

Technische Universität München
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Design, Engineering und Charakterisierung von Anticalinen mit
Bindungsspezifität für das Alzheimer Amyloid-beta Peptid**

Sabine Rauth M.Sc.

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 20.01.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 17.04.2015 angenommen.

Allen, die an mich geglaubt haben

Danksagung

Zahlreiche Kollegen, Freunde und Verwandte haben durch stetige Unterstützung und den Glauben an mich großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Ihnen allen danke ich hier ganz herzlich.

Ganz besonders danken möchte ich Professor Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke ihm herzlich für seine Unterstützung mit der Stipendiumsbewerbung, für sein Interesse an meinem Projekt, für unzählige interessante Diskussionen, für seine hervorragenden Ideen und für sein Vertrauen in mich und meine Arbeit. Während meiner Zeit in Professor Skerra's Arbeitsgruppe habe ich sehr viel gelernt und mich dank seiner Hilfe und fachlichen Führung zu einem selbständigen, pflichtbewussten Wissenschaftler entwickelt.

Allen Kollegen am Lehrstuhl danke ich für ihre Unterstützung, wissenschaftlich und persönlich, aber vor allem für die gute Arbeitsatmosphäre und den tollen Teamgeist. Durch viele gemeinsame Stunden im Labor, geprägt von Frust und Freude, Verzweiflung und Hoffnung, sind zahlreiche enge Freundschaften entstanden.

Jedem meiner Kollegen sei hier herzlich gedankt, aber dennoch möchte ich einige individuell erwähnen. Andrea und Dominik danke ich ganz herzlich für die schöne Zeit im gemeinsamen Labor und für viele nette Gespräche. Dominik danke ich zudem für die hervorragende Zusammenarbeit am Alzheimer-Projekt, aber auch für das Live-Streaming diverser Sportveranstaltungen. Den anderen Kollegen des Alzheimer-Projekts, Andreas, Michael, Claudia und Uli, danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit. Andreas danke ich hierbei besonders für seine große Hilfe bei der Kristallisation und für das Lösen der Komplexstruktur. Meinen weiteren langjährigen Mitstreitern, Uli, Christian, Sven, Jan-Peter, Till, Sebastian, Lars, Michaela, danke ich für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Ganz besonders nah steht mir hierbei Uli, mit welchem ich schon das Studium bestritten habe. Till danke ich ganz herzlich für seine unerschöpfliche Gastfreundschaft, er hatte immer eine offene Tür für mich, wenn es im Labor zu lange wurde. Andre danke ich ganz herzlich für die vielen interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, für seine zahlreichen Tipps und für unsere sportliche Aktivität nach der Arbeit. Alex danke ich für seine unermüdliche Hilfe bei Fragen, er hatte immer ein offenes Ohr und dank Skype konnte so manches Problem gelöst werden. Martin und Klaus danke ich für die hervorragende Organisation des Lehrstuhls und für das ein oder andere nette Gespräch. Resi, Martina, Lisa, Claudia, Ina und Amber danke ich für viele nette Unterhaltungen. Und nicht zu vergessen Evi und Toni; vielen Dank für Eure Freundschaft und für die Organisation des besten Abschiedsgeschenks, das man sich nur vorstellen kann.

Der Pieris AG danke ich ganz herzlich für das ein oder andere Aliquot an Anticalin-Bibliotheken. Ganz besonders danken möchte ich Andrea für ihre unermüdliche Hilfe bei Biacore-Messungen und ihre Freundschaft. Außerdem danke ich Gabi und Martin, für viele interessante Diskussionen.

Meinen Freunden und Kollegen in Australien danke ich für die schöne Zeit bei CSIRO. Besonders danken möchte ich Peter Hudson für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu arbeiten, Stewart für die Aufnahme in sein Team und Olan für seine hervorragende Hilfe bei zahlreichen Biacore Messungen. Hus, Andrew, Julie, Michelle, Anja und Jette danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit und für ihre Freundschaft.

Der Schering Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung, ohne welche der Aufenthalt in Australien nicht möglich gewesen wäre.

Vincent, Markus und Irene danke ich für das kritische Lesen meiner Arbeit und für so manche nette Diskussion.

Meinen besten Freunden, Paula und Laiss, danke ich für ihre jahrelange Freundschaft, ihren Glauben an mich und für unzählige aufbauende Worte.

Ein riesiger Dank geht an meine Familie, ganz besonders an meine Eltern Helga und Michael und meine Oma Barbara. Sie haben mich immer unterstützt, haben immer an mich geglaubt und waren immer für mich da, wenn ich Hilfe benötigt habe.

Mein größter Dank geht an Ben, der mich in schwierigen Zeiten ertragen hat, unwahrscheinlich viel Geduld gezeigt hat und immer für mich da war. Ohne seine Hilfe und seine große Liebe hätte ich so manches Hindernis nicht überwunden. Danke, dass Du unsere Beziehung nicht aufgegeben hast!

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Therapeutische Anwendung von Antikörpern und von Proteinen mit alternativer Gerüststruktur	1
1.2	Anticaline: Künstliche Bindungsproteine auf Grundlage der Lipocalin-Architektur....	6
1.2.1	Die Proteinfamilie der Lipocaline.....	6
1.2.2	Die Anticalin-Technologie.....	8
1.2.3	Humane Lipocaline als Grundlage von Anticalin-Bibliotheken.....	10
1.2.3.1	Das humane Tränenlipocalin.....	10
1.2.3.2	Das humane Apolipoprotein D.....	11
1.2.3.3	Das humane Neutrophilen-Gelatinase-assoziierte Lipocalin	13
1.2.4	Hapten- und proteinspezifische Anticaline mit medizinischer Relevanz	14
1.3	Die Alzheimer-Krankheit: Ursachen und Therapieansätze	16
1.3.1	Die Rolle des Amyloid-beta Peptids	16
1.3.2	Ansätze zur therapeutischen Intervention	18
1.3.3	Immuntherapie	20
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Bakterienstämme.....	25
2.1.2	Bakteriophagen	25
2.1.3	Plasmide	25
2.1.4	Oligodesoxynukleotide	26
2.1.5	Peptide.....	27
2.1.6	Enzyme und sonstige Proteine	28
2.1.7	Chemikalien	29
2.1.8	Standards und Kits	33
2.1.9	Geräte	33
2.1.10	Sonstiges Material.....	36

2.1.11 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	38
2.2 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	44
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	45
2.2.2.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	45
2.2.2.2 Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter Zellen	46
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	46
2.2.3.1 Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab.....	47
2.2.3.2 Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab.....	47
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA und Oligodesoxynukleotiden	47
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.4.3 Reinigung von linearer, doppelsträngiger DNA aus Gelfragmenten.....	48
2.2.4.4 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden durch Polyacrylamid/Harnstoff- Gelelektrophorese	48
2.2.5 <i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	49
2.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	49
2.2.5.2 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.2.5.3 Dephosphorylierung von DNA.....	52
2.2.5.4 Ligierung von DNA-Fragmenten	53
2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....	53
2.3 Gentechnische Methoden	54
2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	54
2.3.1.1 Periplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben	55
2.3.1.2 Cytoplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben.....	56
2.3.1.3 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter	56
2.4 Phagemidpräsentation, -selektion und -screening	58
2.4.1 Propagation von Helferphagen	58
2.4.2 Präparation rekombinanter Phagemide.....	58

2.4.2.1	Produktion von Phagemidbibliotheken	59
2.4.2.2	Amplifizierung selektierter Phagemide	60
2.4.3	Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide	62
2.4.4	Titerbestimmung von Phagemidlösungen	65
2.4.5	Kolonie-Filterstapel-Test	65
2.4.6	Screening-ELISA	67
2.5	Proteinchemische Methoden	68
2.5.1	Chromatographische Verfahren	68
2.5.1.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose	68
2.5.1.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie	69
2.5.1.3	Größenausschlusschromatographie	70
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	71
2.5.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	72
2.5.4	Konzentrierung von Proteinen	73
2.5.5	Markierung von Proteinen mit Biotin oder Digoxigenin	73
2.5.6	Lösen und Vorbereiten von A β -Peptiden	74
2.6	Immunochemische Methoden	75
2.6.1	Western Blotting	75
2.6.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	76
2.6.3	Epitop-Mapping	79
2.7	Biophysikalische Methoden	80
2.7.1	CD-Spektroskopie	80
2.7.2	Fluoreszenzspektroskopische Analyse der chemischen Denaturierung mit Guanidiniumchlorid	84
2.7.3	Fluoreszenzanisotropie	87
2.7.4	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie	91
2.7.5	Thioflavin T-Aggregation Assay	93
2.8	Proteinkristallographische Methoden	94
2.8.1	Identifizierung von Kristallisationsbedingungen	94

2.8.2	Optimierung von Kristallisationsbedingungen.....	95
2.8.3	Sammlung von Röntgenbeugungsdaten, Datenauswertung und Strukturlösung	95
2.9	Computerprogramme und Datenbanken	95
3	Ergebnisse	97
3.1	Konstruktion und Herstellung unterschiedlicher A β -Zielmoleküle.....	97
3.1.1	A β -Peptide.....	98
3.1.2	Fusion von A β 40 mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP-A β 40)	100
3.1.3	Insertion von A β (1-28) in den „ <i>Active-Site Loop</i> “ von Thioredoxin (Trx-A β 28)	101
3.2	Design und Herstellung von Anticalin-Bibliotheken	104
3.2.1	Planung und Herstellung der ApoD-basierten Anticalin-Bibliothek.....	104
3.2.1.1	Löslichkeitsoptimierung von ApoD	104
3.2.1.2	Auswahl der in der Bibliothek zu randomisierenden Positionen.....	106
3.2.1.3	Herstellung der ApoD-Anticalin-Bibliothek	108
3.2.2	Beschreibung der verwendeten Lcn1'-Anticalin-Bibliothek	110
3.2.3	Beschreibung der verwendeten Lcn2'-Anticalin-Bibliothek	111
3.3	Selektion A β -bindender Lcn1'-Varianten	113
3.3.1	<i>Phage Display</i> -Selektion von Lcn1'-Varianten mit biotinylierten A β -Targets.....	113
3.3.2	Identifizierung von A β -spezifischen Lcn1'-Varianten im Kolonie-Filterstapel-Test und Sequenzanalyse.....	114
3.3.3	Produktion potentiell A β -spezifischer Lcn1'-Varianten und Analyse von Oligomerisierungsverhalten und Bindungseigenschaften	117
3.3.4	Funktionelle Charakterisierung der Variante Lcn1_3.3-23.....	121
3.3.4.1	Bestimmung der Affinität von Lcn1_3.3-23 im ELISA	121
3.3.4.2	Bestimmung der kinetischen Daten von Lcn1_3.3-23 mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie.....	123
3.3.4.3	Bestimmung der Affinität von Lcn1_3.3-23 mittels Fluoreszenzanisotropie... ..	126
3.3.5	Versuche zur Monomerisierung der Variante Lcn1_3.3-23.....	128
3.3.5.1	Rückführung der nativen Disulfidbrücke	128
3.3.5.2	Herstellung und Analyse chimärer Varianten basierend auf Lcn1_3.3-23.....	129
3.3.6	Physikochemische Untersuchungen von Lcn1_3.3-23 und dessen Varianten	132

3.3.6.1	Analyse der Sekundärstruktur von Lcn1_3.3-23 mittels CD-Spektroskopie...	132
3.3.6.2	Analyse der thermischen Stabilität von Lcn1_3.3-23 mittels CD-Spektroskopie.....	133
3.3.7	Protein-Engineering zur Stabilisierung von Lcn1 als Gerüst für die Selektion von Anticalinen.....	134
3.3.7.1	Rationale Planung, Expression und Reinigung der Lcn1*-Varianten.....	135
3.3.7.2	CD-Spektren der Lcn1*-Varianten	138
3.3.7.3	Stabilitätsanalyse mittels thermischer Denaturierung	139
3.3.7.4	Stabilitätsanalyse durch thermische Denaturierung in Gegenwart von Gdn•HCl.....	143
3.3.7.5	Stabilitätsanalyse mittels chemischer Denaturierung.....	147
3.4	Selektion A β -bindender ApoD-Varianten.....	150
3.4.1	<i>Phage Display</i> , Screening und Sequenzanalyse potentieller A β -spezifischer ApoD-Varianten.....	150
3.4.2	Produktion und Charakterisierung der ApoD-Varianten	156
3.5	Selektion A β -bindender Lcn2'-Varianten.....	159
3.5.1	<i>Phage Display</i> -Selektion mit Digoxigenin-markiertem Trx-A β 28	159
3.5.2	Identifizierung von Lcn2'-Varianten im Kolonie-Filterstapel-Test und Screening-ELISA	160
3.5.3	Produktion und Charakterisierung von potentiell A β -spezifischen Lcn2'-Varianten.....	164
3.5.4	Funktionelle Charakterisierung der A β -spezifischen Variante Lcn2_US7	167
3.5.4.1	Analyse der Bindung von A β -Targets mittels Größenausschlusschromatographie.....	167
3.5.4.2	Bestimmung der Affinität von Lcn2_US7 mittels ELISA	169
3.5.4.3	Bestimmung der Bindungskinetik von Lcn2_US7 mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie	172
3.5.4.4	Bestimmung des Epitops von Lcn2_US7 im SPOT Assay.....	173
3.5.4.5	Analyse der Inhibierung der A β 40-Aggregation im Thioflavin T Assay	175
3.5.5	Stabilitätsanalyse von Lcn2_US7 durch CD-Spektroskopie	176
3.6	Röntgenstrukturanalyse von Lcn2_US7 im Komplex mit A β 40	177

3.6.1	Kristallisation von Lcn2_US7 im Komplex mit A β 40.....	177
3.6.2	Vergleich der Tertiärstruktur von Lcn2_US7 mit dem natürlichen Lipocalin	179
3.6.3	Struktur des Komplexes aus Lcn2_US7 mit dem A β 40-Peptid.....	181
4	Diskussion	186
4.1	Selektion von A β -spezifischen Anticalinen durch <i>Phage Display</i>	186
4.1.1	<i>Phage Display</i> -Selektion – Design und Durchführung	186
4.1.2	Vor- und Nachteile der verwendeten Lipocalin-Gerüste.....	189
4.1.3	Dimerisierung von Lcn1-basierten Anticalinen – Einfluss der konservierten Disulfidbrücke	192
4.2	Engineering zur Verbesserung der Stabilität des Lcn1-Gerüsts.....	194
4.2.1	Theoretische Grundlagen zur Verbesserung der Thermostabilität des Lcn1	195
4.2.1.1	Knowledge-based Potentials.....	195
4.2.1.2	Stabilisierung durch Austausch von flexiblen Resten	196
4.2.1.3	Stabilisierung durch Einführung von Konsensusmotiven	197
4.2.2	Effekt der eingeführten Mutationen und Rolle der nativen Disulfidbrücke auf die Stabilität des Lcn1-Gerüsts.....	198
4.3	Die zentrale A β -Peptidregion als bevorzugtes Anticalin-Epitop.....	202
4.4	Lcn2_US7: hochaffine Bindung des A β -Peptids in der Bindungstasche	206
4.5	Therapeutisches Potential der A β -spezifischen Anticaline.....	209
5	Zusammenfassung.....	215
6	Summary	217
7	Abkürzungen	219
8	Literaturverzeichnis.....	223
9	Anhang	242

1 Einleitung

1.1 Therapeutische Anwendung von Antikörpern und von Proteinen mit alternativer Gerüststruktur

Seit einigen Jahrzehnten besteht in der modernen Arzneimittelforschung ein deutlicher Trend weg von traditionellen, niedermolekularen Substanzen in Richtung innovativer, biopharmazeutischer Wirkstoffe. Monoklonale Antikörper, Produkte der humoralen Immunantwort (Janeway *et al.*, 2004) und ein Paradigma universeller Bindungsproteine, dominieren das aufstrebende Gebiet der Biopharmazeutika mit fünf der meistverkauften Medikamente (Stand März 2014), mit mehr als 30 zugelassenen Präparaten sowie mehreren hundert unterschiedlichen Antikörpern in klinischen Studien (Beck *et al.*, 2010; Reichert, 2012; Walsh, 2010).

