die unerwartet geringe Konzentration an löslichem Fab-Fragment im Periplasma wurden folgende Punkte in Betracht gezogen: (a) Probleme bei der bakteriellen Transkription infolge der Aneinanderreihung seltener Codons, (b) ineffiziente Ausbildung der nativen Proteinfaltung nach der Translokation ins Periplasma.

Eine mögliche Erklärung für das letztgenannte Problem war der klonierungsbedingte Austausch von Aminosäuren an insgesamt 12 Positionen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz des mAk. Eine teilweise Inkompatibilität der variablen Domänen murinen Ursprungs mit den auf pASK88 kodierten humanen konstanten Domänen konnte als weitere Ursache ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Dies erscheint angesichts der Tatsache plausibel, da es sich bei der im Konstrukt verwendeten C-Domäne der leichten Kette um den humanen  $\kappa$ -Typ handelt, bei der leichten Kette des mAk hingegen um den murinen  $\lambda$ -Typ. Letzten Endes musste aber auch eine den ursprünglichen V-Domänen des mAk inhärente Faltungsinstabilität in Betracht gezogen werden, welche bei der Produktion als rekombinantes Antikörperfragment durch das Fehlen der stabilisierenden Antikörpergesamtstruktur und ggf. in *E. coli* fehlenden Chaperons besonders deutlich zutage tritt.

Beim Versuch, die Produktionsausbeute des rekombinanten Fab-Fragments zu verbessern, wurden alle genannten Punkte adressiert.

#### 3.1.3.1 Korrektur der $V_H$ - und $V_L$ -Inserts im Expressionsvektor mittels Kunkel-Mutagenese

Eine DNA-Sequenzanalyse der beiden klonierten V-Gene zeigte einen Cluster seltener Codons im V-Gen der leichten Kette an. Bei den aufeinanderfolgenden Codons CUA (Leucin) und AUA (Isoleucin) an den Positionen L47 und L48 der klonierten cDNA handelte es sich um zwei der seltensten Codons für *E. coli* (mit Häufigkeiten von  $< 0,5$  %). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass zwei aufeinanderfolgende AUA-Codons erheblichen Einfluss auf die heterologe Proteintranslation haben können (DeTito *et al.*, 1994).

---

<sup>4</sup> [http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg)

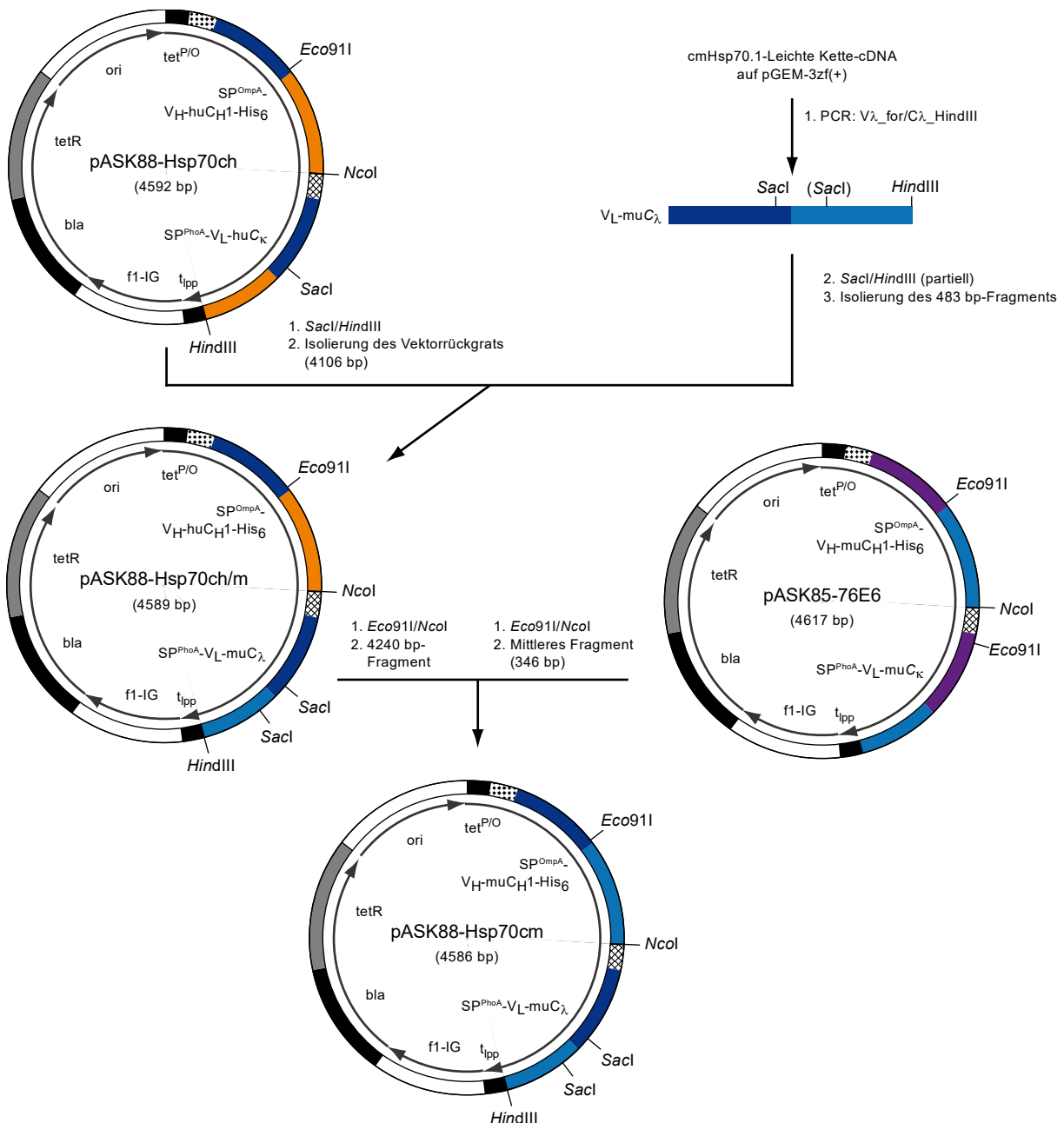
Zur Beseitigung dieses Clusters für *E. coli* untypischer Codons sowie der oben genannten Aminosäuresequenzabweichungen des klonierten Fab-Fragments wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (Kunkel *et al.*, 1987) Punktmutationen an insgesamt 13 Positionen der V-Genregionen auf pASK88-Hsp70o eingeführt. Hierbei wurden die vier Oligodesoxynukleotide Kunkel\_Hsp70\_VH\_N, Kunkel\_Hsp70\_VH\_C, Kunkel\_Hsp70\_VL-N und Kunkel\_Hsp70\_VL\_M verwendet. Auf diese Weise wurden in nur einem Mutageneseschritt die aufeinanderfolgenden seltenen Leu/Ile-Codons gegen die besonders in stark exprimierten Genen häufig vorkommenden Codons CUG bzw. ATT (Neidhardt & Curtiss, 1996) ersetzt und die Aminosäuresequenzabweichungen an den N-Termini beider V-Domänen sowie am C-Terminus der V<sub>H</sub>-Domäne beseitigt. Der resultierende Expressionsvektor wurde als pASK88-Hsp70ch bezeichnet (vgl. Abbildung 3.4). Der C-Terminus der V<sub>L</sub>-Domäne wurde durch diese Mutagenese nicht verändert, so dass die Positionen 105-107 weiterhin, wie auch die auf pASK88 kodierte C<sub>L</sub>-Domäne, der Sequenz einer leichten Kette des  $\kappa$ -Typs entsprachen. Die Korrektur dieser Reste erfolgte erst im Zuge des nachfolgenden Austauschs der humanen C <sub>$\kappa$</sub> - gegen die murine C<sub>L</sub>-Domäne (vgl. Abschnitt 3.1.3.2).

#### 3.1.3.2 Variation der konstanten Domänen

Experimentelle Studien hatten gezeigt, dass sich die lösliche Proteinausbeute bei periplasmatischer Produktion in *E. coli* durch den Austausch der konstanten Domänen eines Fab-Fragments gegen konstante Domänen eines anderen Subtyps mitunter verbessern lässt (MacKenzie *et al.*, 1994). Als mögliche Ursachen hierfür wurden die unterschiedlichen Tendenzen der Domänen zur Aggregation bzw. Effizienzunterschiede bei der periplasmatischen Translokation diskutiert. Vor diesem Hintergrund wurden die auf dem korrigierten Expressionsplasmid pASK88-Hsp70ch kodierten Sequenzen der humanen C-Domänen sukzessiv gegen murine Domänen ersetzt (Abbildung 3.4).

Der erste Schritt war die Klonierung der ursprünglichen Sequenz der leichten Kette von cmHsp70.1. Nachdem die auf pGEM-3zf(+) klonierte cDNA der leichten Kette (s. Abschnitt 3.1.2) durch PCR (Primer V $\lambda$ \_for und C $\lambda$ \_HindIII) mit einer HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende versehen worden war, konnte das PCR-Produkt partiell mit *SacI* und *HindIII* verdaut (1 U *SacI*/10 U *HindIII* mit 950 ng PCR-Produkt für 30 min bei 37 °C) und mit dem Vektorrückgrat des unter Standardbedingungen mit *SacI*/*HindIII* verdauten Plasmids pASK88-Hsp70ch ligiert werden. Das hieraus resultierende Plasmid wurde als pASK88-Hsp70ch/m bezeichnet und kodiert für ein Fab-Fragment mit chimärem Fd-Anteil und komplett muriner  $\lambda$ -Kette.

Unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Eco91I* und *NcoI* wurde letztendlich auch die noch verbleibende humane C<sub>H1</sub>-Domäne gegen die auf dem Vektor pASK85-76E6 (Derivat von pASK85; Skerra, 1994b) kodierte murine C<sub>H1 $\gamma$ 1</sub>-Domäne ersetzt. Der schließlich für das vollständig murine Fab-Fragment kodierende Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung pASK88-Hsp70cm.

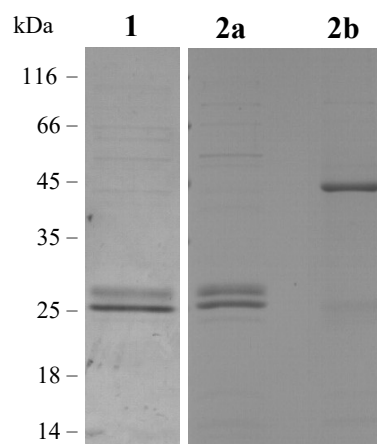


**Abbildung 3.4:** Konstruktion von Fab-Expressionsvektoren mit variierten C-Genregionen. Das Plasmid pASK88-Hsp70ch stellt die sequenzkorrigierte Version von pASK88-Hsp70o dar. Die kodierenden Sequenzen der murinen V-Domänen sind hierbei in den Kontext der humanen C-Domänen gestellt. Das Plasmid pASK88-Hsp70ch/m kodiert für ein Fab-Fragment aus chimärem Fd-Teil und muriner leichter Kette vom  $\lambda$ -Typ. Beim Plasmid pASK88-Hsp70cm entsprechen schließlich alle kodierten Domänen den originalen Aminosäuresequenzen des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1. Für Erklärungen der genetischen Elemente siehe Abbildung 1.3 und Abbildung 3.2

Bei der Produktion der drei verschiedenen Fab-Varianten im Schüttelkolben konnte im Fall der sequenzkorrigierten Variante mit zwei humanen C-Domänen (kodiert auf pASK88-Hsp70ch) erstmals eine Ausbeute von 12  $\mu\text{g/l}$  nach der IMAC-Reinigung nachgewiesen werden. Die Produktion der Fab-Variante mit der komplett murinen leichten Kette (kodiert von pASK88-Hsp70ch/m) stieg die Ausbeute an löslichem Protein leicht auf etwa 24  $\mu\text{g/l}$  an. Durch den

weiteren Austausch der humanen C<sub>H1</sub>-Domäne gegen die murine Sequenz (pASK88-Hsp70cm) wurde dagegen keine weitere Erhöhung der Ausbeute erreicht (ca. 20 µg/l).

Des Weiteren wurde versucht, die beiden Fab-Varianten mit muriner C<sub>λ</sub>-Domäne im Laborfermenter zu produzieren. Hierbei zeigte sich sowohl beim Einsatz von pASK88-Hsp70cm, als auch bei pASK88-Hsp70ch/m eine ungewöhnlich starke Zellyse direkt im Anschluss an die Induktion der Genexpression. Durch IMAC wurden die Fab-Fragmente mit einer Reinheit von über 95 % aus dem löslichen Anteil des Periplasmaextrakts isoliert (Abbildung 3.5). Die anhand der UV-Absorption bei 280 nm ermittelten Proteinmengen betragen im Fall des chimären Hsp70ch/m-Fab ~125 µg pro liter Bakterienkultur und im Fall des vollständig murinen Hsp70cm-Fab bloß ~20 µg/l.

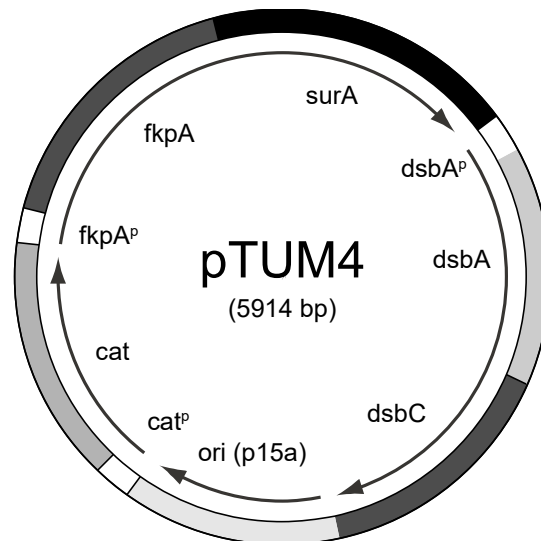


**Abbildung 3.5:** SDS-PAGE-Analyse von fermentierten Varianten des Anti-Hsp70-Fab-Fragments nach der IMAC-Reinigung. 1: humane C<sub>H1</sub> $\gamma$ 1-Domäne und murine C<sub>λ</sub>-Domäne. 2: murine C<sub>H1</sub> $\gamma$ 1-Domäne und murine C<sub>λ</sub>-Domäne. Proben des IMAC-gereinigten Proteins wurden unmittelbar vor der Analyse mit 2-Mercaptoethanol reduziert (1 und 2a) oder unbehandelt aufgetragen (2b).

### 3.1.3.3 Fermentation des teil-humanisierten Fab-Fragments $\alpha$ Hsp70ch/m unter Ko-Expression periplasmatischer Faltungshelferproteine

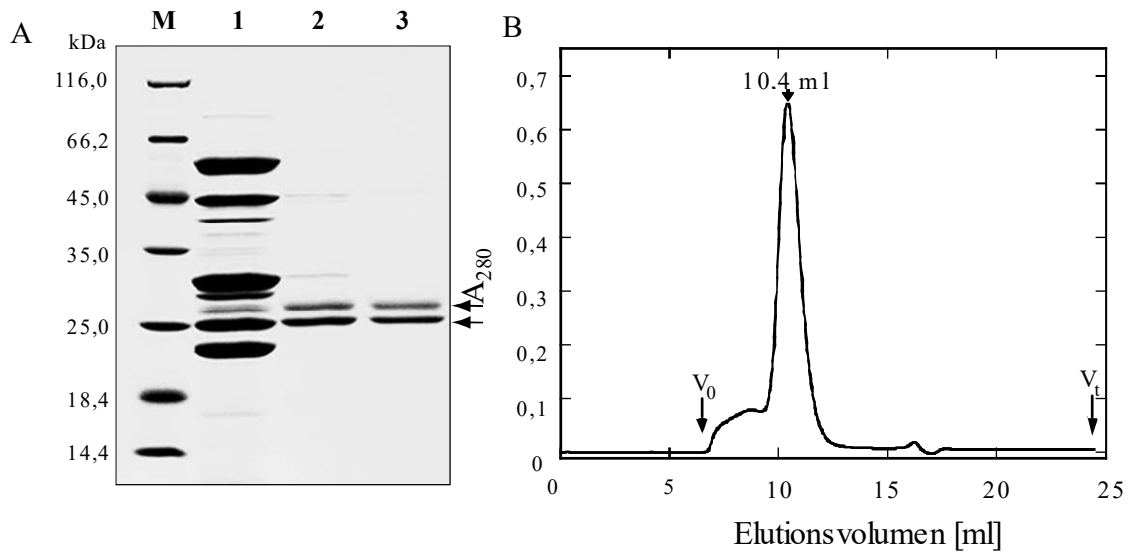
Es ist bekannt, dass Fab-Fragmente dazu tendieren, in unlöslicher Form im bakteriellen Periplasma zu akkumulieren. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Aggregation von Faltungsintermediaten im Anschluss an die Translokation durch die innere Membran (Skerra & Plückthun, 1991; Whitlow & Filpula, 1991). Als geschwindigkeitsbestimmend für die Proteinfaltung gelten insbesondere die langsamen Prozesse der oxidativen Ausbildung bzw. Isomerisierung von Disulfidbrücken wie auch die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Imino-peptidbindungen. Eine neuere Strategie zur Verbesserung der löslichen Expression rekombinanter Proteine sieht dementsprechend die Überexpression von periplasmatischen Enzymen vor, welche die genannten geschwindigkeitsbestimmenden Schritte zur Proteinfaltung beschleunigen. Dies wird beispielsweise durch Kotransformation der *E. coli*-Zellen mit einem

„Faltungshelfer“-Plasmid neben dem eigentlichen Expressionsplasmid erreicht. Im Fall des zuvor am Lehrstuhl für Biologische Chemie entwickelten Plasmids pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) wird die konstitutive Überexpression der generischen Dithiol-Oxidase DsbA und der Disulfid-Isomerase DsbC sowie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen mit Chaperon-Aktivität FkpA und SurA ermöglicht (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung des Faltungshelfer-Plasmids pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006). Für die Überexpression der periplasmatischen Disulfid/Thiol-Oxidoreduktasen DsbA und DsbB und der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen FkpA und SurA trägt das Plasmid zwei künstliche dicistronische Operons, welche unter den konstitutiven Promotoren des fkpA-Gens (fkpA<sup>P</sup>) bzw. des dsbA-Gens (dsbA<sup>P</sup>) stehen. Des Weiteren enthält pTUM4 den p15a-Replikationsursprung und ein Chloramphenicol-Resistenzgen (cat) mit seinem eigenen Promotor (cat<sup>P</sup>).

Bei der Produktion des von pASK88-Hsp70ch/m kodierten chimären Anti-Hsp70-Fab-Fragments wurde im Fermenter-Maßstab unter Verwendung von pTUM4 eine Proteinausbeute von 18 mg pro Liter Bakterienkultur (nach IMAC) ermittelt. Dies entspricht mehr als dem 100fachen der Ausbeute, welche ohne Verwendung des Faltungshelferplasmids unter ansonsten identischen Fermentationsbedingungen erreicht wurde (vgl. Abschnitt 3.1.3.2). Reinheit und Monodispersität des Fab-Fragments wurden mittels SDS-PAGE und analytische Gelfiltration nachgewiesen (Abbildung 3.7).



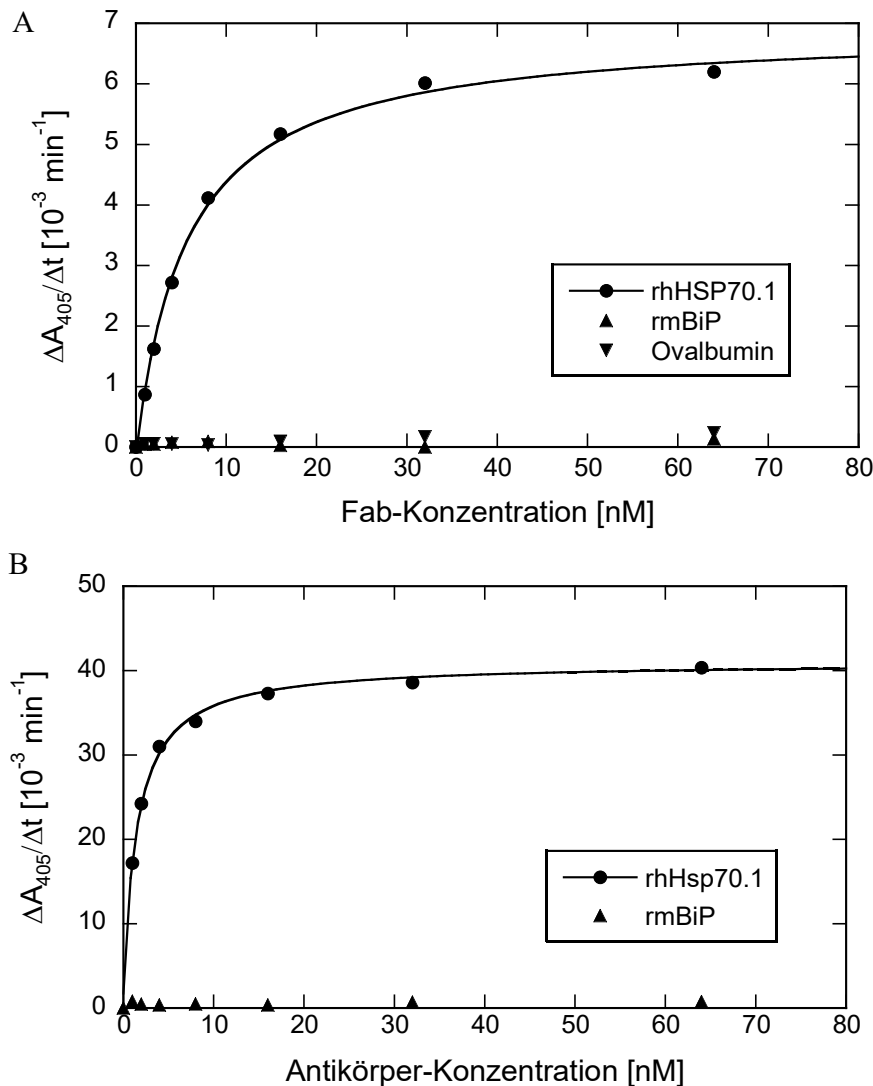
**Abbildung 3.7:** Funktionelle Expression des Anti-Hsp70-Fab-Fragments mit pASK88-Hsp70ch/m unter Verwendung von pTUM4 im Laborfermenter. (A) Reduzierende SDS-PAGE mit dem Molmassen-Marker auf Spur M, dem Periplasmaextrakt auf Spur 1, dem rekombinanten Protein nach der IMAC-Reinigung auf Spur 2 und dem reinen Fab-Fragment nach Gelfiltration auf Spur 3. Die Banden von leichter Kette und Fd-Fragment sind mit Pfeilen markiert. Die prominenten Banden in Spur 1 konnten den auf pTUM4 kodierten Faltungshelferproteinen SurA (45 kDa), FkpA (26,2 kDa), DsbC (23,4 kDa) und DsbA (21,1 kDa) zugeordnet werden. (B) Elutionsprofil eines analytischen Gelfiltrationslaufs des IMAC-gereinigten Fab-Fragments auf einer Superdex 75-HR10/30-Säule. Die anhand des Elutionsvolumens von 10,4 ml abgeleitete apparente Molmasse betrug 35,5 kDa (vgl. berechnete Molmasse: 47,2 kDa).

### 3.1.4 Untersuchung der Antigenbindung mittels ELISA und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Zur funktionellen Charakterisierung des durch Fermentation mit dem Faltungshelferplasmid pTUM4 und dem Expressionsvektor pASK88-Hsp70ch/m hergestellten Anti-Hsp70-Fab-Fragments ( $\alpha$ Hsp70ch/m) wurde dessen Bindungsverhalten gegenüber dem rekombinanten humanen Hsp70.1 (rhHsp70.1, produziert in Insektenzellkultur) *in vitro* untersucht. In einem ELISA wurde die Bindung von immobilisiertem rhHsp70.1 durch das Fab-Fragment, welches in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurde, nachgewiesen (Abbildung 3.8A). Die hierbei erhaltene Sättigungskurve wurde wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben mittels nicht-linearer Regression an die vom Massenwirkungsgesetz abgeleitete Gleichung (6) angepasst. Die apparente Dissoziationskonstante  $K_D^{\text{app}}$  betrug in diesem Experiment  $5.8 \pm 0,2$  nM. Die Spezifität der Proteininteraktion wurde ebenfalls untersucht. Zu diesem Zweck wurden außer dem bekannten Antigen rhHsp70.1 auch das eng mit Hsp70.1 verwandte Protein BiP (Haas, 1994) sowie das unverwandte Ovalbumin auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und auf Bindung durch das Fab-Fragment untersucht. Im betrachteten Konzentrationsbereich wurden dabei keine relevanten Signale detektiert.

Zum Vergleich der Bindungseigenschaften des rekombinanten Fab-Fragments mit dem ursprünglichen monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 wurde mit diesem ein analoges ELISA-

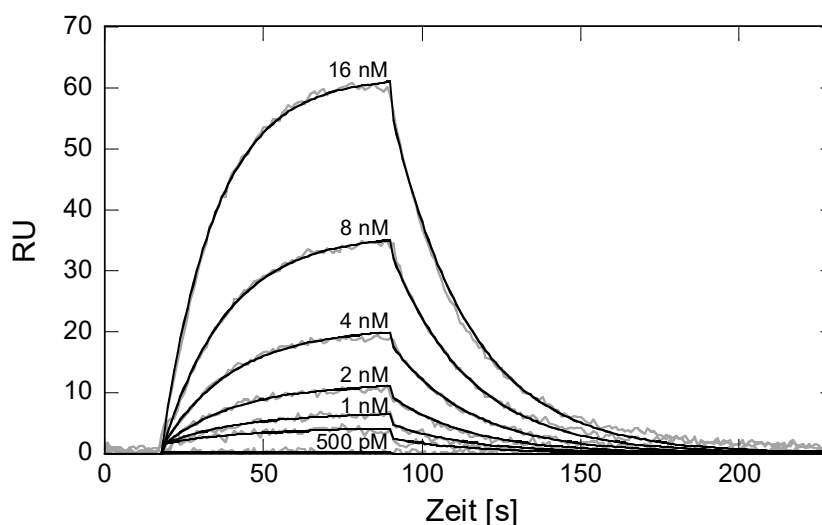
Experiment durchgeführt (Abbildung 3.8B). Dabei zeigte die Proteininteraktion mit rhHsp70.1 die gleiche Spezifität wie das gentechnisch hergestellte Fab-Fragment (getestet mit rmBiP). Die apparente Dissoziationskonstante betrug  $1,5 \pm 0,3$  nM und lag somit innerhalb der gleichen Größenordnung mit der  $K_D^{\text{app}}$  der Fab-rhHsp70.1-Interaktion. Der leicht niedrigere Wert ließ sich auf einen Aviditätseffekt des Antikörpers zurückführen.



**Abbildung 3.8:** ELISA-Experimente zur Untersuchung der Funktionalität des gentechnisch hergestellten Fab-Fragments  $\alpha$ Hsp70ch/m. (A) In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde entweder rekombinantes humanes Hsp70.1 (rhHsp70.1), rekombinantes murines BiP (rmBiP) oder Ovalbumin immobilisiert. Nach dem Absättigen verbliebener Bindungsstellen wurde eine Verdünnungsreihe des von pASK88-Hsp70ch/m kodierten Fab-Fragments appliziert. Die Detektion des gebildeten Komplexes aus Antikörperfragment und Antigen erfolgte photometrisch mithilfe eines Anti-Maus- $C_{\lambda}$ -Antikörpers aus Kaninchen und eines Anti-Kaninchen-IgG-Alkalischephosphatase-Konjugats sowie des entsprechenden chromogenen Substrats. Die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten der Farbreaktion wurden in Abhängigkeit von der eingesetzten Fab-Konzentration an Gleichung (6) angepasst (schwarze Kurve). Für rhHsp70.1 wurde hierbei eine apparente  $K_D$  von 5,8 nM berechnet. (B) Ein ähnliches Experiment wie in (A) wurde auch mit dem monoklonalen Maus-Antikörper cmHsp70.1 durchgeführt. Zur Detektion diente hierbei Anti-Maus (Fc-spezifisch)-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat.  $K_D^{\text{app}}$  für rhHsp70.1 betrug 1,5 nM.



Zusätzlich wurde die Kinetik der Bindungswechselwirkung zwischen kovalent immobilisiertem rhHsp70.1 und dem Anti-Hsp70-Fab-Fragment  $\alpha$ Hsp70ch/m mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie untersucht (Abbildung 3.9). Die aus den kinetischen Parametern des Langmuir-Bindungsmodells errechnete Dissoziationskonstante  $K_D$  betrug mit  $34,5 \pm 6$  nM in etwa das 6fache der im ELISA-Experiment ermittelten Dissoziationskonstante. Mögliche Ursachen hierfür liegen in der unterschiedlichen Art der Immobilisierung sowie in der unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme. So sind die für Hsp70 bekannten Konformationsänderungen von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Präsenz bestimmter divalenter Kationen, abhängig (Wu *et al.*, 2004).



**Abbildung 3.9:** Echtzeit-Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Analyse mit dem Fab-Fragment  $\alpha$ Hsp70ch/m und immobilisiertem rhHsp70.1. Die bei der Applikation verschiedener Konzentrationen des Fab-Fragments aufgenommenen Bindungssignale wurden an ein Langmuir-Bindungsmodell gemäß 1:1-Stöchiometrie angepasst. Aus den hierbei ermittelten Werten für die Parameter  $k_{on}$  und  $k_{off}$  mit  $1,17 \times 10^6$   $M^{-1}s^{-1}$  bzw.  $4,04 \times 10^{-2}$   $s^{-1}$  wurde die Gleichgewichtskonstante  $K_D = 34,5$  nM berechnet.

### 3.1.5 Epitop-Bestimmung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 im Vergleich zum rekombinanten Fab-Fragment $\alpha$ Hsp70ch/m durch SPOT-Analyse

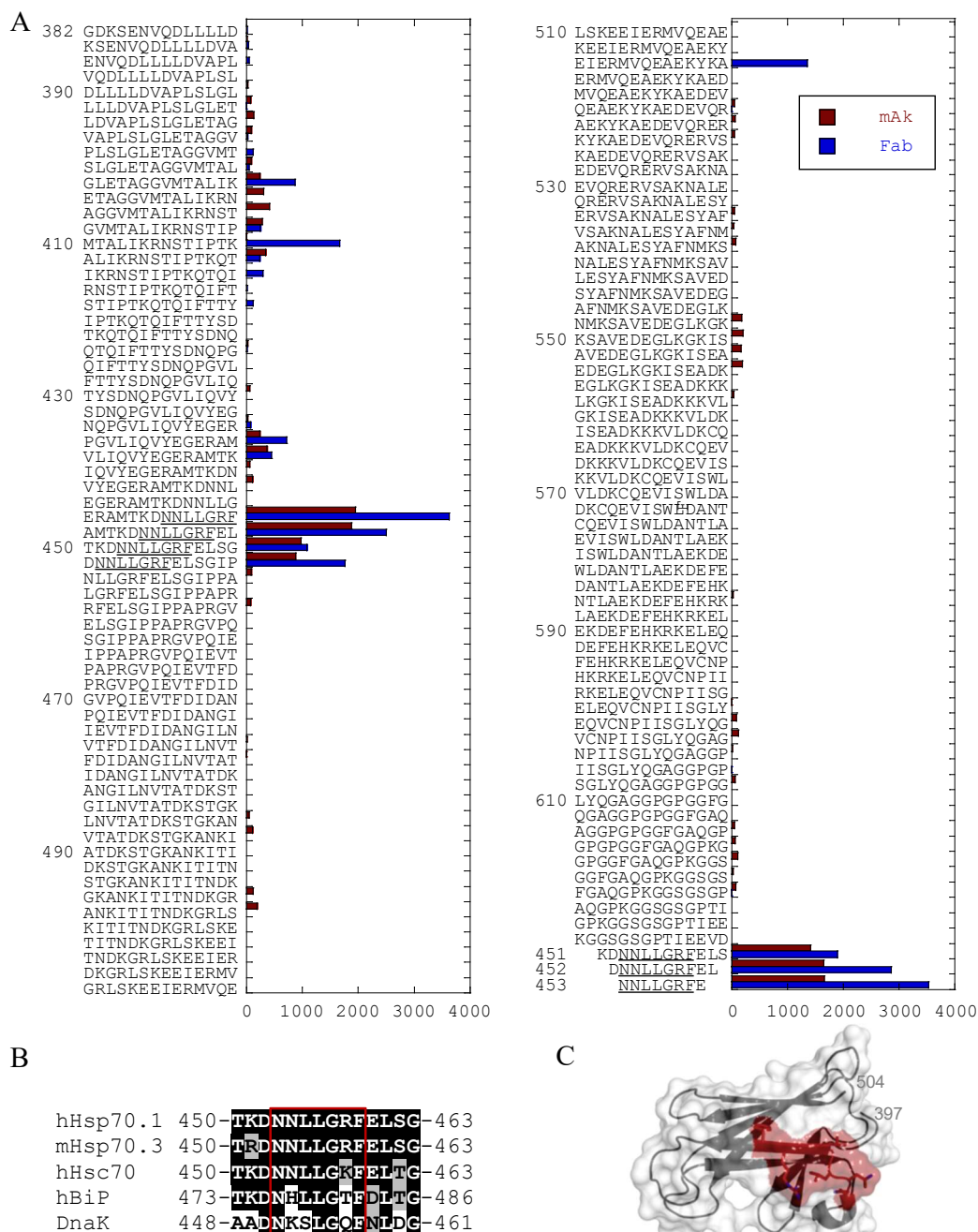
Zur Epitopanalyse des mAk cmHsp70.1 sowie des hiervon abgeleiteten rekombinanten Fab-Fragments wurden Peptid-Arrays für einen Sequenzausschnitt von hHsp70.1 im SPOT-Verfahren (Frank, 2002) auf Membranen synthetisiert. Diese Methode erlaubt den Einsatz immunchemischer Nachweisverfahren für die Interaktion zwischen einem Bindungsprotein und den von den Peptiden repräsentierten Teilsequenzen des Zielproteins. Wenngleich dieses Verfahren durch die sehr hohen lokalen Konzentrationen der Membranpeptide eine enorme Sensitivität für die Identifizierung linearer Peptidepitope bietet, ist zu bedenken, dass diskontinuierliche bzw. konformationelle Epitope hiermit nicht erkannt werden können. Anhand der Literaturdaten des Antikörpers wurde das Epitop im Bereich der hHsp70.1-Substrat-Bindedomäne lokalisiert erwartet (Multhoff & Hightower, 2011). Dementsprechend wurde auch

nur dieser Bereich (AS 382-641) in das Peptid-Array aufgenommen. Zusätzlich wurden drei sequentielle Verkürzungen des zur Generierung des monoklonalen Antikörpers verwendeten Peptid-Antigens TKDNNLLGRFELSG („TKD“-Sequenz; AS 450-463) in die Analyse aufgenommen (Multhoff, 2007).

Die densitometrisch ausgewerteten und um den Hintergrund korrigierten Bindungssignale von sowohl Antikörper als auch Fab-Fragment sind in Abbildung 3.10A wiedergegeben. Hierbei tritt deutlich ein Sequenzbereich hervor, welcher Teil des „TKD“-Peptids ist. Mithilfe der Sequenzverkürzungen konnte der zur Bindung essentielle Bereich dieser Sequenz als Minimalepitop identifiziert werden: 453-NNLLGRF-459. Fab-Fragment und mAk zeigten diesbezüglich ein übereinstimmendes Bindungsverhalten. Die höheren Signalstärken des Fab-Fragments im Vergleich zum mAk sowie einzelne Signalspitzen des Fab-Fragments (Position 410 und 514) resultierten vermutlich aus der Verwendung verschiedener sekundärer Detektionsreagenzien. Darüber hinaus zeigten beide Bindungsproteine in einem weiteren zusammenhängenden Bereich N-terminal vom oben beschriebenen Minimalepitop Bindungssignale (14-mere der Positionen 434-438, entsprechend der Minimalsequenz VLIQVYEGER). Die Signale in diesem Bereich waren jedoch um ein Vielfaches schwächer und deuten auf Bindungswechselwirkungen niedriger Affinität ohne physiologische Relevanz.

Im Alignment der Sequenz von humanem Hsp70 im Bereich des hier identifizierten Minimalepitops mit den Sequenzen homologer Proteine anderer Organismen sowie anderer Mitglieder der Hsp70-Proteinfamilie des Menschen (Abbildung 3.10B) lässt sich erkennen, dass es sich um eine relativ stark konservierten Sequenz handelt. Während die „TKD“-Sequenz im DnaK-Protein des phylogenetisch weit entfernten Bakteriums *E. coli* noch 50 % Übereinstimmung zeigt, weist die Sequenz des homologen Hsp70-Proteins der Maus nur an einer Position einen konservativen Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin auf. Dieser Sequenzunterschied befindet sich außerhalb des hier identifizierten Minimalepitops und ist somit kongruent mit der in der Literatur beschriebenen Kreuzreaktivität des mAk cmHsp70.1 mit dem Hsp70.1-Homologen der Maus. Das Fehlen einer Kreuzreaktivität von Anti-Hsp70-mAk und Fab-Fragment mit dem Hsp70.1-paralogen Protein BiP (vgl. Abbildung 3.8) ist wahrscheinlich das Resultat der Sequenzabweichungen im Bereich der „TKD“-Sequenz, wobei zwei nicht-konservative Aminosäureunterschiede an Positionen innerhalb der hier identifizierten Minimalsequenz auftreten. Die Sequenz des laut Literaturangaben (Multhoff, 2007; Multhoff & Hightower, 2011) ebenfalls nicht mit cmHsp70.1 kreuzreagierenden Hsp70-verwandten Proteins Hsc70 unterscheidet sich im Bereich des Alignments gleichermaßen an zwei Positionen von Hsp70.1. Es handelt sich dabei um konservative Aminosäureunterschiede, und nur einer ist hierbei innerhalb des Minimalepitops lokalisiert.

Im Strukturmodell der  $\beta$ -Sandwich-Subdomäne der SBD des nah mit hHsp70.1 verwandtem bovinen Hsc70 zeigt sich, dass der Bereich des identifizierten Epitops Teil der Sekundärstrukturelemente des  $\beta$ -Strangs B5 und des Loops L4,5 auf der gegenüberliegenden Seite der Peptidbindungsspalte ist (Abbildung 3.10C).

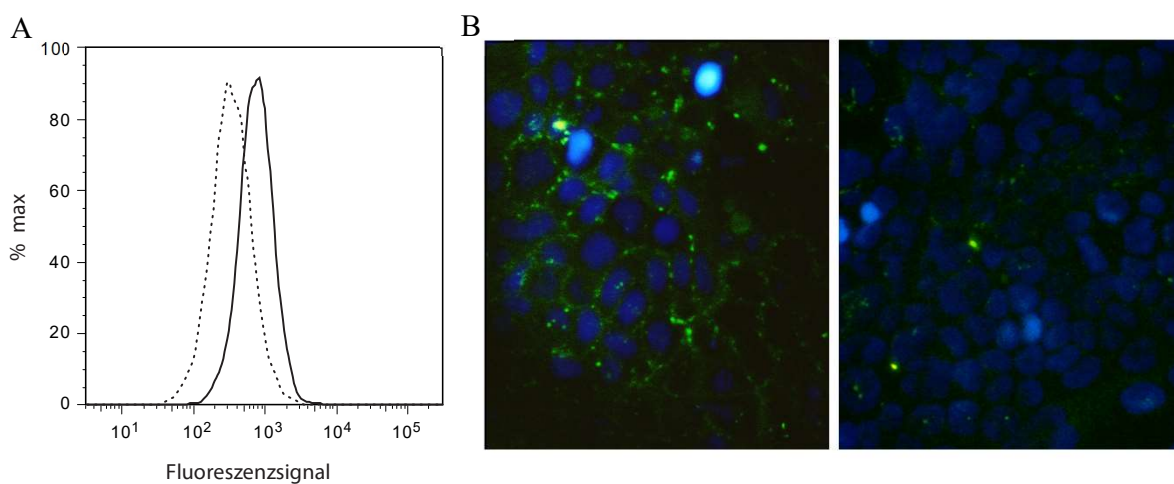


**Abbildung 3.10:** Epitopkartierung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 sowie des Fab-Fragments  $\alpha$ Hsp70ch/m. (A) Die Sequenz der humanen Hsp70.1-SBD wurde in Form von 14mer-Peptiden jeweils mit einem Versatz von zwei Aminosäuren auf Membranen synthetisiert (SPOT-Synthese). Nach Inkubation der Membranen mit den Bindungsproteinen erfolgte der Nachweis der Komplexbildung mit den Peptiden durch chromogene Reaktion mithilfe sekundärer Antikörperreagenzien. Die hier dargestellten Farbdichte-Werte ergaben sich aus der Subtraktion der Farbdichten von Membranen, welche mit bzw. ohne Anti-Hsp70-Bindeprotein entwickelt wurden. Zusätzlich zu den 14mer-Peptiden trugen die Membran drei N- und C-terminal verkürzte Versionen des zur Generierung des Antikörpers verwendeten Peptids (Multhoff, 2007). Das Minimalepitop NLLGRF ist unterstrichen. (B) Alignment der Sequenz des humanen Hsp70.1 (UniProt P0DMV8) mit dem murinen homologen Hsp70.3 (UniProt Q61696) bzw. dem entsprechenden Protein aus *E. coli* (DnaK; UniProt P0A6Y8) sowie den Sequenzen der paralogen humanen Proteine Hsc70 (UniProt P11142) und BiP (UniProt P11021). (C) Das Minimalepitop (rot) im Strukturmodell der SBD- $\beta$ -Sandwichregion von Hsp70.1 (PDB-Kode 4PO2).

### 3.1.6 Nachweis der Bindung von Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen

Zur Charakterisierung der Bindungsaktivität des rekombinanten Anti-Hsp70-Fab-Fragments gegenüber Oberflächen-Hsp70-positiven Tumorzellen wurde es mithilfe des aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein-LC-NHS markiert (vgl. Abschnitt 2.5.5). Der absorptionsphotometrisch bestimmte Kopplungsgrad betrug 3,0 Fluoresceinmoleküle pro Fab-Fragment. Als Negativkontrolle wurde ein durch periplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben produziertes Fab-Fragment (D1.3) mit Spezifität für das nicht mit Hsp70 verwandte Hühnereiweiß-Lysozym (Skerra, 1994a) verwendet, welches analog zum Hsp70-Fab-Fragment gereinigt und mit Fluorescein markiert wurde. Hierbei wurde ein Kopplungsgrad von 3,3 Fluoresceinmolekülen pro Fab-Fragment erreicht.

Bei der Durchfluss-cytofluorimetrischen Messung der Fluoreszenz von Krebszellen der menschlichen Caco-2-Zelllinie, welche entweder mit dem Anti-Hsp70-Fab-Fragment oder mit dem Kontroll-Fab inkubiert worden waren, zeigte FabHsp70ch/m im hierbei aufgezeichneten Fluoreszenz-Histogramm ein Maximum bei 798, wohingegen das Maximum des Kontroll-Fabs bei einer relativen Fluoreszenz von bloß 403 lag (Abbildung 3.11A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, welche ohne vorangegangene Permeabilisierung mit dem fluoreszenzmarkierten Anti-Hsp70-Fab-Fragment inkubiert wurden, zeigten eine punktförmig konzentrierte Färbung im Bereich der Zellmembranen, welche auf die Zelloberflächenlokalisierung von Hsp70 in *Lipid-Rafts* zurückzuführen ist (Broquet *et al.*, 2003). Die Färbung mit dem Anti-Hsp70-Fab-Fragment entspricht somit dem in der Literatur beschriebenen Muster des mAk cmHsp70.1 (Stangl *et al.*, 2011).



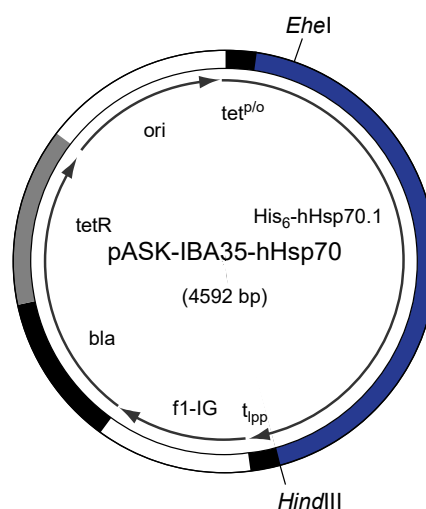
**Abbildung 3.11:** Charakterisierung der Antigenbindung des Anti-Hsp70-Fab-Fragments auf der Oberfläche von Tumorzellen. (A) Vergleichende cytofluorimetrische Analyse der Bindung von Fluorescein-markiertem Fab Hsp70ch/m (durchgezogene Linie) und gleichartig markiertem Fab D1.3 gegen Hühnereiweiß-Lysozym (gestrichelte Linie) auf Zellen der humanen Tumorzelllinie Caco-2. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (grüne Fluoreszenz) von Caco-2-Zellen, welche entweder mit Fluorescein-markiertem Anti-Hsp70-Fab-Fragment (linke Aufnahme) oder dem entsprechend markierten Kontroll-Fab-Fragment D1.3 (rechte Aufnahme) inkubiert wurden. Zum Vergleich wurden die DAPI-Färbungen der Zellkerne (blaue Fluoreszenz) überlagert.

## 3.2 Herstellung und Reinigung von humanem HSP70.1, dessen Substrat-Bindedomäne (SBD) sowie der SBD von humanem BiP in *E. coli*

Zur Selektion eines Hsp70-spezifischen Anticalins sowie zur Charakterisierung und Optimierung seiner Bindungseigenschaften war die Bereitstellung eines rekombinanten „Antigen“-Proteins erforderlich. Aus Literaturdaten war bekannt, dass eine Vielzahl der vorhandenen Antikörper gegen Hsp70, die neben der löslichen Form auch Membran-assoziiertes Hsp70 binden, Epitope im Bereich der Hsp70-Substrat-Bindedomäne (SBD) erkennen. Daher wurde entschieden, für die Anticalin-Selektion ein rekombinantes Fragment der SBD von humanem Hsp70.1 zu produzieren. Zu demselben Zweck wurde ein Fusionsprotein aus SBD<sub>Hsp70</sub> und *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) produziert, welches mit seinen spektroskopischen Eigenschaften für den Einsatz beim *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) von Nutzen ist. Mit dem Ziel der Charakterisierung selektierter Anticaline hinsichtlich der Spezifität ihres Bindungsverhaltens wurden außerdem rekombinantes Volllängen-Hsp70.1 (rhHsp70.1) sowie ein SBD-Fragment des Hsp70-verwandten Proteins BiP produziert (SBD<sub>BiP</sub>).

### 3.2.1 Konstruktion eines Expressionsvektors, Produktion und Reinigung von humanem Hsp70.1

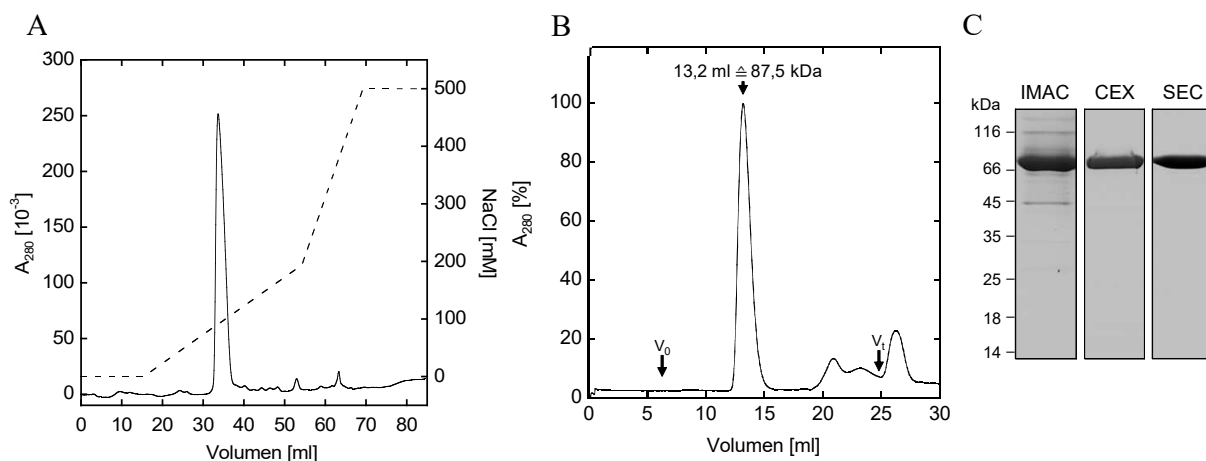
Zur Klonierung von humanem Hsp70.1 wurde die Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen der humanen Lymphomzelllinie SU-DHL-4 präpariert. Nach der reversen Transkription der mRNA in cDNA wurde mithilfe der Primer hHsp70\_for und hHsp70\_rev\_HindIII, welche auf Grundlage der bekannten mRNA-Sequenz von hHsp70.1 (NCBI-Kennziffer NM\_005345) entworfen worden waren, die für hHsp70.1 kodierende Sequenz amplifiziert. Zur Insertion des offenen Leserahmens in den Expressionsvektor pASK-IBA35(+) wurde die Sequenz dabei mit den Primer-Sequenzen am 5'-Ende um eine halbe *EheI*-Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende um die *HindIII*-Erkennungssequenz verlängert.