Im Vergleich zu niedermolekularen Arzneistoffen sind monoklonale Antikörper in präklinischen und klinischen Studien deutlich erfolgreicher (Reichert *et al.*, 2005), was sich vor allem in ihrer herausragenden Spezifität begründet. Mit Affinitäten im nanomolaren bis pikomolaren Bereich übertreffen Antikörper die meisten chemischen Arzneistoffe und zeichnen sich zusätzlich durch eine hohe therapeutische Wirksamkeit mit sehr guten Verträglichkeitsprofilen und dem seltenen Auftreten von schweren Nebenwirkungen aus. Die Fähigkeit zur Komplexierung einer Vielfalt an unterschiedlichen Molekülen - von Proteinen und Peptiden über Zucker bis hin zu kleinen chemischen Molekülen - in Kombination mit zahlreichen unterschiedlichen Wirkmechanismen ermöglichen den Einsatz von Antikörpern in einer Vielzahl von Indikationen und begründen die Hoffnung, mit Antikörpern bisher schlecht therapierbare Erkrankungen erfolgreich zu adressieren.

Neben der antagonistischen Blockierung von biomolekularen Wechselwirkungen, beispielsweise zwischen Wachstumsfaktoren und den entsprechenden Rezeptoren, können Antikörper die natürlichen immunologischen Effektorfunktionen ADCC (*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) und CDC (*Complement-Dependent Cytotoxicity*) induzieren und somit die aktive Krankheitsbekämpfung durch das körpereigene Immunsystem stimulieren (Clark, 1997). Zusätzlich zu diesen immunologischen Effektorfunktionen unterliegen Antikörper einem weiteren Fc-vermittelten Mechanismus, dem sogenannten endosomalen Recycling (Roopenian & Akilesh, 2007), welches zu deutlich verlängerten Plasma-Halbwertszeiten von bis zu 3 Wochen führt und die Dosierung der Antikörperpräparate in größeren Zeitintervallen ermöglicht.

Trotz des großen Erfolgs in Therapie und Diagnostik weisen Antikörper dennoch einige Nachteile auf (Chames *et al.*, 2009; Gebauer & Skerra, 2012). Der komplexe Aufbau von Antikörpern aus vier Polypeptidketten, zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten, mit zahlreichen inter- und intramolekularen Disulfidbrücken sowie

Glycosylierung im Effektorbereich erfordert die zeit- und kostenintensive Herstellung in eukaryotischen Expressionssystemen. Die große molare Masse limitiert zudem die Gewebepenetration, wodurch die Wirksamkeit insbesondere bei der Behandlung von soliden Tumoren deutlich reduziert wird (Beckman *et al.*, 2007). Weiterhin sind in einigen Anwendungen lange Plasma-Halbwertszeiten und Antikörper-vermittelte Effektorfunktionen, welche unerwünschte immunologische Nebenreaktionen induzieren können, von Nachteil. Letztendlich prägt eine komplizierte patentrechtliche Situation das Gebiet der Antikörper und Antikörperfragmente, was ihren kommerziellen Nutzen deutlich einschränkt (Storz, 2010).

Die dargestellten Nachteile monoklonaler Antikörper in Kombination mit Fortschritten in der Generierung von hochkomplexen, kombinatorischen Proteinbibliotheken und deren Durchmusterung mit Hilfe effizienter Selektions- und Screeningmethoden führten in den letzten 10 bis 15 Jahren zur Entwicklung einer neuen Generation an Antigen-bindenden Proteinen. Diese neuartigen Bindungsproteine leiten sich nicht mehr von klassischen Antikörpern ab, sondern sie basieren auf einer wachsenden Zahl alternativer Gerüstproteine, sogenannter „Scaffolds“ (Skerra, 2001; 2003; Gebauer & Skerra, 2009). Von mehr als 50 unterschiedlichen Gerüstproteinen, welche als alternative Bindungsproteine vorgeschlagen wurden, waren bisher allerdings bloß wenige in präklinischen und klinischen Studien nachhaltig erfolgreich (Abbildung 1).

Alle alternativen Bindungsproteine basieren auf ähnlichen Prinzipien, wobei ein in den meisten Fällen natürlich vorkommendes, vorzugsweise kleines und stabiles Protein als Gerüst gewählt und zur Herstellung einer kombinatorischen Bibliothek mit genetischer Variabilität an oberflächenexponierten Positionen verwendet wird (Gebauer & Skerra, 2009; Nygren & Skerra, 2004). Hierbei können generell drei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden:

- die Präsentation und Randomisierung von konformationell flexiblen Schleifenregionen auf einem starren Gerüst, vergleichbar mit den CDRs (*Complementary Determining Regions*) von Antikörpern,
- die Randomisierung bzw. Transplantation einer einzelnen Peptidschleife mit variabler Sequenz und Länge bzw. mit bereits vorhandener Bindungsaktivität,
- die Einführung von Variabilität durch Aminosäureaustausche in Bereichen rigider Sekundärstruktur.

Diese Proteinbibliotheken werden dann in einem zweiten Schritt unter Verwendung unterschiedlicher Selektionsmethoden, wie beispielsweise *Phage Display* (Paschke, 2006), *Ribosome Display* (Plückthun, 2012) oder *Bacterial Surface Display* (Löfblom, 2011), zur Identifizierung von Varianten mit neuartigen Bindungsspezifitäten eingesetzt.

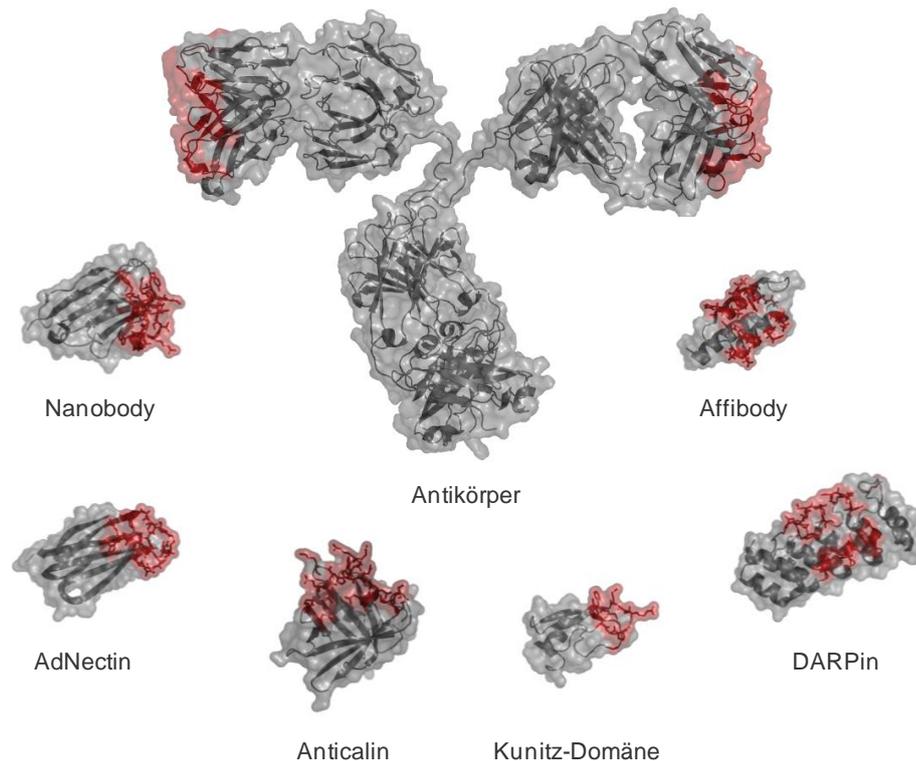


Abbildung 1: Strukturelle Darstellung alternativer Bindungsproteine im Größenvergleich mit einem kompletten Antikörper. Alle alternativen Bindungsproteine sind mit molekularen Massen im Bereich von 6 bis 25 kDa deutlich kleiner und basieren auf unterschiedlichen strukturellen Motiven. Nanobodies und AdNectine besitzen eine Immunglobulin-ähnliche β -Sandwich-Struktur, Anticaline dagegen eine β -Fass-Struktur. Kunitz-Domänen nutzen eine exponierte randomisierte Peptidschleife, DARPins entsprechen Konsensusvarianten der Ankyrin-Repeat-Proteine, und Affibodies leiten sich von der Z-Domäne des bakteriellen Protein A ab. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Arne Skerra)

Alternative Bindungsproteine besitzen im Vergleich zu intakten Antikörpern wichtige Vorteile (Binz *et al.*, 2005; Gebauer & Skerra, 2009). Die geringe Größe und der monomere Aufbau aus nur einer Polypeptidkette ermöglichen die einfache genetische Manipulation sowie die Herstellung in einfach handhabbaren bakteriellen Expressionssystemen. Durch genetische Kopplung können Bindungsproteine mit unterschiedlichen Spezifitäten in einem Molekül kombiniert und so bispezifische Fusionsproteine mit neuen Funktionen und verbesserter Wirksamkeit hergestellt werden. Durch die simultane Blockierung von unterschiedlichen Wachstumsfaktorrezeptoren, durch die Rekrutierung von Effektorzellen oder auch durch den zielgerichteten Transport von Toxinen oder Radionukliden können solche Proteine u.a. der effizienteren Bekämpfung von Tumoren dienen (Löfblom *et al.*, 2011). Die geringe Größe und die hohe Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen machen zudem patientenfreundliche, alternative Darreichungsformen, z.B. inhalativ oder gar in Tablettenform, möglich (Harmsen *et al.*, 2006).

Der in einigen Fällen nicht humane Ursprung der eingesetzten Gerüstproteine und die damit verbundene, erhöhte Immunogenität sowie Einschränkungen bezüglich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik stellen dagegen die größten Nachteile zumindest für einige Vertreter dieser neuartigen Klasse an therapeutischen Proteinen dar (Beck *et al.*, 2010).

Nanobodies: Bei den Nanobodies handelt es sich um eine besondere Klasse von Immunglobulin (Ig)-Domänen, die in Kameliden und Knorpelfischen natürlich vorkommen und aus zwei identischen schweren Ketten allerdings ohne assoziierte leichte Ketten aufgebaut sind (Muyltermans *et al.*, 2009; Streltsov *et al.*, 2004). Die N-terminalen variablen Domäne VHH (*Variable Heavy Chain of a Heavy Chain Antibody*) dienen der Antigenerkennung und unterscheiden sich in einigen Aspekten von konventionellen variablen V_H (*Variable Heavy*)-Domänen der Antikörper. Sie besitzen beispielsweise ungewöhnlich lange CDR3-Segmente, die in Spalten und Vertiefungen des Antigens eindringen und somit Epitope binden können, welche für normale Antikörper nicht zugänglich sind. Ein weiterer Unterschied ist die Abwesenheit von exponierten hydrophoben Aminosäuren, welche in Antikörpern zur Assoziation im V_H/V_L (*Variable Light*)-Interface beitragen und in Abwesenheit der leichten Kette zur Aggregation führen. Aufgrund der reduzierten Hydrophobie können VHH-Domänen in löslicher, monomerer Form im bakteriellen Periplasma exprimiert werden. Zur Isolierung von Varianten mit gewünschten Spezifitäten können sowohl naive, synthetische als auch Genbibliotheken aus immunisierten Tieren eingesetzt werden. Neben der Verwendung in Biosensoren werden Nanobodies derzeit in klinischen Studien zur molekularen Bildgebung bzw. zur Therapie von Krankheiten validiert (www.ablynx.com).

AdNectine: AdNectine (Monobodies) leiten sich von der zehnten extrazellulären Domäne des humanen Fibronectins (¹⁰F_n3) ab und besitzen eine Ig-ähnliche β-Sandwich-Struktur mit drei exponierten Schleifensegmenten, entsprechend den drei CDRs von variablen Antikörperdomänen (Koide & Koide, 2007; Lipovsek, 2010). Im Vergleich zu Antikörperfragmenten zeichnen sich AdNectine durch die Abwesenheit von Disulfidbrücken und die hohe Stabilität des Wildtyp-Proteins aus. Synthetische Bibliotheken mit genetischer Variabilität in zwei bzw. drei Schleifensegmenten wurden hergestellt und erfolgreich für die Selektion von Bindungsproteinen mit bis zu pikomolaren Affinitäten verwendet. CT-322, ein AdNectin mit Spezifität für den VEGF-Rezeptor 2, ist die in hinsichtlich der klinischen Prüfung am weitesten fortgeschrittene modifizierte F_n3-Domäne und befindet sich in Phase II u.a. zur Behandlung des Glioblastoms (Lipovsek, 2010).

Anticaline: Im Gegensatz zu Nano- und Monobodies weisen Anticaline, die von der Familie der Lipocaline abgeleitet sind, zwar keine strukturelle Homologie zur Immunglobulin-Superfamilie auf, sie unterliegen aber dennoch einem ähnlichen Prinzip. Auch hier dient ein strukturell konserviertes Gerüst, das für Lipocaline charakteristische β-Fass (β-Barrel), als Basis für vier hypervariable Peptidschleifen, welche zum Herstellen einer Zufallsbibliothek

randomisiert werden (Skerra, 2008). Da Anticaline im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, werden die Proteinfamilie der Lipocaline und die damit verbundene Anticalin-Technologie im folgenden Kapitel im Detail behandelt.

Kunitz-Domänen: Kunitz-Domänen sind kleine natürlich vorkommende Inhibitoren von Serin-Proteasen. Sie zeichnen sich durch eine charakteristische Peptidschleife aus, die in einer Substrat-ähnlichen Weise an das aktive Zentrum von Proteasen bindet und diese so hemmt (Scott & Taggart, 2010). Durch Randomisierung dieses Loops können optimierte Proteaseinhibitoren mit verbesserter Wirksamkeit bzw. neuer Spezifität generiert werden. Der Kallikrein-Inhibitor Ecallantide (Kalbitor, DX-88) ist in diesem Zusammenhang das erste zur therapeutischen Behandlung des Menschen zugelassene engineerete Gerüstprotein und wird in den USA zur Behandlung des hereditären Angioödems eingesetzt (Martello *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zu randomisierten Peptidschleifen beruhen Affibody- und DARPin-Moleküle auf der Einführung von Variabilität in exponierten Positionen einer stabilen, regelmäßigen Sekundärstruktur. Dieser Ansatz unterscheidet sich deutlich vom Konzept der hypervariablen Peptidschleifen und führt zur Generierung einer eher planaren, starren Bindungsoberfläche mit geringerem strukturellem Spielraum.

Affibodies: Diese Moleküle leiten sich von der engineereten Z-Domäne des IgG-bindenden Protein A aus *Staphylococcus aureus* ab (Löfblom *et al.*, 2010). Dieses besitzt eine charakteristische Dreihelixbündel-Struktur, wobei die beiden N-terminalen Helices 1 und 2 für die Interaktion mit dem Fc-Teil von IgG-Molekülen verantwortlich sind. Zur Generierung einer Affibody-Bibliothek werden in der Regel 13 exponierte Positionen dieser beiden Helices randomisiert. Vorteile der Affibodies sind ihre besonders geringe Größe mit weniger als 60 Aminosäuren und die Abwesenheit von Disulfidbrücken, was die Expression im bakteriellen Cytoplasma in hohen Ausbeuten ermöglicht. Aufgrund der geringen Anzahl von Aminosäureresten ist zudem die Herstellung durch Festphasen-Peptidsynthese möglich, wodurch die ortsgerichtete Modifizierung mit nicht-natürlichen funktionellen Gruppen im Prinzip vereinfacht wird. Aufgrund ihres bakteriellen Ursprungs tragen Affibodies allerdings ein hohes Risiko für immunologische Reaktionen im Patienten, was das therapeutische Potential dieser Moleküle deutlich einschränkt und den Versuch zur Deimmunisierung dieser Moleküle unterstützt. Trotz dieses Risikos befinden sich einige Affibody-Varianten in klinischen Studien zum Tumor-Imaging bzw. in Kombination mit Radionukliden oder Toxinen zur therapeutischen Behandlung. Zusätzliche Anwendung finden Affibodies *in vitro*, beispielsweise als Detektionsreagenzien in Bioassays oder gekoppelt an Säulenmaterialien zur Affinitätsreinigung.

DARPins: Diese Moleküle basieren auf Ankyrin-Repeat-Proteinen und wurden auf der Grundlage einer Konsensusstrategie konstruiert (Stumpp *et al.*, 2008). Sie besitzen einen modularen Aufbau aus zwei bis vier Repeat-Domänen, die jeweils aus 33 Aminosäuren

bestehen und ein charakteristisches Motiv aus einem β -Turn und zwei antiparallelen α -Helices aufweisen. Der hydrophobe Kern dieser Repeat-Einheiten wird dabei N- und C-terminal durch endständige Module abgeschirmt. Durch Variation von 7 exponierten Positionen je Repeat-Einheit werden DARPin-Bibliotheken generiert, die anschließend zur Identifizierung von Target-spezifischen Varianten im Ribosome Display eingesetzt werden. Aufgrund des Konsensus-Designs besitzen isolierte Varianten in der Regel günstige proteinchemische Eigenschaften, wie hohe Ausbeuten nach bakterieller Expression, gute Stabilität gegenüber thermischer und chemischer Denaturierung und hohe Löslichkeit. Wie die anderen hier beschriebenen alternativen Bindungsproteine befinden sich auch DARPins in klinischen Studien: mit einer VEGF-spezifischen Variante zur lokalen Behandlung von Augenkrankheiten (Tamaskovic *et al.*, 2012) und mit einem bispezifischen Molekül mit Bindungsaktivität sowohl für VEGF als auch für HGF zur Behandlung von soliden Tumoren (www.molecularpartners.com).

1.2 Anticaline: Künstliche Bindungsproteine auf Grundlage der Lipocalin-Architektur

1.2.1 Die Proteinfamilie der Lipocaline

Lipocaline bilden eine Familie weit verbreiteter, funktionell diverser, kleiner sekretorischer Proteine von 160 bis 180 Aminosäuren, welche sich trotz niedriger Sequenzhomologie durch eine hoch konservierte Tertiärstruktur auszeichnen (Flower, 1996; Flower *et al.*, 2000; Skerra, 2000). Basierend auf dieser Struktur beschreibt ihr Name Lipocalin, von gr. *Lipos* = Fett und *calyx* = Kelch (Pervaiz & Brew, 1987), die offensichtlichste Eigenschaft dieser Proteinklasse, nämlich die Bindung von lipophilen Molekülen in einer kelchförmigen Bindungstasche (Abbildung 2).

Lipocaline treten in einer Vielzahl von Organismen auf: in Bakterien (Bishop, 2000), in Pflanzen (Hieber *et al.*, 2000) und mit mindestens 12 unterschiedlichen Vertretern auch in Menschen (Breustedt *et al.*, 2006). Hier spielen sie durch Komplexierung diverser niedermolekularer Liganden, darunter Vitamine und Hormone, eine Rolle bei unterschiedlichen physiologischen Mechanismen. Sie dienen dabei nicht nur der Speicherung und dem Transport von schlecht wasserlöslichen oder chemisch empfindlichen Substanzen, wie dem Vitamin A im Retinol-Bindungsprotein (Newcomer & Ong, 2000), sondern wirken darüber hinaus als bakteriostatische Agenzien (Goetz *et al.*, 2002) und sind an der Regulation von Zellwachstum und Stoffwechsel (Breustedt *et al.*, 2006), an der Immunantwort (Logdberg & Wester, 2000; Meining & Skerra, 2012), an der enzymatischen Synthese von Prostaglandin D₂ (Urade & Hayaishi, 2000) und an der olfaktorischen Sensorik (Briand *et al.*, 2002) beteiligt.

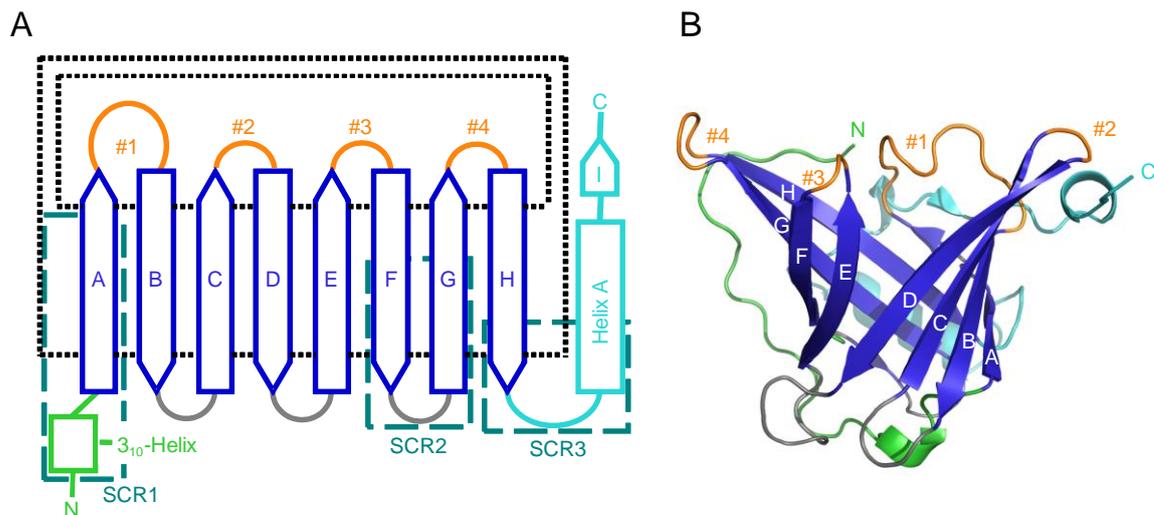


Abbildung 2: (A) Aufbau und Tertiärstruktur eines typischen Lipocalins. Die charakteristischen Merkmale der Lipocalin-Faltung sind anhand einer entlang der Achse des β -Barrels entwundenen Struktur dargestellt. Die acht antiparallelen Stränge des β -Barrels sind als blaue Pfeile dargestellt und mit A bis H bezeichnet. Punkte kennzeichnen den Bereich der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Strängen. Die vier Peptidschleifen (orange), die den Eingang zur Bindungstasche bilden, sind mit #1 bis #4 markiert. Die N-terminale 3_{10} -Helix (grün), die C-terminale α -Helix A (türkis) sowie der nachfolgende einzelne β -Strang I (türkis) sind ebenfalls markiert. Die drei SCRs (*Structurally Conserved Regions*), anhand derer eine eindeutige Zuordnung zur Familie der Lipocaline möglich ist, sind als gestrichelte Boxen markiert. (B) Die Kristallstruktur des prototypischen Bilin-Bindungsproteins (PDB: 1BBP; Huber *et al.*, 1987) veranschaulicht die einzelnen Strukturelemente. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Andrea Holla; in Anlehnung an (Flower *et al.*, 2000))

Das zentrale Faltungsmotiv der Lipocalin-Familie ist ein strukturell konserviertes β -Barrel aus acht antiparallelen β -Strängen (A bis H), welche sich in einer $(+1)_7$ -Topologie um eine zentrale Achse winden (Abbildung 2). An einem Ende ist die Fass-Struktur durch kurze Peptidschleifen sowie zahlreiche dicht gepackte hydrophobe Aminosäureseitenketten verschlossen. Die gegenüberliegende Seite ist dagegen zum Lösungsmittel geöffnet und bildet den Eingang zur Liganden-Bindungstasche, welche durch paarweise Verknüpfung der β -Stränge A/B, C/D, E/F, G/H durch vier strukturell variable Peptidschleifen (Loop #1 bis #4) geformt wird. Loop #1, der die beiden N-terminalen β -Faltblattstränge A und B verbindet und sich in einigen Varianten als eine Art Deckel über die Öffnung des β -Barrels erstreckt (Böcskei *et al.*, 1992), zeichnet sich durch eine überdurchschnittliche Länge und ausgedehnte Ω -Typ Konformation aus. Weitere typische Strukturmerkmale sind eine kurze 3_{10} -Helix am N-Terminus, eine C-terminale α -Helix gefolgt von einem kurzen β -Strang I sowie eine konservierte Disulfidbrücke, die den C-Terminus der Lipocaline mit dem β -Fass verbindet (Abbildung 2; Flower *et al.*, 2000; Skerra, 2000).

Trotz der stark konservierten Tertiärstruktur besitzen die einzelnen Vertreter der Lipocalin-Familie eine ungewöhnlich niedrige Sequenzhomologie, wobei paarweise Sequenzidentitäten häufig unter 20 % liegen (Cowan *et al.*, 1990). Dennoch finden sich bei einer Gruppe, den sogenannten *Kernel* Lipocalinen, drei kurze konservierte Sequenzmotive, anhand derer eine eindeutige Zuordnung zur Lipocalin-Familie möglich ist. Diese Motive entsprechen den drei wichtigsten strukturell konservierten Regionen (*Structurally Conserved Regions*, SCR) der Lipocaline und zeichnen sich durch eine überdurchschnittliche Ähnlichkeit in der Primärsequenz aus. Varianten mit nur einem oder zwei dieser Motive werden in die Gruppe der *Outlier* Lipocaline eingeordnet (Flower, 1996). Das erste und wichtigste Motiv, das in allen Lipocalinen unabhängig von ihrer Zuordnung zum *Kernel* oder *Outlier* Typ vorkommt, umfasst die N-terminale 3_{10} -Helix und den angrenzenden β -Strang A, insbesondere das hochkonservierte, N-terminale „Gly-Xaa-Trp“-Motiv in diesem Bereich. Die beiden anderen SCRs schließen die β -Stränge F und G inklusive der verknüpfenden Peptidschleife F/G an der Unterseite des β -Fasses bzw. den β -Strang H inklusive dem Beginn der C-terminalen α -Helix ein (Abbildung 2).

1.2.2 Die Anticalin-Technologie

Die große Variabilität in der Primärsequenz sowie Länge und Konformation der Schleifen-segmente am offenen Ende des β -Fasses führt zu deutlichen Unterschieden in Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit der Lipocalin-Bindungstaschen und ermöglicht somit die Komplexierung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Liganden. Mit diesem Strukturprinzip, der Präsentation von hypervariablen Peptidschleifen auf einem konservierten, stabilen Proteingerüst, zeigen Lipocaline grundsätzliche Ähnlichkeit zu den variablen Domänen der Immunglobuline. Entsprechend ist es möglich, durch Austausch von Aminosäuren in den Schleifenbereichen und im oberen Bereich der Kavität künstliche Lipocaline, sogenannte Anticaline, mit spezifischen, neuartigen Bindungseigenschaften zu generieren (Skerra, 2001).

Im Gegensatz zur Vielzahl der natürlich vorkommenden Antikörper, welche stetig neu gebildet und bezüglich ihrer Spezifität und Affinität maturiert werden, besitzen Organismen allerdings nur eine begrenzte Anzahl an Lipocalinen, welche im Verlauf der Evolution für spezifische Funktionen optimiert wurden und nicht den Mechanismen der natürlichen Immunantwort, der genetischen Rekombination und der somatischen Hypermutation, unterliegen. Dennoch können durch Methoden des kombinatorischen Protein-Designs, d.h. durch Herstellung von hochkomplexen Proteinbibliotheken mittels ortsgerichteter Zufallsmutagenese in Kombination mit effizienten Selektionsmethoden, Anticaline mit gewünschten Bindungsspezifitäten generiert werden (Beste *et al.*, 1999).

Für das *Proof-of-Principle* wurde in den ersten Studien das strukturell und biochemisch gut charakterisierte Bilin-Bindungsprotein (BBP) aus *Pieris brassicae* (Huber *et al.*, 1987)

verwendet, um Anticaline mit Spezifität für kleine Haptene wie Fluorescein und Digoxigenin zu generieren. Hierbei wurde gezeigt, dass das Lipocalin-Gerüst den Austausch einer großen Zahl an Aminosäuren im Bereich der Bindungstasche toleriert und so die Generierung von neuartigen Bindungsspezifitäten ermöglicht. Die Analyse der Kristallstrukturen zeigte, dass die β -Fass-Struktur ohne signifikante Änderungen erhalten geblieben war, während in den Schleifensegmenten drastische konformationelle Unterschiede auftraten (Körndorfer *et al.*, 2003a; 2003b). Die große Ähnlichkeit zwischen Antikörper/Hapten- und Anticalin/Hapten-Komplexen in Bezug auf Affinität sowie Bindungsmechanismus bestätigt das grundlegende Konzept und das große Potential der Anticalin-Technologie (Skerra, 2001).