**Abbildung 3.12:** Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASK-IBA35-hHsp70. Der Vektor kodiert unter Transkriptionskontrolle des induzierbaren *tet*-Promotor/Operators (*tet*<sup>P/O</sup>) für humanes Hsp70.1 mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag. Die zur Konstruktion des Plasmids verwendeten Restriktionsschnittstellen sind angegeben (*EheI* und *HindIII*). Die Definitionen weiterer Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 1.3.

Das PCR-Produkt wurde mit *Hind*III verdaut, mithilfe der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit *Ehe*I/*Hind*III-verdautem Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid pASK-IBA35-hHsp70 (Abbildung 3.12) ermöglichte die heterologe Produktion von rekombinantem humanen Hsp70.1 (rhHsp70.1) in translationaler Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidin-Anhängsel (vgl. Abbildung 3.15) im Cytoplasma von *E. coli*.

Das Protein rhHsp70.1 wurde in löslicher Form im Cytoplasma von *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 produziert und nach dem Zellaufschluss mittels IMAC gereinigt. Da die Proteinpräparation hiernach noch ausgeprägte Verunreinigungen aufwies (vgl. Abbildung 3.13C), erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mittels Kationenaustauschchromatographie (CEX; Abbildung 3.13A), vor der abschließenden Feinreinigung mittels SEC (Abbildung 3.13B). Hierbei zeigte das rekombinante Protein eine apparente Molekülmasse, welche mit nur geringer Abweichung der berechneten Molekülmasse des monomeren Proteins entspricht. Protein-Oligomere bzw. Aggregate wurden nicht nachgewiesen. In der SDS-PAGE-Analytik zeigte das auf diese Weise gereinigte Protein einen hohen Reinheitsgrad (Abbildung 3.13C).



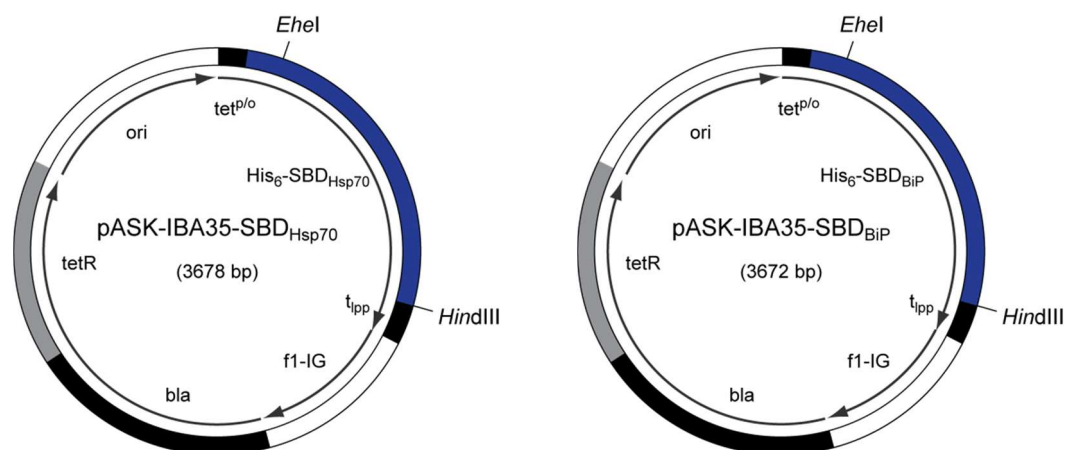
**Abbildung 3.13:** Reinigung von rekombinantem hHsp70.1. Das von pASK-IBA35-hHsp70 kodierte Protein wurde in löslicher Form im Cytoplasma von *E. coli* BL21 produziert und mittels IMAC aus dem Zellextrakt isoliert. Die weitere Reinigung erfolgte durch Kationenaustauschchromatographie (A) an einer Resource S-Säule (1 ml; 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 mM DTT, 0-500 mM NaCl) und Größenausschlusschromatographie (B). Die bei der SEC ermittelte apparente Molekülmasse sowie Durchbruch- ( $V_0$ ) und Bettvolumina ( $V_i$ ) der mit PBS äquilibrierten Superdex 200-HR10/30-Säule sind angegeben. Die berechnete Molekülmasse des Proteins beträgt 71,6 kDa. Die Reinigung wurde mit SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen dokumentiert (C).

### 3.2.2 Konstruktion von Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung der Substrat-Bindedomänen von humanem Hsp70.1 und BiP

Zur Herstellung eines „Antigens“ für die Selektion eines für Hsp70 spezifischen Anticalins wurde derjenige Teil der kodierenden Sequenz von hHsp70.1 (Uniprot-Kennziffer P0DMV8)

kloniert, welcher den Bereich des Interdomänen-Linkers (AS 383–396) und einen Teil der Substrat-Bindedomäne einschließlich der  $\beta$ -Sandwich-Subdomäne mit der Substratbindungstasche (AS 397–507) sowie einen Teil der  $\alpha$ -helikalen „Deckel“-Subdomäne (AS 508–548) umfasst. Dieser Bereich wurde in einer PCR-Reaktion mit der Plasmid-DNA von pASK-IBA35-hHsp70 als Matrize und den Primern hHsp70\_SBD\_for und hHsp70\_SBD\_rev amplifiziert. Mithilfe der Primer-Sequenzen wurde die amplifizierte Sequenz um eine halbe *EheI*-Restriktionschnittstelle entsprechend dem Alanin-Codon GCC am 5'-Ende und um ein Stop-Codon sowie eine *HindIII*-Erkennungssequenz am 3'-Ende verlängert (Abbildung 3.15). Die Klonierung dieser Sequenz auf pASK-IBA35(+) erfolgte analog zur Klonierung des Volllängenproteins (vgl. Abschnitt 3.2.1). Der resultierende Expressionsvektor für das rekombinante Fragment der hHsp70.1-Substrat-Bindedomäne ( $SBD_{Hsp70}$ ) trägt die Bezeichnung pASK-IBA35- $SBD_{Hsp70}$  (Abbildung 3.14).

Die Klonierung des zu  $SBD_{Hsp70}$  sequenzhomologen Bereichs von BiP (AS 408–571) glich in der Vorgehensweise der Konstruktion von pASK-IBA35- $SBD_{Hsp70}$ . Als Matrize für die PCR-Reaktion mit den Primern SBD\_BiP\_for und SBD\_BiP\_rev diente das Plasmid pASK75-mBiP-StrepII, welches den kodierenden Bereich der cDNA des murinen BiP-Transkripts (GenBank-Kennziffer AJ002387.1) mit Ausnahme der Signalsequenz (Codons 1–19) enthält (Haas & Meo, 1988). Das vom resultierenden Expressionsvektor pASK-IBA35- $SBD_{BiP}$  (Abbildung 3.14) kodierte Protein  $SBD_{BiP}$  entspricht in seiner Aminosäuresequenz sowohl dem humanen als auch dem murinen BiP, da die Proteine (Uniprot-Kennziffern P11021 und P20029) in der klonierten Region in beiden Spezies sequenzidentisch sind.



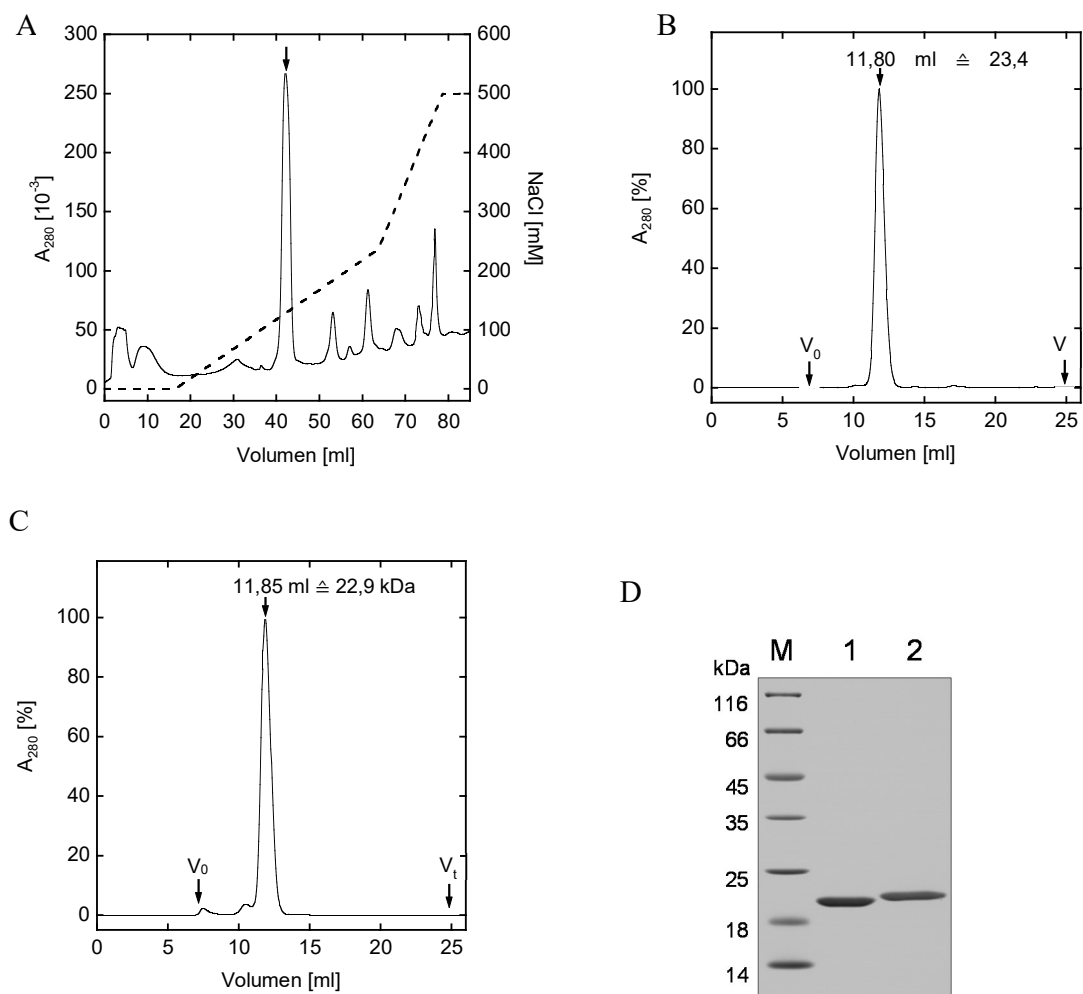
**Abbildung 3.14:** Schematische Darstellung der Expressionsvektoren pASK-IBA35- $SBD_{Hsp70}$  und pASK-IBA35- $SBD_{BiP}$ . Die Plasmide kodieren für sequenzhomologe Bereiche von humanem Hsp70.1 (Uniprot-Code P0DMV8, AS 383-548) und BiP (UniProt-Code P11021, AS 408-571), welche den Interdomänen-Linker sowie die  $\beta$ -Sandwich-Subdomäne und einen Teil der  $\alpha$ -helikalen Subdomäne der Substratbindedomäne einschließen (vgl. Abbildung 3.15). Die zur Konstruktion des Plasmids verwendeten Restriktionschnittstellen sind angegeben (*EheI* und *HindIII*). Die Definitionen weiterer Abkürzungen entsprechen denen in Abbildung 1.3.







Sowohl  $SBD_{BiP}$  als auch  $SBD_{Hsp70}$  wurden in Fusion mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag im Cytoplasma von *E. coli* BL21 produziert und mittels IMAC aus dem löslichen Teil des Zellextrakts gereinigt.  $SBD_{BiP}$  wurde einem weiteren Reinigungsschritt in Form einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen (Abbildung 3.16A). Zur Feinreinigung wurden beide Proteine einer SEC unterzogen. Die hierbei ermittelten apparenten Molekülgrößen beider entsprachen mit 23,4 kDa ( $SBD_{BiP}$ ) und 22,9 kDa ( $SBD_{Hsp70}$ ) entsprachen annähernd den berechneten Massen der monomeren SBD-Fragmente (19,8 kDa). Protein-Oligomere oder Aggregate waren nicht in signifikanten Mengen nachweisbar (Abbildung 3.16B und C). Beide Substrat-Bindedomänen waren zudem in der SDS-PAGE-Analyse frei von Proteinverunreinigungen (Abbildung 3.16D).



**Abbildung 3.16:** Reinigung der rekombinanten Substrat-Bindedomänen von Hsp70.1 und BiP. Die auf pASK-IBA35- $SBD_{Hsp70}$  und pASK-IBA35- $SBD_{BiP}$  kodierten Proteine wurden in löslicher Form im Cytoplasma von *E. coli* BL21 produziert und mittels IMAC aus dem Zellextrakt isoliert. Zur weiteren Reinigung wurde das SBD-Fragment von BiP einer Anionenaustausch-Chromatographie (A) und einer SEC (B) unterzogen. Im Fall des SBD-Fragments von Hsp70.1 erfolgte die weitere Reinigung lediglich durch SEC (C). Die mittels SEC ermittelten apparenten Molekülmassen sowie Durchbruch ( $V_0$ )- und Bettvolumina ( $V_t$ ) der mit PBS äquilibrierten Superdex 75-10/300GL-Säule sind angegeben. Die berechnete Molekülmasse beträgt bei beiden Proteinen 19,8 kDa. (D) SDS-PAGE (reduzierend) von  $SBD_{Hsp70}$  (1) und  $SBD_{BiP}$  (2) nach der Feinreinigung mittels SEC. M: Größenstandard.

### 3.2.3 Konstruktion eines Expressionsvektors, Produktion und Reinigung der Hsp70.1-Substrat-Bindedomäne in Fusion mit eGFP

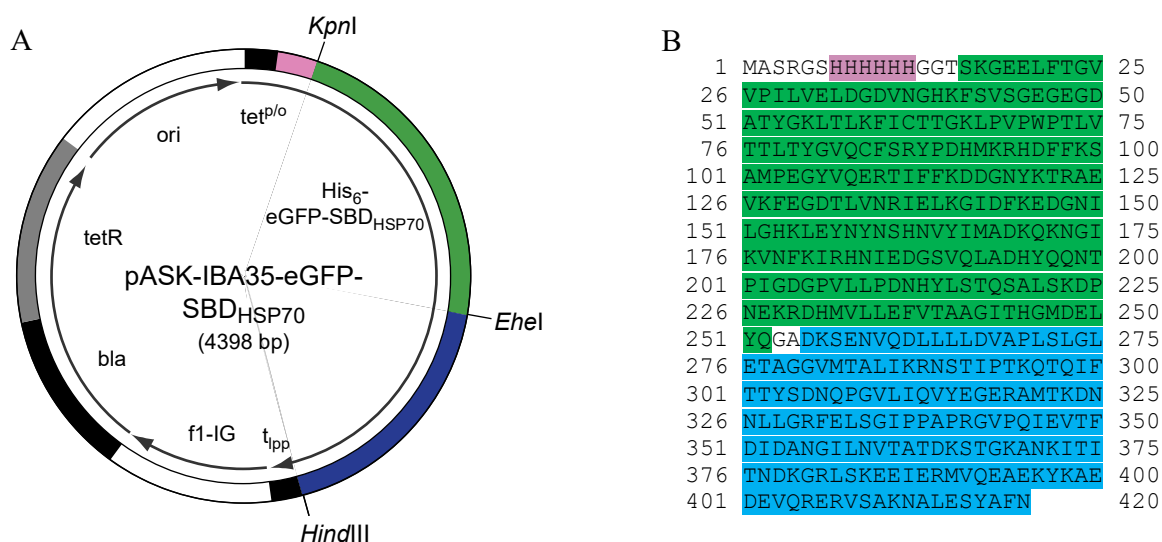
Zur Bereitstellung eines direkt im FACS-Instrument nachweisbaren „Antigens“ wurde eine mit dem Reporterprotein *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) fusionierte Version von SBD<sub>Hsp70</sub> konstruiert (Russo, 2015). Hierfür wurde die für eGFP kodierende Sequenz in einer PCR-Reaktion von pASK37-eGFP amplifiziert (Abbildung 3.17). Die verwendeten Primer eGFP\_for und eGFP\_rev erlaubten die Einführung von zwei zusätzlichen Codons für Glycin und Threonin am 5'-Ende des PCR-Produkts, welche als Abstandshalter zum N-terminalen His<sub>6</sub>-tag dienen sollten. Gleichzeitig bildete diese 5'-Erweiterung auf DNA-Ebene eine *KpnI*-Restriktionsschnittstelle, welche im Bedarfsfall den Austausch des eGFP-Teils im Expressionsplasmid ermöglichen sollte. Zum Erhalt der *EheI*-Schnittstelle von pASK-IBA35-SBD<sub>Hsp70</sub> bei der Insertion der eGFP-Sequenz in den mit *EheI* verdauten Vektor wurde das eGFP-Insert bei der PCR-Amplifikation zudem am 3'-Ende um das Glycin-Codon GCC verlängert. Die vom resultierenden Plasmid kodierte Aminosäuresequenz für das Fusionsprotein eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub> ist in Abbildung 3.18B dargestellt.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
5' -ggTAccTCTAAAGGTGAAGAAGCTTTTC-3' eGFP_for
ATGTCTAAAGGTGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAAATTTCTGTCACT
MetSerLysGlyGluGluLeuPheThrGlyValValProIleLeuValGluLeuAspGlyAspValAsnGlyHisLysPheSerValSer
GlyThrSerLysGlyGluGluLeuPhe
100     110     120     130     140     150     160     170     180
GGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAAGCTACCTGTTCCATGGCCAAACACTT
GlyGluGlyGluGlyAspAlaThrTyrGlyLysLeuThrLeuLysPheIleCysThrThrGlyLysLeuProValProTrpProThrLeu
190     200     210     220     230     240     250     260     270
GTCACACTTTGACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCGGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAA
ValThrThrLeuThrTyrGlyValGlnCysPheSerArgTyrProAspHisMetLysArgHisAspPhePheLysSerAlaMetProGlu
280     290     300     310     320     330     340     350     360
GGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTTCAAAGATGACGGGAAGCTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCCTTGT
GlyTyrValGlnGluArgThrIlePhePheLysAspAspGlyAsnTyrLysThrArgAlaGluValLysPheGluGlyAspThrLeuVal
370     380     390     400     410     420     430     440     450
AATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTTAAAGAAGATGGAACATCTTGGACACAAAATTGGAATACAACATAACTCACACAATGTA
AsnArgIleGluLeuLysGlyIleAspPheLysGluAspGlyAsnIleLeuGlyHisLysLeuGluTyrAsnTyrAsnSerHisAsnVal
460     470     480     490     500     510     520     530     540
TACATCATGGCAGACAAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAAACATGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGAC
TyrIleMetAlaAspLysGlnLysAsnGlyIleLysValAsnPheLysIleArgHisAsnIleGluAspGlySerValGlnLeuAlaAsp
550     560     570     580     590     600     610     620     630
CATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTACCAGACAACCATACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGAT
HisTyrGlnGlnAsnThrProIleGlyAspGlyProValLeuLeuProAspAsnHisTyrLeuSerThrGlnSerAlaLeuSerLysAsp
640     650     660     670     680     690     700     710     720
CCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTGTACCAAGCGCT
ProAsnGluLysArgAspHisMetValLeuLeuGluPheValThrAlaAlaGlyIleThrHisGlyMetAspGluLeuTyrGlnSerAla
eGFP_rev 3'-GTACCTACTTGACATGGTTCgG-5'
GlyMetAspGluLeuTyrGlnGly

```

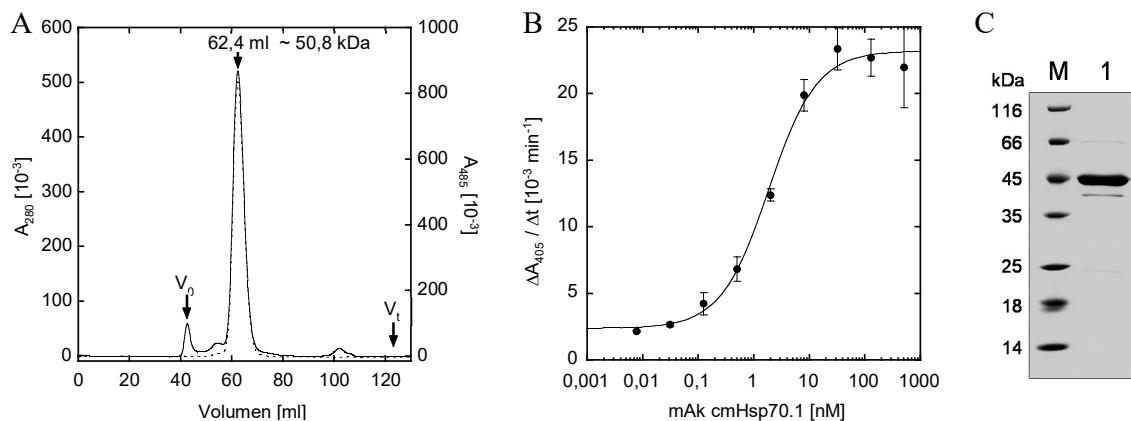
**Abbildung 3.17:** DNA- und Aminosäuresequenz des auf pASK37-eGFP kodierten eGFP. Zur Konstruktion eines Fusionsproteins bestehend aus einem N-terminalen eGFP-Teil und der Substrat-Bindedomäne von Hsp70 am C-Terminus wurde die kodierende Sequenz in einer PCR-Reaktion mit den Primern eGFP-for und eGFP\_rev amplifiziert und in die *EheI*-Restriktionsschnittstelle von pASK-IBA35-SBD<sub>Hsp70</sub> inseriert (vgl. Abbildung 3.14). Die durch die Primer angehängten Aminosäuren sind rot gekennzeichnet.



**Abbildung 3.18:** Schematische Darstellung des Vektors pASK-IBA35-eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub>. (A) Das Expressionsplasmid kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus einem N-terminalem His<sub>6</sub>-tag, eGFP (grün) und der Substrat-Bindedomäne von humanem Hsp70.1 (AS 383-548, blau). Die kodierenden Bereiche dieser Elemente sind durch die angegebenen singulären Restriktionsschnittstellen voneinander separierbar. (B) In der kodierten Aminosäuresequenz des Fusionsproteins sind die verschiedenen Teile in den entsprechenden Farben hervorgehoben.

Die Produktion von eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub> erfolgte im Cytoplasma von *E. coli* BL21. Mittels IMAC wurde das Fusionsprotein aus dem löslichen Teil des Zellextrakts isoliert. Nach Abschätzung durch SDS-PAGE-Analyse betrug die Reinheit des Proteins nach der IMAC auf  $\geq 95\%$  (Abbildung 3.19C). In der SEC zeigte eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub> sowohl annähernd die für das Monomer berechnete Molekülmasse (46,8 kDa) als auch die für eGFP charakteristische Absorption bei 495 nm. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Fluorophor des eGFP-Teils korrekt autokatalytisch ausgebildet wurde (Abbildung 3.19A). Protein-Oligomere bzw. Aggregate traten lediglich in vernachlässigbaren Konzentrationen auf, was auf die korrekte Faltung beider Teile des Fusionsproteins schließen ließ.

Für den Einsatz zur Selektion von Anticalin war vor allem die sterische Zugänglichkeit der SBD im eGFP-Fusionsprotein von Bedeutung. Da das Ziel die Selektion eines Anticalins mit der Fähigkeit zur Bindung des Membran-assoziierten Hsp70.1 war, stand die Zugänglichkeit in dieser Spezies exponierten Epitope im Vordergrund. Als Mindestanforderung galt die Zugänglichkeit des Epitops des cmHsp70.1-mAk, da für diesen Antikörper geeignete Bindungseigenschaften dokumentiert sind (Multhoff & Hightower, 2011). Daher wurde ein ELISA-Experiment durchgeführt, bei dem die konzentrationsabhängige Bindung des mAk cmHsp70.1 an das immobilisierte eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub>-Fusionsprotein nachgewiesen wurde (Abbildung 3.19B). Die durch nicht-lineare Regression mit Hilfe der Gleichung 5 (vgl. Abschnitt 2.6.1) ermittelte apparente Dissoziationskonstante entsprach mit 1,9 nM annähernd der auf gleiche Weise ermittelten  $K_D^{app}$  des Antikörpers für Vollängen-Hsp70.1 (vgl. Abschnitt 3.1.4). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass SBD<sub>Hsp70</sub>, welches sich nur durch die eGFP-Domäne als Bestandteil des Fusionsproteins unterscheidet, notwendige Epitope exponiert und somit für Selektionsexperimente geeignet sein sollte.



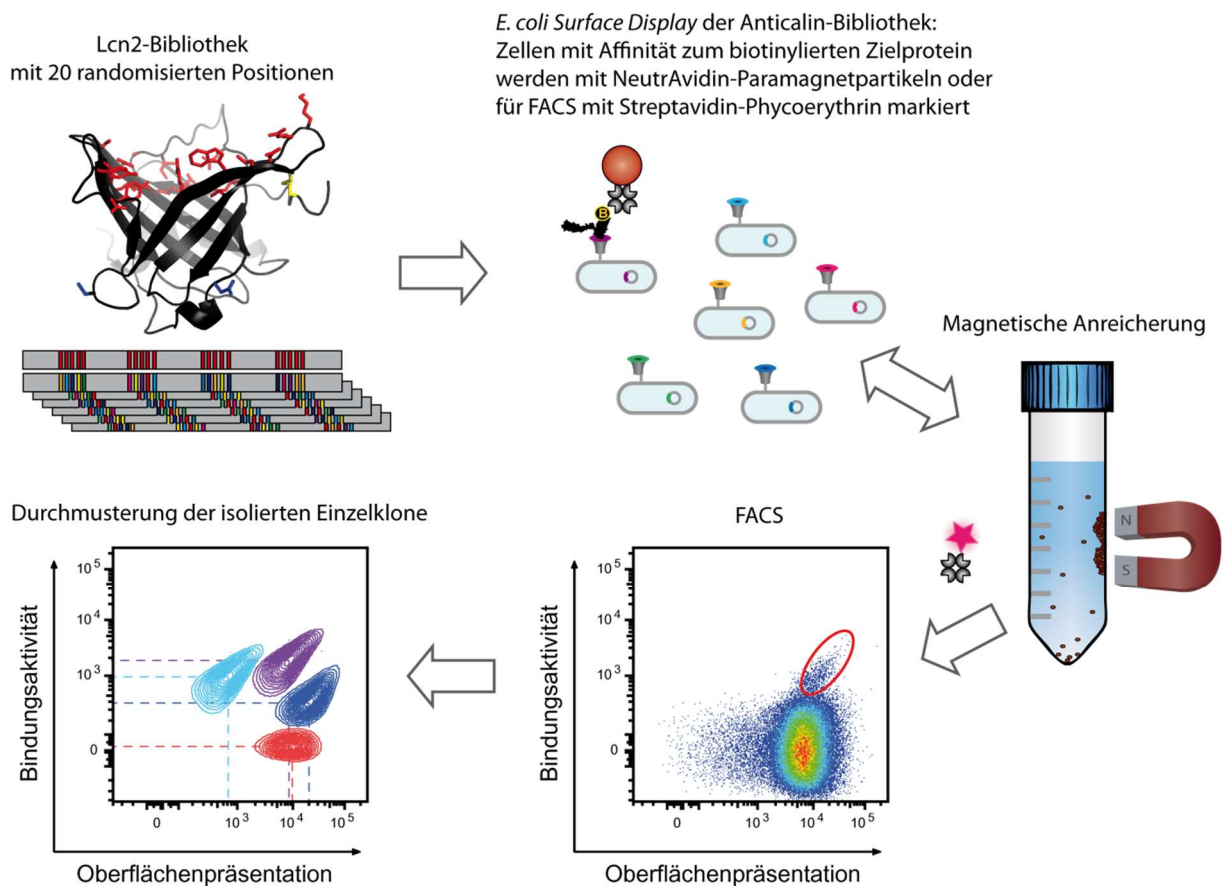
**Abbildung 3.19:** Charakterisierung des Fusionsproteins eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub>. (A) SEC-Profil des cytoplasmatisch in *E. coli* produzierten Fusionsproteins nach der Reinigung mittels IMAC. Die Absorptionswerte bei 280 nm (durchgezogene Linie) und bei 495 nm (gestrichelte Linie) wurden überlagert. Die mittels SEC ermittelte apparente Molekülmasse sowie  $V_0$  und  $V_t$  der Säule sind angegeben. Die berechnete Molekülmasse des Proteins beträgt 46,8 kDa. (B) ELISA zur Untersuchung der Affinität des mAk cmHsp70.1 zum immobilisierten eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub>. Als Sekundärreagenz zur Detektion der Bindung wurde Anti-Maus-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat verwendet. Durch Kurvenanpassung der zeitlichen Absorptionsänderung eines chromogenen Substrats in Abhängigkeit von der mAk-Konzentration wurde eine apparente  $K_D$  von 1,9 nM ermittelt. (C) Reduzierende SDS-PAGE vom Fusionsprotein nach der IMAC-Reinigung (1). M: Größenstandard.

### 3.3 Bakrielles *Surface Display* zur Selektion von Anticalinen gegen Hsp70

#### 3.3.1 Herstellung einer Anticalin-Bibliothek und Affinitätsanreicherung durch Adsorption von *E. coli*-Zellen an paramagnetische „Partikel“

Die in dieser Arbeit verfolgte Strategie zur Selektion eines Hsp70-bindenden Anticalins ist in Abbildung 3.20 illustriert. Grundlage für die Selektion war eine bereits vorliegende Bibliothek des Lcn2-Gens mit 20 randomisierten Positionen (Gebauer *et al.*, 2013). Die Auswahl dieser Positionen wurde auf Basis der verfügbaren Kristallstrukturen des wtLcn2-Proteins sowie der Strukturen eines für CTLA-4 und eines für Y•DTPA spezifischen Anticalins getroffen, wobei sich die mutierten Positionen auf den oberen Teil der kelchförmigen Kavität sowie die unteren Segmente der vier variablen Schleifen des Lipocalins konzentrierten. Durch zusätzlichen konservierten Aminosäureaustausch von Gln28 zu His wurde eine *Bst*XI-Schnittstelle in die DNA-Sequenz eingefügt, welche zusammen mit einer weiteren, bereits in der Lcn2-cDNA vorkommenden *Bst*XI-Schnittstelle die Subklonierung der zentralen Lipocalin-Genkassette vereinfacht. Ein weiterer festgelegter Aminosäureaustausch betraf das freie Cystein an Position 87, welches um die unerwünschte Reaktivität der Thiolseitenkette zu vermeiden, gegen Serin ausgetauscht wurde. Die Synthese der ortsspezifisch randomisierten und im Codon-Gebrauch an *E. coli* angepassten Lcn2-Genkassette wurde mit Hilfe der Slonomics-Technologie durchgeführt (Van den Brulle *et al.*, 2008). Diese Technologie erlaubte den Einbau von 19 ausgewählten Codons mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit. Hierbei handelte es sich um die Codons der

proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein. Die drei Stop-Codons waren ebenfalls vom Einbau ausgeschlossen. Der Vorzug dieser ausgeklügelten Technologie, welche auf der Triplet-weisen Ligierung von doppelsträngigen 18 bp-DNA-Bausteinen basiert, ist neben der stöchiometrischen Verteilung der ortsgerichtet randomisierten Codons die geringe Fehlerrate, insbesondere im Hinblick auf *Frame Shift*-Mutationen.



**Abbildung 3.20:** Strategie für die Isolierung von Hsp70-bindenden Anticalinen aus einer naiven Lcn2-Bibliothek mittels bakteriellem *Surface Display*. Lcn2-Varianten wurden mit Hilfe der EspP-Translokator-domäne auf der *E. coli*-Zelloberfläche präsentiert (vgl. Abbildung 1.3). Bakterien, welche das biotinylierte Zielprotein gebunden hatten, wurden mit NeutrAvidin beladenen Magnetpartikeln separiert. Die so isolierten Bakterien wurden in Kultur vermehrt. Nach einmaliger Wiederholung dieser Voranreicherung wurden fluoreszenzmarkierte Proteinreagenzien appliziert, mit denen sowohl die Antigen-Bindung als auch die Oberflächenpräsentation der Anticaline Durchfluss-Cytofluorimetrisch analysiert werden konnten. Nach der Sortierung wurden die Bakterien durch Kultivierung vermehrt und einem weiteren FACS-Zyklus unterzogen. Bei der individuellen Durchmusterung von Einzelklonen mittels Durchfluss-Cytofluorimetrie wurden Varianten mit vielversprechendem Bindungssignal identifiziert. Es folgten die Sequenzierung der Plasmid-DNA und nach entsprechender Umklonierung die Produktion der selektierten Anticaline in löslicher Form.

218 fmol der Genbibliothek entsprechend einer maximalen Komplexität von  $1,3 \times 10^{11}$  Genvarianten (von theoretisch  $19^{20} \approx 4 \times 10^{25}$  möglichen) wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer BSTXI\_for und BSTXI\_rev reamplifiziert, mit *Bst*XI verdaut und auf dem *Surface Display*-Vektor pNGAL146 kloniert (Abbildung 1.3; vgl. Abschnitt 2.3.1). Nach der

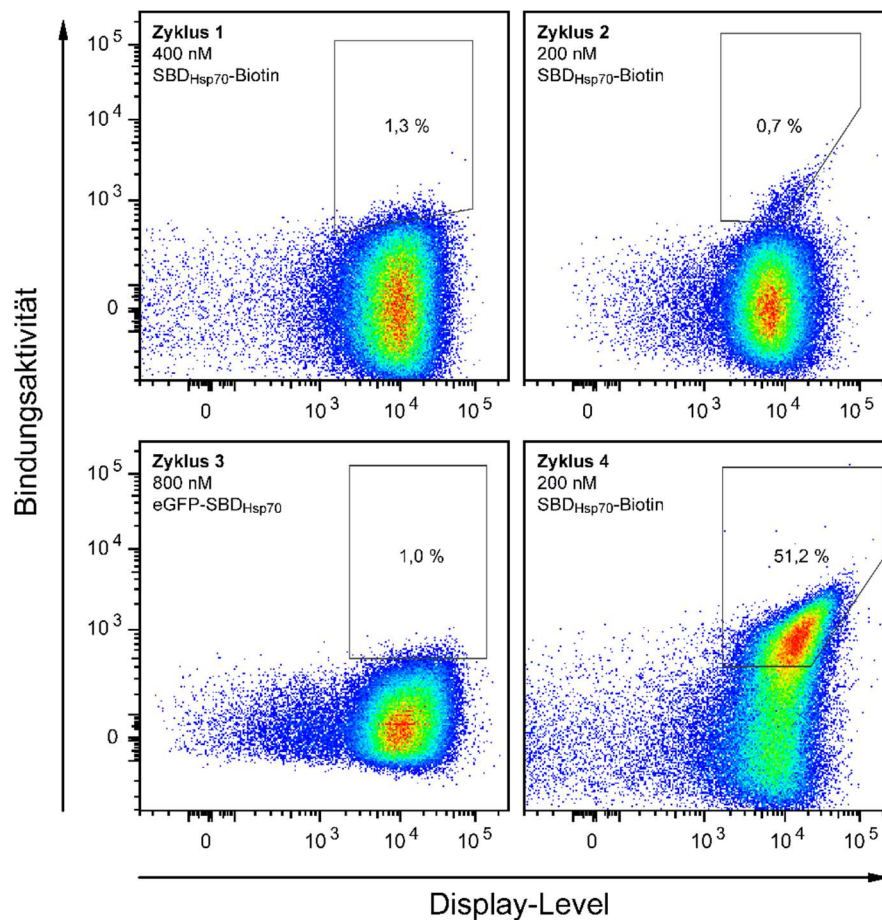
Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen mit dem Ligierungsprodukt wurde eine Transformandenanzahl von  $6 \times 10^9$  Kolonien ermittelt.

Für die effiziente Translokation der Anticalin-Fusionsproteine in die äußere Bakterienmembran ist die Ausbildung von Disulfidbrücken bei der Passage des bakteriellen Periplasmas zu verhindern, was durch die Verwendung des *dsbA*- Stamms *E. coli* JK321 ermöglicht wurde (Jose *et al.*, 1996; Binder *et al.*, 2010). In Anbetracht der limitierten Kapazität des FACS-Verfahrens mit ca.  $1 \times 10^8$  sortierten Zellen in einer praktikablen Zeitdauer (1 h), erschien es sinnvoll, die Komplexität der *E. coli*-Bibliothek vor dem FACS weiter zu reduzieren. Dazu wurde eine beim Hefe-*Surface Display* beschriebene Anreicherungsmethode unter Nutzung von paramagnetischen Partikeln verwendet (Yeung & Wittrup, 2002). Die auf Agarplatten kultivierten Transformanden wurden dabei in Flüssigkultur gebracht (vgl. Abschnitt 2.2.3) und während der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{550} \sim 0,5$ ; 30 °C) wurde durch Zugabe von aTc (10 ng/ml) die Oberflächenexpression des Anticalin-Fusionsproteins induziert. Nach 1,5 h wurden  $\sim 1 \times 10^{11}$  *E. coli*-Zellen (bestimmt durch  $A_{550}$ ) abzentrifugiert und mit PBS/BSA gewaschen (vgl. Abschnitt 2.3.2). Die Bakterien wurden zuerst in PBS/BSA mit 400 nM biotinylierter SBD<sub>Hsp70</sub> (Biotinylierungsgrad:  $\sim 1$ ) und nach erneutem Waschen mit NeutrAvidin-beschichteten Paramagnetpartikeln inkubiert. Auf diese Weise konnten Anticaline mit Affinität zur Substrat-Bindedomäne von Hsp70 angereichert werden. Nach magnetischer Separation wurden die Bakterien durch Kultivierung propagiert, wobei durch das Ausplattieren auf festem Agarmedium anstelle von Flüssigmedium die Überlebenschance für durch die Überexpression/Oberflächenpräsentation des Anticalins in ihrer Vitalität beeinträchtigte Bakterien verbessert werden sollte. Nach dem Abschaben des resultierenden Bakterienrasens und Überführung in Flüssigkultur wurde diese Anreicherungsprozedur einmal wiederholt.

### 3.3.2 Selektion von hHsp70.1-bindenden Anticalinen mittels FACS

Für die nachfolgende Selektion mittels FACS wurde die frisch kultivierte *E. coli*-Bibliothek aus der magnetischen Separation nach Induktion der Anticalin-Oberflächenexpression (vgl. Abschnitt 2.3.3) entweder mit der biotinylierten Hsp70-Substrat-Bindedomäne und anschliessend mit Streptavidin-Phycoerythrin (PE) (Selektionszyklen 1, 2 und 4) oder mit dem eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub>-Fusionsprotein (Zyklus 3) inkubiert. Die im FACS-Instrument gemessene PE- bzw. eGFP-Fluoreszenz korreliert mit der Bindungsaktivität der auf der äußeren Zellmembran von *E. coli* präsentierten Anticaline zum „Antigen“, wird jedoch ebenfalls durch die variable Konzentration der Anticaline auf der bakteriellen Zelloberfläche beeinflusst. Eine Normalisierung bzgl. des letztgenannten Parameters wurde durch die simultane Quantifizierung der Oberflächenpräsentation mit dem DY634-fluoreszenzmarkierten Anti-A3C5-Fab-Fragment, welches ein Epitop-tag im Verbindungsbereich des Fusionsproteins zwischen Anticalin und Transporter-Domäne erkennt, ermöglicht. Bei der Darstellung der jeweiligen Fluoreszenzsignale im zweidimensionalen Plot wirkt sich die natürliche Variation der Oberflächenexpressions in einer diagonalen Form der Punktwolken von Bakterien mit „Antigen“-Bindungsaktivität aus. Zur

Gewährleistung eines von der Präsentationsstärke unabhängigen Selektionsdrucks auf die Bindungsaktivität, wurde das Sortier-Fenster entsprechend angepasst.



**Abbildung 3.21:** FACS einer *E. coli*-Bibliothek nach der magnetischen Voranreicherung. Im ersten, dritten und vierten Zyklus wurden die Zellen mit biotinylierter SBD<sub>Hsp70</sub> inkubiert. Die Bindungsaktivität der einzelnen Zellen wurde anhand der Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE)-Fluoreszenz bestimmt und gegen die Anticalin-Oberflächenexpression, welche durch Färbung mit DY634-gekoppeltem A3C5-Fab-Fragment ermittelt wurde, aufgetragen. Zur Vermeidung einer Anreicherung von Anticalinen mit Affinität zu SA-PE wurde im dritten Zyklus das Fusionsprotein eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub> als alternatives Reagenz für die Messung der Bindungsaktivität verwendet. Der prozentuale Anteil der selektierten Zellen von der Gesamtheit der analysierten Zellen wurde innerhalb der polygonen Sortier-Fenster angegeben.

Ein strategisches Problem bei der Selektion von Bindeproteinen aus naiven Bibliotheken ist die Anreicherung von Bindern mit Affinität für die verwendeten Sekundärreagenzien anstelle des „Antigens“. Aufgrund der im Vergleich zum Target zumeist deutlich höheren Konzentrationen in denen die Sekundärreagenzien (hier z.B. Streptavidin-Phycoerythrin) eingesetzt werden, erhalten schon Sekundärreagenz-Binder mit moderater Affinität einen Selektionsvorteil und drohen die äußerst geringe Zahl hochaffiner „Antigen“-Binder zu überwachen. Ein derartiger Selektionsvorteil ist auch für präsentierte Proteine denkbar, die beispielsweise durch Fehlfaltung hydrophobe Sequenzbereiche an ihrer Oberfläche exponieren. Durch unspezifische hydrophobe



Wechselwirkungen mit den Sekundärreagenzien könnten derartige nicht-selektive Binder angereichert werden.

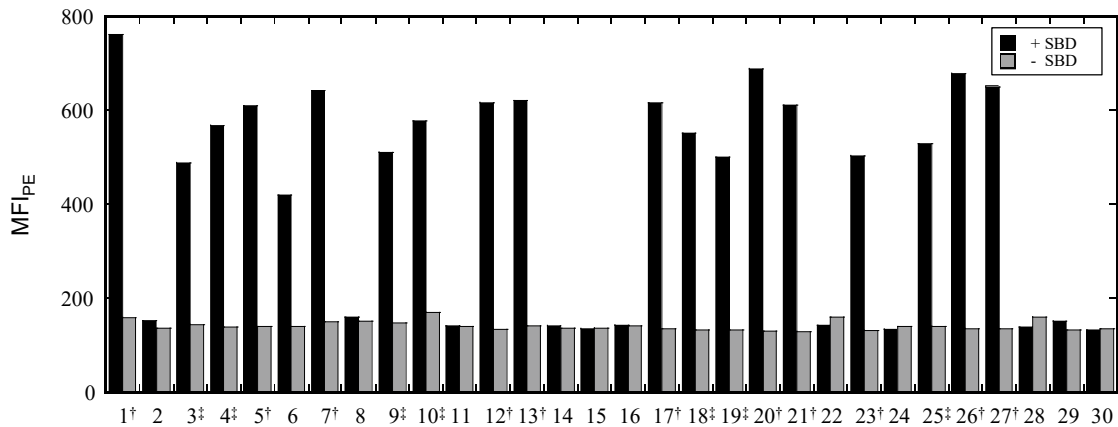
Um die Anreicherung nicht-selektiver oder Sekundärreagenz-spezifischer Anticaline zu verhindern, wurden drei taktische „Kniffe“ angewandt:

1. Von NeutrAvidin (einer deglykosylierten Version von Avidin mit annähernd neutralem pI) als sekundäres Bindungsreagenz bei der magnetischen Voranreicherung wurde beim FACS zu Streptavidin (im Konjugat mit Phycoerythrin) gewechselt, welches nur etwa 30 % Sequenzübereinstimmung mit NeutrAvidin aufweist.
2. Während in den Selektionszyklen 1, 2 und 4 biotinylierte SBD<sub>Hsp70</sub> als „Antigen“ und Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) als Sekundärreagenz eingesetzt wurde, wurde in Zyklus 3 unmittelbar durch die Eigenfluoreszenz nachweisbares eGFP-SBD<sub>Hsp70</sub> verwendet.
3. Um nicht-selektive Binder auszusortieren, wurde simultan zu den beiden schon genannten Fluoreszenzkanälen („Antigen“-Bindungsaktivität und Oberflächenpräsentation) ein dritter Fluoreszenzkanal benutzt, in dem die Bindung zum nicht mit dem Target verwandten Ovalbumin detektiert wurde. Die 5 % der analysierten Bakterien mit dem höchsten Ovalbumin-Bindungssignal wurden durch Setzen eines entsprechenden Sortier-Fenster vom positiven Selektionsprozess ausgeschlossen (ohne Abbildung). In den Zyklen 1, 2 und 4 wurde Fluorescein-markiertes Ovalbumin unmittelbar ohne ein weiteres Sekundärreagenz benutzt. In Zyklus 3 wurde biotinyliertes Ovalbumin eingesetzt und mit Hilfe von SA-PE als Sekundärreagenz detektiert. Somit fand in Zyklus 3 neben der positiven Selektion von „Antigen“-Bindern gleichzeitig eine negative Selektion von Klonen mit Affinität für SA-PE statt.

Während beim Vergleich der 2D-Plots zwischen magnetisch vorangereicherter und naiver *E. coli*-Bibliothek nur marginale Unterschiede auftraten (ohne Abbildung), zeigte sich bereits nach dem ersten Zyklus beim FACS aus der vorangereicherten Bibliothek eine distinkte Bakterienpopulation mit erhöhtem Affinitätssignal (Abbildung 3.21). Bei Verwendung von eGFP-Fluoreszenz anstelle von PE zur Detektion der Target-Affinität in Zyklus 3 wurde das Bindungssignal im Vergleich zum vorherigen Zyklus schwächer und die separate Population war nicht mehr zu erkennen, was vermutlich auf die geringere Leuchtkraft von eGFP im Vergleich zu PE zurückzuführen war (Eser *et al.*, 2009). Bei der Inkubation mit SBD<sub>Hsp70</sub>-Biotin und Streptavidin-PE im darauffolgenden Zyklus zeigten über 50 % der analysierten Zellen starke Bindungssignale.

Nach dem vierten Selektionszyklus wurden 30 Klone auf einer Agar-Kulturplatte isoliert, kultiviert und mittels Durchfluss-Cytofluorimetrie individuell auf Bindungsaktivität für SBD<sub>Hsp70</sub> untersucht (vgl. Abschnitt 2.3.4). Hierbei zeigten 19 der Klone eindeutige „Antigen“-Bindung. Keiner der Klone ergab Bindungssignale gegenüber dem sekundären Nachweisreagens Streptavidin-PE alleine. Die Sequenzierung der 19 positiven Klone nach erfolgter Plasmid-Präparation zeigte nur zwei verschiedene DNA-Sequenzen, welche für unterschiedliche Aminosäuresequenzen kodierten und als BBG1 und BBG10 bezeichnet wurden (Abbildung 3.22).





**Abbildung 3.22:** Durchfluss-Cytofluorimetrische Durchmusterung von Klonen nach Bindungsaktivität gegenüber SBD<sub>Hsp70</sub>. Kulturen von 30 selektierten Klonen aus der Lcn2-Bibliothek wurden mit biotinylierter SBD<sub>Hsp70</sub> inkubiert. Zur Detektion der Antigenbindung wurden die Zellen hierauf mit Streptavidin-PE gefärbt und die mittleren Fluoreszenzintensitäten gemessen (schwarze Balken). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Streptavidin-PE ohne SBD<sub>Hsp70</sub> inkubiert (graue Balken). Bei der Sequenzierung der Klone zeigte sich, dass alle Klone mit signifikantem Bindungssignal eine von zwei verschiedenen Proteinsequenzen exprimierten. Die Sequenzen wurden mit BBG1 (Kreuz) und BBG10 (Doppelkreuz) bezeichnet.

Im Alignment der Aminosäuresequenzen beider Klone mit der Sequenz von Lcn2 konnten, wie erwartet, alle Aminosäureaustausche an einer der 20 randomisierten Positionen stattfinden (Abbildung 3.23). Bemerkenswerterweise entsprachen allerdings bei der Sequenz des Klons BBG1 drei und bei BBG10 vier der 20 randomisierten Positionen der Wildtypsequenz. Auffällig war auch die starke Sequenzähnlichkeit beider Klone im Bereich der Schleife #4, wobei die Aminosäuren an zwei der randomisierten Positionen identisch (Y132, Q134) und an zwei weiteren Positionen bezüglich ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften konserviert waren (K/R125, L/I127).