In Hinblick auf therapeutische Anwendungen wurden nachfolgende Anticalin-Bibliotheken zur Minimierung immunologischer Nebenwirkungen ausgehend von humanen Lipocalinen hergestellt. Zusätzlich wurden vermehrt medizinisch relevante Proteine, wie z.B. extrazelluläre Rezeptordomänen oder Wachstumsfaktoren, als „Antigene“ eingesetzt und somit vielversprechende, therapeutische Anticalin-Kandidaten mit bis zu pikomolaren Affinitäten generiert (s. Abschnitt 1.2.4).

Neben den typischen Vorteilen alternativer Bindungsproteine (s. Abschnitt 1.1), wie geringe Größe, einfache genetische Manipulation und kostengünstige Herstellung in bakteriellen Expressionssystemen, besitzen Anticaline weitere Vorteile, die sie von anderen alternativen Bindungsproteinen differenzieren. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass Anticaline durch die Kombination einer tiefen Bindungstasche mit angrenzenden hypervariablen Peptidschleifen fähig sind sowohl kleine Haptene als auch makromolekulare Proteinliganden zu komplexieren. Neben den für alternative Bindungsproteine üblichen Anwendungen, wie der Neutralisation, Inhibition bzw. Markierung von krankheitsrelevanten Proteinen können Anticaline somit zusätzlich zur Eliminierung kleiner, toxischer Moleküle eingesetzt werden (Eyer *et al.*, 2012).

Trotz der geringeren Zahl von nur 4 hypervariablen Peptidschleifen besitzen Anticaline Bindungsstellen, die flächenmäßig den aus 6 CDRs bestehenden Paratopen von Immunglobulinen vergleichbar und somit deutlich größer sind als Bindungsoberflächen von isolierten Antikörperdomänen (*Domain Antibodies, Nanobodies*). Zudem sind die Peptidschleifen überaus flexibel und können sich ähnlich wie bei den Immunglobulinen durch *Induced Fit* an die Struktur des jeweiligen Antigens anpassen (Schönfeld *et al.*, 2009). Bindungsproteine, die auf einer starren Sekundärstruktur beruhen, weisen dagegen eine niedrigere strukturelle Plastizität auf, was ein eingeschränktes Ligandenspektrum mit sich bringt. Zusätzlich treten humane Lipocaline in hohen Konzentrationen von bis zu 1 mg/ml im humanen Plasma und anderen Körperflüssigkeiten auf (Fournier *et al.*, 2000), was deren Immunogenität verhindert und so die Risiken bei einer therapeutischen Anwendung deutlich reduziert.

1.2.3 Humane Lipocaline als Grundlage von Anticalin-Bibliotheken

Nachdem das Konzept der Anticalin-Technologie am Insekten-Lipocalin BBP erfolgreich demonstriert worden war, wurden Anticalin-Bibliotheken der nächsten Generation ausgehend von humanen Lipocalinen, dem Tränenlipocalin (s. Abschnitt 1.2.3.1), dem Apolipoprotein D (s. Abschnitt 1.2.3.2) und dem Neutrophilen-Gelatinase-assoziierten Lipocalin (s. Abschnitt 1.2.3.3), entwickelt.

1.2.3.1 Das humane Tränenlipocalin

Das humane Tränenlipocalin (Tlc), auch von Ebner's Gland Protein oder Lcn1 genannt, wird von menschlichen Tränendrüsen sekretiert und stellt mit einem Anteil von 15 bis 33 % nach Lysozym das zweithäufigste Protein der menschlichen Tränenflüssigkeit dar (Redl, 2000). Zusätzlich wird Lcn1 in zahlreichen anderen Geweben und Organen produziert, beispielsweise von sekretorischen Drüsen der Zunge, der Nasenschleimhaut wie auch des Tracheobronchialtraktes, von Brust- und Schweißdrüsen, in der Nebenniere, der Prostata, dem Thymus und der Hypophyse (Fattori *et al.*, 1998; Lacazette *et al.*, 2000; Redl, 2000; Wojnar *et al.*, 2002).

Im Vergleich zu anderen Lipocalinen bindet Lcn1 ein ungewöhnlich großes Spektrum an lipophilen Liganden unterschiedlicher chemischer Klassen, von Molekülen mit langen Alkylresten, über Moleküle mit geladenen Gruppen bis hin zu polyzyklischen Verbindungen. So können beispielsweise Fettsäuren und Alkylalkohole, Phospho- und Glycolipide sowie deren Peroxidationsprodukte, Cholesterin, Retinol, Retinolsäure und Arachidonsäure gebunden werden (Glasgow *et al.*, 1995; Redl, 2000; Lechner *et al.*, 2001). Durch Komplexierung dieser Liganden fungiert Lcn1 als der wichtigste Lipidtransporter in der humanen Tränenflüssigkeit, sorgt für die Aufrechterhaltung der Integrität des Tränenfilms, verhindert das Austrocknen, entfernt schädliche lipidartige Substanzen und übt somit eine generelle Schutzfunktion aus (Redl, 2000).

Neben Lipiden komplexiert Lcn1 zusätzlich Eisensiderophore aus Bakterien und Pilzen und wirkt auf diese Weise antibakteriell und fungizid. Auch hier ist das Ligandenspektrum größer als bei anderen Lipocalinen (Fluckinger *et al.*, 2004). Darüber wurden für Lcn1 noch zwei weitere Funktionen beschrieben, welche für die Familie der Lipocaline allerdings eher untypisch sind. Es fungiert möglicherweise als Enzym, als unspezifische Endonuklease (Yusifov *et al.*, 2008), wie auch als Enzyminhibitor, durch *in vitro* Inhibition der Cysteinprotease Papain (van't Hof *et al.*, 1997).

Obwohl in Lcn1 eines der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen SCR-Motive fehlt und es daher zunächst in die Gruppe der *Outlier* Lipocaline eingestuft worden war, zeigt die Kristallstruktur dieses Proteins (Breustedt *et al.*, 2009; 2005) dennoch alle typischen Merkmale der Lipocalin-Architektur. In der *apo*-Struktur des Lcn1 (PDB: 1XKI; Breustedt *et al.*, 2005) sind

die Peptidschleifen an der offenen Seite des β -Barrels, insbesondere Loop #1, ungewöhnlich lang und in der Elektronendichte teilweise nicht sichtbar. Zusätzlich ist die Bindungstasche des Lcn1, welches mit 158 Aminosäuren eines der kleinsten Mitglieder der Lipocalin-Familie darstellt, mit einem Durchmesser von 10 Å und einer Tiefe von 15 Å ausgesprochen voluminös.

Interessanterweise weist eine neuere Kristallstruktur (PDB: 3EYC; Breustedt *et al.*, 2009), in welcher das zur Kristallisation eingesetzte 1,4-Butandiol als Ligand in der Bindungstasche komplexiert ist, deutliche Unterschiede zur *apo*-Struktur auf. Durch Zunahme des β -Faltblatt-Anteils im Eingangsbereich der Bindungstasche kommt es hierbei zu einer deutlichen Umorientierung der β -Stränge, insbesondere der Stränge B, C und D, und damit zu einer Konformationsänderung in den Schleifenbereichen #1 und #2. Die hohe konformationelle Plastizität des Lcn1 im Eingangsbereich der Kavität und im Inneren des β -Barrels, die Fähigkeit, sich über einen sogenannten *Induced Fit*-Mechanismus zusätzlich strukturell an den jeweiligen Liganden anzupassen, und die überdurchschnittlich voluminöse Bindungstasche erklären das breite Liganden-Spektrum dieses Lipocalins und machen es zu einem vielversprechenden Kandidaten zur Generierung von Anticalinen mit neuartigen Bindungsspezifitäten.

1.2.3.2 Das humane Apolipoprotein D

Apolipoprotein D (ApoD; Rassart *et al.*, 2000) ist ein sekretorisches Glycoprotein aus der Familie der Lipocaline, das zuerst aus humanem Plasma isoliert worden ist (McConathy & Alaupovic, 1973). Dort tritt es, über eine Disulfidbrücke kovalent mit ApoA-II verknüpft, als Bestandteil des *High Density Lipoprotein* (HDL) auf, weswegen es ursprünglich in die Gruppe der Apolipoproteine eingeordnet wurde. Allerdings stellt ApoD einen atypischen Vertreter dieser Gruppe dar, da es sich in wichtigen Punkten, wie beispielsweise dem Fehlen der amphiphilen Helices, von klassischen Apolipoproteinen unterscheidet (Perdomo & Henry Dong, 2009).

Die hohe Konservierung von ApoD in Säugetieren und das Auftreten von eng verwandten Proteinen in Pflanzen, Insekten und Bakterien deuten auf eine wichtige biologische Rolle dieses Lipocalins hin (Muffat *et al.*, 2008). ApoD wird im menschlichen Körper in zahlreichen Organen exprimiert, wobei die höchsten Konzentrationen in Niere und Nebenniere auftreten. Zudem wird ApoD in signifikanten Konzentrationen u.a. im Pankreas, in der Milz, der Lunge, der Plazenta, der Leber, dem Dünndarm, dem zentralen und peripheren Nervengewebe sowie der Zerebrospinalflüssigkeit detektiert (Borghini *et al.*, 1995; Drayna *et al.*, 1986; Rassart *et al.*, 2000). Zu den physiologischen Liganden von ApoD zählen Cholesterin, Progesteron, Pregnenolon und Arachidonsäure. Die Funktionen von ApoD sind hierbei jeweils gewebe- und ligandenspezifisch.

ApoD ist u.a. in diversen, meist steroidabhängigen Krebserkrankungen überexprimiert und dient dort als prognostischer Biomarker (Van Dijk *et al.*, 2006). Eine weitere wichtige Rolle spielt ApoD im peripheren und zentralen Nervensystem (ZNS), wo es bevorzugt von endoneuronalen Fibroblasten bzw. Astrozyten und Oligodendrozyten der weißen Substanz produziert wird und der allgemeinen Gewebeintegrität dient (Rassart *et al.*, 2000). Die verstärkte Expression von ApoD im peripheren Nervensystem nach Verletzungen deutet auf dessen Beteiligung im Verlauf der neuronalen Regenerierung hin, in welcher es möglicherweise als Lipidtransporter fungiert und die Verfügbarkeit von Membranbestandteilen wie Cholesterin und anderen Lipiden sicherstellt. Zudem kommt es im ZNS im Verlauf des allgemeinen Alterungsprozesses bzw. unter neuropathologischen Bedingungen, wie Schizophrenie, Alzheimer oder Parkinson, zu einer Überexpression von ApoD (Ordonez *et al.*, 2006; Terrisse *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2001; 2003). Die genaue Funktion von ApoD unter diesen pathologischen Bedingungen ist nicht geklärt, allerdings weisen zahlreiche Studien auf eine antioxidative Wirkung dieses Lipocalins, insbesondere bei der Lipidperoxidation, hin (Ganforina *et al.*, 2008; Muffat *et al.*, 2008). Diese antioxidative Funktion erklärt möglicherweise auch die Anreicherung von ApoD in amyloiden Plaques (Desai *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2003), wo die A β 42-Peptide die Produktion von Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid (Butterfield, 2002) und letztlich die Lipidperoxidation induzieren (Ando *et al.*, 1998).

Die Kristallstruktur des ApoD (PDB: 2HZQ; Eichinger *et al.*, 2007) bestätigt dessen Zugehörigkeit zur Lipocalin-Familie und weist die beschriebenen charakteristischen Strukturmerkmale auf (s. Abschnitt 1.2.1). Im Gegensatz zur weiten, voluminösen Bindungstasche des Lcn1, ist die Kavität von ApoD jedoch verhältnismäßig eng und an die Bindung der Liganden Progesteron und Arachidonsäure angepasst. Neben der in den meisten Lipocalinen konservierten Disulfidbrücke zwischen dem β -Barrel und dem C-Terminus besitzt ApoD eine zweite Disulfidbrücke, die den N-Terminus mit dem β -Barrel verbindet. Zusätzlich ist ApoD glycosyliert, wobei die Oligosaccharide an den beiden Asparaginresten Asn45 und Asn78 gewebeabhängig variieren können.

Im Gegensatz zu vielen anderen Lipocalinen besitzt ApoD in drei der Peptidschleifen am Zugang der Bindungstasche exponierte hydrophobe Seitenketten, die zu der ungewöhnlich hohen Hydrophobie dieses Proteins führen. Diese hydrophoben Oberflächenabschnitte, die im Bereich von Loop #2 und #3 besonders stark ausgeprägt sind, ermöglichen die Insertion von ApoD in die Lipidphase der HDLs (Eichinger *et al.*, 2007), wo es zudem zur Ausbildung der Disulfidbrücke mit ApoA-II kommt (Yang *et al.*, 1994).

Allerdings führt die ausgeprägte Hydrophobie zu Problemen bei der bakteriellen Expression und Reinigung des rekombinanten ApoD, was sich u.a. in einer verstärkten Aggregation und der Interaktion mit Plastikoberflächen und Säulenmaterialien zeigt. Zur Solubilisierung des

Wildtyp-Proteins wurden daher einige der exponierten hydrophoben Positionen ausgetauscht und so eine besser lösliche ApoD-Variante generiert (Nasreen *et al.*, 2006). Da diese Mutagenesestudien eine wichtige Grundlage der in dieser Arbeit hergestellten ApoD-Bibliothek darstellen, werden sie in Kapitel 3.2.1.1 ausführlicher beschrieben.

1.2.3.3 *Das humane Neutrophilen-Gelatinase-assoziierte Lipocalin*

Das humane Neutrophilen-Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL), auch Lcn2 oder Siderocalin genannt, wurde erstmals aus Granula der neutrophilen Granulozyten isoliert, wo es in drei unterschiedlichen Formen vorkommt (Kjeldsen *et al.*, 1993; Triebel *et al.*, 1992): als Monomer, als Disulfid-verbrücktes Homodimer oder als Disulfid-verbrücktes Heterodimer im Komplex mit Gelatinase B (Matrix-Metalloproteinase 9, MMP-9).

Lcn2 ist ein Akute-Phase-Protein, das bakterielle Eisen-Siderophore komplexiert und somit als Bestandteil der nativen Immunantwort eine wichtige Rolle in der Abwehr von bakteriellen Infektionen spielt (Goetz *et al.*, 2002; Holmes *et al.*, 2005). Aufgrund der niedrigen Bioverfügbarkeit von löslichen Fe^{3+} -Ionen in menschlichen Körperflüssigkeiten sekretieren pathogene Bakterien hochaffine Eisen-Chelatoren, sogenannte Siderophore, die Fe^{3+} -Ionen komplexieren und so die Aufnahme über spezialisierte bakterielle Importsysteme ermöglichen (Schaible & Kaufmann, 2004; Fischbach *et al.*, 2006). Durch Bindung bakterieller Fe^{3+} -Siderophore und Endozytose der entsprechenden Lipocalin-Siderophor-Komplexe (Devireddy *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2002) entzieht Lcn2 den Bakterien die wichtigen Fe^{3+} -Ionen und übt so eine bakteriostatische Wirkung aus (Flo *et al.*, 2004).

Neben der antimikrobiellen Wirkung besitzt Lcn2 auch eine wichtige Funktion als nicht invasiver Biomarker zur frühen Diagnose von akuten Nierenschädigungen (Devarajan, 2010). Im Rahmen von Krebserkrankungen spielt Lcn2 dagegen eine eher zwiespältige Rolle, da es sowohl tumorfördernd als auch tumorhemmend wirken kann (Bolognani *et al.*, 2010).

Wie schon bei Lcn1 und ApoD weist auch die Kristallstruktur von Lcn2 (Goetz *et al.*, 2002; 2000) alle in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen für Lipocaline typischen Strukturmerkmale auf. Ähnlich zu Lcn1 ist auch die Bindungstasche von Lcn2 voluminös und weit geöffnet. Im Inneren der Lcn2-Kavität befinden sich zahlreiche polare Reste mit einem konservierten Cluster aus drei basischen Seitenketten – Arg81, Lys125 und Lys134 – welche für die Bindung des negativ geladenen Eisen-Siderophors Fe^{3+} -Enterobactin verantwortlich sind. Während die meisten Lipocaline eine Vielzahl von Liganden mit moderaten Affinitäten im mikromolaren Bereich binden, bildet Lcn2 hochaffine Komplexe mit wenigen Siderophoren, die alle eine ähnliche Größe und Struktur aufweisen. So bindet es z.B. Fe^{3+} -Enterobactin mit einer Dissoziationskonstante von 0,4 nM (Goetz *et al.*, 2002).

1.2.4 Hapten- und proteinspezifische Anticaline mit medizinischer Relevanz

Durch den Einsatz von humanen Lipocalinen als Grundgerüst und durch stetige Optimierung der randomisierten Bibliotheken, Zielmoleküle und Selektionsmethoden konnten in den letzten Jahren vielversprechende Anticaline mit Spezifitäten für medizinisch relevante Targets identifiziert werden. Diese neueren Anticaline basieren auf den beiden humanen Lipocalinen Lcn1 und Lcn2 und besitzen u.a. Bindungsaktivität für kleine Haptene, wie z.B. den Chelator Diethylenetriaminpentaessigsäure komplexiert mit Yttrium(III) (Y^{3+} •DTPA; Kim *et al.*, 2009a), für Peptide, wie z.B. das Peptidhormon Heparin (Giese *et al.*, Manuskript in Vorbereitung), oder für Proteinliganden, wie z.B. die extrazelluläre Domäne des humanen Rezeptors CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4*; Schönfeld *et al.*, 2009) oder den Wachstumsfaktor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*; Giese *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Im Verlauf der Chemotherapie von Krebserkrankungen kommt es häufig zur Suppression des Immunsystems, was die Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen deutlich einschränkt. Um die Eliminierung von Tumorzellen auch unter diesen immunsupprimierten Bedingungen zu gewährleisten, werden Antikörper neuerdings mit Toxinen oder Radionukliden gekoppelt (Kenanova & Wu, 2006). Das Anticalin C26 bindet den mit Radionukliden beladenen Chelator DTPA mit pikomolarer Affinität und ist somit als Fusionsprotein mit einem zweiten tumorzellspezifischen Anticalin zur Radioimmuntherapie (RIT) geeignet (Kim *et al.*, 2009a). In einer *Pretargeting*-Strategie wird hierbei in einem ersten Schritt das Fusionsprotein injiziert, welches sich durch spezifische Interaktion an die Tumorzellen anheftet. In einem zweiten Schritt wird ein Radionuklid•DTPA-Komplex appliziert und über den zweiten Arm des Duocalins am Tumor angereichert. Überschüssige radioaktive Komplexe werden dagegen aufgrund ihrer geringen Größe rasch über die Niere ausgeschieden. Durch die im Vergleich zu kovalenten Protein-Radionuklid-Konjugaten deutlich verkürzte Verweilzeit der zytotoxischen Komponente im Blutstrom ermöglicht die beschriebene *Pretargeting*-Strategie eine gezielte Eliminierung der Tumorzellen unter reduzierten Nebenwirkungen.

CTLA-4 ist ein transmembraner T-Zell-Korezeptor, der wenige Tage nach T-Zell-Aktivierung induziert wird und bei Kontakt mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der T-Zellen ausübt. CTLA-4 konkurriert hierbei mit dem kostimulatorischen Transmembranprotein CD28 um die Bindung an die Rezeptoren B7.1 und B7.2 der antigenpräsentierenden Zellen und führt somit durch negative Rückkopplung zur Hemmung der natürlichen T-Zell-Aktivierung (Egen *et al.*, 2002). In der Krebstherapie, insbesondere im Rahmen der Tumorstimmulierung, sind dagegen länger anhaltende Immunantworten notwendig, um eine komplette Eliminierung des Tumors zu gewährleisten. Durch spezifische Blockade von CTLA-4, beispielsweise mit dem Antikörper Ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb; Postow *et al.*, 2012), wird die Interaktion mit den

B7-Molekülen verhindert und so eine verstärkte T-Zell-Immunantwort gegen den Tumor bewirkt. Da für diese Inhibition des CTLA-4-Signals keine Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen notwendig sind, können Anticaline als potente Alternative eingesetzt werden.

Das Anticalin PRS-010 bindet CTLA-4 mit hoher Affinität und inhibiert dessen Interaktion mit B7.1, was in zahlreichen Experimenten und durch Aufklärung der Struktur des CTLA-4•PRS-010-Komplexes gezeigt wurde (Schönfeld *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde in mit Leishmanien infizierten Mäusen demonstriert, dass PRS-010 die T-Zell-Immunantwort vergleichbar mit CTLA-4-spezifischen Antikörpern stimuliert und somit Potential als Therapeutikum für die Therapie von Infektionskrankheiten und für die Immuntherapie von Krebs besitzt.

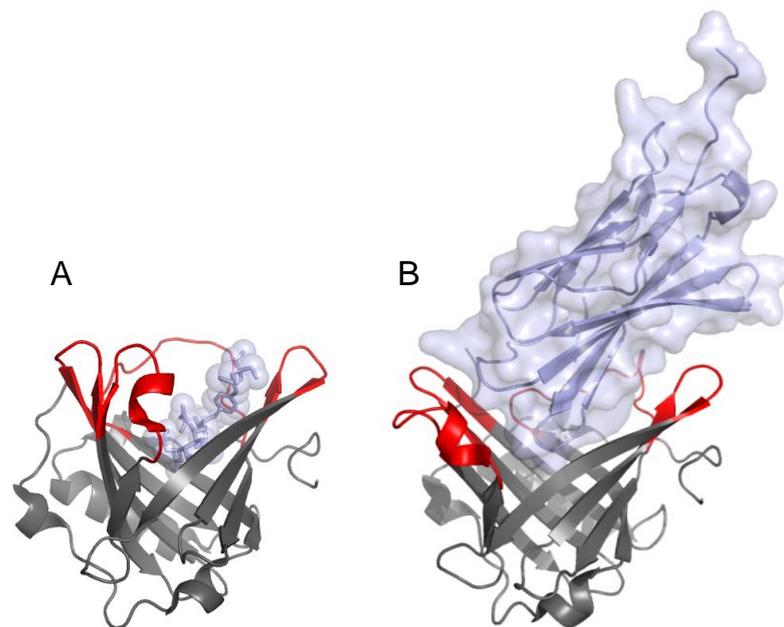


Abbildung 3: Kristallstrukturen von Lcn2-basierten Anticalinen im Komplex mit den zugehörigen Liganden. Die Anticaline sind jeweils als graue Bändermodelle dargestellt, wobei die vier Peptidschleifen, die den Eingang der Bindungstasche bilden, rot hervorgehoben sind. (A) Y^{3+} •DTPA, dargestellt als Stabmodell mit einer transparenten Oberfläche, ist tief im Inneren der Bindungstasche des haptenspezifischen Anticalins gebunden (PDB: 3DSZ; Kim *et al.*, 2009a). (B) Der Komplex des Anticalins PRS-010#003 mit dem inhibitorischen T-Zell-Korezeptor CTLA-4, welcher als Bändermodell mit einer transparenten Oberfläche dargestellt ist, ähnelt in seinem Bindungsmechanismus Antikörper•Antigen-Komplexen (PDB: 3BX7; Schönfeld *et al.*, 2009).

Interessanterweise wurden beide Anticaline, das haptenspezifische C26 und das antigenspezifische PRS-010, aus unterschiedlichen Anticalin-Bibliotheken selektiert, die beide auf dem humanen Lcn2 basieren. Durch Randomisierung unterschiedlicher Positionen, einerseits in das Innere der Kavität gerichteter Reste im oberen Bereich der β -Fass-Struktur für niedermolekulare Liganden und andererseits exponierter Reste in den Schleifensegmenten für

makromolekulare Proteinliganden, wurde der Bindungsmechanismus bereits bei der Konstruktion der Bibliotheken gesteuert. Die damit erhaltenen Ergebnisse bestätigen die hohe Variabilität der Lipocalin-Architektur, die sich an unterschiedlichste Liganden anpassen und diese mit hervorragenden Affinitäten im nanomolaren bis pikomolaren Bereich binden kann.

Die Analyse der Strukturen der Anticalin•Target-Komplexe zeigt zusätzlich die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten der Anticaline (Abbildung 3). Während Y^{3+} •DTPA tief in der Kavität von C26 gebunden ist und so der Komplexierung des natürlichen Liganden Fe^{3+} •Enterobactin ähnelt (Kim *et al.*, 2009a), besitzt die Bindung von CTLA-4 auffällige Ähnlichkeit mit Antikörper•Antigen-Komplexen, wobei die vier randomisierten Peptidschleifen die Rolle der CDRs übernehmen und eine annähernd perfekte, komplementäre Oberfläche für CTLA-4 ausbilden, wobei sogar ein „*Induced Fit*“ beobachtet wird (Schönfeld *et al.*, 2009).

Ein weiteres sehr aussichtsreiches Anticalin ist PRS-050 (Giese *et al.*, Manuskript in Vorbereitung), ein Lcn1-basiertes Anticalin mit pikomolarer Affinität für VEGF, einem Wachstumsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Tumor-Angiogenese und in anderen neovaskulären Erkrankungen spielt (Ferrara & Kerbel, 2005). Durch antagonistische Bindung von VEGF und Inhibition der Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor, beispielsweise durch den monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Avastin, F. Hoffmann-LaRoche), kann das Tumorstadium gebremst werden. Das Anticalin PRS-050 weist im direkten Vergleich mit etablierten VEGF-Inhibitoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgversprechende Bindungs- und Aktivitätsprofile auf und wurde daher als erstes Anticalin im Menschen eingesetzt. Hierbei zeigte das PEGylierte Anticalin in einer klinischen Studie der Phase I bei Patienten mit soliden Tumoren ein hohes Sicherheitsprofil, sehr gute Verträglichkeit, nicht nachweisbare Immunogenität sowie lange Plasma-Halbwertszeit (www.pieris-ag.com; Mross *et al.*, 2013).

1.3 Die Alzheimer-Krankheit: Ursachen und Therapieansätze

1.3.1 Die Rolle des Amyloid-beta Peptids

Die Alzheimer-Krankheit ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems und stellt mit ca. 10 % der über 65-Jährigen und ca. 40 % der über 85-Jährigen weltweit die häufigste Form der Altersdemenz dar (Morgan, 2011). Mit Ausnahme von seltenen früh auftretenden, autosomal-dominant vererbten Formen ist das Alter der Hauptrisikofaktor dieser verheerenden Krankheit (Bateman *et al.*, 2011). Das Fehlen von effektiven präventiven bzw. therapeutischen Maßnahmen in Kombination mit der stetig zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung in den Industrieländern wird daher in den

kommenden Jahrzehnten zu einem drastischen Anstieg der Alzheimer-Prävalenz und somit zu einer großen Belastung der Gesundheitssysteme führen.

Die klinische Entwicklung der Alzheimer-Krankheit, welche im Jahr 1907 erstmals vom Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben wurde (Alzheimer, 1907), ist von einem langsam fortschreitenden Verlust der kognitiven Leistungsfähigkeit gekennzeichnet, welcher zunächst mit leichter Vergesslichkeit beginnt, sich im Verlauf der Krankheit jedoch drastisch verschlimmert und im Endstadium zum vollständigen Verlust der Persönlichkeit und zum Tod führen kann. Neuropathologisch zeichnet sich die Krankheit durch deutliche Veränderungen im Gehirn aus. Hierbei kommt es zur Ablagerung von aggregierten Amyloid-beta-Peptiden (A β) in extrazellulären, senilen Amyloid-Plaques, zur Bildung von intrazellulären, neurofibrillären Bündeln des hyperphosphorylierten Tau-Proteins (*Tangles*), und zu einer drastischen Abnahme der Zahl der Neuronen sowie einer damit verbundenen Reduktion der Hirnmasse insbesondere im Bereich des Neocortex und des Hippocampus (Braak *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus des neuronalen Zelltodes ist noch unklar; allerdings scheint erwiesen, dass Amyloid-Plaques eine toxische Komponente, das zytotoxische A β -Peptid, enthalten, welches die umliegenden Nervenzellen tötet. Als Folge dieses Zelltodes können die senilen Plaques in Extremfällen bis zu 20 % des Volumens der betroffenen Hirnregionen einnehmen (Haass, 2009). Zusätzlich können Amyloid-Plaques Mikroglia-Zellen aktivieren, die ihrerseits Chemokine, neurotoxische Cytokine und freie Radikale produzieren und so Entzündungsreaktionen auslösen. Andererseits können diese destruktiv agierenden Mikroglia-Zellen durch Phagozytose von Amyloid-Partikeln auch eine neuroprotektive Rolle ausüben (Mandrekar-Colucci & Landreth, 2010).