```

      1      10      20      30      40      50      60
Lcn2  QDSTSDLIPÄPPLSKVPLQÖNFQDNQFQÖKWYVVGLAGNÄILREDKDPÖKMYATIYELKÖ
BBG1  .....h.....N...WL.....L..W.....
BBG10 .....h.....HF.....P.....
                =====A===== #1 =====B=====

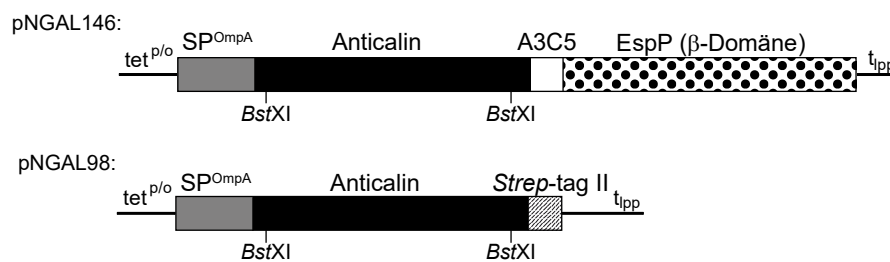
      70      80      90      100     110     120
Lcn2  DKSYNVTSVLFRKKKCDYWIRTFVPGCQPGFETLGNIKSYPLGTSYLVRVSTNYNQHAM
BBG1  .....V.G.E...H.T.I...s.....K...N..W..N.....
BBG10 .....Y.R.E...E.F.H...s.....Q...R..M..V.....
                ===C=== #2 =====D===== ==E===== #3 =====F=====

      130     140     150     160     170
Lcn2  VFFKKVSNREYFKITLYGRTEKELTSELKÖNFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG
BBG1  .....L.....Q.....
BBG10 .....R.I.....Q.....
                =G===== #4 =====H=====

```

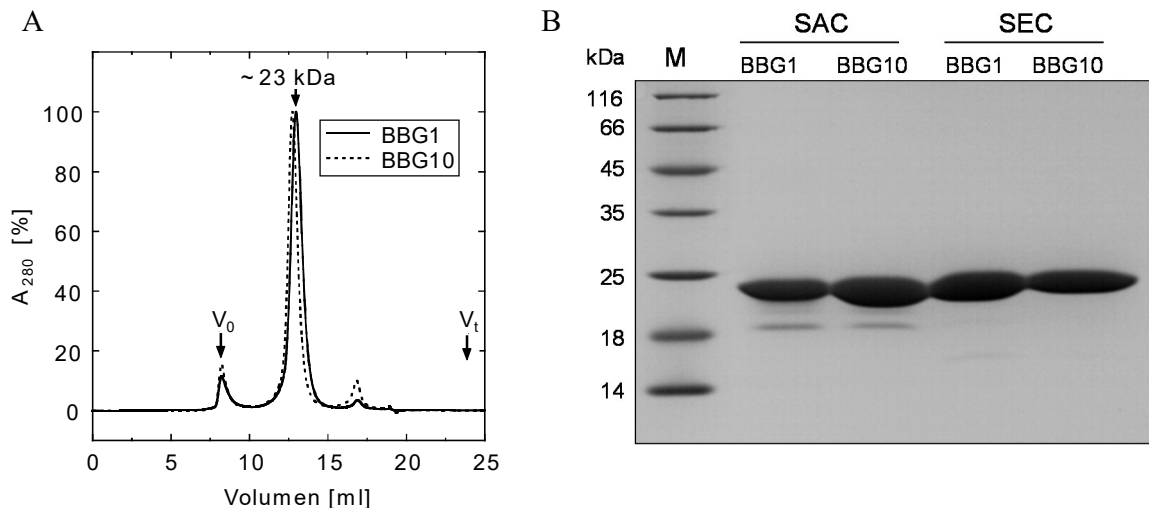
**Abbildung 3.23:** Alignment der Aminosäuresequenzen der selektierten Anticaline BBG1 und BBG10 mit der Sequenz des Lipocalin-2 (Lcn2; UniProt-Kennziffer P80188). Die zwanzig randomisierten Positionen der bei der Selektion verwendeten Lcn2-Bibliothek sind unterstrichen (Gebauer *et al.*, 2013). Zusätzliche fixe Änderungen der Aminosäuresequenz sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Die acht strukturell konservierten  $\beta$ -Stränge A-H sowie die vier flexiblen Schleifen an der offenen Seite des  $\beta$ -Barrels sind annotiert.

Zur weiteren Charakterisierung der selektierten Anticaline wurden die Proteine in löslicher Form produziert. Hierfür wurden die als Plasmid-DNA präparierten pNGAL146-Derivate mit *Bst*XI verdaut und die Anticalin-Genkassette auf dem Expressionsvektor pNGAL98 subkloniert (Abbildung 3.24). Dieser ermöglicht die Fusion der Anticalinsequenz mit der OmpA-Signalsequenz am N-Terminus für den Transport ins Periplasma und einem *Strep*-tag II für die Proteinreinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC). Durch die Verwendung des *dsbA*<sup>+</sup> *E. coli*-Stamms JM83 wurde die Ausbildung der konservierten Disulfidbrücke in der Anticalinstruktur gewährleistet.



**Abbildung 3.24:** Schematischer Vergleich der zum Anticalin-Surface Display sowie zur Produktion des Anticalins in löslicher Form verwendeten Genkonstrukte. Das Plasmid pNGAL146 ermöglichte die Expression eines Anticalins in Fusion mit der OmpA-Signalsequenz ( $SP^{OmpA}$ ) für den anfänglichen Transport ins bakterielle Periplasma und der Translokator-Domäne des *E. coli*-Autotransporterproteins EspP (vgl. Abbildung 1.3) unter der Kontrolle des induzierbaren *tetA*-Promotors/Operators ( $tet^{p/o}$ ). Das die beiden Domänen verbindende A3C5-Epitop ermöglichte die Quantifizierung der Anticalinpräsentation auf der Zelloberfläche. Der  $\rho$ -unabhängige Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{pp}$ ) bildet den Abschluss der Transkriptionseinheit. Der Expressionsvektor pNGAL98 ermöglicht die sekretorische Produktion des Anticalins im periplasmatischen Raum von *E. coli*, wobei die Isolierung des löslichen Proteins durch das *Strep*-tag II vereinfacht wurde. Der Transfer des zentralen Teils der Anticalin-kodierenden Region von einem der Vektoren zum anderen wurde durch die *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen ermöglicht.

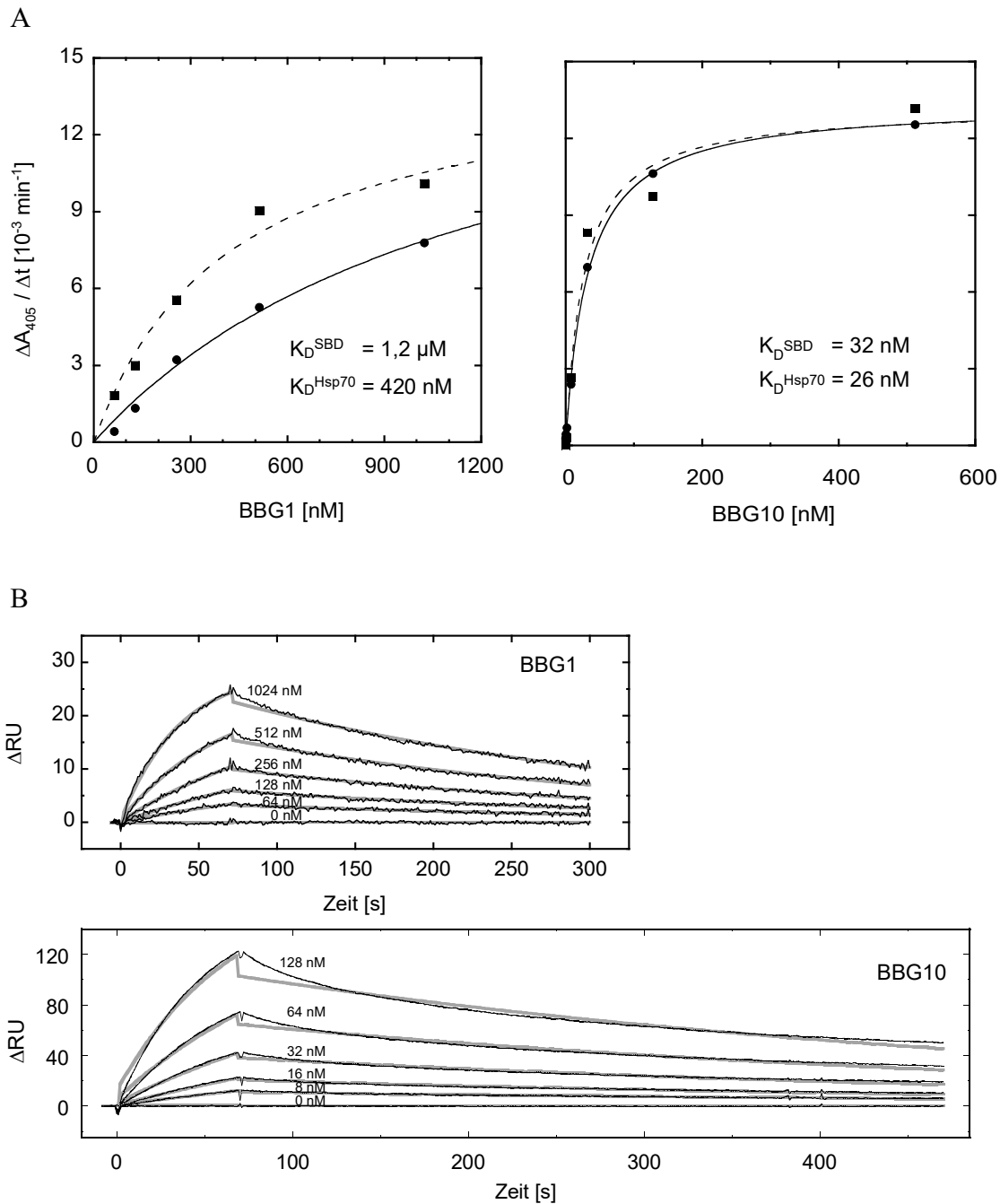
Nach der Isolierung der im Schüttelkolben produzierten Anticaline mittels SA-Affinitätschromatographie und SEC wurde die Homogenität der Proteine mittels SDS-PAGE nachgewiesen (Abbildung 3.25). Im SEC-Elutionsprofil erschienen beide Anticaline monodispers mit einer apparenten Molekülmasse ( $\sim 23$  kDa) entsprechend dem Monomer, welches mit 21,7 kDa (BBG1) bzw. 21,9 kDa (BBG10) berechnet wurde. Die Proteinausbeuten nach der SEC-Feinreinigung betragen 0,85 mg je Liter Kulturmedium für BBG1 und 0,33 mg/L für BBG10.



**Abbildung 3.25:** Reinigung und Charakterisierung der Anticaline BBG1 und BBG10. (A) Feinreinigung und Analyse der mittels SAC aus dem Periplasmaextrakt isolierten Anticaline durch SEC. Die hierbei ermittelten apparenten Molekülmassen sowie Durchbruch- ( $V_0$ ) und Bettvolumina ( $V_t$ ) der in PBS äquilibrierten SEC-Säule (Superdex 75 10/300 GL) sind angegeben. Die berechneten Molekülmassen der Proteine betragen 21,7 kDa (BBG1) und 21,9 kDa (BBG10). (B) SDS-PAGE (reduzierend) der Anticaline nach SAC und SEC. M: Proteingrößenstandard.

Die „Antigen“-Bindungseigenschaften beider Anticaline wurden mittels ELISA und Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Analytik charakterisiert. Für das ELISA-Experiment wurde entweder das in biotinylierter Form auch zur Selektion benutzte Fragment der Hsp70.1-Substrat-Bindedomäne,  $SBD_{Hsp70}$ , oder rekombinantes intaktes Hsp70, rhHsp70.1, immobilisiert. Nach Inkubation der so vorbehandelten Mikrotiterplatten-Vertiefungen mit den gereinigten Anticalinen in einer Konzentrationsreihe wurden die Anticalin/„Antigen“-Komplexe durch Einsatz von Alkalische Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin anhand einer Farbreaktion quantifiziert. Hierbei zeigten beide Anticaline sowohl mit dem zur Selektion eingesetztem Hsp70-Fragment als auch mit dem Volllängenprotein bindungstypische Sättigungskurven (Abbildung 3.26A). Die Anpassung der Messwerte an das Massenwirkungsgesetz (vgl. Abschnitt 2.6.1) erlaubte die Berechnung apparter Dissoziationskonstanten ( $K_D^{app}$ ) für die Komplexe der Anticaline mit den beiden Hsp70-Varianten. Das Anticalin BBG10 zeigte mit  $K_D^{app}$ -Werten von  $\sim 30$  nM eine deutlich höhere Affinität für beide Hsp70-Varianten als BBG1, welches  $K_D^{app}$ -Werte von 420 nM für Hsp70 bzw. 1,2  $\mu$ M für die  $SBD_{Hsp70}$  aufwies.

In SPR-Experimenten mit dem kovalent immobilisiertem rhHsp70.1 zeigten beide Anticaline typische Bindungskurven (Abbildung 3.26B). Die ermittelten Dissoziationskonstanten waren mit 153 nM für BBG1 und 12,5 nM für BBG10 niedriger als im ELISA-Experiment. Beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten zeigen beide Anticaline vergleichbare  $k_{off}$ -Werte mit Dissoziations-Halbwertszeiten von 3,4 min für BBG1 und 5,5 min für BBG10. Der Unterschied im  $K_D$ -Wert war hauptsächlich auf die 7,4-fach langsamere Assoziation ( $k_{on}$ ) von BBG1 mit rhHsp70.1 zurückzuführen.



**Abbildung 3.26:** (A) Bestimmung der Bindungsaktivität von BBG1 und BBG10 mittels ELISA. In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde entweder rhHsp70.1 (durchgezogene Linien) oder SBD<sub>Hsp70</sub> (gestrichelte Linien) immobilisiert. Die Komplexbildung der Anticaline BBG1 (links) und BBG10 (rechts) mit den rekombinanten Antigenen wurde photometrisch durch chromogene Reaktion mit SA-Alkalische Phosphatase detektiert. Durch nicht-lineare Regression nach dem Massenwirkungsgesetz wurden apparente Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für die unterschiedlichen Antigene ermittelt. (B) Analyse der Bindungskinetik von BBG1 und BBG10 mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR). rhHsp70.1 wurde kovalent auf der Oberfläche eines Carboxydextran-Goldchips immobilisiert. Die Anticaline wurden in Konzentrationsreihen über den SPR-Chip geleitet und die massenabhängige Veränderung des Plasmonresonanzwinkels gegen die Zeit aufgetragen. Durch Anpassung der Daten an ein Langmuir-Bindungsmodell gemäß 1:1-Stöchiometrie wurden folgende Bindungsparameter ermittelt:  $k_{\text{on}}^{\text{BBG1}} = 2,25 \times 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{off}}^{\text{BBG1}} = 3,45 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;  $K_D^{\text{BBG1}} = 153 \text{ nM}$ ;  $k_{\text{on}}^{\text{BBG10}} = 1,675 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{off}}^{\text{BBG10}} = 2,086 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ;  $K_D^{\text{BBG10}} = 12,5 \text{ nM}$ .

### 3.4 Affinitätsmaturierung des $\alpha$ Hsp70-Anticalins BBG10

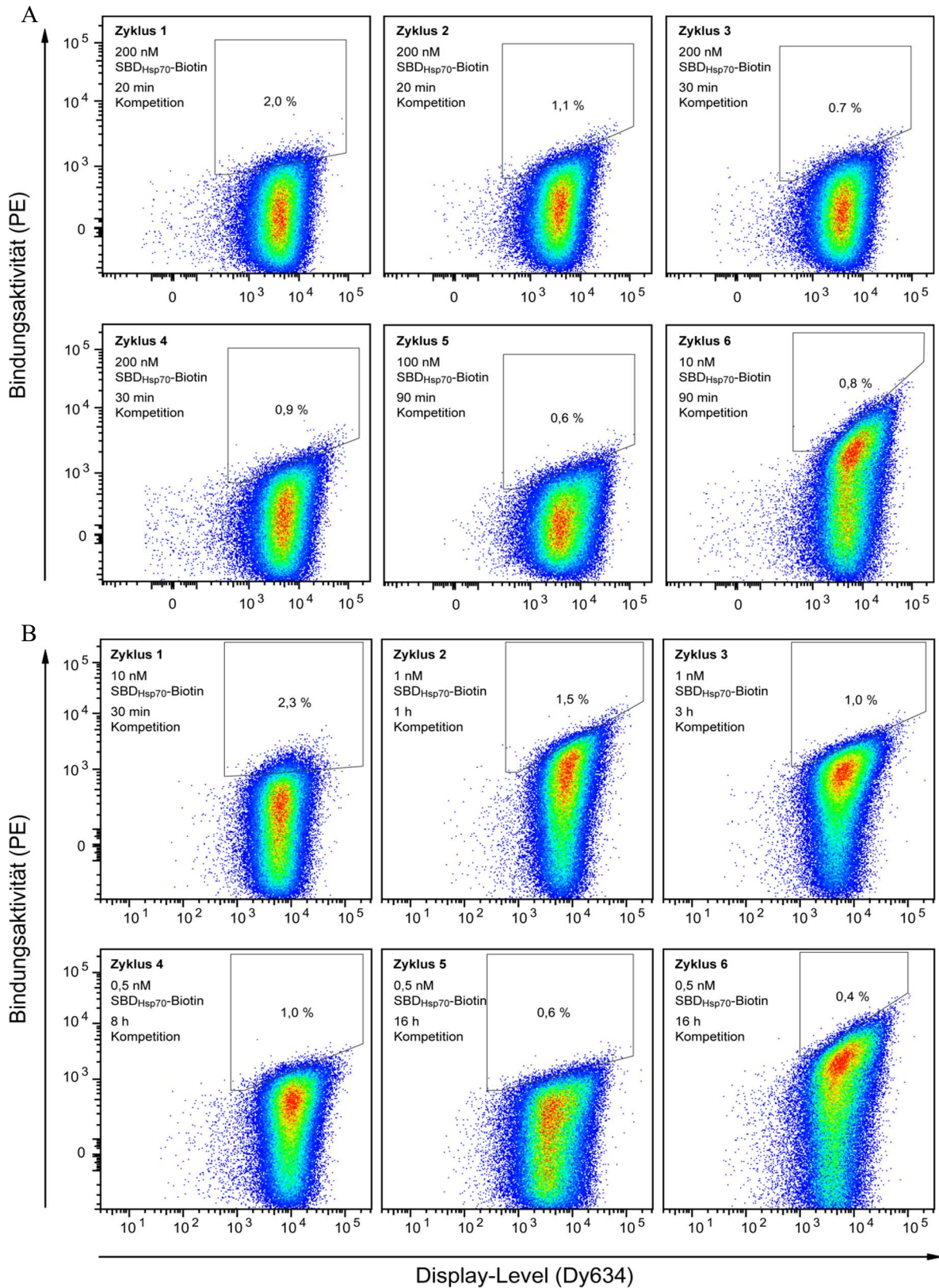
Trotz seiner hinreichend hohen „Antigen“-Affinität, zeigte der BBG10/Hsp70-Komplex in SPR-Experimenten eine rasche Dissoziation mit einer Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}$ ) von weniger als 6 min. Demzufolge wurde BBG10 einer auf die Optimierung der kinetischen Parameter der Komplexbildung ausgerichteten Affinitätsmaturierung unterzogen („Kinetic Screening“; Boder & Wittrup, 1998). Dabei wurde eine publizierte Vorgehensweise verfolgt, die wiederum auf *E. coli*-Surface Display basierte und womit die  $k_{\text{off}}$ -Geschwindigkeit eines gegen CTLA-4 gerichteten Anticalins um mehr als das Achtfache verlangsamt werden konnte (Binder *et al.*, 2010).

#### 3.4.1 Erzeugung einer partiell randomisierten Anticalin-Bibliothek durch Zufallsmutagenese und FACS-Anreicherung gegen Hsp70

Der zentrale Bereich des BBG10-Gens zwischen den beiden zur Klonierung verwendeten *Bst*XI-Schnittstellen (Basenpositionen 151-529 des Anticalin-Leserahmens von pNGAL98-BBG10) wurde einer zufallsbasierten Mutagenese unterzogen. Bei der hierfür verwendeten *Error-Prone*-PCR kommt ein Gemisch aus zwei fehleranfälligen DNA-Polymerasen zum Einsatz, welche bei der DNA-Amplifizierung Punktmutationen in den durch die Primer (Oligodesoxynukleotide *Bst*XI\_for und *Bst*XI\_rev) definierten Sequenzbereich einführen (vgl. Abschnitt 2.2.7.5). Dabei fanden sowohl Transitionen als auch Transversionen statt. Die Mutationsrate wurde durch die Zahl an Amplifizierungszyklen aufgrund der Menge an eingesetzter Matrize gesteuert und nach der Klonierung des PCR-Produkts auf pNGAL146 durch Sequenzierung der präparierten Plasmid-DNA von zehn transformierten *E. coli*-Klonen ermittelt. Die Sequenzanalysen zeigten im Durchschnitt fünf Basenaustausche (entsprechend drei Aminosäureaustauschen) pro Lipocalingen.

Zur Herstellung der *Surface Display*-Bibliothek wurden 1,3  $\mu\text{g}$  des mit *Bst*XI verdauten und gereinigten *Error-Prone*-PCR-Produkts mit 14,1  $\mu\text{g}$  des durch *Bst*XI-Verdau erhaltenen pNGAL146-Vektorrückgrats ligiert und zur Transformation elektrokompenter Zellen des dsbA<sup>-</sup> *E. coli*-Stamms JK321 verwendet, wobei  $2,46 \times 10^9$  Transformanten erhalten wurden. Nach Überführung der Zellen in Flüssigkultur und Induktion der Anticalin-Expression mit 5 ng/ml aTc für 1,5 h erfolgte die Selektion verbesserter BBG10-Varianten durch FACS. Die Vorgehensweise entsprach weitgehend der Selektion aus der naiven Bibliothek (vgl. Abschnitte 2.3.3 und 3.3.2).

Mit dem Ziel der Selektion von Varianten mit verminderter Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) wurden die Bakterienzellen nach der Komplexbildung mit SBD<sub>Hsp70</sub>-Biotin mit PBS/BSA gewaschen und für einen definierten Zeitraum unter Konkurrenz mit einem Überschuss von unmarkiertem SBD<sub>Hsp70</sub>-Protein (10  $\mu\text{M}$  in PBS/BSA) weiter inkubiert. Dies sollte die Dissoziation von „Antigen“/Anticalin-Komplexen mit geringen Halbwertszeiten ermöglichen und diese somit von der Detektion und Selektion im FACS ausschließen. Um einen Selektionsdruck auf die Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) bzw. die Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ) auszuüben, wurde die Konzentration des biotinylierten „Antigens“ im Verlauf der Selektion schrittweise von 200 nM auf 10 nM reduziert (Abbildung 3.27A).



**Abbildung 3.27:** Affinitätsmaturierung des Hsp70-bindenden Anticalins BBG10. Eine auf BBG10 basierende Zufalls-Bibliothek wurde auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen präsentiert. FACS wurde entweder mit (A) oder ohne (B) vorhergehende Magnet-Anreicherung durchgeführt. Die Dot-Plots stellen die fluorimetrisch detektierten *E. coli*-Zellen entsprechend ihrer „Antigen“-Bindung (markiert mit Streptavidin-PE) und der Anticalin-Oberflächenexpression (detektiert mit DY634-markiertem A3C5-Fab) ab. In den polygonen Sortierfenster ist der prozentuale Anteil sortierter Zellen an der Gesamtheit aller analysierten Zellen angegeben.

Das an den Bakterienzellen verbliebene SBD<sub>Hsp70</sub>-Biotin wurde durch Streptavidin-PE im FACS-Instrument detektiert, während durch den simultanen Einsatz des mit DY634 gekoppelten A3C5-Fab-Fragments die von Zelle zu Zelle variierende Anticalin-Oberflächenpräsentation durch Verwendung diagonaler Sortier-Fenster berücksichtigt wurde. Wie zuvor wurde mit Fluorescein markiertes Ovalbumin in einem dritten Fluoreszenz-Kanal gemessen und zur Ausgrenzung von Zellen mit unspezifischen Bindungseigenschaften genutzt.

Nach sechs Selektionszyklen wurden zehn Klone von einer Kulturplatte isoliert und nach Präparation der Plasmid-DNA sequenziert. Hierbei wurden vier verschiedene Nukleotidsequenzen identifiziert, welche für zwei unterschiedliche Anticalin-Aminosäuresequenzen kodierten. Die Aminosäuresequenzen der als BBG10A und BBG10B bezeichneten Klone wiesen zwei bzw. drei Aminosäureaustausche auf, wobei die Mutation G102D in beiden Klonen auftrat (Abbildung 3.28).

Zur weiteren Optimierung der Affinitätsmaturierung mittels *Bacterial Surface Display* wurde die Selektion ausgehend von derselben Mutagenese-Bibliothek mit zwei Änderungen wiederholt: 1. die Bibliothek wurde der Voranreicherung mit paramagnetischen Partikeln unterzogen (vgl. Abschnitt 3.3.1); 2. durch Verlängerung der Dissoziationsperiode auf bis zu 16 h und Senkung der Konzentration des eingesetzten biotinylierten „Antigens“ auf Werte unterhalb des  $K_D$ -Werts (12,5 nM) während der gesamten Selektion wurde der Selektionsdruck erhöht (Abbildung 3.27B).

Die magnetische Vorselektion der Bibliothek erfolgte wie in den Abschnitten 2.3.2 und 3.3.1 beschrieben. Die eingesetzte Konzentration des biotinylierten SBD<sub>Hsp70</sub> betrug 1 nM; auf eine zusätzlichen Dissoziationsphase zur Abreicherung schnell-dissozierender Binder (wie beim späteren FACS) wurde hierbei verzichtet. Im Unterschied zur magnetischen Vorselektion der naiven Bibliothek wurden mit Streptavidin anstelle von mit NeutrAvidin beschichtete paramagnetische Partikeln verwendet, und es wurde auf eine Wiederholung der Voranreicherung verzichtet. Nach dem vierten FACS-Zyklus wurden 15 und nach dem sechsten Zyklus wurden weitere 10 Kolonien isoliert um anschließend die Plasmid-kodierten Anticalin-Gene zu sequenzieren. Es wurden nach dem vierten Zyklus sechs individuelle Aminosäuresequenzen (BBG10C, BBG10D, BBG10E, BBG10F, BBG10G, BBG10H) und nach dem sechsten Zyklus drei verschiedene Aminosäuresequenzen identifiziert, wobei neben den beiden schon zuvor aufgetretenen Varianten BBG10C und BBG10H eine weitere Sequenz gefunden wurde, welche als BBG10I bezeichnet wurde.

Aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen aller während der Affinitätsmaturierung selektierten Varianten (Abbildung 3.28) ließen sich Positionen ausmachen, welche mit erhöhter Frequenz Aminosäureaustausche aufwiesen. So zeigten zwei Drittel der identifizierten Varianten Mutationen an den Positionen 81 und 102. Bei letzterer handelte es sich in allen Fällen um den Austausch von Glycin zu Aspartat. Position 81 ist eine der 20 randomisierten Positionen der ursprünglichen Lcn2-Bibliothek. In drei der neun selektierten Anticalinsequenzen wurde His81 gegen Arginin ausgetauscht, welches an dieser Position auch in der Sequenz des Wildtyp-Lcn2

vorkommt. Bei zwei weiteren Sequenzen wurde das Histidin an dieser Position gegen Phenylalanin ausgetauscht. Zudem traten die Mutationen R43W, F71S und S99G jeweils zweimal auf.

```

      1      10      20      30      40      50      60
BBG10  QDSTSDLIPÄPPLSKVPLQÖNFQDNQFhGKWKYVVGLAGNHFLREDKDPKMYATIYELKE
BBG10A  .....
BBG10B  .....S.....
BBG10C  .....
BBG10D  .....W.....
BBG10E  .....
BBG10F  .....
BBG10G  .....S.....R.....
BBG10H  .....
BBG10I  .....W.....
Lcn2    .....Q.....AI.....Q.....
          =====A===== #1 =====B=====

      70      80      90      100     110     120
BBG10  DKSYNVTYVRFELKKCEYFIHTFVPGsQPGEFTLGQIKSRPGMTSVLVVRVSTNYNQHAM
BBG10A  .....R.....D.....
BBG10B  .....Q.....D.....
BBG10C  .....S.....R.....G..D.....
BBG10D  .....I.....
BBG10E  .....G...D..F.....
BBG10F  .....F.....
BBG10G  .....S.....R.....D.....
BBG10H  .....R.....NG.SD.....
BBG10I  .....D.....
Lcn2    .....S.L.RK...D.W.R....C.....N...Y..L..Y.....
          ===C===-#2-====D=====E-----#3-----F=====

      130     140     150     160     170     178
BBG10  VFFKRVIQNRYFQITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID
BBG10A  .....
BBG10B  .....
BBG10C  .....
BBG10D  .....
BBG10E  .....
BBG10F  .....G.....
BBG10G  .....
BBG10H  .....
BBG10I  .....
Lcn2    ...K.S...K.....
          =G===-#4-====H=====

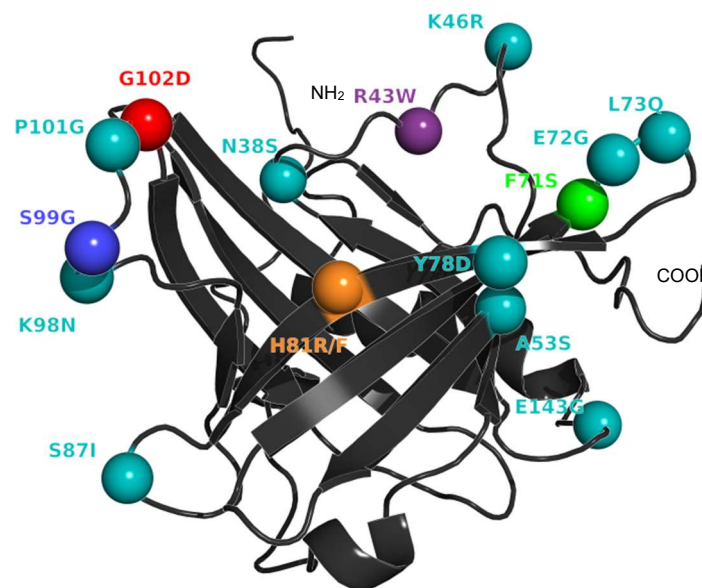
```

**Abbildung 3.28:** Aminosäuresequenz-Alignment des Anti-Hsp70-Anticalins BBG10 mit den aus seiner Affinitätsmaturierung hervorgegangenen Varianten sowie dem Wildtyp-Lipocalin Lcn2. Die Varianten BBG10A und BBG10B wurden aus der Zufallsmutagenese-Bibliothek ohne magnetische Voranreicherung selektiert. Die Varianten BBG10C, -D, -E, -F, -G, -H und -I entstammen derselben Bibliothek, jedoch wurden bei der Selektion magnetische Anreicherung und FACS kombiniert. Die zwanzig randomisierten Positionen der bei der Selektion verwendeten Lcn2-Bibliothek sind unterstrichen (Gebauer *et al.*, 2013). Die weitere Annotation entspricht der in Abbildung 3.23.

Aus der schematischen Übersicht der gefundenen Aminosäureaustausche in einem Strukturmodell (Abbildung 3.29) wird deutlich, dass die Mutationen beinahe ausschließlich auf drei der vier Schleifen an der Öffnung der Bindungstasche sowie die angrenzenden Bereiche der  $\beta$ -Stränge verteilt waren. Ausnahmen bildeten die Mutationen E143G von BBG10F und S87I von

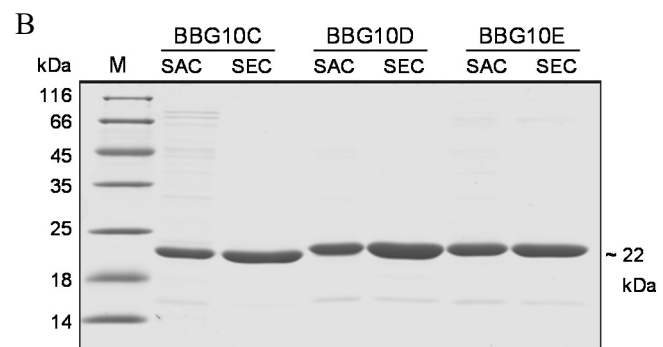
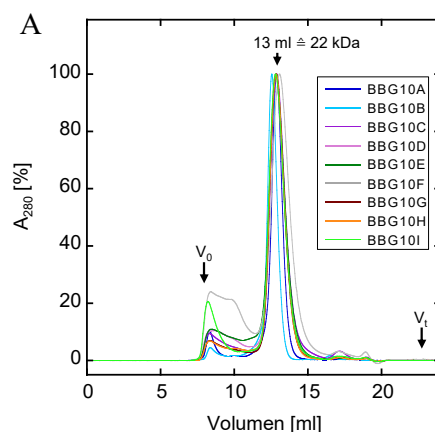


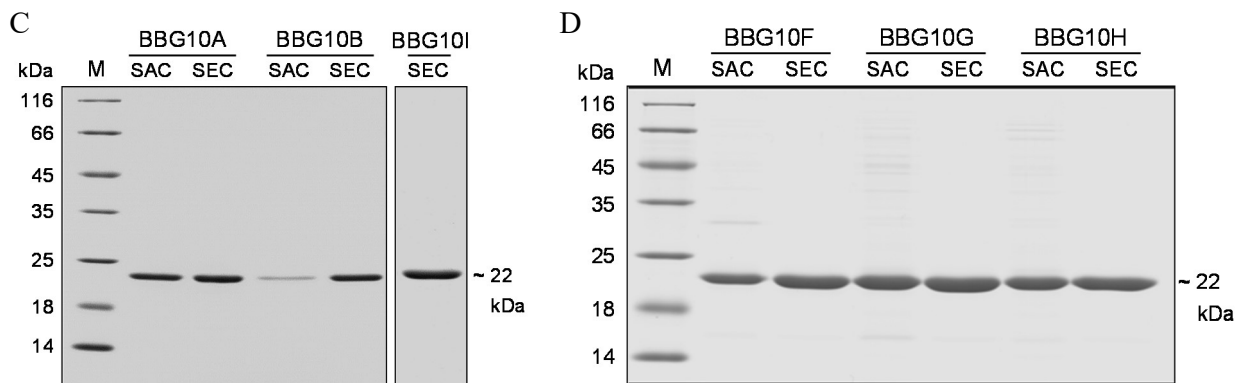
BBG10D, welche sich in der dem „Antigen“ abgewandten Seite befanden. Bei S87 handelt es sich um die Position der absichtlich in die Wildtyp-Lcn2-Sequenz eingefügten C87S-Mutation (vgl. Abschnitt 3.3.1).



**Abbildung 3.29:** Schematische Übersicht der im Zuge der Affinitätsmaturierung von BBG10 aufgetretenen Aminosäuresequenzveränderungen anhand des Strukturmodells von Lcn2 (PDB-Kennziffer 1NGL). Die C $\alpha$ -Atome der Aminosäuren einmalig aufgetretener Mutationen wurden als hellblaue Kugeln dargestellt, wohingegen Mutationen, welche in mehr als einer der selektierten Varianten auftraten, andersfarbig hervorgehoben wurden.

Nach Subklonierung des mutierten zentralen Genbereichs der präparierten pNGAL146-Plasmide auf den Expressionsvektor pNGAL98, wurden die neun isolierten Varianten des Anticalins BBG10 in löslicher Form im Periplasma von *E. coli* produziert und mittels SAC und SEC gereinigt. Sowohl in der SEC als auch in der SDS-PAGE-Analytik erschienen alle Anticalin-Varianten homogen und wiesen apparente Molekülgrößen entsprechend der berechneten Massen der Protein-Monomere auf (Abbildung 3.30). Lediglich bei den Varianten BBG10F und BBG10I zeigten sich in den SEC-Profilen signifikante Mengen oligomerer bzw. aggregierter Spezies.





**Abbildung 3.30:** Reinigung und Charakterisierung der affinitätsmaturierten Varianten des Anticalins BBG10. (A) Feinreinigung und Analyse der mittels SAC aus Periplasmaextrakt isolierten Anticaline erfolgte mittels SEC. Die hierbei ermittelte apparente Molekülmasse sowie Durchbruch ( $V_0$ )- und Bettvolumina ( $V_i$ ) der SEC-Säule sind angegeben. Die berechneten Molekülmassen der Anticalinvarianten liegen im Bereich zwischen 21734 kDa (BBG10F) und 21945 kDa (BBG10B). (B), (C) und (D) SDS-PAGE (reduzierend) der Anticalinvarianten nach SAC und SEC. M: Proteingrößenstandard.

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der selektierten BBG10-Varianten wurden SPR-spektrometrische Analysen mit immobilisiertem rhHsp70.1 durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.2). Hierbei zeigten die beiden ohne magnetische Voranreicherung selektierten Anticaline BBG10A und BBG10B mit  $K_D$ -Werten von  $\sim 8$  nM im Vergleich zu BBG10 eine erhöhte „Antigen“-Affinität, was hauptsächlich auf langsamere  $k_{off}$ -Raten mit verdoppelten Komplex-Halbwertszeiten  $\tau_{1/2}$  von etwa 12 min zurückgeht (Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1:** SPR-spektrometrisch bestimmte Affinitäten und Kinetiken des Anticalins BBG10 und seiner affinitätsmaturierten Varianten für immobilisiertes rhHsp70.1

	$k_{on}$ [ $10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]	$\tau_{1/2}$ [min]
BBG10	$16,75 \pm 0,08$	$209 \pm 1$	$12,45 \pm 0,08$	5,5
BBG10A	$13,35 \pm 0,03$	$106,6 \pm 0,4$	$7,99 \pm 0,04$	10,8
BBG10B	$10,73 \pm 0,03$	$91,7 \pm 0,5$	$8,55 \pm 0,05$	12,6
BBG10C	$14,21 \pm 0,04$	$64,7 \pm 0,6$	$4,56 \pm 0,04$	17,9
BBG10D	$13,20 \pm 0,04$	$45,0 \pm 0,5$	$3,41 \pm 0,04$	25,7
BBG10E	$7,19 \pm 0,04$	$83,6 \pm 0,6$	$11,6 \pm 0,1$	13,8
BBG10F	$7,80 \pm 0,03$	$65,6 \pm 0,5$	$8,42 \pm 0,07$	17,6
BBG10G	$12,17 \pm 0,07$	$63,5 \pm 0,9$	$5,22 \pm 0,08$	18,2
BBG10H	$9,17 \pm 0,02$	$61,5 \pm 0,3$	$6,70 \pm 0,04$	18,8
BBG10I	$10,74 \pm 0,03$	$23,1 \pm 0,1$	$2,15 \pm 0,01$	50,0

Wie die Varianten BBG10A und BBG10B zeigten auch alle der sieben Anticalin-Varianten aus der kombinierten Selektion (magnetische Voranreicherung und FACS) mit 1,1 bis 5,8-fach erniedrigten  $K_D$ -Werten stärkere Affinität zu rhHsp70.1. Die  $k_{off}$ -Raten aller aus dieser zweiten Selektion hervorgegangenen Varianten waren geringer als die der Varianten BBG10A und

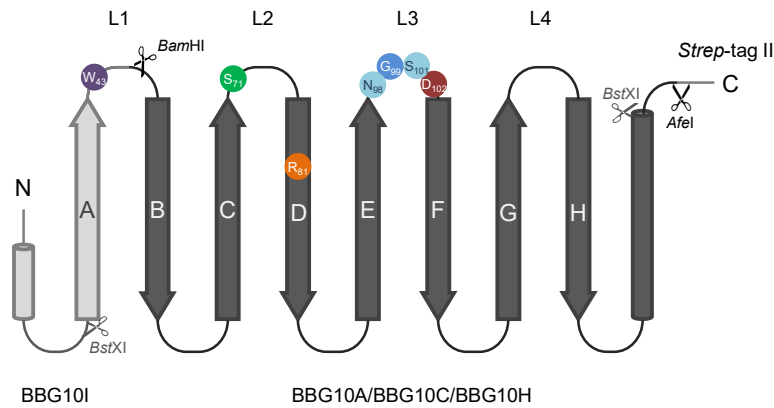
BBG10B. Mit den am deutlichsten verlängerten  $\tau_{1/2}$ -Werten (um einen von Faktor 4,6 bzw. 9,1) waren die Varianten BBG10D und BBG10I gleichzeitig die affinsten der selektierten Anticaline. Im Alignment der Aminosäuresequenzen (Abbildung 3.28) zeigten beide Varianten im Gegensatz zu allen anderen Sequenzen die Mutation R43W. Die beiden Sequenzen unterschieden sich untereinander neben der aufgrund seiner Position für die Bindung wahrscheinlich irrelevanten S87I-Mutation in der prominenten Mutation G102D, welche nur bei der affineren Variante BBG10I vorkam. Beide Varianten wiesen an der andernfalls häufig veränderten Position 81 ein Arginin auf.

Alle selektierten Varianten wiesen eine um Faktor 1,2 (BBG10C) bis 2,3 (BBG10E) verringerte Assoziations-Rate ( $k_{on}$ ) auf. Die beiden Varianten mit der am stärksten beeinträchtigten  $k_{on}$ -Rate (BBG10E und BBG10F) unterscheiden sich in ihren Sequenzen von den anderen Varianten jeweils durch die Mutation von Histidin zu Phenylalanin an Position 81.

### 3.4.2 Kombination von Mutationen sowie gerichtete Evolution der Variante BBG10I

Zur weiteren Verbesserung der „Antigen“-Bindungsaktivität des Anticalins BBG10 wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde versucht, durch Kombination der häufiger aufgetretenen Mutationen der ersten Affinitätsmaturierung die Affinität weiter zu erhöhen, zum anderen wurde eine zufallsbasierte Genbibliothek auf Grundlage der Anti-Hsp70-Anticalinvariante mit der bislang höchsten Affinität (BBG10I) generiert und mittels *E. coli*-Surface Display auf verbesserte Varianten selektiert.

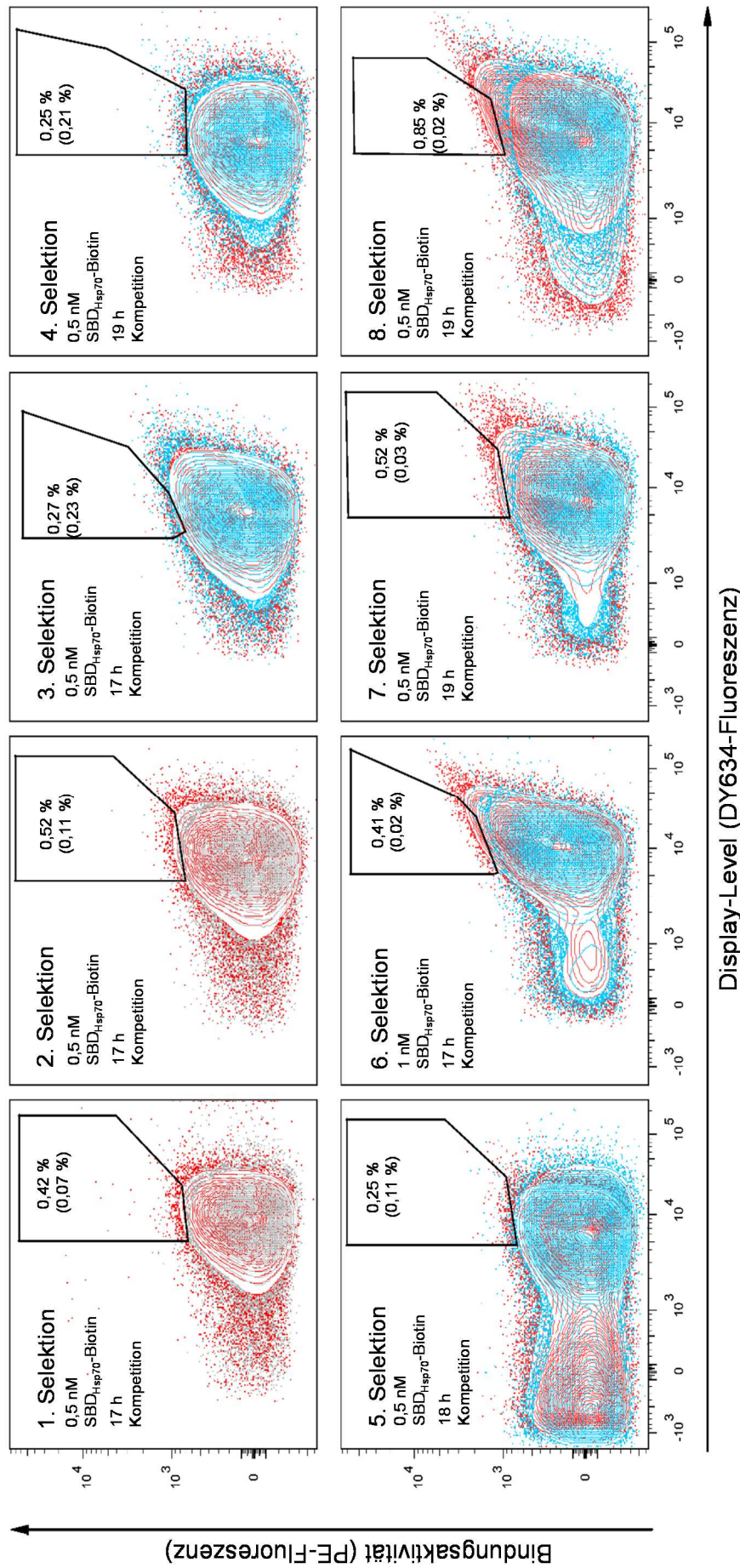
Im Hinblick auf die Kombination von Mutationen erschien der R43W-Austausch besonders interessant, da dies nicht nur die einzige gemeinsame Mutation der beiden besten Varianten sondern auch die einzige bindungsrelevante Mutation der Variante mit der zweitstärksten Affinität (BBG10D) war. Besonders sinnvoll schien die Kombination von R43W mit den beiden Mutationen H81R und G102D, da diese mit 44 % und 67 % unter allen Aminosäureaustauschen am häufigsten auftraten. Zu diesem Zweck wurde der Genabschnitt mit den Mutationen H81R und G102D von Variante BBG10A mithilfe der singulären Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Afe*I in den entsprechenden pNGAL98-Vektor für die Variante BBG10I inseriert (siehe Abbildung 3.31). Die hieraus resultierende Kombinationsvariante wurde als BBG10A/I bezeichnet. Auf gleiche Weise wurde BBG10I mit den beiden weiteren mehrfach aufgetretenen Mutationen S99G und F71S, welche sich beide in der Sequenz von BBG10C fanden, kombiniert, woraus die Variante BBG10C/I hervorging. Des Weiteren schien die Kombination von BBG10I mit der Sequenz von BBG10H interessant, welche neben den vorgenannten Mutationen zwei weitere Mutationen in der dritten Schleife trägt (vgl. Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.31:** Topologie-Diagramm des Anticalins BBG10. Zur Kombination von Mutationen der Anticalin-Varianten BBG10A, BBG10C und BBG10H mit der R43W-Mutation der Varianten BBG10I bzw. BBG10D (vgl. Abbildung 3.28), wurde ein Teil der kodierenden Sequenz dieser Anticaline, welcher die  $\beta$ -Stränge B bis H einschließt (dunkelgrau) unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Afe*I in das BBG10I-kodierende pNGAL98-Derivat inseriert. Auf diese Weise wurden die Anticalinvarianten BBG10A/I, BBG10C/I und BBG10H/I erhalten (vgl. Abbildung 3.33).

Neben der rationalen Kombination von Punktmutationen wurde ausgehend von der bislang besten Variante BBG10I die Selektion weiter verbesserter Anticalinvarianten mittels gerichteter Evolution angestrebt. Die Generierung einer zufallsbasierten Genbibliothek mittels *Error-Prone*-PCR erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Bei der Transformation elektrokompenter Zellen des *E. coli*-Stamms JK321 wurden  $2,0 \times 10^9$  Transformanten erhalten. Die Sequenzierung von fünf Klonen ergab eine Mutationsrate von 5,2 Basenpaaraustauschen pro Gen. Für die Vorselektion wurden die Zellen mit  $SBD_{Hsp70}$ -Biotin in einer Konzentration von 1 nM für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen zwecks Kompetition für weitere 30 min mit 1  $\mu$ M unmarkierter  $SBD_{Hsp70}$  bei 16 °C inkubiert. Die magnetische Anreicherung von Bindern wurde daraufhin mit NeutrAvidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln durchgeführt.

Die FACS-Anreicherung erfolgte analog zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Affinitätsmaturierung von BBG10. Das Sortier-Fenster musste hierbei so gesetzt werden, dass möglichst wenige Klone mit unveränderter Affinität sortiert werden, aber dass andererseits auch keine Klone mit verbesserter Affinität bei nur geringfügig erhöhtem Bindungssignal verloren werden. Hierzu wurde in den ersten beiden von insgesamt acht Selektionszyklen zunächst eine Probe der *E. coli*-Bibliothek analysiert, welche anstelle des mit Biotin markierten „Antigens“ lediglich mit Puffer inkubiert worden war. Das Fenster wurde nun so gesetzt, dass der Unterschied der enthaltenen Zellzahl zwischen dieser Negativkontrolle und der zu sortierenden Bibliothek in Gegenwart des biotinylierten „Antigens“ möglichst groß war. In den Selektionszyklen 3 bis 8 wurde zu demselben Zweck anstelle der „Antigen“-freien Bibliothek die ursprüngliche Variante BBG10I als Referenz verwendet, welche auf die gleiche Weise mit  $SBD_{Hsp70}$ -Biotin inkubiert wurde wie die Bibliothek. Während die Unterschiede zwischen sortierter Bibliothek und mitgeführter Kontrolle während der ersten 5 Zyklen nur marginal waren, ließ sich nach dem 5. Selektionszyklus ein deutlicher Unterschied im Phänotyp der Bibliothek erkennen (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32:** Affinitätsmaturierung der Anti-Hsp70-Antigenvariante BGG101. Ausgehend von der affinsten Variante aus der ersten Affinitätsmaturierung von BGG10 wurde mittels Zufallsmutagenese eine neue Genbibliothek angelegt und auf *E. coli*-Zellen präsentiert. Wie schon beim ersten Selektionszyklus wurde eine Strategie zur Anreicherung von Anticlinen mit verringerten  $K_{off}$ -Raten angewandt. Die eingesetzten Konzentrationen des mit Biotin markierten „Antigens“ sowie die Dauer der Dissoziationsphase unter Einsatz von unmarkiertem „Antigen“ (Kompetition) sind für jeden Zyklus angegeben. In den Graphen sind die 2D-Konturdiagramme der mit dem biotinylierten „Antigen“ inkubierten Anticalin-Bibliothek (rot) mit Diagrammen der anstelle dessen nur mit Puffer inkubierten Bibliothek (grau, Zyklen 1 und 2) bzw. des gleichermaßen mit biotinyliertem „Antigen“ inkubierten Ursprungs-Klons BGG10 (blau, Zyklen 3-8) überlagert. In den polygonalen Sortier-Fenstern wurde der prozentuale Anteil sortierter Zellen an der Gesamtheit aller analysierten Zellen angegeben. Die Zahl in Klammern gibt entsprechenden Anteil der Zellen in den Vergleichsanalysen an (Bibliothek ohne „Antigen“ oder Ausgangsklon BGG10).

Die Analyse der Anticalin-Gensequenzen von 10 Klonen im Anschluss an den letzten Selektionszyklus ergab, dass alle Klone für dieselbe Aminosäuresequenz kodierten, welche als BBG10I-1 bezeichnet wurde. Im Alignment der Aminosäuresequenzen, welche zuvor durch rationale Kombination erzeugt worden waren, mit der nun durch gerichtete Evolution generierten Sequenz des Klons BBG10I-1 fiel auf, dass letzterer sich lediglich durch das Fehlen des Ser/Gly-Aminosäureaustauschs an Position 99 von der Kombinationssequenz BBG10C/I unterschied (Abbildung 3.33).