A β -Peptide mit einer Länge von 38 bis 42 Aminosäuren entstehen durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (*Amyloid Precursor Protein*, APP; De Strooper, 2010), eines Typ I-Transmembranproteins, das aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne aufgebaut ist und in hohen Konzentrationen im Gehirn exprimiert wird (Kang *et al.*, 1987). Im Verlauf der amyloiden Prozessierung des APP kommt es zunächst zur Spaltung durch die β -Sekretase, was zur Bildung eines membrangebundenen C-terminalen Fragments mit einer Länge von 99 Aminosäuren führt. Die anschließende Spaltung durch den γ -Sekretasekomplex innerhalb der Transmembrandomäne des APP führt zur Freisetzung der A β -Peptide, wobei das aus 40 Aminosäuren bestehende A β 40 den größten Anteil ausmacht. Die so gebildeten A β -Peptide besitzen eine Tendenz zur Selbstassoziation, in deren Verlauf zunächst lösliche Oligomere und Protofibrillen gebildet werden, welche sich schließlich als unlösliche Fibrillen in den sogenannten Amyloid-Plaques ablagern (Roychaudhuri *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur β -Sekretase schneidet die α -Sekretase innerhalb der Amyloid-Domäne des APP und verhindert so die Bildung der toxischen A β -Peptide. Aufgrund ihrer niedrigen Expression im Gehirn

kann diese Protease allerdings nicht effizient mit der β -Sekretase konkurrieren und somit der Bildung der A β -Peptide nicht effektiv entgegenwirken (Haass, 2009).

Die Amyloid-Hypothese (Hardy & Selkoe, 2002), welche auf genetischen, neuropathologischen und biochemischen Befunden beruht, stellt die A β -Peptide an die Spitze einer Kaskade, die über zahlreiche Zwischenschritte, wie u.a. Spaltung des APP, Bildung von löslichen A β -Oligomeren, Ablagerung dieser Oligomere in unlöslichen Plaques und Bildung von Tau-*Tangles*, letztendlich zum neuronalen Zelltod und somit zur fortschreitenden Demenz führt. Während in dieser ursprünglichen Hypothese lediglich den unlöslichen A β -Ablagerungen in extrazellulären Plaques eine toxische Rolle zugeschrieben wurde, zeigen neuere Ergebnisse eindeutig, dass vor allem lösliche Oligomere eine zentrale Rolle in dieser pathologischen Kaskade spielen und zum Verlust der Neuronen führen (Benilova *et al.*, 2012; Haass & Selkoe, 2007).

Ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Eliminierung der A β -Peptide sowie eine Verschiebung des A β 40:A β 42-Verhältnisses zugunsten der stärker aggregierenden A β 42-Variante begünstigen die Plaque-Bildung. So kommt es beispielsweise in den familiären Formen der Alzheimer-Krankheit, welche Mutationen im APP-Gen bzw. in den Genen der Preseniline (*PSEN1*, *PSEN2*), den katalytischen Untereinheiten des γ -Sekretasekomplexes, aufweisen, zu einer veränderten proteolytischen Prozessierung des APP und somit zu einer verstärkten Synthese der A β -Peptide bzw. einer gesteigerten Bildung der längeren, besonders toxischen Version A β 42 (Bateman *et al.*, 2011). Erhöhte Konzentrationen an A β 40 und A β 42 in sporadischen Formen der Alzheimer-Krankheit sind dagegen nicht auf eine verstärkte Produktion sondern auf eine deutlich reduzierte Metabolisierung der Peptide zurückzuführen (Mawuenyega *et al.*, 2010). Reduzierter proteolytischer Abbau bzw. eingeschränkter Export der amyloiden Peptide aus dem Gehirn, u.a. hervorgerufen durch die reduzierte Expression der verantwortlichen Transporter bzw. durch Interaktion der A β -Peptide mit ApoE4, können die Akkumulation der toxischen Peptide begünstigen (Castellano *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006). ApoE ϵ 4, eine der drei Isoformen des am Cholesterin-Transport beteiligten Apolipoprotein ApoE, ist hierbei ein genetischer Risikofaktor für die Entwicklung der sporadischen Alzheimer-Krankheit, wobei die Mechanismen bisher nicht vollständig aufgeklärt sind (Kim *et al.*, 2009b).

1.3.2 Ansätze zur therapeutischen Intervention

Alle bisher zugelassenen Alzheimer-Medikamente, vier Acetylcholinesterase-Inhibitoren und ein NMDA-Rezeptor-Antagonist, sind nur wenig wirksam, behandeln ausschließlich die gestörten Konzentrationen an neuronalen Botenstoffen, nicht aber die eigentliche Ursache der Krankheit, und können somit den Gedächtnisverlust bestenfalls bremsen, nicht aber stoppen oder gar rückgängig machen. Aufgrund der beschriebenen wichtigen Rolle der A β -Peptide im

Verlauf der Alzheimer-Krankheit (s. Abschnitt 1.3.1) zielen neue Therapieansätze daher darauf ab, die Anreicherung der toxischen A β -Oligomere zu verhindern und so das Fortschreiten der Krankheit zu bremsen. Durch unterschiedliche Strategien wird versucht (a) die Monomerproduktion zu reduzieren, (b) die A β -Assoziation zu inhibieren oder (c) die A β -Eliminierung zu steigern (Citron, 2010).

(a) Die Reduktion der A β -Produktion durch Inhibierung der β - oder γ -Sekretasen bzw. durch Aktivierung der α -Sekretase erscheint am effektivsten. Da die Sekretasen allerdings neben der Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins noch andere wichtige biologische Funktionen erfüllen, wie u.a. die γ -Sekretase im Rahmen der Notch-abhängigen Zelldifferenzierung, birgt dieser Ansatz ein hohes Risiko unerwünschter Nebenwirkungen. Dieses Problem wurde beispielsweise in klinischen Studien der Phase III bei dem γ -Sekretase-Inhibitor „Semagacestat“ von Eli Lilly deutlich, die aufgrund fehlender Effektivität und eines verstärkten Auftretens an Hautkrebs abgebrochen wurden (Doody *et al.*, 2013). Wegen dieser Nebenwirkungen sind neuartige, selektivere γ -Sekretase-Inhibitoren in Entwicklung, die lediglich die Spaltung von APP inhibieren, jedoch keinen Effekt auf die γ -Sekretase-vermittelte Prozessierung von Notch haben, oder die die γ -Sekretase-Aktivität modulieren und selektiv die Bildung der längeren, stärker toxischen A β 42-Variante unterdrücken (Golde *et al.*, 2013).

(b) Neben der Reduktion der A β -Produktion stellt die Blockierung der Interaktion und Oligomerisierung von A β -Peptiden durch kleine, die Blut-Hirn-Schranke penetrierende Moleküle einen weiteren attraktiven Ansatz zur Alzheimer-Therapie dar. Tramiprosat, welches A β -Monomere bindet und diese in einer nicht-fibrillären Konformation stabilisiert, zeigte in diesem Zusammenhang deutliche Effekte in präklinischen Tierstudien, scheiterte allerdings in klinischen Studien der Phase III aufgrund fehlender Effektivität (Gervais *et al.*, 2007). PBT-2, ein Abkömmling des Antibiotikums Clioquinol, das moderate Affinität für Cu²⁺ und Zn²⁺ besitzt und die Metall-vermittelte A β -Oligomerisierung inhibiert, befindet sich dagegen gegenwärtig in klinischen Studien der Phase II (Lannfelt *et al.*, 2008). Als Alternative zu kleinen chemischen Molekülen können auch kurze Peptide, die die zentrale Region der A β -Peptide binden und so deren Selbstassoziation verhindern, als Aggregationsinhibitoren eingesetzt werden (Gordon *et al.*, 2001; Soto *et al.*, 1998).

(c) Durch spezifische Aktivierung der Proteasen Nephilysin, Plasmin und des Insulin-abbauenden Enzyms, den Schlüsselenzymen im Abbau von A β -Peptiden (Eckman & Eckman, 2005), sollte ebenfalls eine Herabsetzung der A β -Konzentration möglich sein. Da die spezifische Aktivierung von Enzymen allerdings deutlich komplizierter ist als deren Inhibition, ist dieser Ansatz äußerst schwierig. Alternativ könnte anstelle des verstärkten Abbaus der A β -Peptide die Aktivität der A β -Transporter an der Blut-Hirn-Schranke und damit der Export der A β -Peptide gesteigert werden (Citron, 2010).

Im Gegensatz zu kleinen Molekülen, welche häufig unspezifisch wirken und daher unerwünschte Nebenwirkungen induzieren können, besitzen A β -spezifische Antikörper eine hohe Biospezifität, was zu großem Interesse an der A β -Immuntherapie geführt hat.

1.3.3 Immuntherapie

Das Konzept der A β -Immuntherapie wurde 1999 erstmals beschrieben (Schenk *et al.*, 1999), hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen und ist mittlerweile mit mehr als zehn unterschiedlichen Substanzen in mehreren klinischen Studien vertreten (Tabelle 1; Delrieu *et al.*, 2012). Sowohl die aktive Immunisierung, d.h. die Vakzinierung mit A β -Peptiden, als auch die passive Verabreichung von anti-A β -Antikörpern führten in zahlreichen Studien mit transgenen Tiermodellen oder Alzheimer-Patienten zur deutlichen Reduktion der Amyloid-Last und der A β -Plaques im Gehirn sowie zu signifikanten Verbesserungen in Verhaltens- und Gedächtnisleistungen der transgenen Tiere (Brody & Holtzman, 2008). Der genaue Wirkmechanismus der anti-A β -Antikörper ist allerdings nicht bekannt, weswegen gegenwärtig vier unterschiedliche Konzepte postuliert werden (Abbildung 4; Citron, 2010).

Zahlreiche Studien zur aktiven und passiven A β -Immunisierung zeigten einen Mikrogliazell-vermittelten Mechanismus (Bard *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 1999). Hierbei gelangen geringe Mengen an A β -spezifischen Antikörpern über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn, wo sie an Amyloid-Plaques binden, durch Fc-vermittelte Effektorfunktionen Mikrogliazellen aktivieren und so die Phagozytose der Plaques induzieren. Da diese Antikörper quasi katalytisch wirken und lediglich Mikrogliazellen aktivieren müssen, welche sich schon am Ort des Geschehens befinden, sind hierbei niedrige Antikörperkonzentrationen ausreichend.

Im Gegensatz dazu ist unklar, wie geringe Mengen an zerebralen, A β -spezifischen Antikörpern die direkte Auflösung der Amyloid-Plaques auch in Abwesenheit von Fc-vermittelten Effektorfunktionen ermöglichen. Ein solcher Wirkmechanismus wurde durch Einsatz von Antikörperfragmenten in mehreren Studien gezeigt (Bacsikai *et al.*, 2002; Frenkel *et al.*, 2000).

Im Rahmen der peripheren „Sink“-Hypothese wirken die Antikörper dagegen außerhalb des Gehirns und müssen die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren (DeMattos *et al.*, 2001; 2002). Aufgrund eines dynamischen Gleichgewichts zwischen A β im ZNS und A β im Blut oder im peripheren Gewebe kann durch Entzug von A β durch spezifische Komplexbildung in der Peripherie, beispielsweise durch A β -spezifische Antikörper, ein Konzentrationsgefälle aufgebaut und die Amyloid-Last im Gehirn signifikant reduziert werden.

Schließlich wurden in Studien mit transgenen Mausmodellen deutliche Verbesserungen in den kognitiven Fähigkeiten der Tiere sogar ohne entsprechende Veränderungen in der Amyloid-Last detektiert (Dodart *et al.*, 2002). A β -spezifische Antikörper binden hier höchst-

wahrscheinlich an A β -Oligomere und blockieren deren toxische Wirkung ohne den Abbau der Plaques zu induzieren.

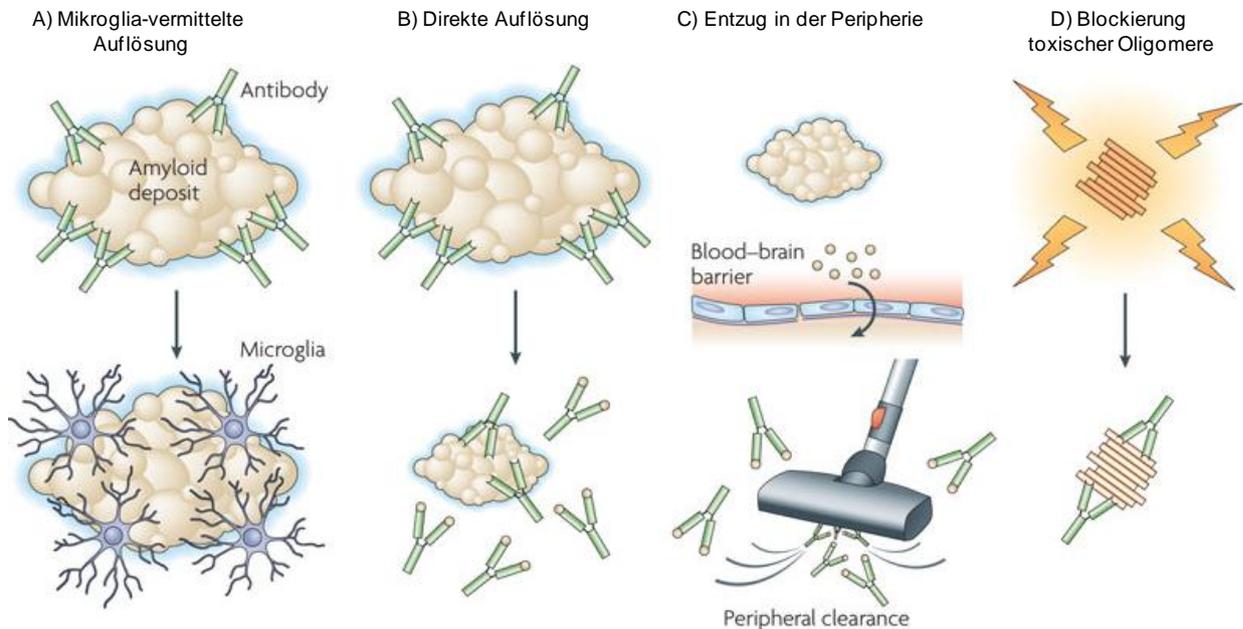


Abbildung 4: Mechanismen der Antikörper-vermittelten Amyloid-Eliminierung. (A) Aktivierung von Mikrogliazellen und Induktion der Phagozytose von Amyloid-Plaques. (B) Direkte Auflösung von Amyloid-Plaques in Abwesenheit von Antikörper-vermittelten Effektorfunktionen. (C) Reduktion der zerebralen Amyloid-Last durch Entzug von A β -Monomeren in der Peripherie und dadurch vermittelten erhöhten Ausstrom von A β aus dem Gehirn (periphere „Sink“-Hypothese). (D) Neutralisierung von toxischen A β -Oligomeren ohne direkten Effekt auf die Amyloid-Last. (Abbildung angepasst aus Citron, 2010)

Die erste klinische Studie im Rahmen der A β -Immuntherapie, AN1792, war eine aktive Immunisierung mit aggregiertem, synthetischem A β 42 in Kombination mit dem Saponin QS-21 als Adjuvans. Aufgrund des Auftretens von Meningoencephalitis in ca. 6 % der behandelten Patienten wurde die Entwicklung dieses Impfstoffes allerdings in der Phase II abgebrochen (Orgogozo *et al.*, 2003). Da A β -spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten als wahrscheinlichste Auslöser dieser entzündlichen Nebenwirkung gelten, werden in laufenden klinischen Studien vermehrt kurze, N-terminale Peptide eingesetzt, welche die zur Antikörpergenerierung notwendigen B-Zellepitope, aber keine T-Zellepitope enthalten (Tabelle 1).