```

      1      10      20      30      40      50      60
BBG10   QDSTSDLIPÄPPLSKVPLQÖNFQDNQFhGKwYVVGLAGNHFLREDKDPKMYATIYELKÉ
BBG10A/I .....W.....
BBG10C/I .....W.....
BBG10H/I .....W.....
BBG10I-1 .....W.....
                =====A=====---#1-----B=====

      70      80      90      100     110     120
BBG10   DKSYNVTYVRFELKKCEYFIHTFVPGsQPGEFTLGQIKSRPGMTSVLVRVSTNYNQHÄM
BBG10A/I .....R.....D.....
BBG10C/I .....S.....R.....G..D.....
BBG10H/I .....R.....NG.SD.....
BBG10I-1 .....S.....R.....D.....
                ===C===---#2-----D=====   ==E-----#3-----F=====   ===

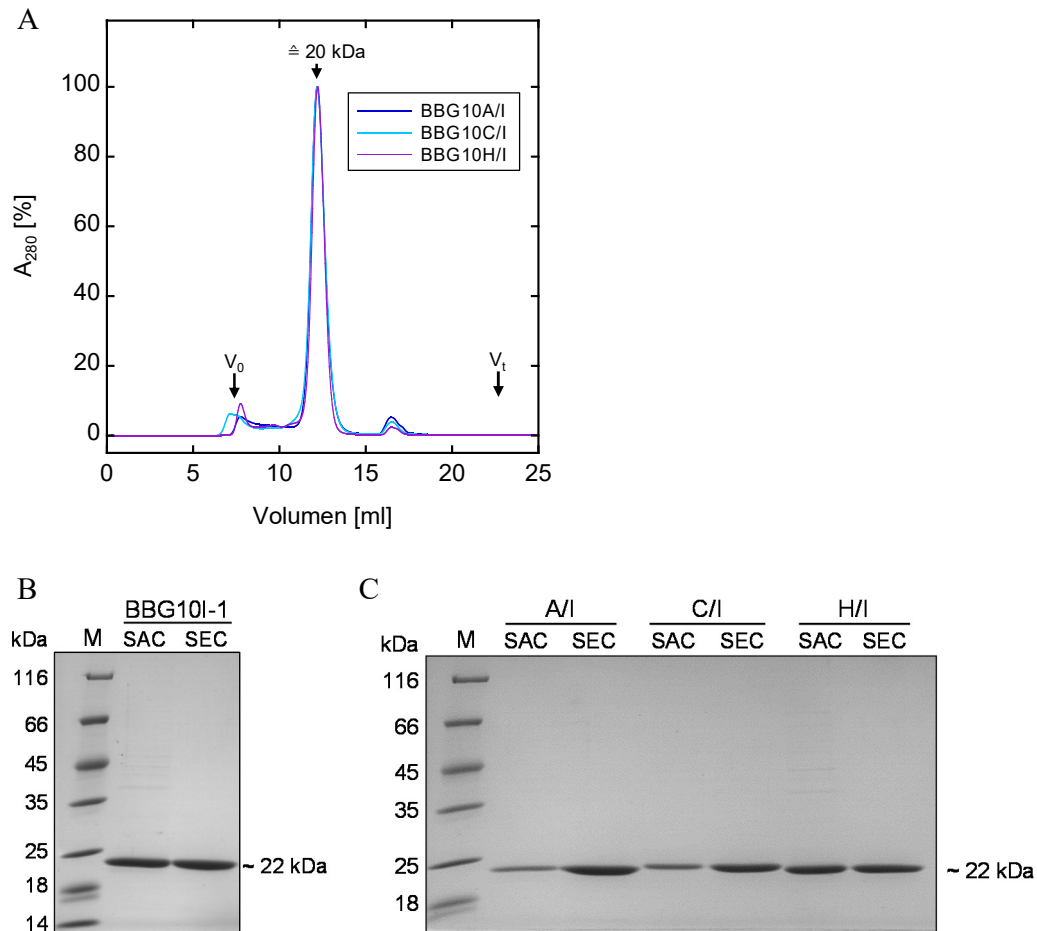
      130     140     150     160     170
BBG10   VFFKRVIQNREYFQITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCID
BBG10A/I .....
BBG10C/I .....
BBG10H/I .....
BBG10I-1 .....

```

**Abbildung 3.33:** Aminosäuresequenz-Alignment des Anti-Hsp70-Anticalins BBG10 mit den durch Kombination von Mutationen einer ersten Affinitätsmaturierung generierten Varianten (vgl. Abbildung 3.28) sowie der aus einer zweiten, auf BBG10I-basierenden Affinitätsmaturierung hervorgegangenen Variante BBG10I-1. Die weitere Annotation entspricht der in Abbildung 3.23.

Die vier Anticalin-Sequenzen BBG10A/I, BBG10C/I, BBG10H/I und BBG10I-1 wurden mit Hilfe der *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen aus dem *Surface Display*-Vektor pNGAL146 auf pNGAL98 subkloniert (vgl. Abbildung 3.24). Die Reinigung der in löslicher Form im bakteriellen Periplasma produzierten Anticalinvarianten erfolgte durch SAC und SEC. Alle Varianten erschienen in der SDS-PAGE-Analyse homogen und zeigten im SEC-Profil Monodispersität mit einem Peak entsprechend der apparenten Molekülmasse des Proteinmonomers (Abbildung 3.34).





**Abbildung 3.34:** Reinigung und Charakterisierung der rekombinierten Anticalinvarianten BBG10A/I, BBG10C/I und BBG10H/I sowie des aus einer weiteren Affinitätsmaturierung hervorgegangenen Anticalins BBG10I-1. (A) Feinreinigung und Analyse der mittels SAC aus Periplasmaextrakt isolierten Anticaline erfolgte mittels SEC. Die hierbei ermittelte apparente Molekülmasse sowie Durchbruch- ( $V_0$ ) und Bettvolumina ( $V_t$ ) der SEC-Säule sind angegeben. Die berechneten Molekülmassen der Anticalinvarianten liegen im Bereich zwischen 21837 kDa (BBG10C/I) und 21963 kDa (BBG10A/I). (B) und (C) SDS-PAGE (reduzierend) der Anticalinvarianten nach SAC und SEC. M: Proteingrößenstandard.

Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der vier neuen Anticalinvarianten wurde in SPR-Experimenten mit kovalent immobilisiertem rhHsp70.1 vorgenommen (Tabelle 3-2). Sowohl die durch Neukombination erzeugten Varianten als auch die mittels FACS neu selektierte Variante BBG10-I zeigten eine deutliche Affinitätssteigerung im Vergleich zur besten Variante aus der ersten Affinitätsmaturierung (BBG10I). Der  $K_D$ -Wert von BBG10I-1 ist mit 391 nM um Faktor 5,5 niedriger als der ihres Vorgängers BBG10I ( $K_D = 2,15$  nM). Interessanterweise konnte allein durch Kombination aller mehrfach aufgetretenen Mutationen der ersten Affinitätsmaturierung (resultierend in der Variante BBG10C/I) die Affinität der Ausgangsvariante BBG10 ( $K_D = 12,5$  nM) um einen Faktor von  $\sim 24$  gesteigert werden ( $K_D = 510$  pM). Das Hinzufügen von zwei weiteren Mutationen in Schleife #3 (BBG10H/I) führte zu keiner weiteren Affinitätssteigerung. Mit einer Komplexhalbwertszeit  $\tau_{1/2}$  von 4,3 h weist die neukombinierte Variante BBG10C/I die

niedrigste Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) auf. Die Verlangsamung der Komplexdissoziation im Vergleich zu BBG10 entspricht somit einem Faktor von 46,7 (vgl. Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-2:** SPR-spektrometrisch bestimmte Affinitäten und Kinetiken von affinitätsmaturierten Anticalinvarianten für immobilisiertes rhHsp70.1

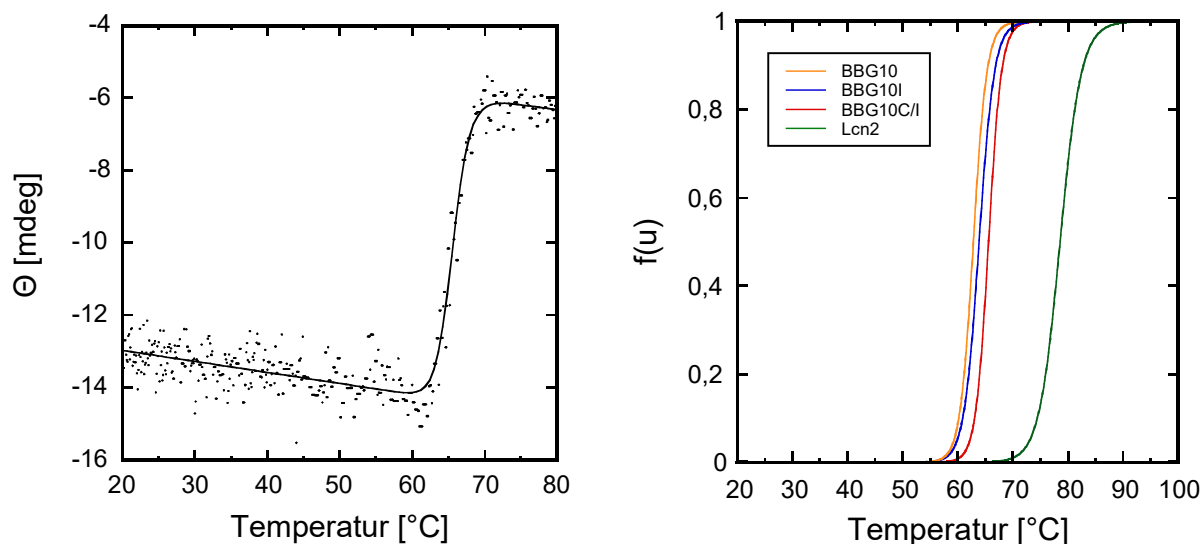
	$K_D$ [pM]	$k_{\text{on}}$ [ $10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$\tau_{1/2}$ [min]
BBG10I	$2150 \pm 7,8$	$10,74 \pm 0,03$	$231,0 \pm 0,05$	$50,0 \pm 0,2$
BBG10A/I	$863 \pm 2,6$	$10,40 \pm 0,01$	$89,30 \pm 0,02$	$129,4 \pm 0,5$
BBG10C/I	$510 \pm 2,6$	$8,77 \pm 0,01$	$44,76 \pm 0,02$	$258,1 \pm 0,5$
BBG10H/I	$548 \pm 1,1$	$8,37 \pm 0,01$	$45,90 \pm 0,002$	$251,7 \pm 0,07$
BBG10I-1	$391 \pm 2,0$	$14,14 \pm 0,02$	$55,21 \pm 0,03$	$209,3 \pm 0,4$

### 3.5 Biophysikalische und funktionelle Charakterisierung des für Hsp70.1 spezifischen Anticalins BBG10C/I

Zur Evaluierung der potentiellen Eignung des Anti-Hsp70-Anticalins BBG10C/I für die molekulare Bildgebung und Tumor-Therapie wurden Experimente zur Analyse der Faltungstabilität, Bindungsspezifität sowie der Fähigkeit zur Bindung des „Antigens“ auf der Oberfläche von Tumorzellen angestellt.

#### 3.5.1 Untersuchung der Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung

Die temperaturabhängige Denaturierung des Anticalins BBG10C/I sowie seiner Vorläufervarianten BBG10 und BBG10I wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht.



**Abbildung 3.35:** Temperaturstabilität des Anticalins BBG10C/I. Links: Die thermische Entfaltung des Anticalins (1 mg/ml in 50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 20 mM  $\text{KP}_i$  pH 7,5) wurde durch CD-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 212 nm analysiert. Die Daten wurden an ein Modell für einen Zweizustands-Übergang angepasst. Die berechnete Übergangstemperatur beträgt  $65,6 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rechts: Normierte Entfaltungskurven gleichbehandelter Anti-Hsp70-Anticaline im Vergleich zu Wildtyp-Lcn2 (Daten freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Sabine Rauth, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München).



Durch Anpassung der gemessenen Daten an ein Zwei-Zustandsmodell der Proteinfaltung unter Berücksichtigung der linearen prä- und posttransitionellen Anstiege (Costa *et al.*, 2015) wurden die Schmelztemperaturen sowie die Entfaltungsenthalpien  $\Delta H_U$  der Proteine bestimmt. Des Weiteren wurden die ermittelten Gleichgewichtskonstanten der Entfaltung ( $K_U$ ) genutzt, um die Gibbs'sche Freie Energie bei 25 °C zu extrapolieren:  $\Delta G^\circ = -R \times 298,15 \text{ K} \times \ln K_U$  ( $R$  = allgemeine Gaskonstante, vgl. Tabelle 3-3). Da die Entfaltung unter den vorliegenden Bedingungen aufgrund von Präzipitation bei keinem der untersuchten Proteine reversibel war, sind die ermittelten thermodynamischen Parameter jedoch kritisch zu betrachten, da die Reversibilität nicht sichergestellt werden konnte. Hierfür wäre die Wiederholung der Messungen unter anderen Pufferbedingungen denkbar. Eine Alternative bietet die experimentelle Analyse der Proteinfaltung durch chemische Denaturierung (Street *et al.*, 2008).

Unter Annahme von Gleichgewichtsbedingungen zeigten die erhaltenen Resultate aller analysierten Anticaline niedrigere Schmelztemperaturen als das Wildtyp-Lipocalin. Die ermittelten Schmelztemperaturdifferenzen zwischen den einzelnen Anticalinvarianten waren relativ gering, wobei  $T_m$  interessanterweise im Verlauf der Affinitätsmaturierung zunahm. Die stabilste Variante war demnach BBG10C/I mit einer Schmelztemperatur von 65,6 °C.

Auffällig war die deutlich erhöhte Steigung des Faltungsübergangs von BBG10C/I im Vergleich zum Wildtyp-Lipocalin, was als stärkere Kooperativität bei der Faltung/Entfaltung zu deuten ist und sich im Parameter  $\Delta H_U$  widerspiegelt. Dies resultierte in einem deutlich höheren  $\Delta G^\circ$ -Wert für die Entfaltung von BBG10C/I verglichen mit dem Wildtyp-Lipocalin, woraus sich – bei Annahme von konstantem  $\Delta H_U$  – trotz der niedrigeren Schmelztemperatur des Anticalins eine höhere Faltungsstabilität des Anticalins bei Raumtemperatur extrapolieren lässt.

**Tabelle 3-3:** Thermodynamische Parameter der Proteinfaltung verschiedener Anti-Hsp70-Anticaline im Vergleich mit wtLcn2

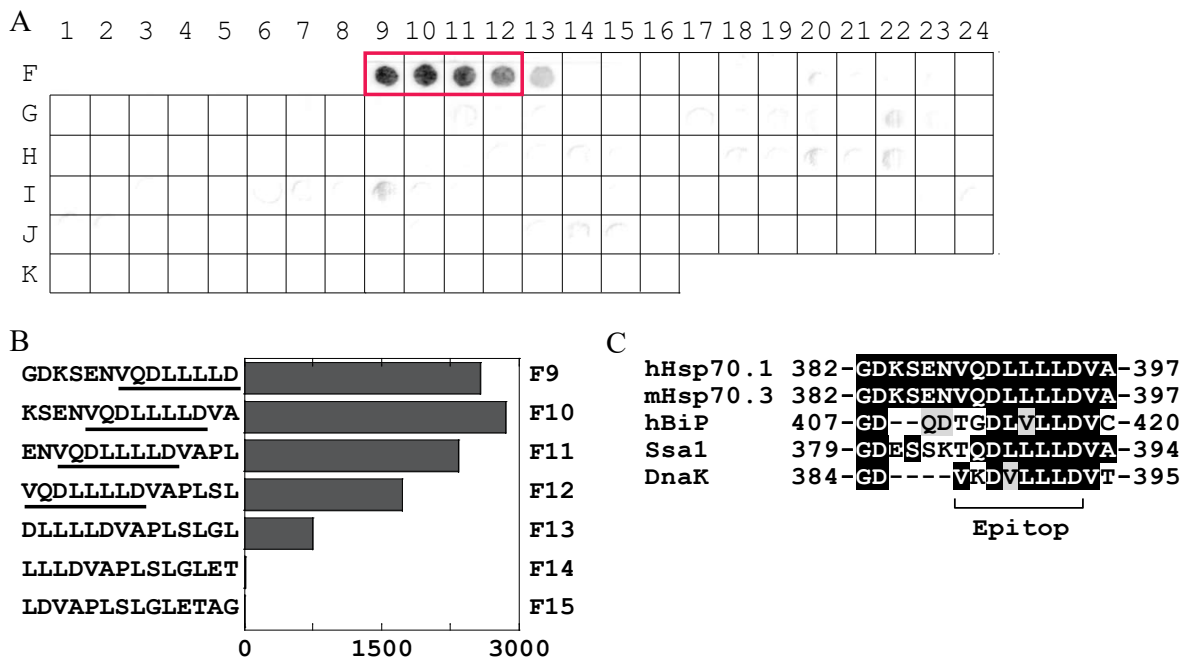
	$T_m$ [°C]	$\Delta H_U$ [kJ/mol]	$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]
BBG10	62,8 ± 0,06	778 ± 30	87,5
BBG10I	63,9 ± 0,06	692 ± 24	79,9
BBG10C/I	65,6 ± 0,08	821 ± 39	98,4
Lcn2	78,8 ± 0,24	541 ± 49	82,7

### 3.5.2 Epitop-Analyse mit dem SPOT-Verfahren

Zur Charakterisierung des vom Anticalin BBG10C/I erkannten Epitops in dem „Antigen“-Protein wurde die schon beim Anti-Hsp70-Fab-Fragment angewandte Methodik verfolgt (vgl. Abschnitt 3.1.5). Ein Peptid-Array mit Abdeckung der kompletten SBD des humanen Hsp70.1 (einschließlich des Interdomänen-Linkers, AS 382-641) wurde mithilfe des SPOT-Verfahrens auf einer Zellulosemembran synthetisiert (Frank, 2002).

Zur Verringerung unspezifischer Bindungssignale beim Nachweis der Komplexbildung des Anticalins mit den Membran-gekoppelten 14mer-Peptiden wurde diesmal der Einsatz von Sekundärantikörpern vermieden. Dies war durch die kovalente Markierung des Anticalins mit

Fluorescein unter anschließender Nutzung eines Fluoreszenz-Scanners möglich. Um eine potentielle Beeinträchtigung der Bindungsaktivität des Anticalins durch die Fluoreszenzmarkierung zu vermeiden, wurde anstelle der sonst üblichen Aminogruppen-Kopplungschemie ein ortsgerichtetes Kopplungsverfahren unter Verwendung des Cystein-spezifischen Kopplungsreagens Fluorescein-Maleimid angewandt (vgl. Abschnitt 2.5.6). Dabei wurde eine Variante des Anticalins mit freiem Cysteinrest im Bereich des C-Terminus verwendet (BBG10C/I-Cys-FluoMal, vgl. Abschnitt 3.7). Zur Korrektur möglicher unspezifischer, durch Wechselwirkungen mit der Lipocalin-Gerüststruktur hervorgerufener Bindungssignale wurde die Membran „gestrippt“, d.h. unter denaturierenden Bedingungen von gebundenem Anticalin befreit (Beutling *et al.*, 2008) und mit einer in gleicher Weise fluoreszenzmarkierten Version von wtLcn2 entwickelt (Lcn2-Cys-FluoMal). Im Fluoreszenz-Scan zeigten sich dabei jedoch keine signifikanten Bindungssignale (ohne Abbildung).



**Abbildung 3.36:** Hsp70-Epitop des Anticalins BBG10C/I. (A) Identifizierung eines linearen Peptid-Epitops mithilfe der SPOT-Technologie (Beutling *et al.*, 2008): 14mer-Peptide, welche jeweils mit einem Versatz von zwei Aminosäuren die Sequenz der SBD von humanem Hsp70.1 einschließlich des Interdomänen-Linkers abbilden, wurden auf einer modifizierten Cellulose-Membran synthetisiert. Nach Inkub-Scanner detektiert. Zur Subtraktion möglicher Hintergrundsignale wurde die Membran „gestrippt“ und analog mit Fluoresceinmaleimid-markiertem wtLcn2 entwickelt. (B) Die korrigierten Fluoreszenzsignale wurden densitometrisch quantifiziert. Das hieraus abgeleitete Minimal-Epitop (unterstrichen) entspricht den Aminosäureresten 388 bis 395 von humanem Hsp70.1 und befindet sich im Bereich des Interdomänen-Linkers. (C) Aminosäuresequenz-Alignment des Interdomänen-Linkers von humanem Hsp70.1 (UniProt-Kennziffer P0DMV8) mit dem homologen Protein von *Mus musculus* (mHsp70.3, Uniprot-Kennziffer Q61696), *Saccharomyces cerevisiae* (Ssa1, Uniprot-Kennziffer P10591) und *E. coli* (DnaK, Uniprot-Kennziffer P0A6Y8) sowie dem paralogen BiP des Menschen (Uniprot-Kennziffer P11021).

Der Scan einer mit BBG10C/I-Cys-FluoMal entwickelten Peptid-Membran nach Abzug des entsprechenden Lcn2-Cys-FluoMal-Scans ist in Abbildung 3.36A dargestellt. Komplexbildung

war ausschließlich bei den Peptid-Spots F9-F13 nachweisbar. Die Zuordnung der um den Hintergrund korrigierten und densitometrisch quantifizierten Fluoreszenzsignale (Abbildung 3.36B) zu den entsprechenden Peptidsequenzen ergab, dass das Anticalin BBG10C/I ein lineares Peptidepitop von Hsp70.1 erkennt, welches den Aminosäurepositionen 388-395 (VQDLLLLD) entspricht.

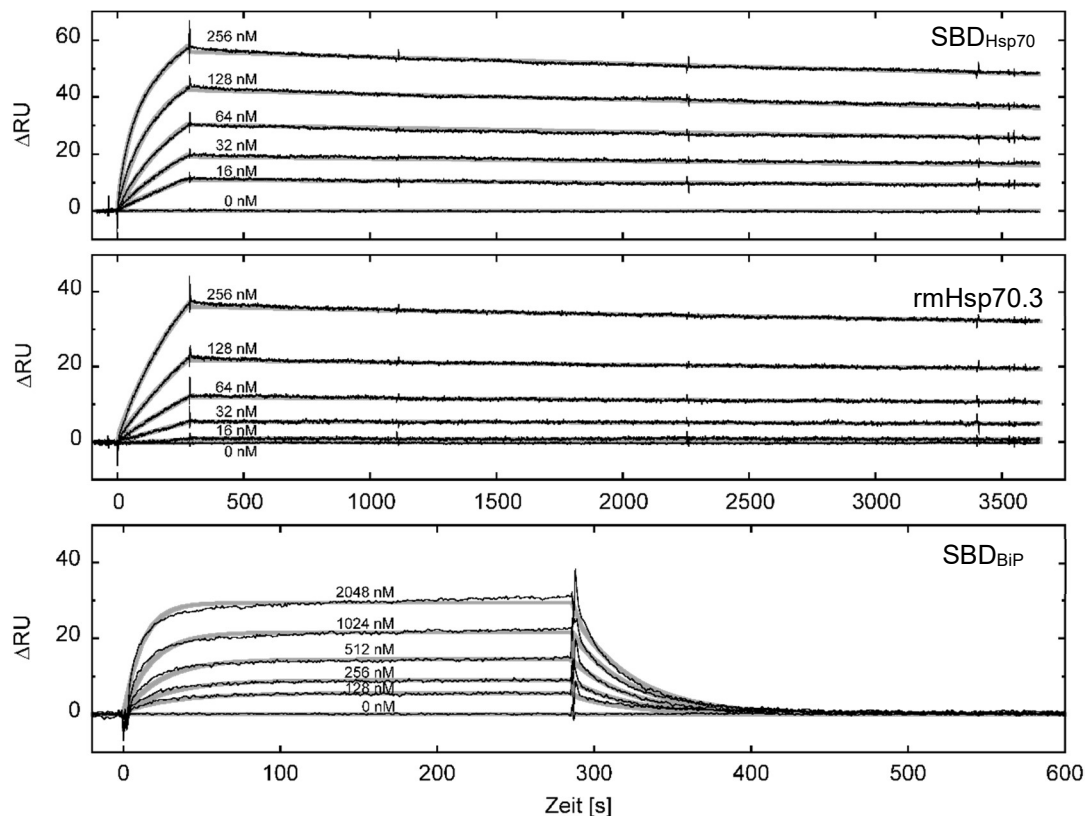
Anhand der Strukturdaten von Hsp70.1 und homologer Hsp70-Proteine (Jiang *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2013; Katagiri *et al.*, 1985) wurde das Epitop im Bereich des Interdomänen-Linkers lokalisiert. Dieser Sequenzbereich – insbesondere das vom ermittelten Minimalepitop umfasste Motiv DLLLLD – gehört zu den evolutionär am stärksten konservierten Bereichen der Hsp70-Proteinfamilie (Vogel *et al.*, 2006). Die N-terminalen Positionen des Epitops sind dabei jedoch weniger stark konserviert, so dass die Übereinstimmung von humanem Hsp70.1 und BiP im Bereich des Epitops insgesamt nur 63 % beträgt (Abbildung 3.36C). Die exakte C-terminale Begrenzung des Epitops konnte aufgrund der randständigen Lage im Peptidarray nicht eindeutig identifiziert werden. Möglicherweise ist das Minimalepitop auf dieser Seite sogar noch kürzer als hier angegeben.

### 3.5.3 Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von BBG10C/I mit Hsp70.1-verwandten Proteinen

Um die Eignung von BBG10C/I für experimentelle Studien im Maus-Modell einzuschätzen, war es erforderlich, die Kreuzreaktivität des Anticalins mit dem orthologen Antigen aus der Maus zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Selektivität von BBG10C/I im Hinblick auf Kreuzreaktivität zu humanen paralogen Proteinen der Hsp70-Familie untersucht werden. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das als BiP (*Binding immunoglobulin*-Protein) bezeichnete Äquivalent von Hsp70.1 im Endoplasmatischen Retikulum (Haas, 1994).

Um die Bindung von BBG10C/I zwischen dem zu Hsp70.1 orthologen Protein der Maus (rekombinant aus *E. coli*: rmHsp70.3) bzw. der rekombinanten Substrat-Bindedomäne von humanem BiP (SBD<sub>BiP</sub>) und der zur Selektion verwendeten SBD<sub>Hsp70</sub> vergleichen zu können, wurden entsprechende Biacore-Experimente jeweils unter identischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde ein Versuchsaufbau gewählt, bei dem im Gegensatz zu den bislang beschriebenen SPR-Experimenten nicht das Zielprotein sondern das Anticalin kovalent auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiert wurde (Abbildung 3.37).

Die in diesem Versuchsaufbau ermittelten Parameter für die Bindung von SBD<sub>Hsp70</sub> stimmten annähernd mit den zuvor bestimmten Parametern für die Bindung des unverkürzten Hsp70.1 überein (Tabelle 3-4, vgl. Tabelle 3-2), womit die Eignung des Versuchsaufbaus bestätigt wurde. Die leichte Erhöhung des zuvor mit dem am Chip immobilisierten Volllängen-Hsp70 ermittelten  $K_D$ -Werts von 510 pM auf 829 pM mit dem nun immobilisierten Anticalin und SBD<sub>Hsp70</sub> in Lösung beruhte auf einem verringerten  $k_{on}$ -Wert.



**Abbildung 3.37:** SPR-Affinitätsanalyse des Anticalins BBG10C/I mit verschiedenen „Antigenen“. Das Anticalin wurde kovalent auf dem Sensorchip immobilisiert und die rekombinanten Substrat-Bindedomänen von humanem Hsp70.1 (SBD<sub>Hsp70</sub>) und humanem BiP sowie rekombinantes murines Hsp70.3 (rmHsp70.3, in voller Länge) wurden in Konzentrationsreihen injiziert. Die Daten wurden an ein Langmuir-Bindungsmodell gemäß 1:1-Stöchiometrie angepasst. Die hieraus abgeleiteten Bindungsparameter sind in Tabelle 3-4 zusammengestellt.

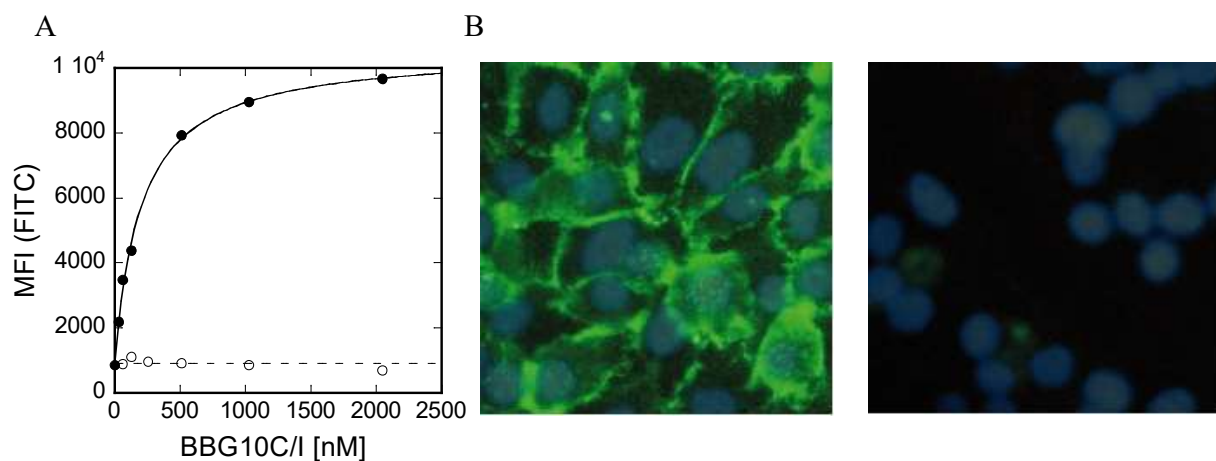
Murines Hsp70.3, welches in der oben identifizierten Epitopsequenz zu 100 % mit humanem Hsp70.1 übereinstimmt, zeigte gleichfalls Bindungsaktivität mit dem Anticalin BBG10C/I. Die ermittelte Affinität war verglichen mit SBD<sub>Hsp70</sub> jedoch um einen Faktor von etwa 3 niedriger, was hauptsächlich auf eine leicht verringerte Assoziationsrate zurückzuführen war. Ursache hierfür kann auch eine geringere Reinheit des kommerziell bezogenen Proteins sein. Verglichen damit zeigte BBG10C/I nur einen Bruchteil der Bindungsaktivität zum SBD<sub>Hsp70</sub>-homologen rekombinanten Fragment des Proteins BiP (SBD<sub>BiP</sub>). Die um einen Faktor >1000 niedrigere Affinität für SBD<sub>BiP</sub> ( $K_D = 893$  nM) ging fast ausschließlich auf eine Erhöhung des  $k_{off}$ -Werts zurück und resultierte wahrscheinlich aus der abweichenden Sequenz im Bereich des identifizierten Minimalepitops (vgl. Abbildung 3.36C).

**Tabelle 3-4:** SPR-spektrometrische Bestimmung der Affinität des immobilisierten Anticalins BBG10C/I gegenüber verschiedenen rekombinanten Hsp70-Proteinen

	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	$K_D$ [nM]
SBD <sub>Hsp70</sub>	$5,01 \times 10^4$	$4,15 \times 10^{-5}$	0,829
rmHsp70.3	$1,17 \times 10^4$	$3,39 \times 10^{-5}$	2,89
SBD <sub>BiP</sub>	$3,01 \times 10^4$	$2,68 \times 10^{-2}$	893

### 3.5.4 Untersuchung der Antigenbindung auf der Oberfläche von Tumorzellen

Wie Untersuchungen der Vergangenheit gezeigt haben, sind viele gegen Hsp70 gerichtete Antikörper – wahrscheinlich aufgrund der sterischen Unzugänglichkeit ihrer Epitope – nicht in der Lage, Hsp70 zu binden, wenn dieses Membran-assoziiert auf der Oberfläche von Tumorzellen vorliegt (Multhoff & Hightower, 2011). Da diese Fähigkeit als essentiell für die hier angestrebte Entwicklung eines Tracers/Wirkstoffs für die Molekulare Bildgebung bzw. die Tumortherapie anzusehen ist, war es notwendig, die Tumorzelloberflächenbindung des Anticalins BBG10C/I experimentell zu untersuchen. Hierzu wurde die Interaktion des Anticalins mit Zellen der Hypopharynx-Karzinomzelllinie FaDu zum einen mittels Durchfluss-Cytofluorimetrie, zum anderen durch Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. In beiden Experimenten wurde das auf den Zellen gebundene Anticalin mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern über den *Strep*-tag II nachgewiesen.



**Abbildung 3.38:** Bindung des Anticalins BBG10C/I an die Oberfläche von Tumorzellen. (A) Cytofluorimetrische Titration von FaDu-Zellen. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe des Anticalins inkubiert, und der entstehende Komplex mit Membran-assoziiertem Hsp70 wurde anhand des *Strep*-tag II mithilfe des sekundären Antikörpers StrepMAB-Immo und AlexaFluor 488-markiertem Anti-Maus-IgG-F(ab') cytofluorimetrisch detektiert. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Zellen (gefüllte Kreise) wurden gegen die eingesetzten Anticalin-Konzentrationen aufgetragen und an eine Gleichung zur bimolekularen Komplexbildung nach dem Massenwirkungsgesetze angepasst. Hierbei wurde eine apparente Dissoziationskonstante  $K_D^{app}$  von  $202 \pm 21$  nM ermittelt. Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde einem identischen Ansatz freies „Antigen“ SBD<sub>Hsp70</sub> in einer sättigenden Konzentration zugegeben (offene Kreise). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von FaDu-Zellen, welche entweder mit dem Anticalin allein (links) oder in Gegenwart einer sättigenden Konzentration SBD<sub>Hsp70</sub> als Kompetitor inkubiert worden waren (rechts). Gebundenes Anticalin wurde anhand des *Strep*-tag II mithilfe der oben genannten Sekundärantikörper detektiert (grüne Fluoreszenz). DAPI-Färbungen der Zellkerne sind überlagert (blau).

Die cytofluorimetrische Titration erlaubte die Bestimmung einer apparenten Dissoziationskonstante ( $K_D^{app}$ ) für die Komplexbildung zwischen BBG10C/I und Hsp70 auf der Oberfläche lebender Zellen. Beim graphischen Auftragen der gemittelten Fluoreszenzintensitäten gegen die eingesetzte Konzentration des Anticalins wurde eine für die selektive Komplexbildung typische Sättigungskurve beobachtet (Abbildung 3.38A). Durch Anpassung der Datenpunkte an das

Massenwirkungsgesetz (vgl. Abschnitt 2.6.1) wurde eine  $K_D^{\text{app}}$  von  $202 \pm 21$  nM bestimmt. Des Weiteren wurde die Spezifität der Wechselwirkung durch die vollständige Konkurrenz der Bindung bei Zugabe einer sättigenden Konzentration des rekombinanten  $\text{SBD}_{\text{Hsp70}}$  in Lösung demonstriert.

Immunfluoreszenzaufnahmen mit nativen, nicht permeabilisierten FaDu-Zellen, welche direkt auf einem Objektträger kultiviert wurden, ergaben deutliche Bindungssignale in den Randbereichen der Zellen (Abbildung 3.38B). Diese Lokalisierung des gebundenen Anticalins zeigt, dass das Anticalin BBG10C/I in der Lage ist, Hsp70 in seiner Membran-assoziierten Form zu binden. Die Selektivität der Bindung wurde in diesem Experiment ebenfalls durch Konkurrenz mit  $\text{SBD}_{\text{Hsp70}}$  nachgewiesen.

### 3.6 Funktionelle Charakterisierung eines Anticalin-basierten Toxin-Konjugats

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass es möglich ist, durch die enzymatische Kopplung eines Anti-HER2/neu-Fab-Fragments mit einem rekombinanten Toxin pflanzlichen Ursprungs potente Immuntoxine zu generieren (Kornberger & Skerra, 2014). Neben der Vermeidung des gentechnischen Sicherheitsrisikos, welches mit einer direkten Kopplung beider Komponenten in einem genetischen Fusionskonstrukt verbunden ist, gestattet die Kopplung *in vitro* eine effiziente Produktion der beiden Einzelkomponenten im Periplasma bzw. Cytoplasma von *E. coli*, was bei der heterologen Expression des komplexeren, aus mehreren Domänen zusammengesetzten Fusionsprodukts unter Umständen nicht der Fall wäre.

Diese Strategie wurde hier auf das Anti-Hsp70-Anticalin BBG10I-1 übertragen. Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde hierzu das Plasmid pNGAL98-BBG10ISR-LPETG-A-His<sub>6</sub> konstruiert, welches die bakterielle Expression des Anticalins in Fusion mit der Erkennungssequenz des Enzyms Sortase-A (LPET↓G) sowie dem His<sub>6</sub>-tag ermöglichte (Abbildung 3.39A). Das auf diese Weise modifizierte Anticalin konnte nun als „Donor“-Substrat für die Transpeptidierung eines N-terminal mit einer Oligoglycin-Sequenz versehenen „Akzeptor“-Substrats dienen (Popp & Ploegh, 2011). Dabei wird die Threonin-Glycin-Peptidbindung der Erkennungssequenz aufgebrochen und unter Freisetzung des C-terminalen Glycins (hier einschließlich des His<sub>6</sub>-tag) eine neue Peptidbindung mit dem N-Terminus des Akzeptors ausgebildet. Das hier als Akzeptor dienende Toxin Gelonin, welches zur Gruppe der Ribosomen-inaktivierenden Proteine (RIPs) vom Typ-I gehört und ohne die Fähigkeit in menschliche Zellen einzudringen nur geringe systemische Toxizität aufweist (Stirpe *et al.*, 1980), wurde mit einem N-terminalen Diglycyl-Motiv zur Kopplung verwendet (rGel). Die Struktur des von Dr. P. Kornberger (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) hergestellten Anticalin-Toxin-Konjugats ist schematisch in Abbildung 3.39B dargestellt.

Ein Vergleich der mittels SPR für immobilisiertes rhHsp70.1 bestimmten Affinitäten von BBG10-1-SALPETGA-His<sub>6</sub> ( $K_D = 829$  pM) und dem Immunkonjugat BBG10I-1-rGel ( $K_D = 858$  pM) zeigte keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 3-5). Allerdings banden beide

Proteine aufgrund verminderter  $k_{on}$ -Raten um den Faktor 2 schlechter als die mit einem *Strep*-tag II versehene Originalvariante BBG10I-1. Ursache hierfür könnte beispielsweise sterische Hinderung als Folge der C-terminalen Verlängerung des Anticalins sein.

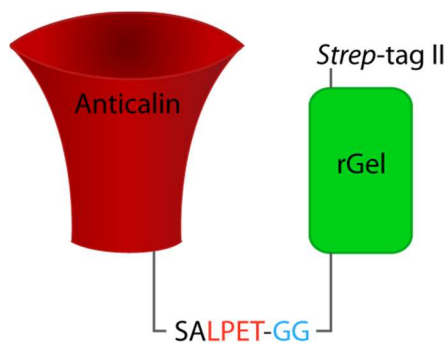
A

```

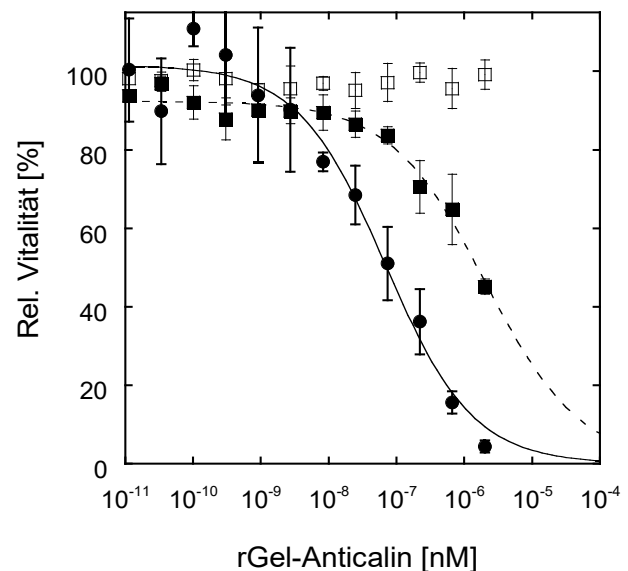
      590      600      610      620      630      640
5' -CAGTGTATCGACGGCAGCGCTCTGCCGGAGACTGGTGCTCACCATCACCATCACCATTTAA-3'
3' -GTCACATAGCTGCCGTGCGGAGACGGCCTCTGACCACGAGTGGTAGTGGTAGTGGTAATT-5'
  GlnCysIleAspGlySerAlaLeuProGluThrGlyAlaHisHisHisHisHisHisEnd
                        178

```

B



C



**Abbildung 3.39:** Herstellung und funktionelle Charakterisierung eines Anticalin-basierten Toxin-Konjugats. (A) 3'-kodierender Bereich des Expressionsvektors pNGAL98-BBG10ISR-LPETG-A-His<sub>6</sub> und entsprechende Aminosäuresequenz: Reste 174-178 des Anticalins BBG10I-1 (grau hinterlegt), Sortase-A-Erkennungssequenz (rot hinterlegt) und His<sub>6</sub>-tag (blau). (B) Struktur des Anticalin-rGel-Konjugats: Die durch Sortase-A katalysierte Transpeptidierung des Anticalins mit einer rekombinanten Version des pflanzlichen Proteintoxins Gelonin, welches N-terminal mit der Sequenz Gly-Gly und C-terminal mit einem *Strep*-tag II ausgestattet ist, bewirkt unter Freisetzung des Gly-Ala-His<sub>6</sub>-Peptids die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen dem am Anticalin verbleibenden Teil der Erkennungssequenz (rot) und dem N-Terminus des Toxins (blau). (C) Die Zytotoxizität des Anticalin-basierten „Immunkonjugats“ (●) sowie eines entsprechenden Toxin-Konjugats mit rekombinantem wtLcn2 (■) bzw. des unkonjugierten Anticalins (□) als Kontrollen wurde mit der humanen FaDu-Krebszelllinie analysiert. Hierfür wurden die Zellen für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen der Proteine in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte kultiviert, bevor die Vitalität der Zellen mit dem WST-1-Proliferationsreagenz bestimmt wurde. Durch nicht-lineare Regression der Datenpunkte auf der Grundlage eines Dosis-Wirkungs-Modells wurden IC<sub>50</sub>-Werte von 68,4 nM für das Anticalin-Toxin und 2054 nM für das Kontrollkonjugat ermittelt.

**Tabelle 3-5:** SPR-spektrometrisch für immobilisiertes rhHsp70.1 bestimmte Affinität des Anticalins BBG10I-1 im Vergleich zu C-terminal modifizierten Varianten

	$k_{\text{on}} [10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	$k_{\text{off}} [10^{-6} \text{ s}^{-1}]$	$K_D [\text{pM}]$
BBG10I-1-StrepII	$14,14 \pm 0,02$	$55,21 \pm 0,03$	$391 \pm 2,0$
BBG10I-1-SALPETGA-His6	$7,79 \pm 0,01$	$64,56 \pm 0,02$	$829 \pm 3,3$
BBG10I-1-rGel	$8,58 \pm 0,02$	$73,60 \pm 0,04$	$858 \pm 4,7$

Die Ergebnisse eines *in-vitro*-Vitalitätstests mit Zellen der humanen FaDu-Krebszelllinie (Daten freundlicherweise von Dr. P. Kornberger zur Verfügung gestellt) zeigen, dass das Anticalin-basierte Toxin-Konjugat bereits in nanomolarer Konzentration Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Tumorzellen hat ( $IC_{50} = 68 \text{ nM}$ ). Dagegen wies ein Kontrollprotein, bei welchem das Toxin mit dem rekombinanten wtLcn2 anstelle des Hsp70-bindenden Anticalins gekoppelt wurde, einen  $IC_{50}$ -Wert von  $> 2000 \text{ nM}$  auf. Das unkonjugierte Anticalin zeigte im entsprechenden Konzentrationsbereich keinen vitalitätshemmenden Effekt.

### 3.7 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von Anticalin-basierten Tracern für das Tumor-Imaging

Für den Einsatz von Proteinen als Tracer beim Tumor-Imaging ist es notwendig, diese so zu markieren, dass sie über die physikalische Barriere der Haut und anderer Gewebe hinweg detektierbar werden. Wenngleich in den letzten Jahren an neuartigen Imaging-Technologien – u.a. basierend auf Infrarotfluoreszenz und ultraschallreflektierenden Mikrobläschen – geforscht wird, so sind Radioaktivitäts-basierte Bildgebungsverfahren derzeit am leistungsfähigsten, sowohl was die Tiefe der Gewebepenetration als auch das Auflösungsvermögen betrifft (James & Gambhir, 2012). Bei der Radioaktivmarkierung von Proteinen haben sich vor allem zwei Methoden etabliert: Zum einen die Radiohalogenierung von Tyrosin- und Histidinseitenketten und zum anderen die Konjugation der Proteine mit Chelatbildnern für radioaktive Metallionen.

Nachdem Versuche zur Iodierung des Anticalins BBG10C/I mithilfe des Oxidationsmittels Iodogen den völligen Verlust der Bindungsaktivität in SPR-Studien mit immobilisiertem Hsp70.1 zur Folge hatten (Daten nicht gezeigt), wurde die Metallchelatomethode zur Radionuklidkopplung des Anticalins angewandt.

#### 3.7.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für die Produktion von Anticalinen mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit und einem reaktiven Cysteinrest

In Tumor-Imaging-Studien mit HER2/neu- und CD20-spezifischen Fab-Fragmenten hat sich gezeigt, dass deren relativ kurze Plasma-Halbwertszeit für das Erreichen eines idealen Tumor-zu-Blut-Kontrasts nachträglich ist. Optimale Bildergebnisse wurden dagegen mit Fab-Fragmenten erzielt, deren Plasma-Halbwertszeit PASylierung (Schlupschy *et al.*, 2013), d.h. durch genetische Fusion mit einer 200 AS-Sequenz aus Prolin, Alanin und Serin (PAS200) verlängert wurde (Mendler *et al.*, 2014). Dementsprechend wurde hier eine entsprechend modifizierte Variante des Anticalins BBG10C/I generiert.



Für die Kopplung von Proteinen mit Chelatbildnern stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Sehr verbreitet ist die Modifikation der Lysin-Aminogruppen von Proteinen durch bifunktionelle Chelatoren mit reaktiven Gruppen wie Isothiocyanaten oder Succinimidyl-Estern. Ein Nachteil dieser Kopplungsmethode ist die potentielle Beeinträchtigung der Aktivität des Bindungsproteins durch die Modifikation von Lysinseitenketten im Bereich des Paratops. Insbesondere bei relativ kleinen Bindungsproteinen wie Anticalinen ist hierfür die statistische Wahrscheinlichkeit erhöht.

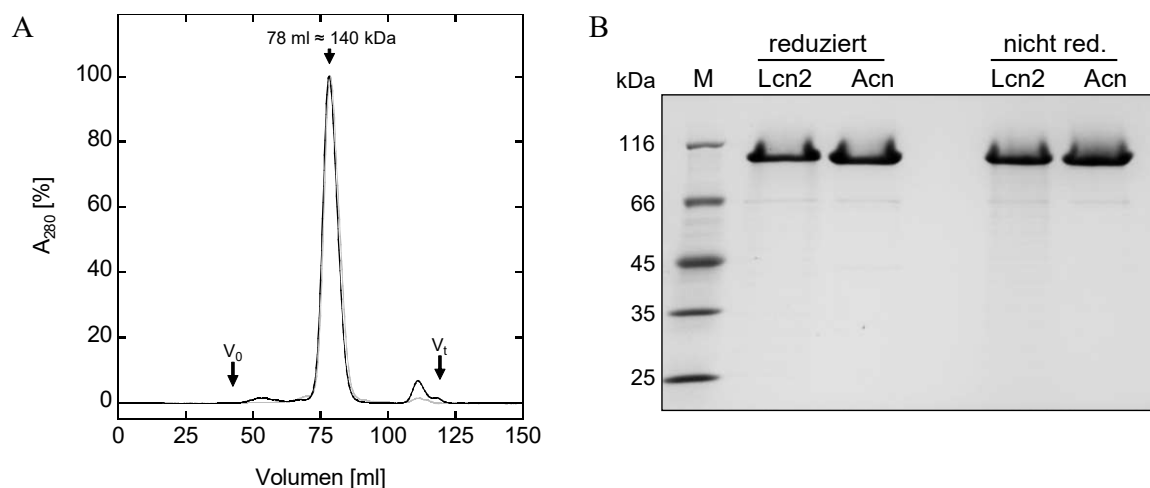
Eine Alternative ist die Einführung neuer Seitenkettenfunktionalitäten in das zu markierende Protein zum Zweck der ortsgerichteten Kopplung. Im Fall des Anti-Hsp70-Anticalins wurde dies durch einen zusätzlichen Cysteinrest am C-Terminus erreicht. Da die beiden in der Lipocalin-Gerüststruktur vorhandenen Cysteinreste eine Disulfidbrücke ausbilden, sollte das eingeführte Cystein als einziges freies Thiol im Protein vorliegen und somit eine ortsgerichtete Kopplung mit Maleimid-funktionalisierten Chelatbildnern erlauben.

Hierzu wurden Expressionsvektoren für drei neue Varianten des Anticalins BBG10C/I kloniert (Abbildung 3.40A): (1) das Anticalin mit einem ungepaarten Cysteinrest am C-Terminus (pASK75-BBG10C/I-Cys), (2) das Anticalin mit PAS200-Sequenz und ungepaartem Cysteinrest am C-Terminus (pASK75-BBG10C/I-PAS200-Cys) und (3) das PASylierte Anticalin ohne zusätzliches Cystein (pASK75-BBG10C/I-PAS200). Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen: die Genkassette für das Anticalin wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern „D20“ und „Lcn2-SapI-Cys“ sowie dem Plasmid pNGAL98-BBG10C/I als Matrize amplifiziert. Mit Hilfe des letztgenannten Primers wurde an die Anticalin-kodierende Sequenz eine *SapI*-Restriktionsschnittstelle, ein Cystein-Codon und das der 5'-seitigen Hälfte einer *AfeI*-Schnittstelle entsprechende Serin-Codon AGC angehängt. Das mit *XbaI* verdaut und mittels T4-Polynukleotidkinase phosphorylierte PCR-Produkt wurde mit dem Vektorrückgrat von mit *XbaI* und *AfeI* verdautem pASK75-his ligiert, wodurch der Leserahmen des Anticalins in dem so entstandenen Plasmid pASK75-BBG10C/I-Cys zudem um das His<sub>6</sub>-tag verlängert wurde (Abbildung 3.40B).

Anschließend wurde das Plasmid pASK75-BBG10C/I-Cys mit *SapI* verdaut und mit einer *SapI*-kompatiblen PAS1.2(200)-Kassette (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Uli Binder, XL-protein GmbH) ligiert, womit der Vektor pASK75-BBG10C/I-PAS200-Cys erhalten wurde. Zur Erzeugung eines Plasmids für die Produktion einer PASylierten Variante des Anticalins ohne freies Cystein, pASK75-BBG10C/I-PAS200, wurde das Cystein-Codon im vorigen Plasmid mittels Quickchange-Mutagenese unter Verwendung der Primer QC-PAS200-His\_f und QC-PAS200-His\_r deletiert. Zur Herstellung entsprechender Kontrollproteine wurde in allen drei Konstrukten der für das Anticalin kodierende Bereich unter Verwendung der *BstXI*-Restriktionsschnittstellen ersetzt gegen die wtLcn2-Sequenz (vgl. Abschnitt 3.3.2).



volumens zurückzuführen (Schlapschy *et al.*, 2013). Sowohl das PASylierte Anticalin, als auch das Kontrollprotein zeigten hierbei ein monodisperses Elutionsprofil und erschienen in der SDS-PAGE homogen (Abbildung 3.41), wobei eine deutlich verminderte Mobilität der PASylierten Proteine im Vergleich mit dem mitgeführten Proteingrößenstandard (Abweichung der apparenten Molmasse zum berechneten Wert etwa 60 kDa) durch die mangelnde Anlagerung von SDS-Molekülen an die hydrophile PAS-Sequenz erklärt werden konnte (Schlapschy *et al.*, 2013).

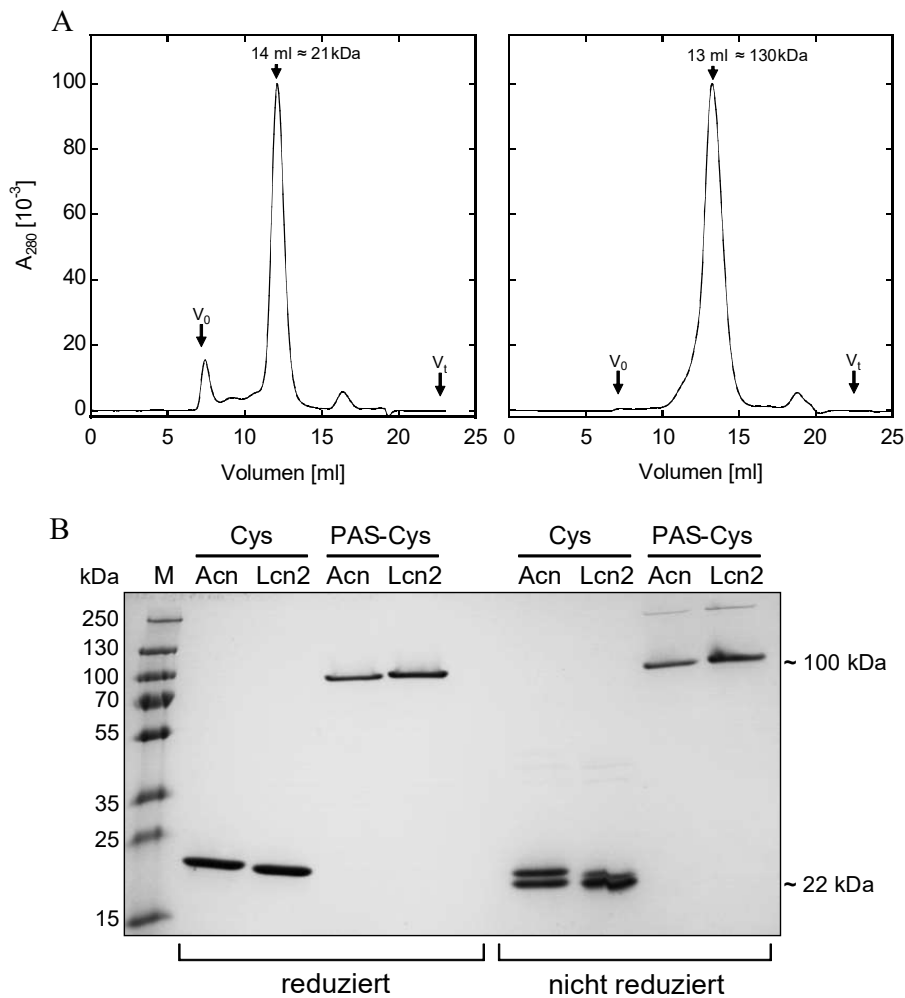


**Abbildung 3.41:** Reinigung und Charakterisierung PASylierter Varianten des Anticalins BBG10C/I und Lcn2 ohne ungepaarten Cysteinrest. (A) Feinreinigung und Analyse der mittels IMAC aus dem Periplasmaextract isolierten Proteine BBG10C/I-PAS200-Cys (schwarze Linie) und Lcn2-PAS200-Cys (rechts) erfolgten durch SEC auf einer HR16/60-Säule mit Superdex 200-Material. Die hierbei ermittelten apparenten Molmassen sowie Durchbruch- ( $V_0$ ) und Bettvolumina ( $V_t$ ) der in PBS äquilibrierten SEC-Säule sind angegeben. Die berechneten Molmassen der Proteine betragen 38,5 kDa (Anticalin) und 38,4 kDa (Lcn2). (B) SDS-PAGE der PASylierten Varianten von Anticalin (Acn) und wt-Lcn2 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen.

Die PASylierten und nicht-PASylierten Varianten von BBG10C/I und wtLcn2 mit dem zusätzlichem Cysteinrest wurden im Periplasma von *E. coli* produziert und mittels IMAC isoliert. Die Proteinausbeuten pro Liter Kulturmedium und  $OD_{550}$  betragen 0,38 bzw. 0,18 mg für nicht-PASyliertes und PASyliertes Anticalin und 0,40 bzw. 0,20 mg für nicht-PASyliertes und PASyliertes Lcn2. Bei Analyse der Proteine mittels SEC zeigte sowohl die PASylierte als auch die nicht-PASylierte Anticalinversion ein monodisperses Elutionsprofil (Abbildung 3.42A). Die anhand des Elutionsvolumens ermittelte apparente Molmasse des nicht PASylierten Anticalins entsprach mit 21 kDa annähernd dem für das Proteinmonomer errechneten Wert (22,1 kDa). Die Abweichung der apparenten Molmasse des PASylierten Anticalins (130 kDa) von der rechnerischen Masse (38,6 kDa) konnte wieder auf die spezifischen Eigenschaften der PAS-Sequenz zurückgeführt werden. Eine leichte Schulter des Elutionspeaks von BBG10C/I-PAS200-Cys deutete auf die Anwesenheit geringer Mengen an vermutlich disulfidverbrücktem Anticalin-Dimer hin. Die Elutionsprofile der gleichermaßen produzierten Lcn2-Varianten entsprachen im Wesentlichen denen der Anticalinvarianten (ohne Abbildung).

Die SDS-PAGE der Anticalin- und Lcn2-Varianten mit zusätzlichem Cysteinrest ergab unter reduzierenden Bedingungen das Bild homogener Proteinpräparationen. Unter nicht-reduzierenden

den Bedingungen zeigten die nicht-PASylierten Varianten von sowohl BBG10C/I als auch wtLcn2 in der SDS-PAGE jedoch zwei Banden in ähnlicher Intensität mit nur geringer Differenz in ihrer elektrophoretischen Mobilität (Abbildung 3.42B). Eine mögliche Erklärung für diese redoxabhängige Inhomogenität war die Präsenz eines Disulfidisomers, bei dem sich die Disulfidbrücke nicht wie in der nativen Lcn2-Struktur zwischen Cys76 und Cys175 sondern zwischen Cys76 und dem künstlich eingeführten strukturell benachbarten Cysteinrest an Position 183 ausgebildet hat (vgl. Abbildung 3.40B). Auch im Fall der PASylierten Proteine mit dem zusätzlichen Cysteinrest zeigte sich in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Inhomogenität. Diese Bande mit deutlich geringerer Intensität wies jedoch ein stark verzögertes Laufverhalten im Vergleich zur Hauptbande auf und war höchstwahrscheinlich auf eine leichte Verunreinigung der Proteinpräparation mit disulfidverknüpftem Proteindimer zurückzuführen.



**Abbildung 3.42:** Reinigung und Charakterisierung PASylierter und nicht-PASylierter Varianten des Anticalins BBG10C/I und wtLcn2 mit ungepaartem Cysteinrest. (A) Feinreinigung und Analyse der mittels IMAC aus dem Periplasmaextrakt isolierten Proteine BBG10C/I-Cys (links) und BBG10C/I-PAS200-Cys (rechts) erfolgten durch SEC auf Tricorn 10/300-Säulen mit Superdex 75 bzw. Superdex 200-Material. Die hierbei ermittelten apparenten Molmassen sowie Durchbruch- ( $V_0$ ) und Bettvolumina ( $V_t$ ) der in PBS äquilibrierten SEC-Säulen sind angegeben. Die berechneten Molekülmassen der Proteine betragen 22,1 kDa (nicht PASyliert) und 38,6 kDa (PASyliert). (B) SDS-PAGE der PASylierten (PAS-Cys) und nicht-PASylierten (Cys) Varianten von Anticalin (Acn) und wtLcn2 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen.

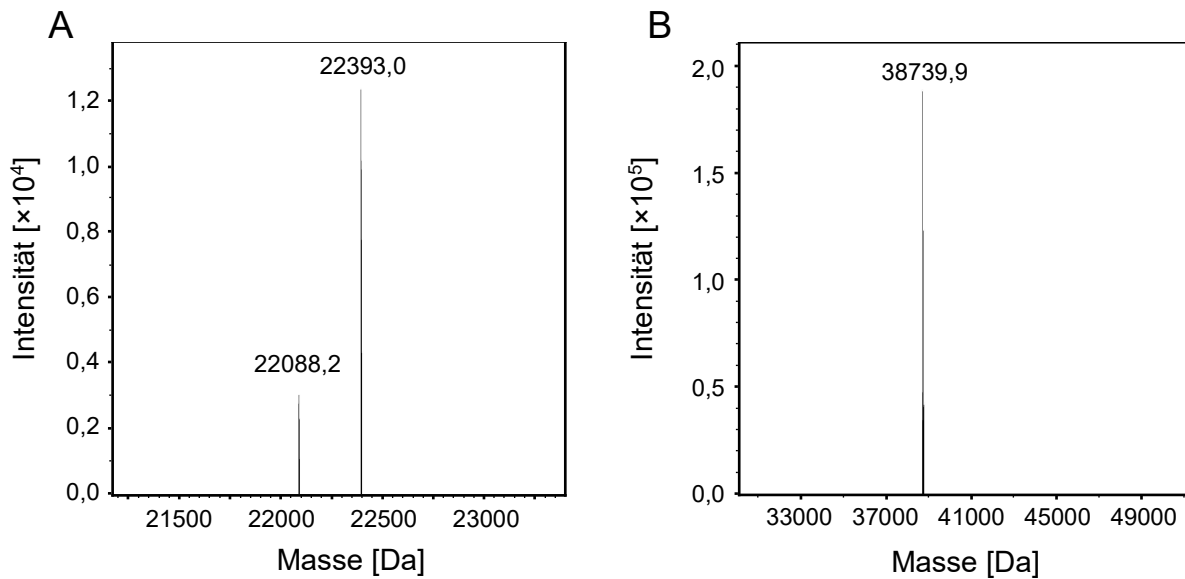
Die Bindungsaktivität der neuen Versionen des Anticalins BBG10C/I wurde in SPR-Experimenten analysiert. Der Versuchsaufbau mit immobilisiertem Hsp70.1 entsprach dabei dem zuvor für die Charakterisierung der ursprünglichen Version von BBG10C/I verwendeten (vgl. Abschnitt 3.4.2). Hierbei zeigte sich, dass die Affinität des Anticalins durch die Einführung des zusätzlichen Cysteins nicht signifikant beeinträchtigt wurde (Tabelle 3-6). Die translationale Fusion des Anticalins mit einer PAS200-Sequenz führte sowohl mit als auch ohne zusätzlichen Cysteinrest am C-Terminus zu einer leichten Erhöhung der  $K_D$ -Werte um das 3,5- bzw. das 2,3-fache.

Da sich in vorangegangenen Studien zur Kopplung von periplasmatisch produzierten Fab-Fragmenten mit einem zusätzlich eingeführtem Cysteinrest gezeigt hat, dass lediglich ein Bruchteil davon mit freier Thiolgruppe vorliegt (Schlupschy, 2004), schien es notwendig, auch die gereinigten Anticaline mit dem zusätzlichen Cysteinrest diesbezüglich zu analysieren. Die Methode der Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) gestattet bei Proteinen im vorliegenden Größenbereich die Bestimmung der exakten Masse mit einer Messgenauigkeit besser als  $\pm 1$  Da. Somit ist es möglich, die Ausbildung von Cystingruppen oder ggf. gemischten Disulfiden mit anderen Substanzen zu erkennen.

Im Fall des nicht-PASylierten Anticalins mit zusätzlichem Cysteinrest wurde die berechnete Masse des Anticalins mit einer ausgebildeten Disulfidbrücke (22089,0 Da) mit einer Abweichung von -0,8 Da im dekonvolvierten Massenspektrum identifiziert. Allerdings wurde auch eine zweite Masse mit deutlich stärkerem Messsignal gefunden, welche eine Abweichung zur errechneten Masse des Anticalins von +304 Da aufwies (Abbildung 3.43). Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Massenspezies ist die Ausbildung eines gemischten Disulfids mit Glutathion (GSH), dessen Vorkommen im Periplasma von *E. coli* belegt ist (Eser *et al.*, 2009). Die errechnete Masse für BBG10C/I-Cys-S-S-G beträgt 22394,1 Da, was einer verbliebenen Massendifferenz von +1,1 Da entspricht.

Bei der Analyse der PASylierten Anticalinversion mit dem zusätzlichen Cysteinrest wurde nur eine Massenspezies identifiziert, wobei diese eine Abweichung von +132,5 Da zum errechneten Wert aufweist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Ausbildung eines gemischten Disulfids mit Homocystein (Hcy), einer Aminosäure die vor allem als Intermediat bei der Methionin-Biosynthese von *E. coli* eine Rolle spielt (Soda, 1987) und möglicherweise auch im Kulturmedium mit Hefeextrakt vorkommt. Die errechnete Masse von BBG10C/I-PAS200-Cys-S-S-Hcy beträgt 38740,2 Da und weicht damit bloß um +0,3 Da von dem kalkulatorischen Wert ab.

Die Produktion der beiden Versionen von BBG10C/I mit freiem Cysteinrest wurde in einem zweiten Versuch in Anwesenheit des Faltungshelferplasmids pTUM4 durchgeführt (vgl. Abbildung 3.6). Die Koexpression der auf pTUM4 kodierten Disulfidisomerasen führte jedoch zu keiner signifikanten Änderung der ESI-Massenspektren (ohne Abbildung).



**Abbildung 3.43:** ESI-MS der Versionen des Anticalins BBG10C/I mit künstlich eingeführtem Cysteinrest. (A) Die nicht-PASylierte Version zeigte zwei Spezies, wovon eine der berechneten Masse des Anticalins mit einer ausgebildeten Disulfidbrücke (22089,0 Da) und die zweite Spezies der Masse des Anticalins im gemischten Disulfid mit Glutathion (22394,1 Da) entsprach. (B) Die Masse der PASylierten Anticalinpräparation entsprach der errechneten Masse eines gemischten Disulfids aus Anticalin-PAS200-Cys und Homocystein (38740,6 Da).

Aufgrund der Blockierung des ungepaarten Cysteinrests bei den Anticalinvarianten BBG10C/I-PAS200-Cys und BBG10C/I-Cys war es notwendig, diese vor der ortsgerichteten Kopplung mit dem Maleimid-derivatisierten Chelator DTPA durch ein geeignetes mildes Reduktionsmittel in die freie Thiolform zu überführen (vgl. Glennie *et al.*, 1987). Unter Einsatz von 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde hierbei auch eine mögliche Reduktion der nativen Disulfidbrücke des Anticalins in Kauf genommen. Durch die faltungsbedingte räumliche Nähe der entsprechenden Cystein-Seitenketten kann allerdings angenommen werden, dass nach Entfernung des Reduktionsmittels die oxidative Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke gegenüber der Kopplungsreaktion mit dem bifunktionellen Chelator bevorzugt abläuft und letzterer damit hauptsächlich mit dem künstlich eingeführten Cystein reagiert.

Nach Kopplung der dementsprechend behandelten Anticalinversionen mit DTPA-Bz-Maleimid (Abschnitt 2.5.6.2, Abbildung 2.1) wurden mittels Terbium-Fluoreszenztitrationen Kopplungsverhältnisse (Chelator:Anticalin) von 1,11 bei BBG10C/I-Cys und 0,99 bei BBG10C/I-PAS200-Cys ermittelt. Trotz vergleichbarer Kopplungseffizienz des PASylierten und des nicht-PASylierten Anticalins wirkte sich die Kopplung unterschiedlich stark auf die Bindungsaktivität beider Versionen aus. Während der  $K_D$ -Wert im Fall von BBG10C/I-PAS200-Cys-DTPA nur um einen Faktor von 1,8 zunahm, verringerte sich die Affinität vom nicht-PASylierten BBG10C/I-Cys-DTPA um den Faktor 9,6. Eine mögliche Erklärung für die hauptsächlich durch Verringerung von  $k_{on}$  hervorgerufene Beeinträchtigung der Affinität können repulsive

Wechselwirkungen der stark negativ geladenen (metallfreien) DTPA-Gruppe mit Teilen des immobilisierten „Antigens“ oder mit der ebenfalls negativ geladenen Carboxymethyldextran-Matrix des SPR-Chips sein. Die PAS-Sequenz könnte dagegen als Platzhalter zwischen DTPA und Bindungsstelle fungieren und so den geringeren Affinitätsverlust der PASylierten Variante erklären. Mit  $K_D$ -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich befanden sich die Affinitäten der Anticaline nach der Kopplung mit DTPA-Bz-Maleimid allerdings immer noch in einem für das *in-vivo*-Imaging geeigneten Bereich.

Neben der ortsgerichteten Markierung von Anticalinen mittels Maleimid-Kopplungschemie wurde ein weiterer auf BBG10C/I-PAS200-basierender Tracer durch aminoselektive Kopplung mit dem als Isothiocyanat aktivierten Chelatbildner Desferrioxamin (Dfo, vgl. Abschnitt 2.5.5.3, Abbildung 2.2) hergestellt. Wie in aktuellen Publikationen gezeigt wurde, eignet sich dieser aus *Streptomyces pilosus* isolierte Chelatbildner, welcher in der Natur Eisenkomplexe ausbildet, durch Bildung von stabilen Komplexen mit dem Nebengruppenelement Zirkonium (Perk *et al.*, 2010). Aufgrund seiner Halbwertszeit von 3,3 Tagen ist insbesondere das positronenemittierende Radioisotop  $^{89}\text{Zr}$  für die Verwendung in PET-Imaging-Studien interessant.

Das Kopplungsverhältnis von BBG10C/I-PAS200 mit SCN-Bz-Dfo wurde wiederum durch Terbium-Fluoreszenztitration bestimmt und betrug 1,18 bzw. 1,30 für das Kontrollprotein Lcn2-PAS200. Die mittels SPR untersuchte Antigenaffinität der so modifizierten Version des Anticalins wurde durch die Kopplung offensichtlich stärker beeinflusst, was sich in ungünstigeren  $k_{\text{on}}$ - und  $k_{\text{off}}$ -Werten und einer Erhöhung des  $K_D$ -Wertes um Faktor 11,9 im Vergleich zum unmodifizierten Anticalin BBG10C/I-PAS200 ausdrückt (Tabelle 3-6).

**Tabelle 3-6:** SPR-spektroskopische Bestimmung der Affinitäten von Anticalinvarianten gegenüber immobilisiertem rhHsp70.1 vor und nach der Kopplung mit verschiedenen bifunktionalen Chelatbildnern

	$k_{\text{on}}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_{\text{off}}$ [s <sup>-1</sup> ]	$K_D$ [nM]
BBG10C/I	$8,78 \times 10^4$	$4,48 \times 10^{-5}$	0,510
BBG10C/I-PAS200	$5,38 \times 10^4$	$9,87 \times 10^{-5}$	1,89
BBG10C/I-PAS200-Dfo	$9,94 \times 10^3$	$2,23 \times 10^{-4}$	22,5
BBG10C/I-Cys	$1,52 \times 10^5$	$8,56 \times 10^{-5}$	0,565
BBG10C/I-Cys-DTPA	$2,37 \times 10^4$	$1,28 \times 10^{-4}$	5,41
BBG10C/I-PAS200-Cys	$3,76 \times 10^4$	$4,86 \times 10^{-5}$	1,29
BBG10C/I-PAS200-Cys-DTPA	$5,49 \times 10^4$	$1,24 \times 10^{-4}$	2,26

### 3.7.3 Untersuchung der Biodistribution von Anti-Hsp70-Anticalin-basierten Tracern am Mausmodell mit xenotransplantierten Tumoren

In einer Pilotstudie sollte die Eignung von Anticalin-basierten Tracern für das Tumor-Imaging *in vivo* untersucht werden. Für diese Experimente wurde ein Mausmodell mit xenotransplantierten Tumoren der humanen FaDu-Krebszelllinie verwendet. Entscheidend für die Aussagekraft eines derartigen Tiermodells ist die Kreuzreaktivität der für den Einsatz im Menschen entwickelten

Substanz mit dem orthologen Zielprotein der Maus. Die Erfüllung dieser Anforderung wurde im Fall des Anticalins BBG10C/I in SPR-Bindungsstudien mit murinem Hsp70.3 gezeigt (vgl. Abschnitt 3.5.3).

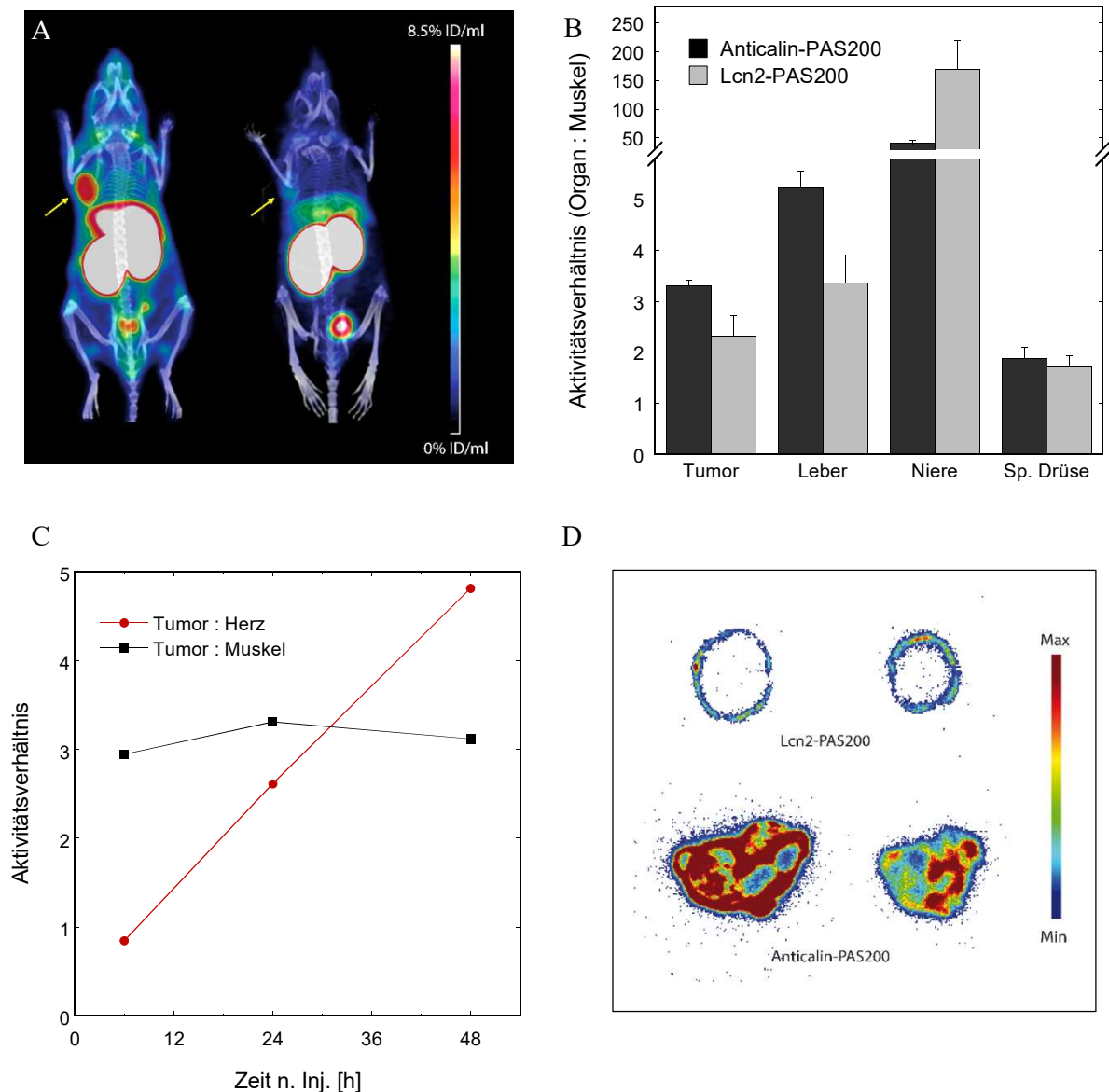
Die durchgeführten Tierexperimente umfassten drei verschiedene BBG10C/I-basierte Tracer und zwei unterschiedliche Methoden zur Analyse der Biodistribution. Die die mit Hilfe des zusätzlichen Cysteinrests hergestellten Proteinkonjugate BBG10C/I-Cys-DTPA und BBG10C/I-PAS200-Cys-DTPA wurden mit dem  $\gamma$ -Strahler Lutetium-177 beladen und konnten so radiometrisch in den präparierten Organen der Versuchstiere quantifiziert werden. Das mittels Aminogruppen-Kopplungschemie erzeugte Konjugat BBG10C/I-PAS200-Dfo wurde mit dem  $\beta^+$ -emittierenden Nuklid Zirkonium-89 beladen und mittels PET in den Versuchstieren visualisiert. Die radiochemische Reinheit der mittels Gelfiltration gereinigten Proteinkonjugate wurde dünnschichtchromatographisch bestimmt und betrug in allen Fällen über 95 %.

Für die PET-Studie wurden je zwei tumortragende Mäuse durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene mit  $^{89}\text{Zr}$ -beladenem BBG10C/I-PAS200-Dfo bzw. äquivalent markiertem Lcn2-PAS200-Dfo als Kontrolle behandelt, wobei die injizierte Dosis zwischen 1,97 MBq und 4,78 MBq betrug. PET/CT-Scans der Mäuse wurden nach 6 h, 24 h und 48 h aufgenommen; die Kontrollmäuse wurden ausschließlich nach 24 h gescannt.

In den mit dem  $^{89}\text{Zr}$ -Anticalin-Konjugat behandelten Mäusen waren die Tumoren in PET/CT-Aufnahmen nach 24 h deutlich sichtbar (Abbildung 3.44A). Die Quantifizierung der maximalen Signalstärke im Bereich des Tumors betrug für die dargestellte Anticalin-behandelte Maus 7,1 % ID/ml, für die dargestellte Kontrollmaus lediglich 2,4 % ID/ml, was etwa einem Faktor von 3 entspricht. Beim Vergleich der durchschnittlichen Signalintensitäten von Tumor zu Muskel fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den Anticalin-behandelten Mäusen (Verhältnis 3,3:1) und den mit dem Kontrollprotein behandelten Mäusen (Verhältnis 2,3:1) weniger deutlich hervortreten (Abbildung 3.44B). Die Ursache hierfür war eine im Verhältnis zu Lcn2 stärkere Hintergrundaktivität des Anticalins im Blut und den stärker perfundierten Organen, wie aus den nachfolgend beschriebenen Resultaten der szintillationsradiometrischen Biodistributionsstudie deutlich wurde (vgl. Abbildung 3.45).

Des Weiteren zeigte sich bei allen behandelten Mäusen eine Anreicherung der Radioaktivität in der Leber, welche in einem ähnlichen Größenbereich lag wie die Anreicherung im Tumor. Das Aktivitätsverhältnis Niere-zu-Muskel betrug für die Anticalin-behandelten Mäuse 40:1 und übertraf die Tumoranreicherung somit um eine Größenordnung. Im Fall des PASylierten Lcn2 war die Akkumulation des Radionuklids mit einem Niere-zu-Muskel-Verhältnis von 170:1 noch einmal signifikant höher. Eine leichte Anreicherung von sowohl Anticalin als auch Kontrollprotein wurde auch im Bereich der Speicheldrüsen festgestellt. Beim Verfolgen der Aktivitätsverhältnisse der Anticalin-behandelten Mäuse über einen Zeitraum von 48 h zeigte sich die schnelle Einstellung eines relativ konstanten Tumor-zu-Muskel-Verhältnisses bereits nach 6 h, während das mit der Blutkonzentration des Tracers korrelierende Tumor-zu-Herz-Verhältnis über die Zeit kontinuierlich anstieg (Abbildung 3.44C).





**Abbildung 3.44:** Charakterisierung des Anti-Hsp70-Anticalins für den Einsatz als Tracer beim *in-vivo*-Tumor-Imaging. (A) Repräsentative PET/CT-Bilder von Mäusen mit Tumor-Xenotransplantaten der FaDu-Zelllinie 24 h nach der Injektion von  $^{89}\text{Zr}$ -markiertem BBG10C/I-PAS200-Dfo (links) oder entsprechend markiertem Lcn2-PAS200-Dfo als Kontrolle (rechts). Die Tumor-Xenotransplantate sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Aus den PET-Daten extrapolierte durchschnittliche Volumenaktivitäten [% injizierte Dosis/ml] der Tumoren und verschiedener anderer Organe im Verhältnisse zur Oberschenkelmuskulatur. Die dargestellten Daten basieren auf den Mittelwerten von jeweils zwei Mäusen für das Anticalin (BBG10C/I) und die Kontrolle (Lcn2). (C) Kinetik der Biodistribution der  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Anticalinvariante. Die dargestellten Aktivitätsverhältnisse wurden aus den zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommenen PET-Daten von zwei Mäusen gemittelt. (D) Autoradiographische Aufnahmen von Tumor-Dünnschnitten 72 h nach Injektion der radioaktiv markierten Proteine.

Nach 72 h wurden die Mäuse eingeschläfert und Dünnschnitte der entnommenen Tumoren am Kryomikrotom hergestellt. Autoradiogramme dieser Schnitte sind in Abbildung 3.44D dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Lokalisierung des Kontroll-Tracers lediglich auf den

äußeren Rand des Tumors beschränkt war. Der Anticalin-Tracer zeigte insgesamt eine deutlich stärkere Aktivität, welche bis in zentrale Bereich des Tumors hineinreichte. Eine gewisse Inhomogenität der Tracer-Verteilung ist wahrscheinlich auf die für Tumoren typische Heterogenität der Vaskularisierung zurückzuführen (Baish *et al.*, 1996).

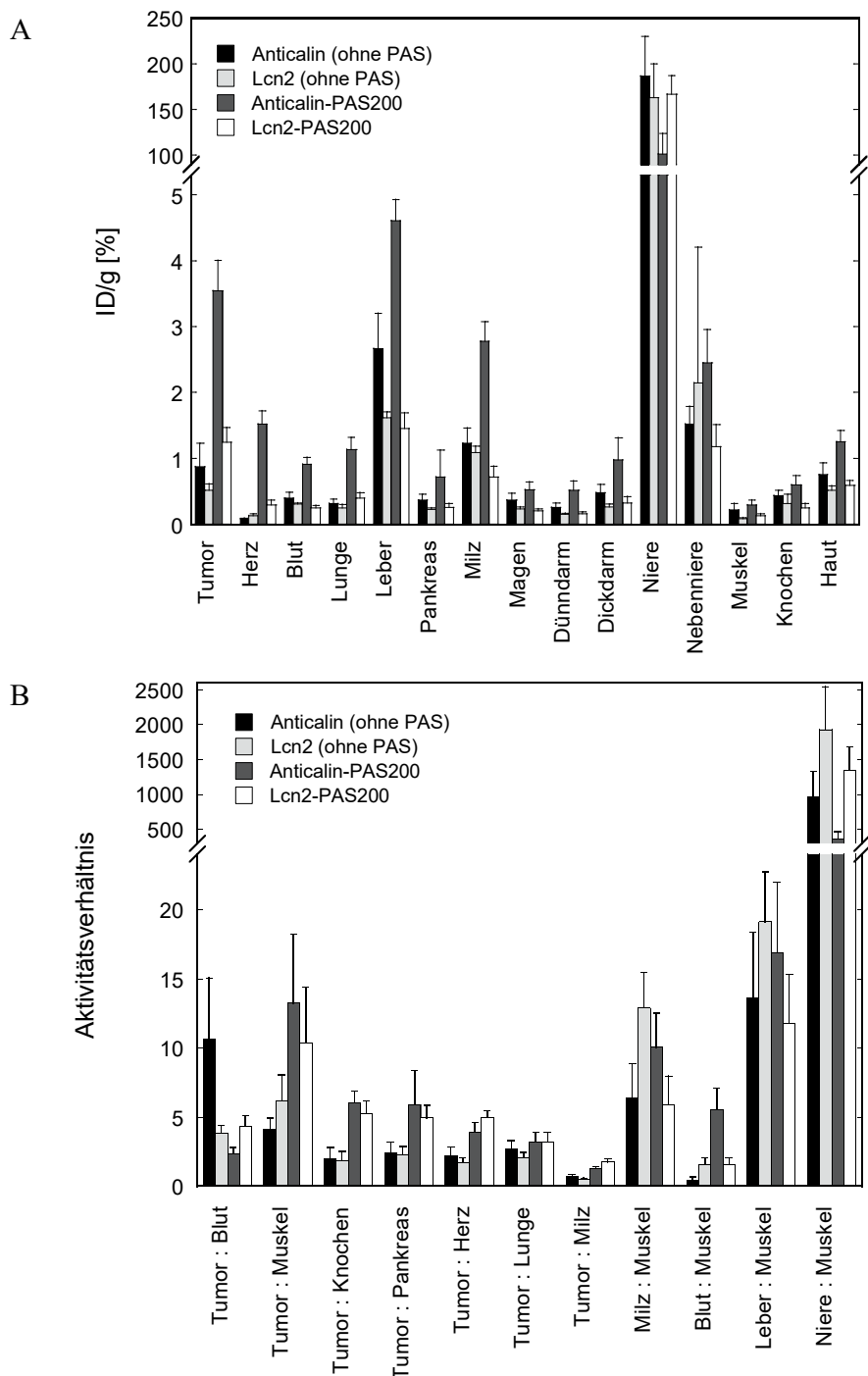
Zur genaueren quantitativen Erfassung der Anti-Hsp70-Anticalin-Biodistribution wurden je vier Tumor-xenotransplantierte Versuchstiere mit  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Versionen des Anticalins BBG10C/I mit bzw. ohne PAS200-Sequenz sowie mit entsprechenden Versionen des Kontrollproteins Lcn2 behandelt. Nach 24 h wurden die Tiere seziert, die entnommenen Organe wurden gewogen, und die aufgenommene Menge des injizierten Radiokonjugats wurde durch  $\gamma$ -Szintillationszählung bestimmt (Abbildung 3.45A, Tabelle 3-7).

Mit durchschnittlich 3,6 % der injizierten Dosis (ID) pro Gramm Gewebemasse war die Tumoranreicherung des PASylierten Anticalins von allen untersuchten Proteinen am größten. Die Anreicherung des gleichfalls PASylierten Kontrollproteins im Tumor war mit 1,3 % ID/g um den Faktor 2,8 geringer. Die Tumoranreicherung der nicht-PASylierten Proteine war mit 0,9 % ID/g (Anticalin) bzw. 0,5 % ID/g (Lcn2) dagegen wesentlich schwächer.

Wie auch schon bei den semiquantitativen PET-basierten Biodistributionsexperimenten beobachtet, bestätigte sich bei der szintillationsradiometrischen Studie die Anreicherung von sowohl Kontrollprotein als auch Anticalin in der Leber. Die prozentual aufgenommene Dosis übertraf in allen Fällen die entsprechende Aufnahme im Tumor. Die PASylierten Versionen von sowohl Anticalin als auch Kontrollprotein zeigten verglichen mit den nicht-PASylierten Proteinen eine höhere Konzentration im Blut. In besonderem Maße traf dies auf die PASylierte Version des Anticalins zu, dessen Konzentration zudem in Organen des retikuloendothelialen Systems (Leber und Milz) stark erhöht war.

Der Hauptanteil der injizierten Dosis akkumulierte bei allen Tracern in der Niere (101-186 % ID/g). Interessanterweise bewirkte die PASylierung im Fall des Anticalins eine Reduktion der Aktivität dort um 54 %, während dies beim Kontrollprotein Lcn2 keine signifikante Auswirkung hatte. Erhöhte Aktivitätswerte für die Nebennieren sind möglicherweise auf eine Kontamination mit Nierengewebe bei der Präparation der Organe zurückzuführen.

Beim Vergleich der Tumor-zu-Blut-Aktivitätsverhältnisse war das nicht-PASylierte Protein mit einem Verhältnis von  $>10:1$  (vgl. 3,8:1 für Lcn2-Cys-DTPA Verhältnis) herausragend, was sich hauptsächlich durch die schnelle Eliminierung des Anticalins aus der Blutbahn erklären lässt (Abbildung 3.45B). Das Tumor-zu-Muskel-Verhältnis war mit 4:1 geringer als das des Kontrollproteins (6:1). Das Tumor-zu-Blut-Verhältnis des PASylierten-Anticalins war aufgrund der erhöhten Blutkonzentration mit einem Wert von 2,4:1 das niedrigste aller analysierten Tracer. Andererseits lag das Tumor-zu-Muskel-Aktivitätsverhältnis für dieses Protein mit 13:1 an der Spitze aller untersuchten Proteine. Erstaunlicherweise zeigte auch das PASylierte Kontrollprotein Lcn2-PAS200-DTPA mit 10:1 eine gute Tumoranreicherung.



**Abbildung 3.45:** Biodistribution von  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Anticalinvarianten mit ortsgerecht gekoppeltem Chelator DTPA-Bz-Maleimid 24 h nach Injektion der radioaktiv markierten PASylierten und nicht PASylierten Anticaline bzw. entsprechender Varianten des Kontrollproteins wtLcn2 in Mäuse mit FaDu-Xenotransplantaten. Je Variante wurde in vier Tieren die Radioaktivität der nach der Entnahme gewogenen Organe durch  $\gamma$ -Szintillationszählung bestimmt. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte der organspezifischen Aktivitäten bezogen auf die injizierte Dosis (16-25 MBq). (B) Verhältnisse der gemittelten spezifischen Aktivitäten [% ID/g] im Tumor zu denen verschiedener Organe bzw. Verhältnisse der Aktivitäten in Organen des retikuloendothelialen Systems und der Niere zu denen der Oberschenkelmuskulatur.

**Tabelle 3-7:**  $^{177}\text{Lu}$ -Biodistribution [% ID/g] 24 h nach Injektion der [ $^{177}\text{Lu}$ -Bz-DTPA]-konjugierten Proteine (n = 4)

	<b>BBG10C/I-PAS200</b>	<b>Lcn2-PAS200</b>	<b>BBG10C/I</b>	<b>Lcn2</b>
<b>Tumor</b>	3,55 ± 0,46	1,25 ± 0,23	0,88 ± 0,35	0,51 ± 0,10
<b>Blut</b>	1,52 ± 0,20	0,29 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,02
<b>Herz</b>	0,91 ± 0,10	0,25 ± 0,04	0,39 ± 0,09	0,30 ± 0,02
<b>Lunge</b>	1,13 ± 0,19	0,40 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,25 ± 0,05
<b>Leber</b>	4,61 ± 0,32	1,45 ± 0,24	2,67 ± 0,53	1,62 ± 0,09
<b>Pankreas</b>	0,72 ± 0,41	0,26 ± 0,06	0,36 ± 0,09	0,23 ± 0,03
<b>Milz</b>	2,78 ± 0,30	0,72 ± 0,16	1,23 ± 0,23	1,09 ± 0,10
<b>Magen</b>	0,52 ± 0,12	0,21 ± 0,03	0,37 ± 0,10	0,23 ± 0,04
<b>Dünndarm</b>	0,51 ± 0,14	0,16 ± 0,03	0,26 ± 0,06	0,15 ± 0,02
<b>Dickdarm</b>	0,98 ± 0,33	0,32 ± 0,10	0,48 ± 0,13	0,27 ± 0,04
<b>Niere</b>	100,9 ± 22,7	166,5 ± 20,1	186,3 ± 43,2	162,5 ± 37,5
<b>Nebenniere</b>	2,45 ± 0,51	1,18 ± 0,34	1,52 ± 0,27	2,14 ± 2,07
<b>Muskel</b>	0,29 ± 0,08	0,13 ± 0,03	0,22 ± 0,10	0,09 ± 0,02
<b>Knochen</b>	0,60 ± 0,14	0,25 ± 0,07	0,44 ± 0,08	0,32 ± 0,14
<b>Haut</b>	1,25 ± 0,18	0,59 ± 0,07	0,75 ± 0,17	0,51 ± 0,08

## 4 Diskussion

### 4.1 Heterologe Produktion und Charakterisierung des Fab-Fragments eines Anti-Hsp70-Antikörpers in *E. coli*

Nahezu ein Drittel aller derzeit kommerzialisierten Proteintherapeutika werden in *E. coli* produziert. Insbesondere die kurze Generationszeit, seine geringen Ansprüche an die zur Kultivierung benötigten Nährmedien, die unkomplizierte und wenig zeitaufwändige genetische Manipulation sowie ein auf jahrzehntelanger Forschung beruhender Erfahrungsschatz erklären die Entwicklung dieses Organismus zum „Arbeitstier“ der biotechnologischen Industrie (Huang *et al.*, 2012). Die Etablierung eines Verfahrens zur Produktion komplexer disulfidverbrückter Immunglobulin-Fragmente im Periplasma des Gram-negativen Bakteriums – zeitgleich beschrieben von (Skerra & Plückthun, 1988) und (Better *et al.*, 1988) – bildet bis zum heutigen Tag die Grundlage für die industrielle Herstellung kommerziell erfolgreicher Proteintherapeutika, wie beispielsweise der Fab-Fragmente Ranibizumab (Lucentis) und Certolizumab Pegol (Cimzia).

Trotz der enormen Leistungsfähigkeit dieses Expressionssystems zeigen die empirische Erfahrung sowie die Veröffentlichung einer Reihe von „Problemfällen“, dass die Verwendung dieses Systems nicht für jedes Antikörperfragment zum unmittelbaren Erfolg führt. Die effektive Produktion eines Proteins im Periplasma ist an zwei Voraussetzungen geknüpft: (1) ein Signalpeptid, welches die Translokation des Proteins über die innere Zellmembran durch ein *E. coli*-eigenes Typ II-Sekretionssystem bewirkt und (2) die inhärente Fähigkeit zur Ausbildung der nativen Faltung einschließlich Disulfidbindungen in dieser Umgebung.

In Anbetracht der hohen Divergenz der V<sub>H</sub>-Keimbahn-Genfamilien innerhalb einer Spezies (35 % Übereinstimmung der am weitesten entfernten Keimbahnsequenzen ohne Einbeziehung der Hypervariablen CDRs in der Maus), wird die Überlegenheit mancher V-Domänensubtypen gegenüber anderen bezüglich der Faltungseffizienz und damit der Ausbeuten an löslich produzierte Protein im Periplasma nachvollziehbar (Honegger *et al.*, 2009). Als hauptsächliche Ursache für die sehr geringen Ausbeuten, welche bei der Produktion mancher Antikörperfragmente in *E. coli* festzustellen sind, wurde die Aggregation von Faltungs- bzw. Entfaltungsintermediaten und die damit verbundene Bildung unlöslicher Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) im Periplasma postuliert (Hunke & Betton, 2003; Knappik & Plückthun, 1995; Chan *et al.*, 1996).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines rekombinanten Fab-Fragments des monoklonalen Maus-Antikörpers cmHsp70.1 (Klon C92F3B1), welcher sich durch die Eigenschaft auszeichnet, Membran-assoziiertes Hsp70 auf der Oberfläche muriner und humaner Tumorzellen zu binden (Multhoff, 2007). Die kodierenden Sequenzen der variablen Domänen von schwerer und leichter Kette lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits kloniert vor und wurden auf einem generischen Vektor zur Expression dieser Domänen im chimären Fab-Format (d.h. fusioniert mit den humanen C<sub>κ</sub> und C<sub>H1γ1</sub>-Domänen) subkloniert (Schiweck & Skerra, 1995).

Unter den publizierten Standardbedingungen (Skerra, 1994a) war es jedoch nicht möglich, ein derartiges Fab-Fragment in löslicher Form aus dem Periplasma von *E. coli* zu isolieren.

Die Analyse der Proteinsequenz des von Hybridomzellen ursprünglichen produzierten Antikörpers mittels MS-*de novo*-Sequenzierung ergab signifikante Übereinstimmungen mit den klonierten Sequenzen der V-Regionen, womit davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei den klonierten Sequenzen nicht um Pseudogenprodukte handelte. Fehler bei der Klonierung von Antikörpergenen haben häufig die Ursache, dass multiple produktive Schwere und Leichte Kette-mRNAs auftreten. In selteneren Fällen exprimiert ein klonales Hybridom auch mehrere produktive mRNAs für die beiden Ketten. Häufig wurde beobachtet, dass Hybridomzellen zwei verschiedene Leichte Kette-mRNAs exprimieren, wovon eine für die intakte leichte Kette kodiert, die andere jedoch für eine unproduktive Version, typischerweise mit *Frameshift*- oder *Non-sense*-Mutationen im Bereich des CDR 3 (Tsurushita *et al.*, 2005).

Auch bei der Sequenzierung mehrerer cDNA-Klone, welche auf Basis der nun zur Verfügung stehenden verlässlichen Aminosäuresequenzinformationen generiert wurden, erschienen die Sequenzen beider Ketten singulär. Die Charakterisierung der Gensequenzen beider Ketten ergab, dass die leichte Kette zu 100 % mit der mutationsfrei rekombinierten  $\lambda$ -Keimbahnsequenz aus IGLV1\*01 und IGLJ\*01 übereinstimmt, während die Sequenz der schweren Kette auf Proteinebene mit 81 % Sequenzidentität Ähnlichkeit zu derjenigen des Anti-Hühnereiweiß-lysozym-Antikörpers D1.3 (Boulot *et al.*, 1990) zeigt. Aus der Klassifizierung der V-Domänen (V $\lambda$ -Subtyp I bzw. V $H$ -Subtyp II) konnte kein Hinweis auf eine durch den Subtyp bedingte intrinsische Faltungsproblematik abgeleitet werden (Deret *et al.*, 1995). Aminosäuresequenzabweichungen in den N- und C-terminalen Bereichen der zuvor klonierten Ketten von der sequenzierten cDNA waren auf die verwendete Klonierungsstrategie zurückzuführen. Durch die Korrektur dieser Abweichungen und das Ersetzen *E. coli*-untypischer Codons im Gen der leichten Kette gelang es, das lösliche Fab-Fragment in nachweisbaren Mengen zu produzieren. Mit deutlich weniger als 0,1 mg/l blieb die Ausbeute an löslichem Fab-Fragment allerdings deutlich hinter den erwartbaren Mengen zurück, welche im Schüttelkolben unter optimalen Bedingungen durchaus  $\geq 10$  mg pro Liter Kulturmedium erreichen können (Knappik & Brundiers, 2009; Nadkarni *et al.*, 2007), was eine Optimierung der Expressionsstrategie erforderte. Das geringe Ausmaß der Produktionsverbesserung durch die Sequenzkorrektur alleine überrascht kaum, da die betreffenden Positionen, was die Sequenz der V $H$ -Domäne anbetrifft, auch bei der Klonierung des D1.3-Fab-Fragments in gleicher Weise mutiert wurden, was zu einem deutlich produktiveren Antikörperfragment führte (Skerra, 1994a).

Bekanntermaßen ist die C $H1$ -Domäne gleichermaßen zur Interaktion mit Domänen des  $\lambda$ - und des  $\kappa$ -Typs in der Lage, wobei ein Wechsel der Domäne von kleineren konformationellen Veränderungen begleitet wird (Padlan *et al.*, 1986). Dennoch haben frühere Studien gezeigt, dass ein Austausch des C $L$ -Typs die Ausbeuten an löslichem Protein bei der Produktion im Periplasma von *E. coli* maßgeblich beeinflussen kann (MacKenzie *et al.*, 1994). Im Fall des hier untersuchten Anti-Hsp70-Fab-Fragments bewirkte der Austausch der im anfänglichen Konstrukt verwendeten

humanen C<sub>κ</sub>-Domäne gegen die von der sequenzierten cDNA kodierte murine C<sub>λ</sub>-Domäne nur eine geringfügige Verbesserung der Produktionsausbeute. Dies steht im Einklang mit der publizierten Produktion eines Fab-Fragments gegen Hühnereiweiß-Cystatin („M41“), wobei der Austausch von C<sub>κ</sub> zu C<sub>λ</sub> keinen positiven Effekt hatte (Schiweck & Skerra, 1995).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bereits die Mutation einzelner Positionen in der Gerüststruktur oder in den CDRs der variablen Domänen eine drastische Verminderung der Löslichkeit von Antikörperfragmenten zur Folge haben kann (McManus & Riechmann, 1991; Pepinsky *et al.*, 2010). Im endoplasmatischen Retikulum von B-Zellen steht ein spezialisierter Satz von Chaperonen und Faltungskatalysatoren, wie z.B. Grp94, der Proteindisulfidisomerase (PDI) und der Peptidyl-Prolyl-Isomerase Cyclophilin B bereit, um die Ausbildung der nativen Konformation der Ig-Domänen zu beschleunigen und die Aggregation von Faltungsintermediaten zu verhindern (Feige *et al.*, 2010). Als essentiell für die Sekretion funktioneller Antikörpermoleküle hat sich dabei das zur Hsp70-Proteinfamilie gehörende Faltungshelferprotein BiP (Grp78) erwiesen (Haas, 1994). Mit Hilfe einer ganzen Reihe von Co-Chaperonen und Nukleotidaustauschfaktoren bindet es reversibel (mit K<sub>D</sub>-Werten im Bereich von 1 bis 100 μM) exponierte Sequenzmotive mit alternierenden hydrophoben Resten, welche im nativen Zustand als Teil von β-Strängen im hydrophoben Kern der Ig-Domäne begraben liegen, und vermindert auf diese Weise zur Aggregation führende intermolekulare Interaktionen (Gidalevitz *et al.*, 2013). Bei Untersuchungen zur Faltung der λ-Kette hat sich gezeigt, dass hier eine konzertierte Aktion verschiedener Chaperone zum Tragen kommt, wobei die Ausbildung der Disulfidbrücke in der variablen Domäne mit der Ablösung von BiP einhergeht (Melnick *et al.*, 1994).

Wie im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen, so stehen auch im bakteriellen Periplasma verschiedene Faltungskatalysatoren und Chaperone bereit (Merdanovic *et al.*, 2011). Die Thioredoxine DsbA und DsbC katalysieren die oxidative Ausbildung von Disulfidbrücken bzw. deren Reduktion und Isomerisierung im Fall falsch gepaarter Cysteinreste. Die Aufrechterhaltung des spezifischen Redox-Zustands dieser Protein-Disulfid-Oxidoreduktasen wird durch die membranintegralen Transmembranproteine DsbB und DsbD sichergestellt (Berkmen, 2012).

Neben der Ausbildung von Disulfidbrücken, welche als essentiell für Ausbildung der nativen Konformation angesehen werden (Feige *et al.*, 2009), stellt die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Peptidbindungen einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Faltung von Ig-Domänen mit konservierten *cis*-Prolinresten dar (Feige *et al.*, 2010). Die Aktivierungsenergie dieser Isomerisierungsreaktion ist mit ca. 80 kJ/mol relativ hoch und erklärt den langsamen Ablauf der Reaktion im Minutenbereich. Mit einer Reihe von Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPlasen) – die Proteine SurA, PpiD und FkpA sind hier als die wichtigsten Vertreter zu nennen – finden sich auch im Periplasma von *E. coli* Katalysatoren für diese faltungsrelevante Reaktion. Wenngleich keine dem BiP-Chaperonnetzwerk vergleichbaren Hsp70-basierten Faltungshelfersysteme im Periplasma von *E. coli* bekannt sind, so wurden bei mehreren der genannten Enzyme unabhängige Chaperonfunktionen beschrieben. Hierzu zählen sowohl die

Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA (Zheng *et al.*, 1997) und DsbC (Chen *et al.*, 1999) als auch die PPIasen SurA (Behrens *et al.*, 2001) und FkpA (Ramm & Plückthun, 2000).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass es möglich ist, durch Überexpression von DsbC oder FkpA die Ausbeuten von Antikörperfragmenten in löslicher Form zu steigern (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Schlapschy *et al.* (2006) haben daraufhin ein Plasmid entwickelt, welches die gleichzeitige Expression der Faltungshelferproteine DsbA, DsbC, SurA und FkpA gestattet und unter Verwendung des p15a-Replikationsursprungs sowie eines unabhängigen Antibiotikaresistenzgens kompatibel mit ColE1-basierten Expressionsplasmiden ist. Tatsächlich wurde bei der Herstellung des Anti-Hsp70-Fab-Fragments durch die Koexpression dieser Faltungshelferproteine die Ausbeute an löslichem und funktionellem Fab-Fragment um mehr als das 100fache gesteigert. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Faltungsproblem des rekombinanten Fab-Fragments Ursache für die extrem niedrige Ausbeute war und dass die normale periplasmatische Faltungshelfer-Maschinerie – unter den Bedingungen der Überexpression – hierfür nicht ausreicht.

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Ausbeuten könnte die Produktion des Antikörperfragments im verstärkt oxidierend wirkenden Cytoplasma eines *E. coli*-Stamms mit Mutationen in den Genen für Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und Glutathion-Reduktase (*gor*) sein. Studien zur Produktion von scFv-Fc-Fusionsproteinen haben gezeigt, dass hiermit – insbesondere bei Koexpression des GroELS-Chaperonsystems – funktionelle Antikörperfragmente in durchaus hohen Ausbeuten hergestellt werden können (Sonoda *et al.*, 2011). Auch wenn bei dieser Methode von einer erhöhten Gefahr des Abbaus durch eine Vielzahl cytoplasmatischer Proteasen ausgegangen werden muss, so könnte die starke Auslastung des Sec-Transportsystems umgangen werden, welche sich in vielen Fällen limitierend auf die Proteinausbeute bei der Produktion im Periplasma auswirkt (Schlegel *et al.*, 2013).

Alternativ hierzu ist es möglich, die Stabilität und damit auch die Produktionseffizienz eines Antikörperfragments im Zuge seiner Humanisierung durch Transplantation seiner CDRs auf Gerüstregionen humanen Ursprungs mit besonders günstigen Faltungseigenschaften zu erhöhen (Damschroder *et al.*, 2007; Honegger, 2008, Zettlitz *et al.*, 2010).

Aufgrund beobachteter Abweichungen des Bindungsverhaltens eines humanisierten cmHsp70.1-scFv-Fragments gegenüber Hsp70-oberflächenexprimierenden Tumorzellen (Prof. G. Multhoff, persönliche Kommunikation) wurde auf die Bindungsaktivität des hier beschriebenen Anti-Hsp70-Fab-Fragments besonderes Augenmerk gerichtet. Durchfluss-cytofluorimetrische Studien belegten eindeutig die Bindung des Fab-Fragments  $\alpha$ Hsp70ch/m auf Tumorzellen der humanen Caco-2-Zelllinie *in-situ*. Der Vergleich mit einer publizierten Untersuchung mit dem ursprünglichen mAk auf Zellen der K562-Zelllinie weist sogar auf ein etwas höheres Bindungssignal des Fab-Fragments hin (Friedrich *et al.*, 2010). Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten die Lokalisierung des gebundenen Fab-Fragments im Bereich der Zellumrandungen, was die Fähigkeit des Fab-Fragments zur Bindung von Membran-assoziiertem Hsp70 bestätigt.



Um ein detaillierteres Bild von der Bindungsspezifität des rekombinanten Fab-Fragments im Vergleich zum IgG-Antikörper zu erhalten, wurde eine Peptid-basierte Epitopkartierung für beide Proteine durchgeführt. Hierbei wurde die im  $\beta$ -Sandwich-Bereich der humanen Hsp70-Substrat-Bindedomäne lokalisierte Sequenz NNLLGRF (Reste 453-459) als Minimalepitop identifiziert. Dies steht im Einklang mit der Generierung des monoklonalen Antikörpers durch Immunisierung von Mäusen mit einem Hsp70-Peptid der Sequenz TKDNNLLGRFELSG (TKD-Peptid) und anschließender Durchmusterung der isolierten Hybridome auf selektive Reaktivität mit hHsp70.1 bei Ausschluss Hsc70-kreuzreaktiver Klone (Multhoff, 2007). Im Ergebnis zeigt der mAk cmHsp70.1 spezifische Erkennung des humanen Antigens Hsp70.1 sowie dessen Orthologen aus der Maus, dagegen bindet er nicht die menschlichen Paralogen Hsc70 und auch BiP (Multhoff, 2007; Multhoff & Hightower, 2011 und diese Arbeit). Dieses Bindungsverhalten kann anhand eines direkten Vergleichs der dem identifizierten Minimalepitop entsprechenden Sequenzabschnitte dieser unterschiedlichen Proteine erklärt werden, wobei die Sequenzen der paralogen Proteine im Gegensatz zum orthologen Hsp70 der Maus jeweils an mindestens einer Position von der Sequenz des humanen Hsp70.1 abweichen (vgl. Abbildung 3.10B). Die Bindungsmuster von Fab-Fragment und Antikörper weisen (abgesehen von vereinzelt Signalpikes geringer Stärke) keine signifikanten Unterschiede auf.

Zettlitz *et al.* (2010) haben in Bindungsexperimenten mit verschiedenen Polypeptid-Fragmenten der Hsp70.1-SBD gezeigt, dass ein weiterer Bereich der Hsp70-SBD an der Hsp70/cmHsp70.1-Interaktion beteiligt ist, welcher in der Sequenz zwischen den Resten 473 und 504 liegt. Dieser Bereich befindet sich im Modell der Hsp70-Proteinstruktur (PDB-Kennziffer 4PO2) benachbart zur TKD-Sequenz, schließt diese jedoch nicht mit ein. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Epitopkartierung sowohl des intakten Antikörpers als auch des Fab-Fragments zeigt in diesem Bereich keine Bindungssignale. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtungen ist ein diskontinuierliches Epitop, welches sich aus einem linearen und einem konformationell bestimmten Teil zusammensetzt. Ein ähnlich komplexes Epitop ist beispielsweise für den Anti-CD20-Antikörper Ofatumumab (2F2) beschrieben (Teeling *et al.*, 2006). Eine genaue Aufklärung der an der Bindung beteiligten Wechselwirkungen wird lediglich anhand einer Kristallstruktur des Komplexes aus Antikörper(fragment) und Antigenprotein möglich sein.

Die hier beschriebene Vorgehensweise zur Konstruktion und gentechnischen Herstellung des rekombinanten Fab-Fragments  $\alpha$ Hsp70ch/m ermöglichte die Durchführung erster präklinischer Tumor-Imaging-Studien im Xenotransplantat-Mausmodell (Stangl *et al.*, 2011).

#### **4.2 *E. coli*-Surface Display als Grundlage zur Selektion von Bindungsproteinen aus naiven Genbibliotheken**

Die zur Selektion von Bindungsproteinen ursprünglich entwickelten Technologien wie *Phage Display* (Hoogenboom, 2002; Marks *et al.*, 1991) und *Ribosome Display* (He & Khan, 2005) wurden in den letzten Jahrzehnten durch eine Reihe von *in-vivo*-Technologien erweitert, welche

die Nutzung von Hefe-, Bakterien- und sogar Säugerzellen einschließt (vgl. die Übersichtsartikel von Boder *et al.*, 2012; Doerner *et al.*, 2014; Harel Inbar & Benhar, 2012; Löfblom, 2011). Wie eine Reihe von aktuellen Studien zeigt, eignen sich diese neuartigen Technologien sehr gut für die Affinitätsmaturierung bereits charakterisierter Bindungsproteine (z.B. Binder *et al.*, 2010; Daugherty *et al.*, 1998; De Schutter & Callewaert, 2012; Koide & Koide, 2012). In Kombination mit den klassischen *in-vitro-Display*-Technologien (z.B. Kronqvist *et al.*, 2008; Kronqvist *et al.*, 2011; Mazor *et al.*, 2010) bzw. der vorhergegangenen Immunisierung von Tieren (z.B. De Schutter & Callewaert, 2012; Fleetwood *et al.*, 2013; McConnell *et al.*, 2012; Salema *et al.*, 2013) haben sich *Surface Display*-Technologien darüber hinaus als wertvolles Hilfsmittel für die Selektion neuer Binder erwiesen. Allerdings sind bislang nur wenige Studien veröffentlicht worden, welche die Selektion von Bindungsproteinen aus naiven Bibliotheken unter ausschließlicher Verwendung einer *Cell Surface Display*-basierten Vorgehensweise beschreiben (z.B. Feldhaus *et al.*, 2003). Der Erfolg dieser Methoden ist sicherlich zu einem großen Teil auf die Möglichkeit des Einsatzes der FACS-Technologie zurückzuführen, welche die Echtzeit-Analyse der Interaktion zwischen fluoreszenzmarkiertem „Antigen“ und oberflächenpräsentiertem Bindungsprotein auf Einzelzell-Ebene erlaubt. Hiermit ist ein wesentlich höheres Maß an Kontrolle über den Selektionsprozess möglich, als dies bei den „klassischen“ *in-vitro-Display*-Methoden der Fall ist. Ein weiterer Vorteil der Verwendung lebender Zellen für den Selektionsprozess ist deren Fähigkeit zur nachfolgenden Vermehrung durch Zellteilung, welche – ähnlich dem Prinzip der klonalen Expansion einer Immunantwort – die Amplifizierung der angereicherten Bindeproteine nach den einzelnen Selektionszyklen komfortabel und verlustarm macht.

Wie sowohl theoretische Studien als auch die empirische Auswertung von Selektionsexperimenten gezeigt haben, kommt der Komplexität einer Bibliothek, d.h. der Anzahl der vorhandenen unterschiedlichen Klone zu Beginn des Experiments, eine zentrale Bedeutung für den Erfolg der Selektion und der erzielten Affinität und Spezifität zu (Ling, 2003; Perelson & Oster, 1979). Dies gilt insbesondere für die Selektion aus naiven Bibliotheken, jedoch weniger bei Affinitätsmaturierungen oder der Selektion aus Immun-Bibliotheken.

Die beschränkte Transformationseffizienz der für das *in-vivo-Surface Display* verwendeten Zelltypen wirkt sich limitierend auf die maximal analysierbare Bibliotheksgröße aus. So liegt die Komplexität von beschriebenen Hefe-, Bakterien-, und Säugerzell-Bibliotheken für gewöhnlich in der Größenordnung von  $10^6$ - $10^7$  unabhängigen Klonen (z.B. Boder *et al.*, 2000; Bowers *et al.*, 2011; Kronqvist *et al.*, 2008).

Mit einer Zahl von  $6 \times 10^9$  unabhängigen Transformanden lag die in dieser Arbeit generierte *E. coli*-präsentierte Lipocalin-Bibliothek im unteren Bereich der für heutige *Phage Display*-Bibliotheken üblichen Komplexität (Hoogenboom, 2005). Allerdings übertraf sie andere mikrobielle *Surface Display*-Plattformen, wie ein auf dem Gram-positiven Bakterium *Staphylococcus carnosus* basierendes System (Kronqvist *et al.*, 2008). Deutlich größere Bibliotheken, mit Komplexitäten zwischen  $10^{12}$  und  $10^{13}$ , sind lediglich mit gänzlich zellfreien Systemen wie *Ribosome Display* oder *mRNA-Display* möglich.

Moderne FACS-Systeme erreichen beim Sortieren einen enormen Durchsatz von 10.000 bis 20.000 Bakterien pro Sekunde. In einem den lebenden Bakterien für die Selektion zumutbaren Zeitraum von einer Stunde können somit  $10^7$  bis  $10^8$  Zellen durchmustert werden. Das heißt aber, dass mit dem FACS nur ein Bruchteil der Klone aus einer frischen Transformation erfasst werden kann. Dieses Problem verschärft sich noch, wenn man die nach der Transformation erfolgende Vervielfältigung der Bakterien durch die Kultivierung auf Agarplatten und im Flüssigmedium bedenkt. Entsprechend einer grundlegenden Gesetzmäßigkeit der Stochastik, ist noch eine wesentlich höhere Stichprobenzahl notwendig, um möglichst alle in der Bibliothek enthaltenen Klone mindestens einmal zu erfassen (Oversampling). Zum Beispiel hat Schreiber (1988) mithilfe einer mathematischen Annäherung gezeigt, dass bei einer Diversität von  $10^9$  mindestens die 20fache Anzahl von Klonen der vervielfältigten Bibliothek durchmustert werden muss, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % davon ausgehen zu können jeden individuellen Klon mindestens einmal in der Probe enthalten zu haben. Daraus wird klar, dass mit der FACS-Methode allein keine ausreichende Abdeckung der genetischen Bibliothek möglich ist und eine Voranreicherung notwendig ist.

Feldhaus *et al.* (2003) ist es erstmals gelungen, eine Hefe-*Surface Display*-Bibliothek mit einer für diese Plattform (s.o.) außergewöhnlichen Komplexität von ca.  $10^9$  zu generieren, und aus dieser synthetischen scFv-Bibliothek Bindeproteine mit nanomolarer Affinität zu selektieren. Dem FACS wurde dabei eine dem „*Panning*“ der *Phage Display*-Selektion vergleichbare Anreicherungsprozedur mit paramagnetischen Partikeln vorangestellt, womit es möglich wurde, die Komplexität der Bibliothek auf eine mit Durchflusszytometrie durchmusterbare Größenordnung zu reduzieren.

Bei der hier beschriebenen Selektion von Anticalinen gegen humanes Hsp70.1 aus einer synthetischen Lipocalin-Bibliothek wurde diese Vorgehensweise adaptiert: nach zwei Zyklen magnetischer Anreicherung folgten vier Zyklen FACS. Dabei wurde durch Variation der zur „Antigen“-Bindungsdetektion verwendeten Sekundärreagenzien der Anreicherung von Bindeproteinen gegen diese ebenfalls potentiell-„antigenen“ Substanzen entgegengewirkt. Das Bindungsverhalten einzelner Klone, welche auf diese Weise selektiert wurden, konnte ebenfalls mittels Durchfluss-Zytofluorimetrie analysiert werden. Dies ersparte für eine erste Einschätzung der Klone zeitaufwändige Umklonierungs- bzw. Reinigungsschritte.

Unter den 30 analysierten Einzelklonen zeigten 19 Klone spezifische Bindungssignale mit der biotinylierten Substrat-Bindedomäne von humanem Hsp70.1. Durch DNA-Sequenzierung konnten diese Klone bloß zwei individuellen Anticalinsequenzen zugeordnet werden, was dafür spricht, dass sich die Selektion unter dem gewählten Selektionsdruck einem „Sättigungszustand“ angenähert hat. Die Sequenzen beider Klone wiesen insbesondere im Loop #4, aber auch im Bereich der restlichen drei ortsgerecht randomisierten Loops starke Ähnlichkeiten auf, woraus geschlossen werden kann, dass die entsprechenden Anticaline verwandte Epitope in der Hsp70-Substrat-Bindedomäne erkennen. Die SPR-Bindungsanalyse der schließlich in löslicher Form produzierten und gereinigten Anticaline ergab bei einem Anticalin (Klon BBG10) hochaffines

Bindungsverhalten zu dem rekombinanten hHsp70.1 mit einem  $K_D$ -Wert von 12,5 nM, wohingegen die Bindung des zweiten Klons mit einem  $K_D$ -Wert von 153 nM deutlich schwächer war.

Diese Ergebnisse demonstrieren die Eignung des ursprünglich von Binder *et al.* (2010) etablierten und in dieser Arbeit weiterentwickelten *E. coli*-Surface Display-Methodik für die Selektion neuer Anticaline aus einer synthetischen Bibliothek. Zudem liefern sie das erste Beispiel einer Selektion von Bindungsproteinen aus einer naiven Bibliothek mithilfe lebender Bakterienzellen.