Zusätzlich befinden sich zahlreiche Antikörper in klinischen Studien zur passiven Immunisierung (Tabelle 1). Die als erstes in Phase III getesteten Antikörper sind Solanezumab (Doody *et al.*, 2014), die humanisierte Version des murinen Antikörpers m266.2 (DeMattos *et al.*, 2001), Bapineuzumab (Salloway *et al.*, 2014), die humanisierte

Version des murinen Antikörpers 3D6 (Bard *et al.*, 2000), und Gammagard (Loeffler, 2013), eine zur Substitutionstherapie zugelassene Mischung humaner Immunglobuline, die u.a. A β -spezifische Antikörper enthält. Solanezumab erkennt ein zentrales A β -Epitop im Bereich von Aminosäure 16 bis 23, bindet hauptsächlich die lösliche Form der A β -Peptide und übt seine Wirkung vermutlich im Einklang mit der peripheren „Sink“-Hypothese aus. Bapineuzumab erkennt dagegen den freien N-Terminus der A β -Peptide, bindet im Gehirn an Amyloid-Plaques und induziert deren Phagozytose. In einer großen klinischen Studie der Phase III wurden allerdings die notwendigen Endpunkte der Bapineuzumab-Behandlung verfehlt, weswegen alle weiteren Studien mit intravenöser Applikation dieses Antikörpers eingestellt wurden. Ähnlich wurden auch in den Studien mit Solanezumab und Gammagard die notwendigen Endpunkte nicht erreicht. Hier konnte allerdings in den Studien mit Solanezumab eine Verbesserung in Patienten mit milder Alzheimer-Krankheit detektiert werden, weswegen eine neue Studie der Phase III ausschließlich in dieser Patientengruppe geplant ist.

Andere vielversprechende Antikörper sind Gantenerumab, ein durch *Phage Display* selektierter humaner Antikörper (Bohrmann *et al.*, 2011), sowie BAN2401, die humanisierte Version des murinen Antikörpers mAb158 (Lord *et al.*, 2009), die beide jeweils konformationelle Epitope erkennen und A β -Fibrillen bzw. toxische Protofibrillen mit hoher Affinität binden. Crenezumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper mit Spezifität für A β -Monomere, Oligomere wie auch -Fibrillen, ist weltweit der erste Antikörper, der in einer Präventionsstudie an kognitiv gesunden Personen, die aufgrund einer genetischen Veranlagung mit hoher Wahrscheinlichkeit an Alzheimer erkranken werden, getestet wird (Mullard, 2012). Im Gegensatz dazu wurde die Entwicklung des C-terminal spezifischen Antikörpers Ponezumab (La Porte *et al.*) mittlerweile eingestellt.

Die Wirksamkeit von Fc-unabhängigen Mechanismen zur Eliminierung der toxischen A β -Peptide (Bacsikai *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2003; Frenkel *et al.*, 2000,) sowie die beschriebenen Nachteile von Antikörpern, insbesondere das Risiko von unerwünschten entzündlichen Nebenwirkungen, haben dazu geführt, dass vermehrt Antikörperfragmente und alternative Bindungsproteine hinsichtlich ihres Potentials zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit untersucht werden. Diese Studien schließen diverse Bindungsproteine mit unterschiedlichen Spezifitäten ein, u.a. scFv-Fragmente (*Single Chain Variable Fragment*) gegen die zentrale A β -Region (Liu *et al.*, 2004) bzw. gegen oligomere A β -Formen (Kasturirangan *et al.*), V_H-Antikörper aus Kameliden mit Spezifität für oligomere A β -Formen (Habicht *et al.*, 2007), einen dimeren Affibody mit Bindungsaktivität für das lösliche A β -Monomer (Gronwall *et al.*, 2007; Hoyer *et al.*, 2008), ein DARPin Molekül mit Bindungsaktivität für das lösliche A β -Monomer (Hananberg *et al.*, 2014) sowie proteolytische Nanobodies mit α -Sekretase-Aktivität (Kasturirangan & Sierks, 2010).

Name	Epitop	Sponsor	Phase	Kommentar
Aktive Immunisierung				
AFFITOPE AD01	keine Angabe	Affiris	I	Molekulare Mimikry des A β N-Terminus
AFFITOPE AD02	1-6	Affiris/GSK	II	Molekulare Mimikry des A β N-Terminus
AFFITOPE AD03	keine Angabe	Affiris	I	Molekulare Mimikry des verkürzten oder mit Pyroglutamat-modifizierten N-Terminus
ACC-001	1-6	Janssen	II	QS-21 als Adjuvans
CAD106	1-6	Novartis	II	Q β als Träger
UB311	1-14	United Biochemical	Ib	
V950	keine Angabe	Merck	I	Iscomatrix als Adjuvans
ACI-24	keine Angabe	AC Immune	I	SupraAntigen™
Passive Immunisierung, Monoklonale Antikörper				
Bapineuzumab	1-5	Janssen/Pfizer	III (abgebrochen)	bindet freien N-Terminus und Plaques
		Wyeth		Endpunkte in Phase III nicht erreicht
Solanezumab	16-23	Eli Lilly	III (beendet)	bindet lösliches Monomer
				Endpunkte in Phase III nicht erreicht
Ponezumab	33-40	Pfizer	III (geplant)	neue Phase III in milder AD geplant
Gantenerumab	konformationell	Roche	II/III	DIAN Prevention Trial
			III	A4 Prevention Trial
			II (abgebrochen)	bindet freien C-Terminus
			III (milde AD)	Affinität am höchsten für Fibrillen
			III (abgebrochen)	Studie in prodromaler AD abgebrochen
			II/III	DIAN Prevention Trial
Crenezumab (MABT5102A)	12-23	Genentech	II	bindet Monomere, Oligomere und Fibrillen
			II	API Prevention Trial
BAN-2401	konformationell	Eisai/Bioarctic	II	bindet Protofibrillen
GSK933776A	N-Terminus	GSK	I	
Aducanumab (BIIB037)	konformationell	Biogen IDEC/ Neuroimmune	III	bindet Oligomere und Fibrillen
Intravenöse Immunglobuline				
Gammagard	polyklonal	Baxter	III (beendet)	Endpunkte in Phase III nicht erreicht
Octagam	polyklonal	Octapharma	II	

Tabelle 1: Klinische Studien zur Immuntherapie der Alzheimer-Krankheit (angepasst an Pul et al., 2011).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die tiefe Bindungstasche der Anticaline, die besonders gut zur Bindung von Peptiden geeignet scheint, in Kombination mit den hervorragenden proteinbiochemischen Eigenschaften der Lipocalin-Familie, machen dieses Proteingerüst zu einem vielversprechenden Kandidaten zur Entwicklung von neuartigen A β -spezifischen Therapeutika.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher mit Hilfe des evolutiven Protein Designs ein A β -spezifisches Anticalin als potentieller Wirkstoff in einem innovativen Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit entwickelt werden. Dieses Anticalin sollte fähig sein, A β -Peptide mit hoher Affinität zu binden und dabei deren Aggregation zu inhibieren. Zur Selektion durch *Phage Display* aus Zufallsbibliotheken auf der Grundlage des Tränenlipocalins, des ApoD sowie des Lcn2 und zur anschließenden Charakterisierung der selektierten Anticaline standen unterschiedliche A β -Moleküle zur Verfügung. Im Anschluss an die molekulare Selektion und die bakterielle Produktion sollten ausgewählte Anticaline nicht nur bezüglich ihrer Bindungsaktivität für A β sondern auch bezüglich ihrer Stabilität und Struktur charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollten zusätzlich Studien zur Stabilisierung des Tränenlipocalins als Proteingerüst für Anticaline durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden Materialien und Methoden aufgeführt, die im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente verwendet wurden. Bei den Texten aus dem Material und Methodenteil handelt es sich zum Teil um allgemeine Arbeitsvorschriften aus dem Labor Prof. Skerra, die aus Schlehuber, 2001, Schlapschy, 2004, und Holla, 2012, in angepasster Form übernommen wurden.

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
HM125	F ⁻ , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL(strA)</i> , Δ <i>phoA(PvuII)</i> ²⁵ , <i>degP</i> , <i>rpoH15</i> , <i>eda</i> (Meerman & Georgiou, 1994)
JM83	<i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> , ϕ 80, <i>lacZ</i> Δ M15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
TG1-F	F ⁻ , <i>supE</i> , Δ (<i>hsdSM-mcrB</i>), <i>thi-1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) (Kim <i>et al.</i> , 2009a)
W3110	F ⁻ , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rph-1</i> , λ ⁻ (Bachmann, 1972)
XL1-Blue	<i>endA1</i> , <i>hsdR17(r_k⁻m_k⁺)</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , λ ⁻ , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA11</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169[F ⁻ : <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10(Tet ^r)] (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

2.1.2 Bakteriophagen

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

2.1.3 Plasmide

pASK75his-Trx	Dr. Michael Schneider, Labor Prof. Skerra
pASK75-TrxAbeta28	Dr. Michael Schneider, Labor Prof. Skerra
pASK75-MBPhis	Dr. Michael Schneider, Labor Prof. Skerra
pASK75-MBP-Abeta40	Dr. Michael Schneider, Labor Prof. Skerra
pTlc22	Dr. Amber Nasreen, Labor Prof. Skerra
pTlc26	Dr. Amber Nasreen, Labor Prof. Skerra
pTlc27	Dr. Amber Nasreen, Labor Prof. Skerra
pTlc28	Dr. Amber Nasreen, Labor Prof. Skerra
pTlc3-basierte Plasmide	Markus Moosmeier, Sabine Gonsior, Labor Prof. Skerra
pApoD_IN90	Irmgard Neumaier, Labor Prof. Skerra
pApoD12	Dr. Martin Vogt, Labor Prof. Skerra
pApoD19	Dr. Martin Vogt, Labor Prof. Skerra

pNGAL98	Dr. Gabriele Matschiner, Pieris AG
pNGAL124	Dominik Hinz, Labor Prof. Skerra
pTUM4	Dr. Martin Schlapschy, Labor Prof. Skerra

2.1.4 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung standen im Labor von Prof. Skerra zur Verfügung. Alle anderen Oligodesoxynukleotide wurden von Frau Neumaier am Lehrstuhl für Biologische Chemie synthetisiert (SR-3, SR-4, SR-5, SR-6) oder von Thermo Electron, Ulm, in HPLC-gereinigter Form bezogen. Von Frau Neumaier synthetisierte Oligodesoxynukleotide und die Oligodesoxynukleotide zur Herstellung der ApoD-Bibliothek wurden zusätzlich mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.4.4) gereinigt.

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

D20	5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'
F83	5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
PR1	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

Oligodesoxynukleotide zur ortsgerechten Mutagenese

SR-FP1	5'-CG CAG GGC CGG TGC CAG GAG GTG AAG G-3'
SR-RP1	5'-C CTT CAC CTC CTG GCA CCG GCC CTG CG-3'
SR-3	5'-G TAC CAC GGC CGG TGC CAG GAG GTG AAG G-3'
SR-4	5'-C CTT CAC CTC CTG GCA CCG GCC GTG GTA C-3'
SR-ApoDQQ1	5'-G ATC CCA GGG AGT GCT GTG AAT GGA CGC TGC-3'
SR-ApoDQQ2	5'- GCA GCG TCC ATT CAC AGC ACT CCC TGG GAT C-3
SR-ApoDQQ3	5'- G GAA GTA AAG GTC CGC GCC GCT ATG CCA TCG TAC-3'
SR-ApoDQQ4	5'- GTA CGA TGG CAT AGC GGC GCG GAC CTT TAC TTC C-3'

Oligodesoxynukleotide für die Herstellung der ApoD-Bibliothek

SR-ApoD1a	5'- GTG AAT AAG TAT CCA GGA AGA TGG TAC GAA ATT GAG AAG-3'
MV-4, SR-ApoD2	5'- GA TGG TAC GAA ATT GAG AAG ATC CCA NNK NNK NNK NNK NNK GGA CGC TGC ATC CAG G-3'
SR-ApoD3	5'- AAG ATC AAG GTG CTG AAC CAG NNS TTG NNS GCT GAT GGT ACT GTG NNS CAA NNS GAA GGT GAA GCC ACT CCA G-3'
SR-ApoD4	5'- AG CCT GCC AAG CTG GAA GTA AAG NNS NNS NNS GCT NNS CCA TCG NNS CCG TAC TGG ATC CTG GCT ACC-3'

SR-ApoD5	5'- GAG AAC TAT GCC CTC GTG TAT NNS TGT NNS AGC ACC TCC CAA TCT CAT CAC NNS GAT NNS GCT TGG ATC TTG GCC AGA-3'
SR-ApoD6	5'- AGG GAG AGC CAC GTT TCT GGC CAA GAT CCA AGC-3'
SR-ApoD7	5'- A CAC GAG GGC ATA GTT CTC ATA GTC GGT AGC CAG GAT CCA GTA C-3'
SR-ApoD8	5'-ACT TCC AGC TTG GCA GGC TCT GTG AGG TTA ACT GGA GTG GCT TCA CCT TC-3'
SR-ApoD9a	5'-GGT TCA GCA CCT TGA TCT TAC CGT TTT CCA TCA GTG AGT AGT TGG CCT GGA TGC AGC GTC C-3'

2.1.5 Peptide

Alle Peptide wurden chemisch synthetisiert und als lyophilisierte Präparationen von unterschiedlichen Herstellern bezogen. Chemische Modifikationen, wie z.B. Biotinylierung, wurden direkt vom Hersteller durchgeführt.