### 4.3 Affinitätsmaturierung

Experimentelle Studien zur Biodistribution von Varianten eines Anti-HER2/*neu*-scFv-Fragments mit unterschiedlichen Affinitäten haben gezeigt, dass ein Optimum von Tumorpenetration und Tumor-zu-Blut-Kontrast bei Affinitäten ( $K_D$ ) im Bereich zwischen  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M erreicht wird (Adams *et al.*, 2001). Bei höheren Affinitäten trat der erstmals von Weinstein postulierte Effekt der „Bindungsstellenbarriere“ auf (Fujimori *et al.*, 1990), was sich – entgegen theoretischer Überlegungen (Thurber *et al.*, 2008) – auch nicht durch eine Steigerung der Dosis kompensieren ließ. Mit einem im SPR-Experiment ermittelten  $K_D$ -Wert im Bereich um  $1 \times 10^{-8}$  und einer durch die  $k_{\text{off}}$ -Rate bestimmten Halbwertszeit des „Antigen“/Anticalin-Komplexes von etwa 5 min erfüllt das Anti-Hsp70-Anticalin BBG10 die angestrebten Affinitätskriterien für ein 24 h nach Injektion des Tracers durchgeführtes Tumor-Imaging nur unzureichend. Aus diesem Grund wurde das Anticalin einer Affinitätsmaturierung mittels *E. coli*-basiertem Surface-Display unterzogen. Ähnlich der bei Binder *et al.* (2010) beschriebenen Affinitätsmaturierung eines Anti-CTLA-4-Anticalins wurde ein kinetischer Selektionsmodus gewählt, bei dem auf eine Steigerung der Affinität durch Verlangsamung der  $k_{\text{off}}$ -Rate hingewirkt wurde. Dies geschah durch Wahl einer zeitlich beschränkten Dissoziationsphase (bzw. Kompetitionsphase), in der die Zellen nach der Komplexbildung mit Biotin-markiertem „Antigen“ gewaschen und mit einer sättigenden Konzentration von nicht-markiertem „Antigen“ inkubiert werden, um ein erneutes Binden von abdissoziiertem markiertem „Antigen“ zu verhindern (Boder & Wittrup, 1997; Mahalka *et al.*, 2014).

Boder & Wittrup (1998) sind in einer theoretischen Arbeit zur Affinitätsmaturierung mit einer vergleichbaren Hefe-Display-Plattform zu dem Schluss gelangt, dass in Abhängigkeit von der Hintergrundfluoreszenz nicht-bindender Zellen und der Fluoreszenz maximal „Antigen“-beladener Zellen eine optimale Anreicherung verbesserter Bindungsproteine erfolgt, wenn  $3,5 \leq k_{\text{off}}^{\text{wt}} \cdot t_{\text{komp}} \leq 6$  gegeben ist, wobei  $k_{\text{off}}^{\text{wt}}$  die Dissoziationsrate der ursprünglichen Variante und  $t_{\text{komp}}$  die Zeitdauer der Kompetitionsphase darstellt. Bei Einsatz einer sättigenden Konzentration des markierten „Antigens“ vor der Kompetitionsphase entspricht dieser Bereich einer relativ niedrigen Stringenz. So soll der Verlust von Varianten mit geringer Affinitätssteigerung vermieden werden, da diese als Grundlage für eine Affinitätssteigerung durch Kombination der Mutationen mehrerer Varianten dienen können.

In einem ersten *E. coli*-Surface Display-Selektionsexperiment aus der auf BBG10 basierenden Zufallsmutagenese-Bibliothek wurden sechs Zyklen FACS Voranreicherung durchgeführt. Die

Dauer der Kompletionsphase wurde dabei von 20 min ( $k_{\text{off}}^{\text{wt}} \cdot t_{\text{komp}} = 2,5$ ) zyklweise auf 90 min ( $k_{\text{off}}^{\text{wt}} \cdot t_{\text{komp}} = 11,3$ ) erhöht. Das markierte „Antigen“ wurde während der ersten fünf FACS-Zyklen bei sättigenden Konzentrationen eingesetzt, im letzten Zyklus entsprach die eingesetzte Konzentration mit 10 nM etwa dem  $K_D$ -Wert der Ursprungsvariante BBG10 ( $K_D^{\text{BBG10}} = 12,5$  nM). Ergebnis dieser Selektion waren zwei Varianten mit leicht verbesserter Affinität ( $K_D \approx 8$  nM) und etwa um die Hälfte langsamerer Dissoziationsrate.

In einer Wiederholung dieses Selektionsexperiments wurde der FACS-Prozedur ein Anreicherungsschritt mit paramagnetischen Partikeln vorangestellt. Dabei wurde die Bibliothek mit biotinyliertem „Antigen“ inkubiert, woraufhin durch Zugabe von Neutravidin-beschichteten Eisenoxidpartikeln und mithilfe eines Magneten die Isolierung jener *E. coli*-Zellen mit Antigen-Bindungsaktivität aus der Suspension ermöglicht werden sollte. Obwohl diese Methodik keine exakte Steuerung des Selektionsdrucks erlaubt und aufgrund der relativ niedrigen Effizienz nicht ausreicht um einzelne hochaffine Bindungsproteine zu isolieren, sollte es auf diese Weise dennoch möglich sein, die Diversität der Bibliothek ( $\sim 10^9$  individuelle Klone) zugunsten von Anticalinen mit „Antigen“-Bindungsaktivität zu reduzieren. Dies sollte die Effizienz der nachfolgenden FACS-Selektion weiter erhöhen. Im Vergleich zur ersten Affinitätsmaturierung wurde außerdem das markierte „Antigen“ in nicht-sättigender Konzentration eingesetzt, wobei die für den ersten FACS-Zyklus eingesetzte Konzentration in etwa  $K_D^{\text{BBG10}}$  entsprach und im Verlauf der Selektion auf  $< 1/20 K_D^{\text{BBG10}}$  gesenkt wurde. Der Selektionsdruck auf die  $k_{\text{off}}$ -Rate wurde ebenfalls erhöht, indem die Kompletionsdauer zyklweise von 30 min ( $k_{\text{off}}^{\text{wt}} \cdot t_{\text{komp}} = 3,75$ ) auf 16 h ( $k_{\text{off}}^{\text{wt}} \cdot t_{\text{komp}} = 120$ ) erhöht wurde. Unter diesen deutlich stringenteren Selektionsbedingungen wurden nach vier Zyklen sechs individuelle Klone mit erhöhter Affinität zu hHsp70.1 identifiziert, wobei alle niedrigere  $k_{\text{off}}$ -Raten aufwiesen als die beiden im ersten Selektionsexperiment isolierten Varianten. Nach dem sechsten Selektionszyklus wurden in einer Stichprobe ( $n = 10$ ) nur noch zwei der Klone von Zyklus 4 und dazu eine neue Variante gefunden. Erstaunlicherweise war diese Variante, BBG10I, welche die höchste Affinität und die niedrigste  $k_{\text{off}}$ -Rate aufwies, während den vorangegangenen Selektionszyklen offenbar so stark unterrepräsentiert, dass sie in den 15 Klonen, die nach dem vierten Selektionszyklus sequenziert wurden, nicht vertreten war und erst durch eine deutliche Erhöhung der Stringenz in den letzten beiden FACS-Zyklen in genügendem Maße angereichert wurde.

Die wahrscheinlichste Ursache hierfür liegt im Prinzip des bakteriellen *Surface Display* begründet: Die Signale für Bindung des fluoreszierenden „Antigens“ steigen nicht nur mit Erhöhung der Affinität (sofern keine sättigende Konzentration eingesetzt wurde) sondern auch durch eine wachsende Anzahl der auf der Zelloberfläche präsentierten Anticalinmoleküle. Dies hat zur Folge, dass Anticaline mit geringerer Affinität zum „Antigen“ aber stärkerer Expression, aufgrund höherer Faltungsstabilität, effizienterer Sekretion oder geringerer Toxizität für *E. coli*, stärker angereichert werden als affinere Binder mit schlechterer Eignung für die Oberflächenpräsentation. Dieser Effekt wird während des FACS durch die Messung der Anticalin-Präsentation anhand eines nicht an der „Antigen“-Bindung beteiligten Affinitätsanhängsels und

entsprechender Anpassung des Sortier-Fensters kompensiert. Des Weiteren können (z.B. als Folge von Fehlfaltung) unspezifisch mit Ovalbumin interagierende Binder unter Nutzung eines weiteren Fluoreszenzkanals aussortiert werden. Während der Voranreicherung der Bibliothek durch magnetische Selektion ist eine derartige Kompensation jedoch nicht möglich, und das daraus resultierende Ungleichgewicht der Bibliothek zugunsten stark präsentierter Bindeproteine ist offenbar so groß, dass dieses selbst durch mehrere Zyklen FACS bei moderater Stringenz nicht hinreichend kompensiert werden kann. Diesem Problem könnte in zukünftigen Selektionsexperimenten beispielsweise damit begegnet werden, dass eine größere Anzahl von Klonen sequenziert wird oder dass die Stringenz schon während der Voranreicherung weiter erhöht wird.

Zusammengenommen zeigt der Vergleich beider Selektionsexperimente den Vorzug eines stärkeren Selektionsdrucks mit dem Einsatz des markierten „Antigens“ in Konzentrationen deutlich unterhalb des  $K_D$ -Werts der Ursprungsvariante und bei Kompetitionszeiten ( $t_{\text{komp}}$ ) von bis zu  $120/k_{\text{off}}^{\text{wt}}$ . Trotz der beobachteten Begünstigung von Klonen mit guten Expressions- aber nur suboptimalen Bindungseigenschaften, stützt die Isolierung einer hohen Anzahl individueller Anticalinsequenzen mit verlangsamer  $k_{\text{off}}$ -Rate während des zweiten Selektionsexperiments die Notwendigkeit eines Anreicherungsschrittes zur initialen Reduktion der Bibliotheksdiversität.

Obwohl die beste Variante aus der ersten Affinitätsmaturierung des Anti-Hsp70-Anticalins BBG10 mit einem  $K_D$ -Wert von 2,2 nM und einer Dissoziationshalbwertszeit von 50 min bereits in einem für *in vivo*-Studien geeignetem Bereich lag, erschien das Erreichen eines  $K_D$ -Werts im sub-nanomolaren Bereich durch weitere Verlangsamung der Dissoziation wünschenswert. Mit einem einfachen Subklonierungs-Ansatz war es möglich, alle konvergent aufgetretenen Mutationen, welche zum einen in den Loops #2 und #3 (bzw. den daran angrenzenden  $\beta$ -Strängen) und zum anderen in Loop #1 lokalisiert waren, zusammenzuführen. Die Affinität der so generierten Anticalinvariante BBG10C/I zu hHsp70.1 war mit einem  $K_D$ -Wert von 510 pM etwa 25fach höher als die der Ausgangsvariante BBG10. Die Komplexdissoziation wurde sogar um das 47fache verlangsamt (Komplexhalbwertszeit  $\tau_{1/2} = 4,3$  h).

Die Kombination von Mutationen mit positivem Effekt auf die Affinität einer Bindungsreaktion hat sich als probate Methodik für die Affinitätsmaturierung herausgestellt. So findet sich diese Vorgehensweise bei der *in-vitro*-Affinitätsmaturierung von Antikörperfragmenten wie dem *Chain Shuffling* (Marks *et al.*, 1992) und dem *CDR Walking*, wobei die CDRs eines Antikörpers einzeln parallel randomisiert werden und die CDRs selektierter Varianten anschließend rekombiniert werden (Yang *et al.*, 1995). Dies ist, wie Lowman & Wells (1993) auch bei der Affinitätsmaturierung der Interaktion vom menschlichen Wachstumshormon (hGH) mit seinem Rezeptor gezeigt haben, möglich, da die Effekte einzelner Mutationen in der Regel additiv wirken. Dieser Sachverhalt lässt sich anhand der Änderung der freien Enthalpie folgendermaßen ausdrücken:

$$\Delta\Delta G_{\text{AB}} = \Delta\Delta G_{\text{A}} + \Delta\Delta G_{\text{B}} + \Delta\Delta G_{\text{I}} \quad (9)$$

Wobei  $\Delta\Delta G_{\text{AB}}$  die Änderung der freien Enthalpie der Doppelmutante,  $\Delta\Delta G_{\text{A}}$  bzw.  $\Delta\Delta G_{\text{B}}$  die Änderungen der freien Enthalpien der Einzelmutanten und  $\Delta\Delta G_{\text{I}}$  den Differenzbetrag der freien

Enthalpien der Wechselwirkung beider Reste untereinander darstellen. Im Fall völliger Unabhängigkeit der mutierten Reste sollte deren Kombination einen rein-additiven Effekt haben ( $\Delta\Delta G_I=0$ ). Da die thermodynamische Affinität zur freien Enthalpie mit  $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_A$  in exponentiellem Zusammenhang steht, wirkt sich der Effekt kumulativer Mutationen multiplikativ auf die Gleichgewichtskonstante ( $K_A$  bzw.  $K_D$ ) aus.

Im Fall des Anticalins BBG10C/I würde sich demzufolge für die einfache Kumulation der Mutationen der Varianten BBG10C und BBG10I eine 16fach erhöhte Affinität errechnen. Die tatsächliche, im SPR-Experiment ermittelte Affinität zu rhHsp70.1 war allerdings um den Faktor von 25 höher als die der Ursprungsvariante BBG10. Ein derartiger Synergismus lässt darauf schließen, dass trotz der vermuteten räumlichen Distanz der mutierten Positionen (vgl. Abbildung 3.29 und Abbildung 3.32) keine völlige Unabhängigkeit der beteiligten Mutationen vorliegt ( $\Delta\Delta G_I < 0$ ). Ähnliche Effekte, wenn auch typischerweise mit negativer Auswirkung auf die Affinität, wurden bei der Kombination von Mutationen beim *CDR Walking* beobachtet (Yang *et al.*, 1995). Neben einer direkten Wechselwirkung der betreffenden Reste sind auch indirekte Effekte auf die Konformation der Bindungstasche denkbar, was wiederum durch *Induced Fit*-Mechanismen Auswirkungen auf die „Antigen“-Bindung haben kann (Tavagnacco *et al.*, 2013). Eine konkretere Interpretation ist jedoch erst durch die vergleichende Analyse hochauflösender Kristallstrukturen möglich.

Parallel zu diesem Kombinationsexperiment wurde versucht, die Affinität der Anticalinvariante BBG10 durch Zufallsmutagenese und eine weitere *E. coli*-*Surface Display*-Selektion zu verbessern. Die hierbei erhaltene Variante BBG10I-1 unterscheidet sich nur durch das Fehlen der S99G-Mutation von der kombinierten Anticalinvariante BBG10C/I, was aber offensichtlich bloß geringe Auswirkungen auf die Affinität hat (vgl. Abbildung 3.34 und Tabelle 3-2). Dies zeigt, dass es möglich ist, durch Sequenzanalyse von Mutanten mit moderat erhöhter Affinität konvergente Mutationen zu erkennen und durch deren Kombination einen verstärkten Affinitätsgewinn zu erreichen, welcher sonst nur durch weitere Zyklen von Zufallsmutagenese und Selektion erreichbar wäre. Demnach scheint es interessant, klassische, auf der Rekombination von CDRs basierende Methoden und moderne Variationen wie die *Look-through/combinatorial beneficial*-Mutagenese (Rajpal *et al.*, 2005), welche für die Affinitätsmaturierung von Antikörpern entwickelt wurden, für Anticaline zu adaptieren.

#### 4.4 Der Hsp70-Interdomänenlinker: ein außergewöhnliches Epitop

Mithilfe einer Peptid-basierten Epitopkartierung wurde eine Sequenz im Bereich des Interdomänen-Linkers von humanem Hsp70.1 an den Positionen 388-396 (VQDLLLLDV) identifiziert, die die Bindung des Anticalins BBG10C/I vermittelt. Eine N-terminal verkürzte Version der Hsp70.1-Substrat-Bindedomäne (beginnend mit AS 394) wurde im ELISA-Experiment nicht von BBG10C/I gebunden (Daten nicht gezeigt), was die Relevanz dieses Sequenzabschnitts als Epitop belegt.

Da es mit der verwendeten Methode zur Epitopkartierung nicht ohne weiteres möglich ist, konformationelle bzw. diskontinuierliche Epitope zu identifizieren, konnte in dieser Arbeit die Frage nach einer Beteiligung anderer Bereiche von hHsp70.1 an der „Antigen“/Anticalin-Wechselwirkung nicht abschließend geklärt werden. Die Feststellung leichter Unterschiede im Bindungsverhalten des Anticalins zu humanem Hsp70.1 bzw. murinem Hsp70.3, welche zwar in der Sequenz des Minimalepitops übereinstimmen, in der restlichen Proteinsequenz jedoch an insgesamt 30 Positionen divergieren, kann ein Hinweis auf eine derartige Beteiligung sein. Obwohl das identifizierte Epitop einen der am stärksten konservierten Sequenzbereiche der Hsp70-Proteinfamilie umfasst (Vogel *et al.*, 2006), erlaubt es ein hohes Maß an Spezifität bezüglich der Bindung zu paralogen Mitgliedern der Hsp70-Proteinfamilie, wie am Beispiel des im ER lokalisierten Hsp70-Proteins BiP demonstriert wurde.

Eine vergleichende Bindungsstudie des Anticalins mit dem als Epitop identifizierten Peptid könnte zeigen, ob die isolierte Sequenz für eine Wechselwirkung mit der für das Volllängen-Protein beobachteten Affinität ausreichend ist. Genauere Einblicke in den Mechanismus der Komplexbildung könnte auch eine entsprechende Kristallstruktur gewähren. Initiale Versuche zur Cokristallisation des Anticalins mit rhHsp70.1 bzw. SBD<sub>Hsp70</sub> verliefen jedoch erfolglos (Daten nicht gezeigt).

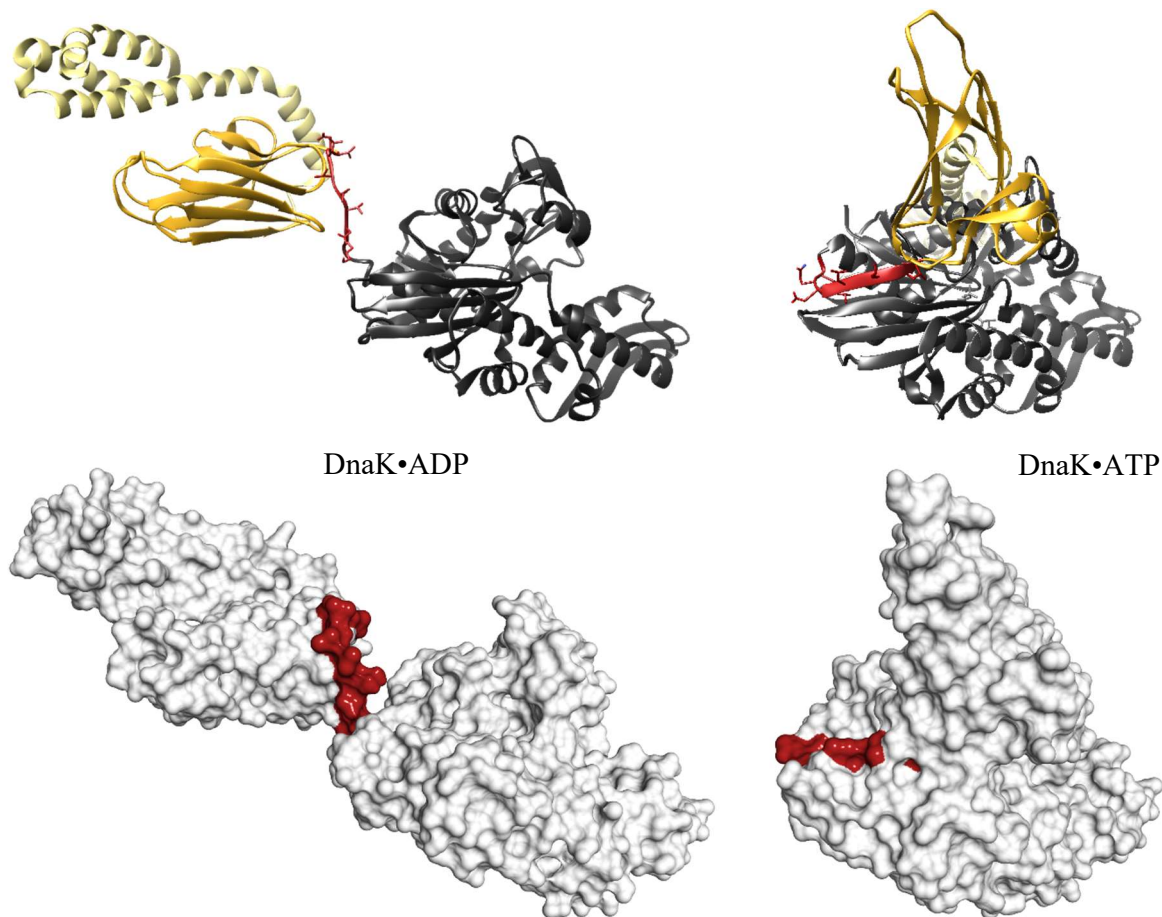
Unter den derzeit zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen hHsp70.1 existieren sowohl mAbs mit Spezifität für die Nukleotid-Bindedomäne (NBD) als auch welche mit Spezifität für die Substrat-Bindedomäne (SBD). Allerdings konnte die Fähigkeit zur Erkennung von Hsp70 in seiner membrangebundenen Form auf der Oberfläche von Tumorzellen bislang nur bei einigen Antikörper mit in der SBD lokalisiertem Epitop, jedoch bei keinem für die NBD spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Botzler *et al.*, 1998a; Multhoff & Hightower, 2011). Dementsprechend wurde für die Anticalinselektion die SBD von Hsp70 als „Antigen“ gewählt. Die Ursache für die Unfähigkeit vieler Antikörper zur Bindung von Hsp70 auf der Oberfläche von Tumorzellen liegt vermutlich in der Art der Interaktion von Hsp70 mit Zellmembranen. Obwohl die Existenz von Lipidbindungsstellen sowohl in der NBD als auch der SBD von Hsp70 schon vor längerer Zeit beschrieben wurde (Arispe *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2007), offenbarte erst eine kürzlich publizierte Studie genauere Einblicke in die Natur der Interaktion zwischen Hsp70 und den Membranen von Tumorzellen (Mahalka *et al.*, 2014): in fluoreszenzspektroskopischen Experimenten wurde gezeigt, dass Hsp70 peripher an die Membran bindet. Die Art der Interaktion hängt dabei – insbesondere im Hinblick auf die Eintauchtiefe des Proteins in die Lipiddoppelschicht – von der Lipidzusammensetzung ab und unterscheidet sich deutlich von integralen Membranproteinen. Bei dem zuerst für die Interaktion von Cytochrom C mit Membranen beschriebenen Phänomen des *Extended Lipid Anchorage* klappt eine der Fettsäureketten eines Phospholipids aus der Lipiddoppelschicht nach außen und besetzt eine hydrophobe Bindungstasche des Proteins (Tuominen *et al.*, 2002). Hsp70 wird offensichtlich auf diese Weise unter Beteiligung der Lipid-Bindungsstellen von NBD und SBD in einer bestimmten Orientierung auf der Oberfläche von Membranen fixiert, was als Ursache der Unzugänglichkeit mancher Epitope von Membran-assoziiertem Hsp70 gelten kann. Die Fähigkeit des Anticalins



BBG10C/I zur Bindung von Hsp70.1 auf der Oberfläche von Tumorzellen wurde in dieser Arbeit dagegen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Cytofluorimetrie demonstriert, was als Hinweis dafür zu sehen ist, dass die hydrophobe Sequenz des Interdomänen-Linkers nicht direkt an der Wechselwirkung von Hsp70 mit der Zellmembran beteiligt ist.

Eine in Durchfluss-cytofluorimetrischen Bindungsstudien für das Anticalin ermittelte apparente Dissoziationskonstante auf Zellen lag mit 202 nM allerdings um mehrere Größenordnungen höher (die Affinität also schwächer) als in SPR-Experimenten mit immobilisiertem rhHsp70.1 ( $K_D = 0,5$  nM). Neben dem Einfluss anderer konzentrationsabhängiger Vorgänge, wie der Internalisierung von Membran-assoziierten Anticalin-Hsp70-Komplexen, liegen mögliche Ursachen für diese Diskrepanz in der außergewöhnlichen strukturellen bzw. funktionellen Rolle, welche der Interdomänen-Linker auf den allosterischen Chaperonmechanismus von Hsp70-Proteinen ausübt. Sowohl NMR-, Mutagenese- als auch bioinformatische Studien haben gezeigt, dass der hydrophobe Linker als Übermittler der konformationellen Änderung bei der Bindung eines Proteins oder Peptids in der SBD auf die ATPase-Aktivität der NBD und, umgekehrt, bei der konformationellen Änderung in Folge der Bindung von ATP durch die NBD auf die Substrataffinität der SBD fungiert (Jiang *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Smock *et al.*, 2010; Swain *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2006; Zhuravleva *et al.*, 2012; Zhuravleva & Gierasch, 2011).

Die kürzlich publizierte Kristallstruktur des Hsp70-Proteins aus *E. coli* (DnaK) im Komplex mit ATP lieferte die Daten zum detaillierten Verständnis dieses konformationellen Kopplungsmechanismus: während DnaK im nukleotidfreien bzw. ADP-gebundenen Zustand eine gestreckte Konformation einnimmt, bei der keine signifikante Interaktion zwischen den beiden Domänen stattfindet und die  $\alpha$ -helikale Subdomäne einen „Deckel“ über dem gebundenen Peptidsubstrat ausbildet (Bertelsen *et al.*, 2009; Swain *et al.*, 2007), nimmt das Protein bei ATP-Bindung eine kompakte Form an, in welcher der  $\alpha$ -helikale Deckel von der Substratbindungstasche der  $\beta$ -Sandwich-Subdomäne wegklappt und beide SBD-Subdomänen ausgeprägte Wechselwirkungen mit der NBD eingehen (Qi *et al.*, 2013). In diesem Zustand ist die Peptidaffinität gering, gebundene Proteinsubstrate werden also freigesetzt, und die ATPase-Aktivität der NBD wird durch Bindung des Interdomänen-Linkers in einem sich öffnenden hydrophoben Spalt der NBD erhöht (Vogel *et al.*, 2006). Die Kristallstruktur von DnaK•ATP zeigt, dass der ansonsten flexible Linker im Komplex die Sekundärstruktur eines  $\beta$ -Strangs einnimmt (Abbildung 4.1) und hierbei ein Teil der Seitenketten im hydrophoben Kern der NBD begraben werden. Berechnet man die lösungsmittlexponierten Oberflächen der beiden DnaK-Proteinstrukturen im Bereich des Anticalin-Epitops (ausgehend von einem Strukturmodell, in dem die beiden in diesem Bereich von der humanen Hsp70.1-Sequenz abweichenden Reste angeglichen wurden), zeigt sich, dass in der ATP-Form mit  $494 \text{ \AA}^2$  die Oberfläche nur halb so groß ist wie in der ADP-Form ( $989 \text{ \AA}^2$ ).



**Abbildung 4.1:** Der Hsp70-Interdomänen-Linker im Kontext der Nukleotid-abhängigen Proteinkonformation. *In-Solution*-NMR-Struktur des Hsp70-homologen Proteins DnaK aus *E. coli* in der ADP-gebundenen Form (links, PDB-Kennziffer: 2KHO) und DnaK-Kristallstruktur in der ATP-gebundenen Form (rechts, PDB-Kennziffer: 4JNE). Die Sekundärstrukturelemente von Nukleotid-Bindedomäne (schwarz), Substrat-Bindedomäne (gelb) und Interdomänenlinker (rot) sind schematisch als Bänderdiagramm dargestellt (oben). Die Strukturmodelle wurden durch Austausch von zwei Seitenketten (K387Q und V389L) der Sequenz des hHsp70.1-Epitops VQLLLLDV (Seitenketten als Stab-Modell angezeigt) angeglichen. Die unteren Bilder stellen die dem Lösungsmittel zugänglichen Oberflächen der Proteinstrukturen dar, wobei die dem Anticalin-Epitop entsprechenden Reste rot hervorgehoben sind.

Da sowohl bei der primären Selektion der Anti-Hsp70-Anticaline als auch bei den Affinitäts-maturierungen eine verkürzte Version von Hsp70.1 ( $SBD_{Hsp70}$ ) als „Antigen“ eingesetzt wurde, welche neben einem Teil der SBD auch den Interdomänen-Linker, nicht aber die NBD umfasst, kann angenommen werden, dass die selektierten Anticaline den Linker in seiner flexiblen exponierten Konformation erkennen. Ferner ist zu vermuten, dass die Affinität des Anticalins zur ATP-gebundenen Form von Hsp70 aufgrund der Unzugänglichkeit und konformationellen Fixierung des Linker-Epitops dort deutlich geringer ist. Im Umkehrschluss sollte sich das Konformationsgleichgewicht mit der Anticalin-Bindung zugunsten der ADP-Form von Hsp70 verschieben; womit das Anticalin als allosterischer Effektor wirken und in einer Art heterotroper Kooperativität auch die Peptidsubstrataffinität von Hsp70 steigern würde (Hammes, 2000). Das

Ausmaß dieses allosterischen Effekts sollte hierbei, wie in einem analogen Beispiel mit konformationsabhängig bindenden Antikörperfragmenten für das Maltose-Bindungsprotein (MBP) schon gezeigt, hauptsächlich von dem Quotienten der Affinitäten des Bindungsproteins für die unterschiedlichen Konformationen abhängen (Rizk *et al.*, 2011).

Angesichts der Relevanz von Hsp70-Proteinen für eine Reihe von pathologischen Prozessen, insbesondere bei onkologischen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie mikrobiellen Infektionen, wären für ein Anticalin mit der Fähigkeit zur spezifischen Modulation der Hsp70-Funktion neben dem in dieser Arbeit anvisierten Wirkprinzip der bloßen Tumorantigen-Erkennung weitere therapeutische Anwendungen denkbar (Patury *et al.*, 2009). So wird zurzeit der Einsatz verschiedener niedermolekularer Substanzen mit der Fähigkeit zur Stabilisierung der Hsp70•ADP-Konformation im Hinblick auf eine Reduktion proteotoxischer Aggregate bei neurodegenerativen Proteinfaltungserkrankungen untersucht (Abisambra *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Die allosterische Verstärkung der Hsp70-Proteinsubstratbindung, welche hierbei das relevante Wirkprinzip darstellt, ließe sich im Fall der selektierten Anti-Hsp70-Anticaline durch Fluoreszenzanisotropie-basierte Bindungsstudien mit einem etablierte Hsp70-Substratpeptid („FITC-HLA“) untersuchen (Cesa *et al.*, 2013; Ricci & Williams, 2008). Für die Analyse möglicher allosterischer Effekte der Anticaline auf die ATP-Hydrolyserate von Hsp70 bietet sich ein photometrisches Verfahren an, welches unter Verwendung des Farbstoffs Malachitgrün die Verfolgung der Bildung von anorganischem Phosphat erlaubt (Chang *et al.*, 2008). Entsprechende medizinische Anwendungen setzen allerdings einen gentherapeutischen Ansatz voraus.

#### **4.5 Anti-Hsp70-Anticaline für das molekulare *In vivo*-Imaging und die Therapie von Tumoren**

Die Idee hinter der gezielten Wirkstoffabgabe (*Targeted Drug Delivery*) ist die Kombination der Spezifität einer Molekülfunktion zur Zielausrichtung (*Targeting*), wobei es sich klassischerweise um einen monoklonalen Antikörper handelt, mit funktionellen Effektoren zu sogenannten Immunkonjugaten. Bei diesen Effektoren werden sowohl niedermolekulare Zytostatika, Proteintoxine als auch Radionuklide erprobt (Koshkaryev *et al.*, 2013). Eine interessante Alternative für Antikörper bzw. Antikörperfragmente als *Targeting*-Module stellen künstliche Bindungsproteine dar: Anticaline versprechen nicht nur eine bessere Penetration solider Tumoren aufgrund ihrer verhältnismäßig geringen molekularen Größe, sie lassen sich dank ihres einfachen Aufbaus auch effizient in bakteriellen Expressionssystemen produzieren und sollten durch ihre enge Verwandtschaft mit den humanen Lipocalin-Proteinen vom menschlichen Körper gut vertragen werden (Richter *et al.*, 2013).

Die vorliegende Arbeit liefert eine der ersten experimentellen Studien zur Verwendung Anticalin-basierter Immunkonjugate für die Tumorthherapie bzw. das molekulare Tumor-Imaging. Die experimentelle Vorgehensweise sah hierbei drei grundlegend verschiedene Ansätze vor: (1) Die

Untersuchung der zytotoxischen Aktivität eines Fusionsproteins bestehend aus dem Anti-Hsp70-Anticalin und dem Proteintoxin Gelonin im *in-vitro*-Versuch mit einer Tumorzelllinie; (2) eine tierexperimentelle Biodistributionsstudie mit einem  $^{177}\text{Lu}$ -markiertem DTPA-Anticalin-Konjugat und (3) ein PET/CT-basiertes Experiment zum Tumor-Imaging mit einem  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Desferrioxamin-Anticalin-Konjugat in Mäusen mit Tumor-Xenotransplantaten.

Bei der Kopplung des Anticalins BBG10I-1 mit dem Proteintoxin Gelonin wurde eine neuartige enzymatische Ligierungsmethode verwendet (durchgeführt von Dr. P. Kornberger, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München), welche unter Verwendung des Enzyms Sortase A die peptidische Verknüpfung von zwei Proteinen *in vitro* gestattet und somit neben der Umgehung von potentiellen Problemen bei der heterologen Expression (einschl. Sekretion) entsprechender rekombinanter Fusionsproteine auch zur Vermeidung gentechnischer Sicherheitsrisiken beiträgt (Kornberger & Skerra, 2014). SPR-basierte Affinitätsstudien mit dem enzymatisch erzeugten Fusionsprotein ergaben, dass die Bindungsaktivität gegenüber rhHsp70.1 durch die Kopplung kaum beeinträchtigt wird. Im Zell-Vitalitätstest zeigte das Anticalin-basierte Immunkonjugat zudem die Fähigkeit zur spezifischen Abtötung Hsp70-positiver Tumorzellen einer menschlichen Krebszelllinie. Während in ähnlichen Experimenten mit chemisch oder enzymatisch erzeugten Konjugaten von Gelonin mit Anti-HER2/neu-Antikörperfragmenten in verschiedenen Zelllinien ein Teil der Zellen (teilweise > 30%) in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt wurde (Kornberger & Skerra, 2014; Rosenblum *et al.*, 1999), wurde ein derartiges Resistenzverhalten hier nicht festgestellt. Dies deutet auf die effektivere Zellaufnahme des Immunotoxins hin, was im Einklang mit der – auch experimentell mit dem Anti-Hsp70-Fab-Fragment beobachteten (Stangl *et al.*, 2011) – hohen Internalisierungsrate von Membran-assoziiertem Hsp70 steht und als positives Merkmal des Anti-Hsp70-Anticalins bezüglich seiner Eignung für die gezielte Wirkstoffabgabe gewertet werden kann. Verglichen mit den oben genannten Antikörperfragment/Gelonin-Immunkonjugaten, welche  $\text{IC}_{50}$ -Konzentrationen im einstelligen nanomolaren bis hinab in den picomolaren Bereich aufwiesen, ist die Antigenaffinität des hier untersuchten Anticalin/Toxin-Konjugats mit  $\text{IC}_{50} = 68 \text{ nM}$  um mindestens eine Größenordnung geringer. Als Ursache für die große Abweichung der  $\text{IC}_{50}$  von der mittels SPR ermittelten Gleichgewichtskonstante der Hsp70-Immunkonjugat-Bindung ( $K_D = 0,86 \text{ nM}$ ) muss die spezifische Schwellenkonzentration, welche der Wirkstoff in der Zielzelle erreichen muss, um tödlich zu wirken, in Betracht gezogen werden. Die dabei involvierten Prozesse, wie die Internalisierung des Immunkonjugats, dessen intrazelluläre Freisetzung sowie intrazellulärer Transport, Metabolisierung und Sekretion sind nicht ohne weiteres vorhersagbar und bedürfen einer genaueren experimentellen Aufklärung (Kovtun & Goldmacher, 2007). Eine Möglichkeit zur Verbesserung der  $\text{IC}_{50}$  besteht in der gezielten Steigerung der Affinität des Anticalins zur Membran-assoziierten Form von Hsp70. Für eine derartige Affinitätsmaturierung würde es sich anbieten, das hier zur Selektion verwendete *E. coli*-Surface Display-System für ein beim Hefe-Display für andere Zielproteine beschriebenes „Biopanning“ zu modifizieren, bei der die Selektion der Anticalin-präsentierenden Bakterien anhand der Stärke ihrer Bindung an Hsp70-Oberflächenexprimierende Tumorzellen erfolgen würde (Tillotson *et al.*, 2013).

Für die *In-vivo*-Studien mit Tumor-transplantierten Mäusen wurden zwei verschiedene Radionuklide zur Markierung des Anti-Hsp70-Anticalins gewählt. Für die quantitative Biodistributionsstudie wurde der für die Radioimmuntherapie vielversprechende  $\beta^-$ - und  $\gamma$ -Strahler Lutetium-177 gewählt, welcher eine geeignete Halbwertszeit (6,7 Tage) aufweist und aufgrund der relativ geringen Reichweite seiner  $\beta^-$ -Strahlung (im Mittel 0,3 mm) ein optimales Verhältnis von Tumor-zu-Normalgewebe-Dosis (TND) ermöglicht (Audicio *et al.*, 2011; Bernhardt *et al.*, 2001). Für die PET-Tumor-Imaging-Studie dagegen wurde das Anti-Hsp70-Anticalin mit dem durch Positronen-Strahlung und Elektroneneinfang zerfallenden Übergangsmetall Zirconium-89 markiert.  $^{89}\text{Zr}$  zeichnet sich im Vergleich zu anderen gebräuchlichen Radionukliden, wie  $^{68}\text{Ga}$  und  $^{124}\text{I}$ , durch eine geringe  $\beta^+$ -Energie ( $< 1$  MeV) aus. Somit haben die emittierten Positronen nur eine geringe Reichweite (im Mittel 1,1 mm) innerhalb derer sie mit Elektronen des Körpers wechselwirken müssen (Annihilation) um die im PET detektierbaren Photonen auszusenden (Vernichtungsstrahlung), was in einer sehr hohen räumlichen Auflösung der PET-Aufnahmen resultiert (de Jong *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). Aufgrund der Ähnlichkeit des Biodistributionsverhaltens von  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Antikörpern mit  $^{90}\text{Y}$ - und  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Antikörpern stellt  $^{89}\text{Zr}$ -basiertes PET-Imaging eine gute Möglichkeit zur Abklärung der Biodistribution von Immunkonjugaten im Vorfeld von therapeutischen Anwendungen der Radionuklide  $^{90}\text{Y}$  und  $^{177}\text{Lu}$  dar (Perk *et al.*, 2005).

Zur Konjugation des Anticalins mit dem für das jeweilige Radionuklid optimalen Chelatbildner wurden zwei verschiedene chemische Kopplungsverfahren angewandt. Die aminoselektive Kopplung des Isothiocyanat-derivatisierten Chelators Bz-Dfo führte zu einer Verringerung der Affinität zum „Antigen“ um den Faktor  $\sim 40$ , was wahrscheinlich auf die Beeinträchtigung bindungsrelevanter Lysinseitenketten zurückzuführen ist. Bei der Thiol-selektiven DTPA-Bz-Maleimid-Kopplung von Anticalinen mit zusätzlich eingeführtem Cysteinrest konnte die Affinität dagegen wesentlich besser erhalten werden. Ein Nachteil dieser Methode war allerdings neben der teilweisen Disulfid-Inhomogenität auch die Notwendigkeit eines Reduktionsschrittes vor der eigentlichen Kopplung, da der zusätzliche Cysteinrest bei der periplasmatischen Produktionsmethode nicht in seiner freien Thiolform erhalten wurde. Auch wenn die Qualität der so hergestellten Anticalin-Immunkonjugate für Pilotstudien im Tiermodell ausreichend erschien, wird es notwendig sein, effektivere Strategien zur positionsselektiven Markierung von Anticalinen für zukünftige Tumor-Targeting-Studien zu entwickeln. Hier bieten sich vor allem enzymatische Kopplungsmethoden (Rashidian *et al.*, 2013) sowie bioorthogonale chemische Kopplungsreaktionen mit nicht-natürlichen Aminosäuren an (Lang & Chin, 2014; Liu & Schultz, 2010; Stephanopoulos & Francis, 2011). Erste am Lehrstuhl für Biologische Chemie (TU München) durchgeführte Experimente mit derartigen Strategien zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse (Reichert *et al.*, 2015).

In der PET-Imaging-Studie mit dem  $^{89}\text{Zr}$ -markiertem Anti-Hsp70-Anticalin-Konjugat konnte das Tumor-Xenotransplantat visualisiert und klar vom umgebenden Gewebe abgegrenzt werden. Zur Vermeidung der verfrühten Ausscheidung des Protein-Tracers aus dem Körper, wurde das hydrodynamische Molekülvolumen mithilfe der PASylierungs-Technologie vergrößert, was eine

Verzögerung der glomerulären Filtration in den Nieren zur Folge hat (Schlapschy *et al.*, 2013). Der Siebkoeffizient lässt sich hierbei durch die Wahl der Länge einer mit dem Tracer-Protein fusionierten Polypeptidsequenz aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS) steuern. In einer publizierten Imaging-Studie mit PASylierten Fab-Fragmenten, in welcher verschiedene Sequenzlängen hinsichtlich optimalem Tumor-zu-Blut-Kontrasts nach 24 h untersucht wurden, hatten sich 100- und 200-Aminosäuren umfassende PAS-Kassetten als optimal herausgestellt (Mendler *et al.*, 2014). Dementsprechend wurde zur Modulierung der Plasma-Halbwertszeit des Anti-Hsp70-Anticalins, dessen Molekülgröße mit ~22 kDa deutlich unter der von Fab Fragmenten (~48 kDa) liegt, für diese Pilot-Studie eine PAS-Kassette mit 200 Aminosäuren gewählt. Abgesehen von der gut kontrastierten Visualisierung des Tumors im PET-*Image* nach 24 h spricht vor allem die gute Gewebedurchdringung für den Erfolg dieser Strategie, wie anhand autoradiographischer Aufnahmen von 48 h nach der Tracerinjektion angefertigten Tumorschnitten dokumentiert.

Wie die PET-Studie gezeigt hat, findet die stärkste Akkumulation der Strahlung jedoch nicht im Tumor sondern in den Nieren statt. Dieses Verhalten ist typisch für chemisch mit Radiometallchelatkomplexen gekoppelte Proteine und Peptide, welche anders als Volllängenantikörper nicht zielgerichtet durch das hepatobiliäre System eliminiert werden (Akizawa *et al.*, 2008). Ursache hierfür ist der Vorgang der Wiederaufnahme und Prozessierung von renal filtrierten Proteinen im Bereich der proximalen Tubuli, woran verschiedene relativ unspezifisch agierende Endocytose-Rezeptoren wie Megalin und Cubulin beteiligt sind (Vegt *et al.*, 2010). Im Fall von Anticalinen ist auch die Beteiligung eines in der Maus im distalen Bereich der Tubuli lokalisierten Lcn2-Rezeptors (24p3R) denkbar (Langelueddecke *et al.*, 2012). Die bei der Metabolisierung entstehenden Aminosäure-Metallchelatkongjugate oder gar die Metallionen selbst sind offenbar nicht ohne weiteres in der Lage, die Lysosomen zu verlassen und sorgen so für eine Akkumulation der Radiometabolite in der Nierenrinde (Tsai *et al.*, 2001). Beim Vergleich der 24 h nach der Injektion mittels  $^{177}\text{Lu}$ - $\gamma$ -Szintillationszählung erfassten Biodistribution von PASyliertem und nicht-PASyliertem Anti-Hsp70-Anticalin zeigte sich bei der PAS-Version eine drastische Reduktion der Strahlungsakkumulation in den Nieren (um mehr als 50 %), was wahrscheinlich auf die längere Verweilzeit des Immunkongjugats in der Zirkulation in Folge der PASylierung zurückzuführen ist und sich zudem in einer signifikanten Steigerung der im Blut gemessenen Strahlung widerspiegelte. Warum dieser Effekt allerdings nicht in vergleichbarer Weise bei dem als Kontrollprotein eingesetzten Lipocalin-2 auftrat, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Das nach 24 h erreichte Tumor-zu-Blut-(T/B)-Verhältnis des nicht-PASylierten  $^{177}\text{Lu}$ -markierten Anti-Hsp70-Anticalins übertrifft mit ~10:1 deutlich das T/B-Verhältnis von ~3, welches mit [ $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe $^1$ ]-Octreotide, einem der zurzeit gängigsten Imaging-Reagenzien, in dem gleichen Zeitfenster erreicht wird (Bakker *et al.*, 1991). Andererseits erreicht das Anticalin-basierte Radio-Immunkongjugat noch nicht die Kontrastwerte modernerer Radioimmunkongjugate, welche gegen sehr stark überexprimierte Tumorantigene wie HER2/neu oder CEA (*Carcinogenic Antigen*) gerichtet sind und T/B-Verhältnisse von > 35 erzielen (Kenanova *et al.*,

2007; Tran *et al.*, 2007). Gerade in Anbetracht der relativ niedrigen Oberflächendichte von Hsp70 auf den charakterisierten Tumorzellen (~10.000 pro Zelle der CT26-Linie; Stangl *et al.*, 2010) im Vergleich zu hochexprimierten Tumorantigenen wie HER2/neu (50.000 – 2.000.000 Rezeptoren pro Zelle; Lohrisch & Piccart, 2001) sind die erreichten Resultate jedoch vielversprechend.

Die PASylierung des Anticalins zeigte einen positiven Effekt auf die Anreicherung im Tumor (3,55 % ID/g verglichen mit 0,88 % ID/g ohne PASylierung), welcher sich jedoch aufgrund der erhöhten Konzentration im Blut nach 24 h (1,52 % ID/g verglichen mit 0,08 % ID/g ohne PASylierung) nicht in einem verbesserten T/B-Verhältnis niederschlug. Somit wird die Notwendigkeit ausführlicherer Studien der Pharmakokinetik von Anti-Hsp70-Anticalinen mit PAS-Fusionspartnern verschiedener Länge deutlich.

Obwohl die beobachtete starke Akkumulation des Tracers in den Nieren ( $\geq 100$  % ID/g bei allen untersuchten Tracern) sich nicht unmittelbar negativ auf den diagnostischen Wert für *In vivo*-Tumor-Imaging auswirkt, da die Nieren nur sehr selten von Metastasen betroffen sind, ist die renale Strahlungstoxizität begrenzend für die maximal verträgliche Dosis des Immunkonjugats. Für den sicheren Einsatz wird eine maximale Aufnahme von unter 10 % ID/g für die Nieren angestrebt (Li *et al.*, 2002), was in etwa einem Zehntel des für das PASylierte Anti-Hsp70-Anticalin ermittelten Werts entspricht. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, wäre die Tyrosinspezifische Markierung der Anticaline mit Radiohalogeniden. Eine Akkumulation der Strahlung in den Nieren findet dabei nicht statt, da die modifizierten Tyrosinreste metabolisiert und dehalogeniert werden (Eary, 1989), was allerdings zur Anreicherung in der Schilddrüse führt. Davon abgesehen, dass die oxidative Halogenierung mithilfe von Iodogen den Verlust der Bindungsfähigkeit des Anticalins BBG10C/I zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt), kann die schnelle Metabolisierung und Ausscheidung des Radionuklids bei internalisierenden Zielstrukturen wie etwa Hsp70 auch ein Nachteil sein, da der Einschluss schwer metabolisierbarer Radiometall-Chelatkomplexe in der Tumorzelle durchaus wünschenswert ist und zur Erhöhung des TND-Verhältnisses beiträgt (Kenanova *et al.*, 2007).

Vielversprechend erscheinen Ansätze, um den Einschluss der Radiometabolite in den Nierenzellen nicht aber in den Tumorzellen zu unterbinden. Dies scheint teilweise durch die Blockierung von Endozytoserezeptoren in den Nierentubuli zu gelingen, wobei sich insbesondere die Gabe von succinylierter Gelatine als wirksam erwiesen hat (van Eerd *et al.*, 2006). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Gly-Lys-Linkern für die Kopplung des Chelators, wodurch die selektive Freisetzung durch Enzyme in der renalen Bürstensaummembran erfolgt, bevor eine Reabsorption des Immunkonjugats stattfinden kann (Li *et al.*, 2002; Uehara *et al.*, 2007).

Neben der Akkumulation in den Nieren könnte die (wenngleich weniger massive) Anreicherung der Anticalin-basierten Immunkonjugate in der Leber ein Problem für deren therapeutische und diagnostische Verwendung darstellen. Nachdem es sich hierbei ebenfalls um ein für Peptid-/bzw. Protein-Metallchelatkomplexe bekanntes Phänomen handelt, wurden bereits Ursachen und

mögliche Gegenmaßnahmen beschrieben (Hosseinimehr *et al.*, 2012; Tolmachev & Stone-Elander, 2010). Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Stabilität des Metallchelatkomplexes, da die frei werdenden Metallionen bei physiologischen pH-Werten zu unlöslichen Metallhydroxiden reagieren, welche in kolloidaler Form vom retikuloendothelialen System (v.a. in den Kupfferzellen der Leber) resorbiert und dort deponiert werden. Weitere Faktoren, welche die Leber-Akkumulation von Immunkonjugaten beeinflussen können, sind die Eigenschaften des Chelatbildners, wobei sich vor allem lipophile und negativ geladene Chelatbildner als vorteilhaft erwiesen haben, sowie die Art etwaiger Affinitätsanhängsel. So wurde gezeigt, dass durch Ersetzen des His<sub>6</sub>-Anhängsels durch einen gleichermaßen für die IMAC-Reinigung geeigneten (HisGlu)<sub>3</sub>-tag die Leberakkumulation von Affibody-basierten Immunkonjugaten drastisch reduziert werden konnte (Hofström *et al.*, 2011).

Als weitere Ursache für die Anreicherung des Immunkonjugats im retikuloendothelialen System wird die Präsenz des „Tumorantigens“ in der Zirkulation diskutiert (Davies *et al.*, 1997; Dillman *et al.*, 1984; Watanabe *et al.*, 1989). Hsp70.1 kann in der Zirkulation gesunder Menschen nachgewiesen werden, wobei die Konzentration aktuellen Studien zufolge zwischen 1,8 und 14 ng/ml liegt und bei bestimmten Typen und Stadien von Krebserkrankungen signifikant erhöht ist (Abe *et al.*, 2004; Pockley *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2006; Yeh *et al.*, 2010). In mehreren Studien hat sich die Anwendung einer „kalten Dosis“, d.h. des unkonjugierten Bindungsproteins, als geeignet erwiesen, um vor der Injektion des „heißen“ Immunkonjugats das zirkulierende und gut zugängliche Antigen zu sättigen. Hiermit kann die Rückhaltung des Tracers im retikuloendothelialen System vermieden werden, was wiederum zu einer Kontraststeigerung zu Gunsten des Tumor-Signals führt (Beatty *et al.*, 1989; Knox *et al.*, 1996; Prinssen *et al.*, 1998).



## 5 Zusammenfassung

Die gezielte Ansteuerung von Krebszellen mit (radio)chemisch „bewaffneten“ Antikörpern ist bereits erfolgreich für die Behandlung leukämischer Krebserkrankungen eingesetzt worden. Der Versuch, diese Strategie auch auf die Bekämpfung solider Tumoren auszuweiten, lieferte bislang nicht die erhofften Erfolge. Eine der Ursachen hierfür ist die begrenzte Verfügbarkeit von Antigenen, die spezifisch auf Krebszellen zu finden sind und somit den nebenwirkungsarmen Einsatz hochdosierter Wirkstoffe erlauben. Andere Ursachen sind die lange Zirkulation von Antikörpern im Blut sowie die begrenzte Fähigkeit dieser großen Proteine, extravasal in das Tumorgewebe einzudringen. Als Mitglied einer neuen Klasse von Tumorantigenen ist das Protein Hsp70.1 von besonderem Interesse. Während es bei gesunden Zellen nur im Zellinneren anzutreffen ist, wird es bei Tumorzellen auch Membran-assoziiert auf der Oberfläche präsentiert. Speziell bei Krebserkrankungen im fortgeschrittenen Stadium scheint dies ein vielversprechender Angriffspunkt für die zielgerichtete Therapie zu sein, da die Hsp70.1-Oberflächenexpression durch Metastasierung sowie durch vorangegangene Strahlen- oder Chemotherapie weiter verstärkt wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, kleinere Bindungsreagenzien für Hsp70.1 zu entwickeln, welche den Tumor besser durchdringen und einfache Funktionalisierung sowie flexible Anpassung der Plasma-Halbwertszeit erlauben. Dabei wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt: erstens, die Herstellung eines rekombinanten Antikörper-Fragments (Fab) und, zweitens, die Generierung eines Anticalins. Die Grundlage zur Klonierung des Anti-Hsp70.1-Fab-Fragments war ein monoklonaler Antikörper der Maus mit der speziellen Fähigkeit zur Bindung von Hsp70.1 in seiner Membran-assoziierten Form. Nach schrittweiser Optimierung, wie etwa durch Entfernung seltener Codons, war es möglich, das funktionelle Fab-Fragment in verschiedenen chimären Versionen periplasmatisch in *E. coli* zu produzieren. Durch den Einsatz des Faltungshelferplasmids pTUM4 wurde die zunächst außergewöhnlich geringe Ausbeute um einen Faktor >100 (~15 mg/l Fermenterkultur) gesteigert. Die Bindungsaktivität des Fab-Fragments wurde in ELISA- und SPR-Experimenten charakterisiert, und die Fähigkeit zur Erkennung von Membran-assoziiertem Hsp70.1 auf der Oberfläche von Tumorzellen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Cytofluorimetrie nachgewiesen. Eine Epitop-Kartierung ergab zudem identische Spezifität für das Fab-Fragment und den mAk. Für weiterführende Tierexperimente mit dem Ziel eines Hsp70.1-basierten Tumor-Imaging wurde das Fab-Fragment mit dem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 gekoppelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Anticalin als neuartiges Bindungsprotein gegen Hsp70.1 generiert und im Hinblick auf den potenziellen Einsatz für Tumor-Imaging und -Therapie charakterisiert. Zur Selektion des Anticalins aus einer synthetischen Genbibliothek wurde ein *E. coli*-Surface Display-Verfahren angewandt. Nach magnetischer Voranreicherung und fluoreszenzaktiviertem bakteriellem Cell-Sorting (FACS) gelang es erstmals, durch ausschließliche Verwendung dieser Display-Methode aus einer naiven Anticalin-Bibliothek ein hochaffines Bindungsprotein zu selektieren, das Anticalin BBG10 ( $K_D = 12,5$  nM). Durch

ebenfalls FACS-basierte Affinitätsmaturierung wurden daraufhin die Anticaline BBG10C/I und BBG10I-1 erhalten, welche mit  $K_D$ -Werten von  $\leq 500$  pM und bis zu 47-fach verlangsamter Komplex-Dissoziationsrate deutlich verbesserte Bindungseigenschaften zeigten.

SPR-Bindungsstudien mit BBG10C/I zeigten keine Kreuzreaktivität mit dem zu Hsp70.1 paralogen BiP, während murines und humanes Hsp70.1 mit vergleichbarer Affinität gebunden wurden. Mit Hilfe der SPOT-Technologie wurde die im Bereich des Interdomänen-Linkers von Hsp70.1 liegende Sequenz VQDLLLLD als lineares Peptidepitop des Anti-Hsp70.1-Anticalins identifiziert. Dessen Fähigkeit zur Bindung von Membran-assoziiertem Hsp70.1 auf der Oberfläche von Tumorzellen wurde durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Des Weiteren gelang es, durch enzymatisch katalysierte Kopplung des Anti-Hsp70.1-Anticalins mit dem Proteintoxin Gelonin ein zielgerichtet wirkendes „Immun“-Konjugat zu erzeugen, welches Tumorzellen bereits in nanomolaren Konzentrationen abtötet.

Pilotexperimente mit Tumor-tragenden Mäusen sollten eine erste Einschätzung des Potentials des hier generierten Anti-Hsp70-Anticalins für einen zukünftigen Einsatz bei der Krebstherapie bzw. -diagnostik ermöglichen. Hierfür wurde das Anticalin mit verschiedenen Chelatbildnern und Kopplungsstrategien entweder mit dem PET-Tracer Zirkonium-89 oder dem für die Tumorthherapie geeigneten Lutetium-177 markiert. Mit dem  $^{89}\text{Zr}$ -Anticalin-Konjugat konnten Xenograft-Tumore in PET/CT-Aufnahmen deutlich visualisiert werden. Quantitative Biodistributionsanalysen mit dem  $^{177}\text{Lu}$ -Anticalin-Konjugat ergaben ein radioaktives Tumor-zu-Blut-Verhältnis von mehr als 10:1. Die Modifikation des Anticalins mit der die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit bewirkenden PASylation-Technologie ermöglichte die Steigerung der im Tumor akkumulierten Dosis um den Faktor 4, verringerte allerdings das Tumor-zu-Blut-Verhältnis.

Sowohl mit dem hier klonierten Fab-Fragment als auch mit dem synthetischen Anticalin wurden in dieser Arbeit Bindungsproteine generiert, die aufgrund ihrer Spezifität für das neuartige Tumor-Oberflächenantigen Hsp70.1 und ihres günstigen Biodistributionsverhaltens neben Anwendungen in der medizinischen Bildgebung vielversprechende Wirkstoffe für zukünftige Tumortheraeutika darstellen.

## 6 Summary

Targeted drug delivery systems based on radioactively armed antibodies against specific tumour antigens have proven effective for the treatment of leukemic diseases while lacking comparable success for solid tumours. One reason is the limited number of antigens that are specifically expressed on malignant cells, thus allowing administration of the therapeutic agent without provoking dose-limiting side effects. Other significant problems relate to the long circulation of antibodies in the blood and their large molecular size, which prevents efficient extravascular penetration of the tumour tissue. A new type of tumour antigen is the major stress inducible 70 kDa heat shock protein (Hsp70.1), which shows promise as target for drug-delivery systems. While limited to intracellular location in normal cells, Hsp70.1 is frequently exposed on the plasma membrane of tumours and, even more pronounced, on metastases. The enhancement of Hsp70.1 surface expression after treatment with cytostatic agents or conventional radiation therapy suggests high value as a therapeutic target even for refractory cancers.

Goal of this work was the development of smaller binding proteins against Hsp70.1 which allow better tumour penetration, simple functionalisation and also flexible tailoring of their plasma half-life. To this end, two different strategies were pursued: first, the preparation of a recombinant antibody (Fab) fragment and, second, the generation of an alternative binding protein (Anticalin).

Basis for the cloning of the anti-Hsp70.1 Fab fragment was a murine monoclonal antibody with the capability to bind Hsp70.1 in its membrane-associated form. After multiple optimisation, involving e.g. the replacement of rare codons, the soluble Fab fragment was successfully produced in the periplasm of *E. coli*. With the aid of the folding helper plasmid pTUM4 it was possible to increase the yield, which initially was exceptionally low, by a factor >100 (~15 mg/l fermentation culture). Binding activity of the Fab fragment was characterised using ELISA and SPR, and its ability to bind membrane-associated Hsp70.1 was demonstrated by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. Furthermore, identical binding specificity of the antibody fragment and the full-length antibody were confirmed in an epitope mapping by employing the SPOT technique. For subsequent animal studies, the Fab fragment was conjugated with the infrared fluorescent dye Cy5.5.

In the second part of this work, an Anticalin based on the protein scaffold of the human Lipocalin-2 was developed as a novel binding protein against Hsp70.1 and was characterised with regard to application for *in vivo* tumour imaging. The selection of this binding protein from a synthetic Lipocalin random library was performed with a recombinant fragment of the Hsp70.1 substrate binding domain serving as molecular target and employing an *E. coli* surface display technique. Combining magnetic pre-enrichment and fluorescence-activated bacterial cell sorting (FACS) allowed for the first time the selection of a high-affinity binding protein from a naïve Anticalin library by exclusive use of bacterial surface display, resulting in clone BBG10 with a  $K_D$  value of 12.5 nM. FACS-based affinity maturation, after error-prone mutagenesis, of this clone yielded two Anticalins (BBG10C/I and BBG10-1) showing considerably improved binding

characteristics, revealing  $K_D$  values of  $\leq 500$  pM while the dissociation rate of the Hsp70.1-Anticalin complex was slowed down by a factor 47.

In SPR binding experiments the Anticalin BBG10C/I showed no cross-reactivity with the paralogue BiP, while the murine and human Hsp70.1 were bound with comparable affinities. Using the SPOT technique, the sequence VQDLLLLD, which is located in the interdomain linker of Hsp70.1, was identified as linear peptide epitope of the anti-Hsp70.1 Anticalin. The ability of the Anticalin to bind membrane-associated Hsp70.1 at the surface of tumour cells was demonstrated using immunofluorescence microscopy. Moreover, the Anticalin was armed with the protein toxin Gelonin by enzyme-catalysed coupling. The resulting “immuno”conjugate had the capacity to specifically kill cultured tumour cells with a half-maximal inhibitory concentration in the nanomolar range ( $IC_{50} = 68$  nM).

Animal studies with a tumour xenotransplant mouse model were performed in order to allow a first evaluation of the anti-Hsp70.1 Anticalin toward *in vivo* application in tumour diagnostics. Different chelators and coupling strategies were employed to label the Anticalin either with the PET tracer Zirkonium-89 or with Lutetium-177, which is suitable for radioimmunotherapy. After injection of the  $^{89}\text{Zr}$ -labelled Anticalin tumour xenografts could be clearly visualised in PET/CT imaging of the mice. Quantitative biodistribution studies with a  $^{177}\text{Lu}$ -Anticalin conjugate revealed a radioactive tumour-to-blood ratio of more than 10:1. Modification of the Anticalin with the plasma half-life extending PASylation technology allowed increase of the total dose accumulated in the tumour by a factor of 4, yet, at the expense of a lowered tumour-to-blood ratio.

Both with the recombinant Fab fragment and the engineered Anticalin, two promising novel binding proteins were generated in this work. Due to their specificity for the novel tumour antigen Hsp70.1 and their favourable biodistribution behaviour, each of them has potential as a prospective tumour targeting agent apart from applications in medical imaging.

## 7 Abkürzungen

A <sub>x</sub>	Absorption bei Wellenlänge x
AEX	Anionenaustausch-Chromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
aTc	Anhydrotetracyclin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BiP	Immunglobulin heavy chain-binding protein
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
Bz-	Benzyl-
c	Konzentration
Cam	Cloramphenicol
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	Complementary Determining Region
CEX	Kationenaustausch-Chromatographie
CHX-	Cyclohexyl-
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
Dfo	Desferrioxamin
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreit
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
fl-IG	Intergenische Region des Bakteriophagen fl
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting

Fab	„Fragment Antigen Binding“ der Immunglobuline
Fc	„Fragment Crystallizable“ der Immunglobuline
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
f(u)	Fraction Unfolded
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
hHsp70.1	Humanes 70 kDa Heat-Shock Protein 1
ID	Injizierte Dosis
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
$k_{on}$	Assoziationsrate
$k_{off}$	Dissoziationsrate
$K_D$	Dissoziationskonstante
mHsp70.3	Murines Heat-Shock Protein 3
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
$OD_x$	Optische Dichte bei Wellenlänge $x$
oHsp70	Oberflächen-Hsp70.1, siehe hHsp70.1
OmpA	Outer Membrane Protein A
ori	Plasmid-Replikationsursprung
p.A.	analysenrein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
(Na)P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat (Natrium-Salz)
PP	Polypropylen
PPA	Periplasmaaufschluss
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rhHsp70.1	Rekombinantes humanes Hsp70.1, siehe hHsp70.1
RID	Radioimmundiagnostik
RIT	Radioimmuntherapie
rmBiP	Rekombinantes murines BiP
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest

rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAC	Streptavidin-Affinitätschromatographie
SBD	Substrat-Bindedomäne
scFv	“Single Chain Variable Fragment” der Immunglobuline
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography
SP	Signalpeptid
tet <sup>pro</sup>	Tetracyclin-Promotor/Operator
t <sub>pp</sub>	Lipoprotein-Transkriptionsterminator
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TND	Tumor-zu-Normalgewebe-Dosis
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
V <sub>0</sub>	Durchbruchvolumen einer SEC-Säule
V <sub>H</sub>	Variable heavy chain-Region der Immunglobuline
V <sub>L</sub>	Variable light chain-Region der Immunglobuline
V <sub>t</sub>	Bettvolumen einer SEC-Säule
v/v	Volume per Volume
wt	Wildtyp
w/v	Weight per Volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

## 8 Literatur

- Abe, M., Manola, J.B., Oh, W.K., Parslow, D.L., George, D.J., Austin, C.L. & Kantoff, P.W. (2004) Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin. Prostate Cancer* 3, 49-53.
- Abisambra, J., Jinwal, U.K., Miyata, Y., Rogers, J., Blair, L., Li, X., Seguin, S.P., Wang, L., Jin, Y., Bacon, J., Brady, S., Cockman, M., Guidi, C., Zhang, J., Koren, J., Young, Z.T., Atkins, C.A., Zhang, B., Lawson, L.Y., Weeber, E.J., Brodsky, J.L., Gestwicki, J.E. & Dickey, C.A. (2013) Allosteric heat shock protein 70 inhibitors rapidly rescue synaptic plasticity deficits by reducing aberrant tau. *Biol. Psychiat.* 74, 367-374.
- Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D. & Weiner, L.M. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules. *Cancer Res.* 61, 4750-4755.
- Akizawa, H., Uehara, T. & Arano, Y. (2008) Renal uptake and metabolism of radiopharmaceuticals derived from peptides and proteins. *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 1319-1328.
- Albanesi, M. & Daëron, M. (2012) The interactions of therapeutic antibodies with Fc receptors. *Immunol. Lett.* 143, 20-27.
- Alexander, H., Harpprecht, J., Podzuweit, H.G., Rautenberg, P. & Müller-Ruchholtz, W. (1994) Human monoclonal antibodies recognize early and late viral proteins of human cytomegalovirus. *Hum. Antibodies Hybridomas* 5, 81-90.
- Arispe, N., Doh, M. & De Maio, A. (2002) Lipid interaction differentiates the constitutive and stress-induced heat shock proteins Hsc70 and Hsp70. *Cell Stress Chaperones* 7, 330-338.
- Arispe, N., Doh, M., Simakova, O., Kurganov, B. & De Maio, A. (2004) Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J.* 18, 1636-1645.
- Audicio, P.F., Castellano, G., Tassano, M.R., Rezzano, M.E., Fernandez, M., Riva, E., Robles, A., Cabral, P., Balter, H. & Oliver, P. (2011) [<sup>177</sup>Lu]DOTA-anti-CD20: labeling and pre-clinical studies. *Appl. Radiat. Isot.* 69, 924-928.
- Baish, J.W., Gazit, Y., Berk, D.A., Nozue, M., Baxter, L.T. & Jain, R.K. (1996) Role of tumor vascular architecture in nutrient and drug delivery: an invasion percolation-based network model. *Microvasc. Res.* 51, 327-346.
- Bakker, W.H., Krenning, E.P., Reubi, J.C., Breeman, W.A., Setyono-Han, B., de Jong, M., Kooij, P.P., Bruns, C., van Hagen, P.M., Marbach, P. & et al. (1991) *In vivo* application of [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci.* 49, 1593-1601.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M. & Srivastava, P.K. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-κB pathway. *Int. Immunol.* 12, 1539-1546.
- Baxter, L.T. & Jain, R.K. (1989) Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc. Res.* 37, 77-104.
- Beatty, B.G., Beatty, J.D., Williams, L.E., Paxton, R.J., Shively, J.E. & O'Connor-Tressel, M. (1989) Effect of specific antibody pretreatment on liver uptake of <sup>111</sup>In-labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody in nude mice bearing human colon cancer xenografts. *Cancer Res.* 49, 1587-1594.



- Beckman, R.A., Weiner, L.M. & Davis, H.M. (2007) Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 109, 170-179.
- Behrens, S., Maier, R., de Cock, H., Schmid, F.X. & Gross, C.A. (2001) The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions *in vivo* and has chaperone activity. *EMBO J.* 20, 285-294.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. (1998) Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol. Sci.* 42, 152-157.
- Berkmen, M. (2012) Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 82, 240-251.
- Bernhardt, P., Benjegård, S.A., Kölby, L., Johanson, V., Nilsson, O., Ahlman, H. & Forssell-Aronsson, E. (2001) Dosimetric comparison of radionuclides for therapy of somatostatin receptor-expressing tumors. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* 51, 514-524.
- Bertelsen, E.B., Chang, L., Gestwicki, J.E. & Zuiderweg, E.R. (2009) Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8471-8476.
- Bessette, P.H., Rice, J.J. & Daugherty, P.S. (2004) Rapid isolation of high-affinity protein binding peptides using bacterial display. *Protein Eng., Des. Sel.* 17, 731-739.
- Better, M., Chang, C.P., Robinson, R.R. & Horwitz, A.H. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240, 1041-1043.
- Beutling, U., Stading, K., Stradal, T. & Frank, R. (2008) Large-scale analysis of protein-protein interactions using cellulose-bound peptide arrays. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 110, 115-152.
- Binder, R.J., Blachere, N.E. & Srivastava, P.K. (2001) Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.* 276, 17163-17171.
- Binder, U., Matschiner, G., Theobald, I. & Skerra, A. (2010) High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. *J. Mol. Biol.* 400, 783-802.
- Binz, H.K., Amstutz, P. & Plückthun, A. (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1257-1268.
- Binz, H.K., Stumpp, M.T., Forrer, P., Amstutz, P. & 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.
- Boder, E.T., Midelfort, K.S. & Wittrup, K.D. (2000) Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10701-10705.
- Boder, E.T., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M. & Price, J.V. (2012) Engineering antibodies by yeast display. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 99-106.
- Boder, E.T. & Wittrup, K.D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15, 553-557.
- Boder, E.T. & Wittrup, K.D. (1998) Optimal screening of surface-displayed polypeptide libraries. *Biotechnol. Prog.* 14, 55-62.

- Borges, J.C. & Ramos, C.H. (2009) Characterization of nucleotide-induced changes on the quaternary structure of human 70 kDa heat shock protein Hsp70.1 by analytical ultracentrifugation. *BMB Rep.* 42, 166-171.
- Boroughs, L.K., Antonyak, M.A., Johnson, J.L. & Cerione, R.A. (2011) A unique role for heat shock protein 70 and its binding partner tissue transglutaminase in cancer cell migration. *J. Biol. Chem.* 286, 37094-37107.
- Botzler, C., Li, G., Issels, R.D. & Multhoff, G. (1998a) Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones* 3, 6-11.
- Botzler, C., Schmidt, J., Luz, A., Jennen, L., Issels, R. & Multhoff, G. (1998b) Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency. *Int. J. Cancer* 77, 942-948.
- Boulot, G., Eisele, J.L., Bentley, G.A., Bhat, T.N., Ward, E.S., Winter, G. & Poljak, R.J. (1990) Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the bacterially expressed Fv from the monoclonal anti-lysozyme antibody D1.3 and of its complex with the antigen, lysozyme. *J. Mol. Biol.* 213, 617-619.
- Bowers, P.M., Horlick, R.A., Neben, T.Y., Toobian, R.M., Tomlinson, G.L., Dalton, J.L., Jones, H.A., Chen, A., Altobelli, L., 3rd, Zhang, X., Macomber, J.L., Krapf, I.P., Wu, B.F., McConnell, A., Chau, B., Holland, T., Berkebile, A.D., Neben, S.S., Boyle, W.J. & King, D.J. (2011) Coupling mammalian cell surface display with somatic hypermutation for the discovery and maturation of human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20455-20460.
- Brandt, K.D., Schnobrich, K.E. & Johnson, D.K. (1991) Characterization of antibody-chelator conjugates: determination of chelator content by terbium fluorescence titration. *Bioconjugate Chem.* 2, 67-70.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E. & Macario, A.J. (2008) hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. *BMC Evol. Biol.* 8, 19.
- Broquet, A.H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G. & Bachelet, M. (2003) Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J. Biol. Chem.* 278, 21601-21606.
- Brunder, W., Schmidt, H. & Karch, H. (1997) EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 24, 767-778.
- Bukau, B. & Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Burris, H.A., 3rd, Tibbitts, J., Holden, S.N., Sliwkowski, M.X. & Lewis Phillips, G.D. (2011) Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2<sup>+</sup> breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 11, 275-282.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104, 541-555.
- Cesa, L.C., Patury, S., Komiyama, T., Ahmad, A., Zuiderweg, E.R. & Gestwicki, J.E. (2013) Inhibitors of difficult protein-protein interactions identified by high-throughput screening of multiprotein complexes. *ACS Chem. Biol.* 8, 1988-1997.

- Chan, W., Helms, L.R., Brooks, I., Lee, G., Ngola, S., McNulty, D., Maleeff, B., Hensley, P. & Wetzel, R. (1996) Mutational effects on inclusion body formation in the periplasmic expression of the immunoglobulin VL domain REI. *Fold. Des.* 1, 77-89.
- Chang, L., Bertelsen, E.B., Wisén, S., Larsen, E.M., Zuiderweg, E.R. & Gestwicki, J.E. (2008) High-throughput screen for small molecules that modulate the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK. *Anal. Biochem.* 372, 167-176.
- Chen, J., Song, J.L., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D.F. & Wang, C.C. (1999) Chaperone activity of DsbC. *J. Biol. Chem.* 274, 19601-19605.
- Chiti, F., Taddei, N., Baroni, F., Capanni, C., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C.M. (2002) Kinetic partitioning of protein folding and aggregation. *Nat. Struct. Biol.* 9, 137-143.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2110-2114.
- Costa, T.R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M.S., Redzej, A., Trokter, M. & Waksman, G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 343-359.
- Damschroder, M.M., Widjaja, L., Gill, P.S., Krasnoperov, V., Jiang, W., Dall'Acqua, W.F. & Wu, H. (2007) Framework shuffling of antibodies to reduce immunogenicity and manipulate functional and biophysical properties. *Mol. Immunol.* 44, 3049-3060.
- Daugaard, M., Rohde, M. & Jäättelä, M. (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett.* 581, 3702-3710.
- Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (1998) Antibody affinity maturation using bacterial surface display. *Protein Eng.* 11, 825-832.
- Daugherty, P.S., Olsen, M.J., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (1999) Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* 12, 613-621.
- Dautin, N., Barnard, T.J., Anderson, D.E. & Bernstein, H.D. (2007) Cleavage of a bacterial autotransporter by an evolutionarily convergent autocatalytic mechanism. *EMBO J.* 26, 1942-1952.
- Davies, A.J. (2007) Radioimmunotherapy for B-cell lymphoma: Y90 ibritumomab tiuxetan and I(131) tositumomab. *Oncogene* 26, 3614-3628.
- Davies, Q., Perkins, A.C., Frier, M., Watson, S., Lalani, E. & Symonds, E.M. (1997) The effect of circulating antigen on the biodistribution of the engineered human antibody hCTM01 in a nude mice model. *Eur. J. Nucl. Med.* 24, 206-209.
- de Jong, H., Perk, L., Visser, G.W.M., Boellaard, R., van Dongen, G. & Lammertsma, A.A. (2005) High resolution PET imaging characteristics of <sup>68</sup>Ga, <sup>124</sup>I and <sup>89</sup>Zr compared to <sup>18</sup>F. IN YU, B. (Ed.) *2005 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, Vols 1-5*. New York, IEEE.
- De Maio, A. (2011) Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones* 16, 235-249.
- De Schutter, K. & Callewaert, N. (2012) *Pichia* surface display: a tool for screening single domain antibodies. *Methods Mol. Biol.* 911, 125-134.

- DelTito, B.J., Watson, F.A., Sathe, G.M., Moyer, M.L. & Kane, J.F. (1994) Effects of a rare isoleucine transfer-RNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *FASEB J.* **8**, A1305-A1305.
- Deret, S., Maissiat, C., Aucouturier, P. & Chomilier, J. (1995) SUBIM: a program for analysing the Kabat database and determining the variability subgroup of a new immunoglobulin sequence. *Comput. Appl. Biosci.* **11**, 435-439.
- Di Cesare, S., Poccia, F., Mastino, A. & Colizzi, V. (1992) Surface expressed heat-shock proteins by stressed or human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphoid cells represent the target for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology* **76**, 341-343.
- Dillman, R.O., Beauregard, J.C., Sobol, R.E., Royston, I., Bartholomew, R.M., Hagan, P.S. & Halpern, S.E. (1984) Lack of radioimmunodetection and complications associated with monoclonal anticarcinoembryonic antigen antibody cross-reactivity with an antigen on circulating cells. *Cancer Res.* **44**, 2213-2218.
- Doerner, A., Rhiel, L., Zielonka, S. & Kolmar, H. (2014) Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening. *FEBS Lett.* **588**, 278-287.
- Dy, G.K. & Adjei, A.A. (2008) Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years. *Cancer* **113**, 1857-1887.
- Eary, J.F.K., K. A.; Kishore, R.; Nelp, W.B. (1989) Radiochemistry of halogenated antibodies. IN ZALUTSKY (Ed.) *Antibodies in radiodiagnosis and therapy*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- Epstein, A.L., Herman, M.M., Kim, H., Dorfman, R.F. & Kaplan, H.S. (1976) Biology of the human malignant lymphomas. III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer* **37**, 2158-2176.
- Eser, M., Masip, L., Kadokura, H., Georgiou, G. & Beckwith, J. (2009) Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the E. coli periplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1572-1577.
- Essen, L.O. & Skerra, A. (1993) Single-step purification of a bacterially expressed antibody Fv fragment by immobilized metal affinity chromatography in the presence of betaine. *J. Chromatogr. A* **657**, 55-61.
- Feige, M.J., Groscurth, S., Marciniowski, M., Shimizu, Y., Kessler, H., Hendershot, L.M. & Buchner, J. (2009) An unfolded C<sub>H</sub>1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol. Cell* **34**, 569-579.
- Feige, M.J., Hendershot, L.M. & Buchner, J. (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 189-198.
- Fekkes, P. & Driessen, A.J. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 161-173.
- Feldhaus, M.J., Siegel, R.W., Opresko, L.K., Coleman, J.R., Feldhaus, J.M., Yeung, Y.A., Cochran, J.R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., Graff, C., Wiley, H.S. & Wittrup, K.D. (2003) Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat. Biotechnol.* **21**, 163-170.
- Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R. & Rugarli, C. (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer* **51**, 613-619.
- Fidler, I.J. (2012) Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **8**, 1141-1142.

- Fiedler, M. & Skerra, A. (1999) Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody F(ab) fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expr. Purif.* 17, 421-427.
- Fisher, B., Bryant, J., Dignam, J.J., Wickerham, D.L., Mamounas, E.P., Fisher, E.R., Margolese, R.G., Nesbitt, L., Paik, S., Pisansky, T.M. & Wolmark, N. (2002) Tamoxifen, radiation therapy, or both for prevention of ipsilateral breast tumor recurrence after lumpectomy in women with invasive breast cancers of one centimeter or less. *J. Clin. Oncol.* 20, 4141-4149.
- Fisher, B., Dignam, J., Wolmark, N., Mamounas, E., Costantino, J., Poller, W., Fisher, E.R., Wickerham, D.L., Deutsch, M., Margolese, R., Dimitrov, N. & Kavanah, M. (1998) Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *J. Clin. Oncol.* 16, 441-452.
- Fleetwood, F., Devoogdt, N., Pellis, M., Wernery, U., Muyldermans, S., Ståhl, S. & Löfblom, J. (2013) Surface display of a single-domain antibody library on Gram-positive bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1081-1093.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.
- Flower, D.R., North, A.C. & Sansom, C.E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9-24.
- Fogh, J., Wright, W.C. & Loveless, J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 209-214.
- Fourie, A.M., Sambrook, J.F. & Gething, M.J. (1994) Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 269, 30470-30478.
- Frank, R. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *J. Immunol. Methods* 267, 13-26.
- Friedländer, E., Barok, M., Szöllösi, J. & Vereb, G. (2008) ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunol. Lett.* 116, 126-140.
- Friedrich, L., Stangl, S., Hahne, H., Küster, B., Köhler, P., Multhoff, G. & Skerra, A. (2010) Bacterial production and functional characterization of the Fab fragment of the murine IgG1/ $\lambda$  monoclonal antibody cmHsp70.1, a reagent for tumour diagnostics. *Protein Eng., Des. Sel.* 23, 161-168.
- Fujimori, K., Covell, D.G., Fletcher, J.E. & Weinstein, J.N. (1990) A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J. Nucl. Med.* 31, 1191-1198.
- Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G. & Skerra, A. (2013) Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J. Mol. Biol.* 425, 780-802.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 245-255.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2012) Anticalins small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol.* 503, 157-188.
- Gehrmann, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G. & Multhoff, G. (2008) Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PLoS One* 3, e1925.

- Gehrmann, M., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jäättelä, M., Zilch, T. & Multhoff, G. (2005) Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ.* 12, 38-51.
- Gehrmann, M., Pfister, K., Hutzler, P., Gastpar, R., Margulis, B. & Multhoff, G. (2002) Effects of antineoplastic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol. Chem.* 383, 1715-1725.
- Gehrmann, M., Stangl, S., Kirschner, A., Foulds, G.A., Sievert, W., Doss, B.T., Walch, A., Pockley, A.G. & Multhoff, G. (2012) Immunotherapeutic targeting of membrane Hsp70-expressing tumors using recombinant human granzyme B. *PLoS One* 7, e41341.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P. (1987) Efficient site-directed *in-vitro* mutagenesis. *BioTechniques* 5, 786-791.
- Getz, J.A., Schoep, T.D. & Daugherty, P.S. (2012) Peptide discovery using bacterial display and flow cytometry. *Methods Enzymol.* 503, 75-97.
- Gidalevitz, T., Stevens, F. & Argon, Y. (2013) Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 2410-2424.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Giudicelli, V., Duroux, P., Ginestoux, C., Folch, G., Jabado-Michaloud, J., Chaume, D. & Lefranc, M.P. (2006) IMGT/LIGM-DB, the IMGT comprehensive database of immunoglobulin and T cell receptor nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D781-784.
- Glanville, J., Zhai, W., Berka, J., Telman, D., Huerta, G., Mehta, G.R., Ni, I., Mei, L., Sundar, P.D., Day, G.M., Cox, D., Rajpal, A. & Pons, J. (2009) Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20216-20221.
- Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T. & Stevenson, G.T. (1987) Preparation and performance of bispecific F(ab'  $\gamma$ )<sub>2</sub> antibody containing thioether-linked Fab'  $\gamma$  fragments. *J. Immunol.* 139, 2367-2375.
- Graff, C.P. & Wittrup, K.D. (2003) Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: Importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res.* 63, 1288-1296.
- Green, N.M. (1965) A Spectrophotometric Assay for Avidin and Biotin Based on Binding of Dyes by Avidin. *Biochem. J.* 94, 23C-24C.
- Grijpstra, J., Arenas, J., Rutten, L. & Tommassen, J. (2013) Autotransporter secretion: varying on a theme. *Res. Microbiol.* 164, 562-582.
- Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispe, N. & Multhoff, G. (2003) Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J. Biol. Chem.* 278, 41173-41181.
- Gupta, R.S. & Golding, G.B. (1993) Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 37, 573-582.
- Haas, I.G. (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* 50, 1012-1020.

- Haas, I.G. & Meo, T. (1988) cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 2250-2254.
- Haas, I.G. & Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387-389.
- Hammes, G.G. (2000) *Thermodynamics and kinetics for the biological sciences*, New York, NY, USA, John Wiley & Sons.
- Han, W. & Christen, P. (2004) *cis*-Effect of DnaJ on DnaK in ternary complexes with chimeric DnaK/DnaJ-binding peptides. *FEBS Lett.* 563, 146-150.
- Harada, Y., Sato, C. & Kitajima, K. (2007) Complex formation of 70-kDa heat shock protein with acidic glycolipids and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 655-660.
- Harel Inbar, N. & Benhar, I. (2012) Selection of antibodies from synthetic antibody libraries. *Arch. Biochem. Biophys.* 526, 87-98.
- He, M. & Khan, F. (2005) Ribosome display: next-generation display technologies for production of antibodies *in vitro*. *Expert Rev. Proteomics* 2, 421-430.
- Hervent, A.S. & De Keulenaer, G.W. (2012) Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 12268-12286.
- Hofström, C., Orlova, A., Altai, M., Wängsell, F., Gräslund, T. & Tolmachev, V. (2011) Use of a HEHEHE purification tag instead of a hexahistidine tag improves biodistribution of affibody molecules site-specifically labeled with <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, and <sup>125</sup>I. *J. Med. Chem.* 54, 3817-3826.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126-1136.
- Honegger, A. (2008) Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 47-68.
- Honegger, A., Malebranche, A.D., Röthlisberger, D. & Plückthun, A. (2009) The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. *Protein Eng., Des. Sel.* 22, 121-134.
- Hoogenboom, H.R. (2002) Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol. Biol.* 178, 1-37.
- Hoogenboom, H.R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105-1116.
- Horvath, I. & Vigh, L. (2010) Cell biology: Stability in times of stress. *Nature* 463, 436-438.
- Hosseinimehr, S.J., Tolmachev, V. & Orlova, A. (2012) Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design. *Drug Discovery Today* 2012/07/12 ed.
- Huang, C.J., Lin, H. & Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 383-399.
- Hunke, S. & Betton, J.M. (2003) Temperature effect on inclusion body formation and stress response in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 50, 1579-1589.
- Hunter-Lavin, C., Davies, E.L., Bacelar, M.M., Marshall, M.J., Andrew, S.M. & Williams, J.H. (2004) Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 511-517.

- Illidge, T. & Morschhauser, F. (2011) Radioimmunotherapy in follicular lymphoma. *Best Pract. Res., Clin. Haematol.* 24, 279-293.
- Jäättelä, M. (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248, 30-43.
- Jain, R.K. (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.* 50, 814s-819s.
- James, M.L. & Gambhir, S.S. (2012) A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol. Rev.* 92, 897-965.
- Jang, S.H., Wientjes, M.G., Lu, D. & Au, J.L. (2003) Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm. Res.* 20, 1337-1350.
- Jensen, H., Andresen, L., Hansen, K.A. & Skov, S. (2009) Cell-surface expression of Hsp70 on hematopoietic cancer cells after inhibition of HDAC activity. *J. Leukocyte Biol.* 86, 923-932.
- Jensen, R.E. & Johnson, A.E. (1999) Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr. Biol.* 9, R779-782.
- Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Lafer, E.M. & Sousa, R. (2007) Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol. Cell* 28, 422-433.
- Jiang, J., Prasad, K., Lafer, E.M. & Sousa, R. (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol. Cell* 20, 513-524.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. & Goeddel, D.V. (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Jolesch, A., Elmer, K., Bendz, H., Issels, R.D. & Noessner, E. (2012) Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 48-52.
- Jose, J., Krämer, J., Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T.F. (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga $\beta$  autotransporter pathway. *Gene* 178, 107-110.
- Jose, J. & Meyer, T.F. (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 600-619.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B. & Hightower, L.E. (2009) Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14, 105-111.
- Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods* 145, 229-240.
- Katagiri, S., Yonezawa, T., Kuyama, J., Kanayama, Y., Nishida, K., Abe, T., Tamaki, T., Ohnishi, M. & Tarui, S. (1985) Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. *Int. J. Cancer* 36, 241-246.
- Kenanova, V., Olafsen, T., Williams, L.E., Ruel, N.H., Longmate, J., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Colcher, D., Raubitschek, A.A. & Wu, A.M. (2007) Radioiodinated versus radiometal-labeled anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments: optimal pharmacokinetics for therapy. *Cancer Res.* 67, 718-726.
- Kenanova, V. & Wu, A.M. (2006) Tailoring antibodies for radionuclide delivery. *Expert Opin. Drug Delivery* 3, 53-70.



- Khanna, V.K. (2011) Optical Nanosensors. IN KHANNA, V. K. (Ed.) *Nanosensors: Physical, Chemical, and Biological*. Taylor & Francis.
- Kim, J. (2012) The Biology of the Neonatal Fc Receptor (FcRn). *Therapeutic Proteins*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S. & Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 362, 841-844.
- King, D.J. (1998) *Applications and engineering of monoclonal antibodies*, Taylor & Francis.
- Kirov, A., Al-Hashimi, H., Solomon, P., Mazur, C., Thorpe, P.E., Sims, P.J., Tarantini, F., Kumar, T.K. & Prudovsky, I. (2012) Phosphatidylserine externalization and membrane blebbing are involved in the nonclassical export of FGF1. *J. Cell. Biochem.* 113, 956-966.
- Klinke, R. & Baumann, R. (2010) *Physiologie*, Thieme.
- Knappik, A. & Brundiers, R. (2009) Recombinant Antibody Expression and Purification. IN WALKER, J. (Ed.) *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press.
- Knappik, A. & Plückthun, A. (1995) Engineered turns of a recombinant antibody improve its *in vivo* folding. *Protein Eng.* 8, 81-89.
- Knox, S.J., Goris, M.L., Trisler, K., Negrin, R., Davis, T., Liles, T.M., Grillo-Lopez, A., Chinn, P., Varns, C., Ning, S.C., Fowler, S., Deb, N., Becker, M., Marquez, C. & Levy, R. (1996) Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2, 457-470.
- Kocsis, J., Madaras, B., Toth, E.K., Fust, G. & Prohaszka, Z. (2010) Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis. *Cell Stress Chaperones* 15, 143-151.
- Koenen, M., Rüther, U. & Müller-Hill, B. (1982) Immunoenzymatic detection of expressed gene fragments cloned in the *lacZ* gene of *E. coli*. *EMBO J.* 1, 509-512.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Koide, A., Bailey, C.W., Huang, X. & Koide, S. (1998) The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J. Mol. Biol.* 284, 1141-1151.
- Koide, A. & Koide, S. (2012) Affinity maturation of single-domain antibodies by yeast surface display. *Methods Mol. Biol.* 911, 431-443.
- Kontermann, R. (2012) *Therapeutic proteins strategies to modulate their plasma half-lives*, Weinheim, Wiley-Blackwell.
- Kornberger, P. & Skerra, A. (2014) Sortase-catalyzed *in vitro* functionalization of a Her2-specific recombinant Fab for tumor targeting of the plant cytotoxin gelonin. *mAbs* 6, 25-37.
- Korndörfer, I.P., Beste, G. & 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.
- Koshkaryev, A., Sawant, R., Deshpande, M. & Torchilin, V. (2013) Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv. Drug Delivery Rev.* 65, 24-35.
- Kovtun, Y.V. & Goldmacher, V.S. (2007) Cell killing by antibody-drug conjugates. *Cancer Lett.* 255, 232-240.

- Kronqvist, N., Löfblom, J., Jonsson, A., Wernerus, H. & Ståhl, S. (2008) A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. *Protein Eng., Des. Sel.* 21, 247-255.
- Kronqvist, N., Malm, M., Gostring, L., Gunneriusson, E., Nilsson, M., Hoiden Guthenberg, I., Gedda, L., Frejd, F.Y., Ståhl, S. & Löfblom, J. (2011) Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3-specific Affibody molecules. *Protein Eng., Des. Sel.* 24, 385-396.
- Kuhn, S.M., Rubini, M., Fuhrmann, M., Theobald, I. & Skerra, A. (2010) Engineering of an orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase for efficient incorporation of the non-natural amino acid *O*-methyl-L-tyrosine using fluorescence-based bacterial cell sorting. *J. Mol. Biol.* 404, 70-87.
- Kumar, D.P., Vorvis, C., Sarbeng, E.B., Cabra Ledesma, V.C., Willis, J.E. & Liu, Q. (2011) The four hydrophobic residues on the Hsp70 inter-domain linker have two distinct roles. *J. Mol. Biol.* 411, 1099-1113.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154, 367-382.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lang, K. & Chin, J.W. (2014) Bioorthogonal reactions for labeling proteins. *ACS Chem. Biol.* 9, 16-20.
- Langelueddecke, C., Roussa, E., Fenton, R.A., Wolff, N.A., Lee, W.K. & Thevenod, F. (2012) Lipocalin-2 (24p3/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J. Biol. Chem.* 287, 159-169.
- Laursen, R.A. (1966) A Solid-State Edman Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 5344-5346.
- Lefranc, M.P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., Regnier, L., Ehrenmann, F., Lefranc, G. & Duroux, P. (2009) IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* 37, D1006-1012.
- Lemmon, S.K. (2001) Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.* 11, R49-52.
- Li, L., Olafsen, T., Anderson, A.L., Wu, A., Raubitschek, A.A. & Shively, J.E. (2002) Reduction of kidney uptake in radiometal labeled peptide linkers conjugated to recombinant antibody fragments. Site-specific conjugation of DOTA-peptides to a Cys-diabody. *Bioconjugate Chem.* 13, 985-995.
- Li, Z.L., Z. (2012) Glucose regulated protein 78: a critical link between tumor microenvironment and cancer hallmarks. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 13-22.
- Ling, M.M. (2003) Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Comb. Chem. High Throughput Screening* 6, 421-432.
- Liu, C.C. & Schultz, P.G. (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 413-444.
- Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C. & Sun, J. (2008) Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J. Pharm. Sci.* 97, 2426-2447.
- Löfblom, J. (2011) Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol. J.* 6, 1115-1129.
- Lohrisch, C. & Piccart, M. (2001) An overview of HER2. *Semin. Oncol.* 28, 3-11.

- Lowman, H.B. & Wells, J.A. (1993) Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J. Mol. Biol.* 234, 564-578.
- Lumry, R. & Biltonen, R. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- MacKenzie, C.R., Sharma, V., Brummell, D., Bilous, D., Dubuc, G., Sadowska, J., Young, N.M., Bundle, D.R. & Narang, S.A. (1994) Effect of C $\lambda$ -C $\kappa$  domain switching on Fab activity and yield in *Escherichia coli*: synthesis and expression of genes encoding two anti-carbohydrate Fabs. *Bio/Technology* 12, 390-395.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Controlled Release* 65, 271-284.
- Mahalka, A.K., Kirkegaard, T., Jukola, L.T., Jäättelä, M. & Kinnunen, P.K. (2014) Human heat shock protein 70 (Hsp70) as a peripheral membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 1344-1361.
- Mambula, S.S. & Calderwood, S.K. (2006) Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J. Immunol.* 177, 7849-7857.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.P., Jacob, M.C., Sotto, J.J., Leroux, D., Bensa, J.C. & Plumas, J. (2003) *In vitro* mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 949-954.
- Marks, J.D., Griffiths, A.D., Malmqvist, M., Clackson, T.P., Bye, J.M. & Winter, G. (1992) Bypassing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/Technology* 10, 779-783.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222, 581-597.
- Mayer, M.P. & Bukau, B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670-684.
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Carroll, S. & Georgiou, G. (2010) Selection of full-length IgGs by tandem display on filamentous phage particles and *Escherichia coli* fluorescence-activated cell sorting screening. *FASEB J.* 277, 2291-2303.
- Mazor, Y., Van Blarcom, T., Mabry, R., Iverson, B.L. & Georgiou, G. (2007) Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 25, 563-565.
- McConnell, A.D., Do, M., Neben, T.Y., Spasojevic, V., Maclaren, J., Chen, A.P., Altobelli, L., 3rd, Macomber, J.L., Berkebile, A.D., Horlick, R.A., Bowers, P.M. & King, D.J. (2012) High affinity humanized antibodies without making hybridomas; immunization paired with mammalian cell display and *in vitro* somatic hypermutation. *PLoS One* 7, e49458.
- McManus, S. & Riechmann, L. (1991) Use of 2D NMR, protein engineering, and molecular modeling to study the hapten-binding site of an antibody Fv fragment against 2-phenylloxazolone. *Biochemistry* 30, 5851-5857.
- Melnick, J., Dul, J.L. & Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.
- Mendler, C.T., Schlapschy, M., Friedrich, L., Laitinen, I., Schwaiger, M., Wester, H. & Skerra, A. (2014) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *mAbs* 307, 96-109.

- Mercader, J.V. & Skerra, A. (2002) Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Anal. Biochem.* **308**, 269-277.
- Merdanovic, M., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. (2011) Protein quality control in the bacterial periplasm. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 149-168.
- Moser, C., Schmidbauer, C., Gürtler, U., Gross, C., Gehrman, M., Thonigs, G., Pfister, K. & Multhoff, G. (2002) Inhibition of tumor growth in mice with severe combined immunodeficiency is mediated by heat shock protein 70 (Hsp70)-peptide-activated, CD94 positive natural killer cells. *Cell Stress Chaperones* **7**, 365-373.
- Mross, K., Richly, H., Fischer, R., Scharr, D., Büchert, M., Stern, A., Gille, H., Audoly, L.P. & Scheulen, M.E. (2013) First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors. *PLoS One* **8**, e83232.
- Multhoff, G. (2007) Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods* **43**, 229-237.
- Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J. & Issels, R. (1997) Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J. Immunol.* **158**, 4341-4350.
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W. & Issels, R.D. (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* **61**, 272-279.
- Multhoff, G. & Hightower, L.E. (2011) Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones* **16**, 251-255.
- Multhoff, G., Mizzen, L., Winchester, C.C., Milner, C.M., Wenk, S., Eissner, G., Kampinga, H.H., Laumbacher, B. & Johnson, J. (1999) Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* **27**, 1627-1636.
- Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M. & Hiddemann, W. (2001) A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* **6**, 337-344.
- Multhoff, G., Pockley, A.G., Streffer, C. & Gaip, U.S. (2012) Dual role of Heat Shock Proteins (HSPs) in anti-tumor immunity. *Curr. Mol. Med.* **12**, 1174-1182.
- Muthukrishnan, A.B., Kandhavelu, M., Lloyd-Price, J., Kudasov, F., Chowdhury, S., Yli-Harja, O. & Ribeiro, A.S. (2012) Dynamics of transcription driven by the *tetA* promoter, one event at a time, in live *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8472-8483.
- Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* **12**, 279-284.
- Nadkarni, A., Kelley, L.L. & Momany, C. (2007) Optimization of a mouse recombinant antibody fragment for efficient production from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **52**, 219-229.
- Navarro-Teulon, I., Lozza, C., Pelegrin, A., Vives, E. & Pouget, J.P. (2013) General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* **5**, 467-487.
- Neidhardt, F.C. & Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ASM Press.
- News, G.E.B. (2013) Top 20 best-selling drugs of 2012. *Insight & Intelligence*. Mary Ann Liebert, Inc. publishers.

- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Ståhl, S., Uhlén, M. & Nygren, P.A. (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* 15, 772-777.
- Nossal, G.J. (2002) One cell, one antibody: prelude and aftermath. *Immunol. Rev.* 185, 15-23.
- Ntziachristos, V. (2006) Fluorescence molecular imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 8, 1-33.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* 7, 215-219.
- Padlan, E.A., Cohen, G.H. & Davies, D.R. (1986) Antibody Fab assembly: the interface residues between CH1 and CL. *Mol. Immunol.* 23, 951-960.
- Patury, S., Miyata, Y. & Gestwicki, J.E. (2009) Pharmacological targeting of the Hsp70 chaperone. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 1337-1351.
- Pepinsky, R.B., Silvian, L., Berkowitz, S.A., Farrington, G., Lugovskoy, A., Walus, L., Eldredge, J., Capili, A., Mi, S., Graff, C. & Garber, E. (2010) Improving the solubility of anti-LINGO-1 monoclonal antibody Li33 by isotype switching and targeted mutagenesis. *Protein Sci.* 19, 954-966.
- Perelson, A.S. & Oster, G.F. (1979) Theoretical studies of clonal selection: minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *J. Theor. Biol.* 81, 645-670.
- Perk, L.R., Visser, G.W., Vosjan, M.J., Stigter-van Walsum, M., Tijink, B.M., Leemans, C.R. & van Dongen, G.A. (2005)  $^{89}\text{Zr}$  as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J. Nucl. Med.* 46, 1898-1906.
- Perk, L.R., Vosjan, M.J., Visser, G.W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E. & van Dongen, G.A. (2010) *p*-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 250-259.
- Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J.G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H.J., Milani, V., Issels, R. & Multhoff, G. (2007) Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer* 110, 926-935.
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 178, 497-515.
- Pockley, A.G., Shepherd, J. & Corton, J.M. (1998) Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol. Invest.* 27, 367-377.
- Popp, M.W. & Ploegh, H.L. (2011) Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 50, 5024-5032.
- Prinssen, H.M., Molthoff, C.F., Verheijen, R.H., Broadhead, T.J., Kenemans, P., Roos, J.C., Davies, Q., van Hof, A.C., Frier, M., den Hollander, W., Wilhelm, A.J., Baker, T.S., Sopwith, M., Symonds, E.M. & Perkins, A.C. (1998) Biodistribution of  $^{111}\text{In}$ -labelled engineered human antibody CTM01 (hCTM01) in ovarian cancer patients: influence of prior administration of unlabelled hCTM01. *Cancer Immunol., Immunother.* 47, 39-46.
- Qi, R., Sarbeng, E.B., Liu, Q., Le, K.Q., Xu, X., Xu, H., Yang, J., Wong, J.L., Vorvis, C., Hendrickson, W.A. & Zhou, L. (2013) Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 900-907.

- Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., Bhatt, R.R., Takeuchi, T., Lerner, R.A. & Crea, R. (2005) A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8466-8471.
- Ramm, K. & Plückthun, A. (2000) The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 275, 17106-17113.
- Rangan, S.R. (1972) A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29, 117-121.
- Rashidian, M., Dozier, J.K. & Distefano, M.D. (2013) Enzymatic labeling of proteins: techniques and approaches. *Bioconjugate Chem.*
- Reichert, A.J., Poxleitner, G., Dauner, M. & Skerra, A. (2015) Optimisation of a system for the co-translational incorporation of a keto amino acid and its application to a tumour-specific Anticalin. *Protein Eng., Des. Sel.* 28, 553-565.
- Ricci, L. & Williams, K.P. (2008) Development of fluorescence polarization assays for the molecular chaperone Hsp70 family members: Hsp72 and DnaK. *Curr. Chem. Genomics* 2, 90-95.
- Richter, A., Eggenstein, E. & Skerra, A. (2013) Anticalins: Exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.*
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K. & Zwegyick, D. (2011) In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 2638-2645.
- Rizk, S.S., Paduch, M., Heithaus, J.H., Duguid, E.M., Sandstrom, A. & Kossiakoff, A.A. (2011) Allosteric control of ligand-binding affinity using engineered conformation-specific effector proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 437-442.
- Rosenblum, M.G., Shawver, L.K., Marks, J.W., Brink, J., Cheung, L. & Langton-Webster, B. (1999) Recombinant immunotoxins directed against the *c-erb-2/HER2/neu* oncogene product: *in vitro* cytotoxicity, pharmacokinetics, and *in vivo* efficacy studies in xenograft models. *Clin. Cancer Res.* 5, 865-874.
- Röthlisberger, D., Honegger, A. & Plückthun, A. (2005) Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J. Mol. Biol.* 347, 773-789.
- Russo, A., Rosell, R. & Rolfo, C. (2015) *Targeted Therapies for Solid Tumors: A Handbook for Moving Toward New Frontiers in Cancer Treatment*, Springer New York.
- Russo, A.R., Rafael; Rolfo, Christian (2015) Targeted Therapies for Solid Tumors. IN RUSSO, A. R., RAFAEL;ROLFO, CHRISTIAN (Ed.) *A Handbook for Moving Toward New Frontiers in Cancer Treatment*. New York, Springer.
- Safdari, Y., Farajnia, S., Asgharzadeh, M. & Khalili, M. (2013) Antibody humanization methods - a review and update. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 29, 175-186.
- Sahai, E. (2007) Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* 7, 737-749.
- Salema, V., Marin, E., Martínez-Arteaga, R., Ruano-Gallego, D., Fraile, S., Margolles, Y., Teira, X., Gutierrez, C., Bodelón, G. & Fernández, L.A. (2013) Selection of single domain antibodies from immune libraries displayed on the surface of *E. coli* cells with two  $\beta$ -domains of opposite topologies. *PLoS One* 8, e75126.

- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Schiefner, A. & Skerra, A. (2015) The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc. Chem. Res.* 48, 976-985.
- Schiweck, W. & Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* 23, 561-565.
- Schlapschy, M. (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)<sub>2</sub>-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München.
- Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A. (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng., Des. Sel.* 26, 489-501.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A. (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng., Des. Sel.* 19, 385-390.
- Schlapschy, M., Theobald, I., Mack, H., Schottelius, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2007) Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. *Protein Eng., Des. Sel.* 20, 273-284.
- Schlegel, S., Rujas, E., Ytterberg, A.J., Zubarev, R.A., Luirink, J. & de Gier, J.W. (2013) Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microb. Cell Fact.* 12, 24.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A. (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* 297, 1105-1120.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (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.
- Schreiber, G. (1988) Ein kombinatorisches Problem aus der Genetik. *BioEngineering* 2, 32-35.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shin, B.K., Wang, H., Yim, A.M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J.H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C.W., Misek, D.E. & Hanash, S.M. (2003) Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.* 278, 7607-7616.
- Sidhu, S.S. & Geyer, C.R. (2005) *Phage Display In Biotechnology and Drug Discovery*, CRC Press.
- Siegele, D.A. & Hu, J.C. (1997) Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8168-8172.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen-bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

- Skerra, A. (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141, 79-84.
- Skerra, A. (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- Skerra, A. (2000) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 13, 167-187.
- Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 683-693.
- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 275, 2677-2683.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273-278.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and *cis*-prolines. *Protein Eng.* 4, 971-979.
- Skerra, A.S., K. (2015) Rekombinante therapeutische Proteine - eine Erfolgsgeschichte. *BIOspektrum* 21, 36-38.
- Slepenkov, S.V. & Witt, S.N. (2002) The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol. Microbiol.* 45, 1197-1206.
- Smock, R.G., Rivoire, O., Russ, W.P., Swain, J.F., Leibler, S., Ranganathan, R. & Gierasch, L.M. (2010) An interdomain sector mediating allostery in Hsp70 molecular chaperones. *Mol. Syst. Biol.* 6, 414.
- Soda, K. (1987) Microbial sulfur amino acids: an overview. *Methods Enzymol.* 143, 453-459.
- Sonoda, H., Kumada, Y., Katsuda, T. & Yamaji, H. (2011) Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 465-470.
- Stangl, S., Gehrman, M., Riegger, J., Kuhs, K., Riederer, I., Sievert, W., Hube, K., Mocikat, R., Dressel, R., Kremmer, E., Pockley, A.G., Friedrich, L., Vigh, L., Skerra, A. & Multhoff, G. (2010) Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 733-738.
- Stangl, S., Themelis, G., Friedrich, L., Ntziachristos, V., Sarantopoulos, A., Molls, M., Skerra, A. & Multhoff, G. (2011) Detection of irradiation-induced, membrane heat shock protein 70 (Hsp70) in mouse tumors using Hsp70 Fab fragment. *Radiother. Oncol.* 99, 313-316.
- Stangl, S., Wortmann, A., Guertler, U. & Multhoff, G. (2006) Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *J. Immunol.* 176, 6270-6276.
- Stephanopoulos, N. & Francis, M.B. (2011) Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nat. Chem. Biol.* 7, 876-884.
- Stirpe, F., Olsnes, S. & Pihl, A. (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 255, 6947-6953.



- Strebhardt, K. & Ullrich, A. (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 473-480.
- Street, T.O., Courtemanche, N. & Barrick, D. (2008) Protein Folding and Stability Using Denaturants. *Method. Cell Biol.* Academic Press.
- Studier, F.W. & 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.
- Suzuki, K., Ito, Y., Wakai, K., Kawado, M., Hashimoto, S., Seki, N., Ando, M., Nishino, Y., Kondo, T., Watanabe, Y., Ozasa, K., Inoue, T. & Tamakoshi, A. (2006) Serum heat shock protein 70 levels and lung cancer risk: a case-control study nested in a large cohort study. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **15**, 1733-1737.
- Swain, J.F., Dinler, G., Sivendran, R., Montgomery, D.L., Stotz, M. & Gierasch, L.M. (2007) Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker. *Mol. Cell* **26**, 27-39.
- Tavagnacco, L., Brady, J.W. & Cesaro, A. (2013) The Interaction of Sorbitol with Caffeine in Aqueous Solution. *Food Biophys.* **8**, 216-222.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J., Wiegman, L.J., van den Brakel, J.H., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., Parren, P.W., Glennie, M.J. & van de Winkel, J.G. (2006) The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol.* **177**, 362-371.
- Thurber, G.M., Schmidt, M.M. & Wittrup, K.D. (2008) Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Adv. Drug Delivery Rev.* **60**, 1421-1434.
- Tiller, T., Schuster, I., Deppe, D., Siegers, K., Strohn, R., Herrmann, T., Berenguer, M., Poujol, D., Stehle, J., Stark, Y., Hessling, M., Daubert, D., Felderer, K., Kaden, S., Kölln, J., Enzelberger, M. & Urlinger, S. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *mAbs* **5**, 445-470.
- Tillotson, B.J., Cho, Y.K. & Shusta, E.V. (2013) Cells and cell lysates: a direct approach for engineering antibodies against membrane proteins using yeast surface display. *Methods* **60**, 27-37.
- Tolmachev, V. & Stone-Elander, S. (2010) Radiolabelled proteins for positron emission tomography: Pros and cons of labelling methods. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 487-510.
- Tran, T., Engfeldt, T., Orlova, A., Sandström, M., Feldwisch, J., Abrahmsén, L., Wennborg, A., Tolmachev, V. & Karlström, A.E. (2007) <sup>99m</sup>Tc-maEEE-Z<sub>HER2:342</sub>, an Affibody molecule-based tracer for the detection of HER2 expression in malignant tumors. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1956-1964.
- Tsai, S.W., Li, L., Williams, L.E., Anderson, A.L., Raubitschek, A.A. & Shively, J.E. (2001) Metabolism and renal clearance of <sup>111</sup>In-labeled DOTA-conjugated antibody fragments. *Bioconjugate Chem.* **12**, 264-270.
- Tsurushita, N., Hinton, P.R. & Kumar, S. (2005) Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* **36**, 69-83.
- Tung, W.L. & Chow, K.C. (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* **11**, 128-129.
- Tuomanen, E., Cozens, R., Tosch, W., Zak, O. & Tomasz, A. (1986) The rate of killing of *Escherichia coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1297-1304.

- Tuominen, E.K., Wallace, C.J. & Kinnunen, P.K. (2002) Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J. Biol. Chem.* **277**, 8822-8826.
- Uehara, T., Koike, M., Nakata, H., Hanaoka, H., Iida, Y., Hashimoto, K., Akizawa, H., Endo, K. & Arano, Y. (2007) Design, synthesis, and evaluation of [<sup>188</sup>Re]organorhenium-labeled antibody fragments with renal enzyme-cleavable linkage for low renal radioactivity levels. *Bioconjugate Chem.* **18**, 190-198.
- van Bloois, E., Winter, R.T., Kolmar, H. & Fraaije, M.W. (2011) Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* **29**, 79-86.
- Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'Connell, T., O'Connell, D., Auckenthaler, A. & Schwer, H. (2008) A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *BioTechniques* **45**, 340-343.
- van Eerd, J.E., Vegt, E., Wetzels, J.F., Russel, F.G., Masereeuw, R., Corstens, F.H., Oyen, W.J. & Boerman, O.C. (2006) Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of <sup>111</sup>In-octreotide in mice and rats. *J. Nucl. Med.* **47**, 528-533.
- Vega, V.L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrman, M., Diaz, J.C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N. & De Maio, A. (2008) Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J. Immunol.* **180**, 4299-4307.
- Vegt, E., de Jong, M., Wetzels, J.F., Masereeuw, R., Melis, M., Oyen, W.J., Gotthardt, M. & Boerman, O.C. (2010) Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J. Nucl. Med.* **51**, 1049-1058.
- Veronese, F.M. (Ed.) (2009) *PEGylated protein drugs: Basic science and clinical applications*, Basel, Birkhäuser Verlag.
- Victoria, G.D. & Nussenzweig, M.C. (2012) Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429-457.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Vogel, M., Mayer, M.P. & Bukau, B. (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J. Biol. Chem.* **281**, 38705-38711.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J. Mol. Recognit.* **14**, 79-86.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**, 975-982.
- Wang, A.M., Miyata, Y., Klinedinst, S., Peng, H.M., Chua, J.P., Komiyama, T., Li, X., Morishima, Y., Merry, D.E., Pratt, W.B., Osawa, Y., Collins, C.A., Gestwicki, J.E. & Lieberman, A.P. (2013) Activation of Hsp70 reduces neurotoxicity by promoting polyglutamine protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 112-118.
- Ward, E.S. & Ober, R.J. (2012) The Diverse Roles of FcRn: Implications for Antibody Engineering. *Therapeutic Proteins*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Watanabe, Y., Endo, K., Koizumi, M., Kawamura, Y., Saga, T., Sakahara, H., Kuroki, M., Matsuoka, Y. & Konishi, J. (1989) Effect of tumor mass and antigenic nature on the biodistribution of labeled monoclonal antibodies in mice. *Cancer Res.* **49**, 2884-2889.

- Weidle, U.H., Maisel, D., Klostermann, S., Schiller, C. & Weiss, E.H. (2011) Intracellular proteins displayed on the surface of tumor cells as targets for therapeutic intervention with antibody-related agents. *Cancer Genomics Proteomics* 8, 49-63.
- Wenning, L.A. & Murphy, R.M. (1999) Coupled cellular trafficking and diffusional limitations in delivery of immunotoxins to multicell tumor spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 562-575.
- Wentzel, A., Christmann, A., Kratzner, R. & Kolmar, H. (1999) Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the Ecballium elaterium trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* 274, 21037-21043.
- Werner, W.E., Wu, S. & Mulkerrin, M. (2005) The removal of pyroglutamic acid from monoclonal antibodies without denaturation of the protein chains. *Anal. Biochem.* 342, 120-125.
- Whitlow, M. & Filpula, D. (1991) Single-chain Fv proteins and their fusion proteins. *Methods* 2, 97-105.
- WHO (2013) WHO fact sheet on cancer providing key facts and information on figures, causes, risk factors, prevention, early diagnosis, treatment, palliative care, WHO response. *Media centre*. World Health Organisation.
- Wu, X., Yano, M., Washida, H. & Kido, H. (2004) The second metal-binding site of 70 kDa heat-shock protein is essential for ADP binding, ATP hydrolysis and ATP synthesis. *Biochem. J.* 378, 793-799.
- Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R. & Barbas, C.F., 3rd (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392-403.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yeh, C.H., Tseng, R., Hannah, A., Estrov, Z., Estey, E., Kantarjian, H. & Albitar, M. (2010) Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk. Res.* 34, 605-609.
- Yeung, Y.A. & Wittrup, K.D. (2002) Quantitative screening of yeast surface-displayed polypeptide libraries by magnetic bead capture. *Biotechnol. Prog.* 18, 212-220.
- Zander, H., Hettich, E., Greiff, K., Chatwell, L. & Skerra, A. (2007) Biochemical characterization of the recombinant human Nogo-A ectodomain. *FEBS J.* 274, 2603-2613.
- Zettlitz, K.A., Seitter, J., Müller, D. & Kontermann, R.E. (2010) Humanization of a mouse monoclonal antibody directed against a cell surface-exposed epitope of membrane-associated heat shock protein 70 (Hsp70). *Mol. Biotechnol.* 46, 265-278.
- Zhang, Y., Hong, H. & Cai, W. (2011) PET tracers based on Zirconium-89. *Curr. Radiopharm.* 4, 131-139.
- Zhang, Z., Li, Z.H., Wang, F., Fang, M., Yin, C.C., Zhou, Z.Y., Lin, Q. & Huang, H.L. (2002) Overexpression of DsbC and DsbG markedly improves soluble and functional expression of single-chain Fv antibodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 26, 218-228.
- Zhang, Z., Song, L.P., Fang, M., Wang, F., He, D., Zhao, R., Liu, J., Zhou, Z.Y., Yin, C.C., Lin, Q. & Huang, H.L. (2003) Production of soluble and functional engineered antibodies in *Escherichia coli* improved by FkpA. *BioTechniques* 35, 1032-1038, 1041-1032.

- Zheng, W.D., Quan, H., Song, J.L., Yang, S.L. & Wang, C.C. (1997) Does DsbA have chaperone-like activity? *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 326-331.
- Zhukov, N.V. & Tjulandin, S.A. (2008) Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. *Biochemistry (Moscow)* 73, 605-618.
- Zhuravleva, A., Clerico, E.M. & Gierasch, L.M. (2012) An interdomain energetic tug-of-war creates the allosterically active state in Hsp70 molecular chaperones. *Cell* 151, 1296-1307.
- Zhuravleva, A. & Gierasch, L.M. (2011) Allosteric signal transmission in the nucleotide-binding domain of 70-kDa heat shock protein (Hsp70) molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6987-6992.

## 9 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit unter seiner Ägide meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm für sein stetiges Interesse am Fortgang meines Projekts, für seine Unterstützung mit hervorragenden Ideen und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München für ihre Kollegialität, wobei hier vor allem Therese Wiedemann, Martina Dotzauer, Klaus Wachinger und Irmgard Neumaier für ihre tatkräftige Hilfe im Laboralltag Erwähnung finden sollen.

Claudia T. Mandler danke ich für die maßgebliche Hilfe bei der Planung und Umsetzung der tierexperimentellen Studien, ohne die diese Doktorarbeit wesentlich an Relevanz verlieren würde.

Dr. Petra Kornberger und Alois Bräuer danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen zur Entwicklung eines Anticalin-basierten Tumor-Toxins.

Bei Dr. Michael Müller möchte ich mich für seine hilfreiche Einweisung in die Methode der SPOT-Peptidsynthese und andere Fragestellungen aus der organischen Chemie bedanken.

Weiterer Dank gilt Prof. Gabriele Multhoff und Stefan Stangl am Klinikum rechts der Isar für die fruchtbare projektbezogene Zusammenarbeit.

Unter all meinen Mitstreitern im Labor, bei denen ich mich allgemein für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken möchte, gilt meinen Laborkameraden Sebastian Kuhn und Ludwig Kirmair ganz besonderer Dank. Durch ihren Enthusiasmus für außergewöhnliche Freizeitaktivitäten wurde mein Horizont auch außerhalb der Wissenschaft erweitert. Sabine Rauth, Till Giese, Dominik Hinz, Antonia Richter und Uli Binder danke ich dafür, dass sie die Zeit am Lehrstuhl unvergesslich gemacht haben.

Bei Dipl.-Ing. (FH) Rico Stein bedanke ich mich für die beständige Motivationsarbeit sowie die großartigen Klettertouren in den Alpen und im Elbsandstein.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Anita und Volker bedanken. Sie waren mir durch ihren Glauben in meine Fähigkeiten und ihre Geborgenheit eine große Unterstützung in dieser Zeit.

Mein größter Dank gilt Maria für ihre Liebe und Kameradschaft.

## 10 Anhang

### Sequenzierung der V-Domänen des mAk cmHsp70.1

```

120 1 CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCCTGGTGGCACCCTCACAGACCTGCTCCATGTCACATGTCACAGAAATAGTGTACTACTGGTTCGCCAGCCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCACGTCGACTTCCTCAGTCTCAGTGGACCCACCGTGGAGTGTCTCGACAGGAAAGTACGTACAGACACCAAGAGTACAGGCTTTATCACAATGTGACCCCAAGCGGTGGGA
GlpValGlnLeuLysGlnSerGlyProGlyLeuValAlaProSerGlnSerLeuSerPheThrCysThrValSerGlyPheSerLeuSerArgAsnSerValHisTrpValArgGlnPro
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121 CAGGAAAGGGTCTGGAGTGGTGGGAATGATATGGGGTGGGAAGACACAGACTATAATTCAGCTCCTCAATCCAGACTGAACATCAGCAAGCACACTCCAGAGCCAGGTTTCCCTA 240
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCTTTCCACAGACTCACCGACCTTACTATACCCACACTTCGTGTGATATAAAGTCAGAGTTTAGTCTGACTTTAGTCTGACTTTAGTCTGCTCGAGGTTCTCGGTCCAAAAGGAT
ProGlyLysGlyLeuGluTrpLeuGlyMetIleTrpGlyGluValGlySerThrAspTyrAsnSerAlaLeuLysSerArgLeuAsnIleSerLysAspSerSerLysSerGlnValPheLeu
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
241 AAAATGAACAGCTGCAAACTGATGACACCCGCCATGTACTTCTGTGCCAGAAATGGGGTTACGACGCTTTTCATTACTGGGGCCAAAGGACCTGTGTCACCTGTCTGTCAGGCCAAAACG 360
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTACTTGTCCAGCGTTGACTGTGGCGGTACATGACACACGGTCTTTACCCCAATGCTGCAGAAAGTAAATGACCCCGGTTCCCTGAGACCCAGTGACAGAGACGTCGGTTTTGC
LysMetAsnSerLeuGlnThrAspAspThrAlaMetTyrPheCysAlaArgAsnGlyGlyTyrAspValPheHisTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThrValSerAlaAlaLysThr
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361 ACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTCTGCCAAATAACTCCATGCTGGATGCCCTGGGATGCTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCT 480
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTGGGGTAGACAGATAGGTGACCCGGGACCTAGACACGGGTTTGATGAGGTACCACTGGACCCCTACGGACCACTCCCGATAAAGGGACTCGGTCACTGCTACTGGACCTTGAGA
ThrProSerValTyrProLeuAlaProGlySerAlaAlaGlnThrAsnSerMetValThrLeuGlyCysLeuValLysGlyTyrPheProGluProValThrValThrTrpAsnSer
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
481 GGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACC 507
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTAGGGACAGGTCGCCACACACGTTGTGG
GlySerLeuSerSerGlyValHisThr

```

**Abbildung 10.1:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz der variablen Domäne der schweren Kette von cmHsp70.1. Teile der Aminosäuresequenz wurden mittels Edman-Sequenzierung (gelb) bzw. MS/MS-Sequenzierung (türkis) ermittelt. Da der Edman-Abbau erst nach Behandlung der Proteinprobe mit einer Pyroglutamyl-Aminopeptidase möglich war, konnte auf eine Pyroglutamat-Modifikation (Glp) am N-Terminus geschlossen werden. Der Teil der Basenabfolge, welcher bei der cDNA-Amplifizierung durch den verwendeten Primer vorgegeben wurde (und damit nicht die genomische Situation wiedergibt), ist umrahmt. Die CDRs sind unterstrichen und markiert.



**Tabelle 10-1:** <sup>89</sup>Zr-Biodistribution zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion (n. I.) der [<sup>89</sup>Zr-Dfo]-konjugierten Proteine extrapoliert aus PET-Bildern

Protein	Zeitpunkt n. I.	Maus	Tumor	Herz	Radioaktivität [% ID/ml]				
					Muskel	Niere	Leber	Speicheldrüse	
BBG10C/I- PAS200	6 h	#5	5,6 ± 0,9	7,4 ± 0,4	2,1 ± 0,3	89,9 ± 14,7	8,8 ± 0,5	4,4 ± 0,2	
		#6	5,8 ± 0,7	6,2 ± 0,4	1,9 ± 0,2	68,0 ± 11,4	7,8 ± 0,3	3,9 ± 0,2	
BBG10C/I- PAS200	24 h	#5	5,5 ± 0,7	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2	91,8 ± 14,8	9,3 ± 0,6	3,4 ± 0,3	
		#6	4,4 ± 0,7	1,5 ± 7,2	1,3 ± 0,1	57,1 ± 9,9	6,5 ± 0,7	2,3 ± 0,1	
BBG10C/I- PAS200	48 h	#5	3,3 ± 0,4	0,75 ± 0,04	1,3 ± 0,1	56,4 ± 9,7	6,4 ± 0,9	2,2 ± 0,2	
		#6	3,7 ± 0,6	0,71 ± 0,05	1,0 ± 0,1	29,4 ± 14,7	5,9 ± 0,7	2,2 ± 0,1	
wtLcn2- PAS200	24 h	#7	2,1 ± 0,4	0,54 ± 0,07	0,81 ± 0,09	108 ± 17	2,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	
		#8	1,8 ± 0,2	0,84 ± 0,04	0,88 ± 0,09	181 ± 31	3,3 ± 0,3	1,5 ± 0,1	