Abeta40 (A β 40)	Keck Laboratories, Yale University, New Haven, USA
Abeta40-K-Biotin (A β 40-Bio)	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg
Abeta(1-11)-GGK-Biotin (A β (1-11)-Bio)	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg
NAc-Abeta(16-27)-GG- Biotin (A β (16-27)-Bio)	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg
NAc-Abeta(16-27)-GG	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Abeta(16-28) (A β (16-28))	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg
Fluorescein-Abeta(16-28) (Flu-A β (16-28))	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg

Sequenzen der A β -Peptide

Abeta40	NH ₂ -Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val- His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser- Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val- OH
Abeta40-K-Bio	Abeta40 mit C-terminalem ϵ -Lys-Biotin Biotin an Aminogruppe der C-terminalen Lysin-Seitenkette
Abeta(1-11)-GGK-Bio	Abeta1-11 mit GGK-Linker und C-terminalen Biotin Biotin über Ethylendiamin
NAc-Abeta(16-27)-GG- Bio	Abeta16-27 mit GG-Linker und C-terminalen Biotin, Biotin über Ethylendiamin, N-Terminus acetyliert

Abeta(16-28) Abeta16-28, N- und C-terminal nicht modifiziert

Flu-Abeta(16-28) Abeta16-28 mit N-terminalen Fluorescein

2.1.6 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische-Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Anti-DIG-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotinin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Benzonase, Reinheitsgrad I	E. Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Applichem, Darmstadt
Carboanhydrase	Sigma Chemie, Deisenhofen
ExtrAvidin-AP	Sigma Chemie, Deisenhofen
Herculase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Humanes Serum Albumin (HSA), Frak. V	Sigma Chemie, Deisenhofen
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Roche Diagnostics, Mannheim
Ovalbumin	Sigma Chemie, Deisenhofen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>PfuUltra</i> und <i>PfuUltra</i> II DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
<i>Strep</i> MAB-Immo	IBA, Göttingen
<i>Strep</i> -Tactin-Alkalische-Phosphatase	IBA, Göttingen
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire
<i>Taq</i> DNA-Polymerase 1 unit/ μ l bzw. 5 units/ μ l	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland, Mannheim
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.7 Chemikalien

Aceton	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies, Eggenstein; Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose (low melting point), ultra pure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Aktivierte Aminosäuren zur SPOT- Membransynthese	Intavis, Köln
Ammoniak	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Formedium LTD, England
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure (ANS)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Antifoam A-Stammlösung	Sigma Chemie, Deisenhofen
Bacto Agar	BD Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Bacto Tryptone	BD Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Bacto Yeast Extract	BD Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Benzamidin-Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt
D-Biotinyl- ϵ -aminocaprinsäure-N- hydroxysuccinimidester	Roche Diagnostics, Mannheim
Bis/Tris	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Blue Dextran	Sigma Chemie, Deisenhofen
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-4- Toluidinsalz (BCIP)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
1,4-Butandiol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Calciumchlorid-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt

Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Cobalt(II)chlorid Hexahydrat	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dichlormethan	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Di-Ammoniumhydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy-succinimidester (NHS)	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-DIG-Immunglobulin G beschichtete paramagnetische Partikel	Europa Bioproducts Ltd, Cambridge, UK
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)	BIACORE, Uppsala, Schweden
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂ -2H ₂ O)	AppliChem, Darmstadt
Eisen(III)chlorid	E. Merck, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 % oder technisch	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck, Darmstadt
Ethanolamin (für Biacore)	BIACORE, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid (1 % (w/v) in Wasser)	AppliChem, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidiniumchlorid, Molecular Biology Grade, Ultrapure (LQ)	NIGU Chemie, Waldkraiburg

HABA (2'-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure)	Alfa Aesar, Karlsruhe
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
HFIP (1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Iodoacetamid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Imidazol	E. Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	Sigma Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	E. Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Kanamycin A Monosulfat	Sigma Chemie, Deisenhofen
Kupfer(II)chlorid Dihydrat	E. Merck, Darmstadt
Magermilchpulver (Skim)	Sucofin, TSI, Zeven
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Manganese(II)chlorid Tetrahydrat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie, Deisenhofen
MES	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Molekularsieb 0,4 nm	E. Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumazid	E. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	BIACORE, Uppsala, Schweden

Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	AppliChem, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	AppliChem, Darmstadt
Phenol, ≥ 99 %, redestilliert	Sigma Chemie, Deisenhofen
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) Dinatriumsalz	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol (PEG) 200, 3350	Sigma Chemie, Deisenhofen
Polyethylenglycol (PEG) 1000, 4000, 8000, 10000	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Gerbu, Wieblingen
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Sequenziergel Verdüner	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	AppliChem, Darmstadt
Streptavidin-Partikel (paramagnetisch)	Roche Diagnostics, Mannheim
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Surfactant P20	BIACORE, Uppsala, Schweden
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin)	AppliChem, Darmstadt
Tetracyclin Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid (Vitamin B)	AppliChem, Darmstadt
Thioflavin T	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Triethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra-Qualität	Formedium LTD, England
Triisopropylsilan	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
tRNA (from brewer's yeast)	Roche Diagnostics, Mannheim
Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitan- monolaurat)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Zinkacetat	AppliChem, Darmstadt
Zinksulfat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

2.1.8 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

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

Protein-Größenstandards:

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

Kits zur DNA-Isolierung:

E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit Peqlab Biotechnology, Erlangen
 JETquick Plasmid Miniprep, Spin Kit Genomed, Bad Oeynhausen
 JETsorb Gel Extraction Kit Genomed, Bad Oeynhausen
 Qiagen Gel Extraction Kit Qiagen, Hilden
 Qiagen Plasmid Midi Kit Qiagen, Hilden
 Qiaprep Spin MiniPrep Kit Qiagen, Hilden
 Qiaquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

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

2.1.9 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt

Brutschränke:

Friocell und Incucell MMM Medcenter Einrichtungen, Gräfelfing
 BIACORE X und BIACORE T100 BIACORE, Uppsala, Schweden
 CD-Spektropolarimeter Jasco J-810 Jasco, Groß-Umstadt

Durchflußdetektoren:

2138 Uvicord S LKB Instrument, Gräfelfing
 2138 Uvicord SII GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
 ELGA Wasseranlage ELGA LabWater, Celle
 ELISA Reader Spectra MAX 250 Molecular Devices, MWG Biotech
 Elektrobplot-Apparatur Eigenbau
 Elektroporator Bio-Rad Laboratories, München
 Elektrophoresekammern Eigenbau; Biometra, Göttingen

Fermenter:

10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder Schütt Labortechnik, Göttingen

C Flow Durchfluss-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Mess- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach
Fluoreszenzphotometer LS 50B	Perkin-Elmer, Langen
FluoroMax-3	HORIBA Jobin Yvon, Grasbrunn
Fraktionssammler:	
Gradi Frac / Redi Frac	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111 und Superrac 2211	LKB Instrument, Gräfelfing
Frac-920	GE Healthcare
French press	Spectronic Unicam, Cambridge, UK
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Heizblock Dri-Block DB-2A Techne	Thermodux, Wertheim
Heizrührer/Magnetrührer	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik, München
Heidolph MR Hei-Standard	Heidolph
HPLC:	
ÄKTA-Explorer	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA-Purifier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kristall-Imaging-System:	
RockImager	Formulatrix Inc., MA, USA
Kristallisationsroboter:	
FreedomEvo	Tecan Deutschland, Crailsheim
Membranspotter	
MultiPep RS Instrument	Intavis, Köln
Mikrowelle T.D.S. MW81W	Samsung
Netzgeräte:	
Power Pack P25 und P30	Biometra, Göttingen
PCR-Gerät	
Master Cycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Plattenschüttler:	
Multiplate-Shaker	VWR International
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter:	
Inolab, pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

Pipettierhilfen:

accu-jet / accu-jet pro

Brand, Wertheim

Pipetten:

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000

Abimed Analysen-Technik, Langenfeld

Pumpen:

Membran Vakuumpumpe MZ-2c

Vacuubrand, Wertheim

Divaco 0.8 L

Oerlikon

Refraktometer 22304

Carl Zeiss, Deutschland

Rollenmischer Roller Mixer SRT1

Stuart Scientific, Redhill, UK

Signalschreiber

REC 112

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

SE 120

ABB Goerz, Wien, Österreich

2210

LKB Instrument, Gräfelfing

Schüttelapparate:

Typ 3012 / Typ 3017

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Schüttelinkubatoren:

Modell G25

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

Multitron

Infors, Bottmingen, Schweiz

Spektrophotometer:

Ultrospec 2000, 3000

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Speed-Vac-Konzentrator

Univapo UVC 150H

UniEquip, Martinsried

UV-Transilluminator TI3

Biometra, Göttingen

Autoklav Varioklav Typ 500

H & P Labortechnik, Oberschleißheim

Vortex-Genie 2

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

Waagen:

Micro m3p

Sartorius, Göttingen

PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C

W. Wolfinger, Straubenhardt

PAG Oerlikon Precisa 125 A

W. Wolfinger, Straubenhardt

2001 MP2

Sartorius, Göttingen

1202 MP

Sartorius, Göttingen

Wasserbad Haake F6/K20

Thermo Haake, Karlsruhe

Wipptisch WT12

Biometra, Göttingen

Zentrifugen:

Sigma 4K10 und Sigma 4K15C

Sigma, Osterode

Sorvall RC 3B Plus mit Rotor

Kendro Laboratory Products, München

Sorvall RC 5B, RC 5C Plus

Evolution RC mit Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000	Kendro Laboratory Products, München
Eppendorf 5415 R	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Mini Spin	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2.1.10 Sonstiges Material

Sensorchips für Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

CM5-Chip für T100	BIACORE, Uppsala, Schweden
CMD 2001 Chips für Biacore X	XanTec Bioanalytics, Düsseldorf

Dialyseschläuche

Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth, Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol, Hamburg

Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Elektroporationsküvetten

Bio-Rad Laboratories, München

Einwegspritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml

Braun Melsungen, Melsungen

Reaktionsgefäße

0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
1,5 ml, 2 ml (DNA low binding)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

SDS-PAGE:

Apparaturen, Glasplatten, Spacer, Dichtungen, Kämme	Biometra, Göttingen
---	---------------------

Größenausschlusschromatographie-Säulen:

GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Superdex 75 und 200 HR 10/30
Superdex 75 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>
Superdex 200 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>

Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)

Sarstedt, Nümbrecht

Konzentratoren

Amicon Ultra 4 (5K, 10K, 30K)	Millipore, Eschborn
Amicon Ultra 15 (5K, 10K, 30K)	Millipore, Eschborn

Klebefolie für die Proteinkristallographie:

Crystal Clear	Hampton Research, CA, USA
---------------	---------------------------

Kristallisationsplatten:

96-Well CrystalQuick Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Linbro-Plate	Hampton Research, CA, USA
Cryscem-Plate	Hampton Research, CA, USA

Kunststoffröhrchen:

Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 und 50 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Membranen

Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon P (0,45 µm) (hydrophob)	Millipore, Eschborn
PVDF-Membran (Typ GVWP, 0,22 µm) (hydrophil)	Millipore, Eschborn
Spotmembran Amino-PEG500-UC540	Intavis, Köln

Mikrotiterplatten

Multiple Well Platten 96 round bottom mit Deckel	Sarstedt, Nümbrecht
MaxiSorp Polystyrene Mikrotiterplatten	Nunc, Langenselbold

Parafilm

Pechiney Plastic Packaging Company

Petrischalen aus Polystyrol

Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten-Spitzen:

blau (200-1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Quarzküvetten:

Typ 108.002 QS (Absorption)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 105 QS (Fluoreszenz)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 110 QS (CD)	Hellma, Müllheim, Baden

Säulenmaterialien

<i>Strep</i> -Tactin-Sepharose	IBA, Göttingen
<i>Strep</i> -Tactin Superflow	IBA, Göttingen
IDA-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

Schwan-Stabilo Klarsichtfolie aus PP

Müller & Nemecek, Frankfurt/Main

Sterilfilter:

Filtropur (0,22 und 0,45 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Membransterilfilter (0,45 µm; Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Spin-X (0,22 und 0,45 µm)	Costar Corning, NY, USA

Whatman-Filterpapier 3MM

Bender & Hobein, München

Zentrifugenbecher für Sorvall Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000

Nalgene Company, New York, USA

2.1.11 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen für DNA-Arbeiten mit ddH₂O und alle Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen mit Millipore/ELGA Wasser hergestellt. Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen und DNA wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Lösungen für das Arbeiten mit Proteinen wurden bei Bedarf filtriert und entgast. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

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

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O	1:1000
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol	1:1000
Kanamycin (Kan)	35 mg/ml in H ₂ O	1:500
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 70 % (v/v) Ethanol	1:1000

Induktor-Stammlösungen:

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml, 5 mg/ml in DMF	1:10'000
Lagerung bei -20 °C		

LB-Medium:

Bacto Tryptone	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)
Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und im Autoklav sterilisieren.	

2xYT-Medium:

Bacto Tryptone	16 g/l
Bacto Yeast Extract	10 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)
	6 g/l (nur für Softagar)

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und im Autoklav sterilisieren.

TB-Medium (Screening-ELISA):

Bacto Tryptone	12 g/l
Bacto Yeast Extract	24 g/l
Glycerin	55 mM
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO ₄	72 mM

Tryptone, Hefeextrakt und Glycerin in 900 ml H₂O lösen und im Autoklav sterilisieren. Vor Gebrauch Zugabe von 100 ml sterilfiltrierten KHPO₄-Puffer (0,17 M KH₂PO₄; 0,72 M K₂HPO₄).

SOB-/SOC-Medium:

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

Mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und im Autoklav sterilisieren.

Vor Gebrauch Zugabe von jeweils 10 ml/l einer 1 M MgCl₂ und 1 MgSO₄-Lösung (beide sterilfiltriert), bzw. im Fall von SOC zusätzlich 20 ml/l 20 % (w/v) Glucose-Lösung (sterilfiltriert oder autoklaviert).

Lösungen für die Fermentation:Mineralsalzlösung:

Na ₂ HPO ₄ •2 H ₂ O	31 mM
KH ₂ PO ₄	19 mM
NH ₄ Cl	25 mM
Na ₃ -Citrat•2 H ₂ O	5 mM

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

Glucoselösungen:

Glucose	20 % und 50 % (w/v)
---------	---------------------

(separat autoklaviert)

MgSO₄-Stammlösung:

MgSO ₄	1 M
-------------------	-----

(separat autoklaviert)

Thiamin-Stammlösung:

Thiamin-Hydrochlorid	10 mg/ml
----------------------	----------

(sterilfiltriert)

FeCl₃-Stammlösung:

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

Zn-Acetat-Stammlösung:

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

Spurenelement-Stammlösung:

MnCl₂•4 H₂O 3,0 g/l
CuCl₂•6 H₂O 0,3 g/l
H₃BO₃ 0,6 g/l
CoCl₂•6 H₂O 0,5 g/l
(NH₄)₆Mo₇O₂₄•4 H₂O 1,2 g/l
EDTA 4 mM
(sterilfiltriert)

Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v) NH₃ zur pH-Regulierung

Antifoam A: 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:TAE-Puffer:

Tris 40 mM
Essigsäure 20 mM
EDTA 1 mM

TBE-Puffer:

Tris 89 mM
Borsäure 89 mM
EDTA 2 mM

TE-Puffer:

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

10x Auftragspuffer für Agarosegele:

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

Puffer für die SDS-PAGE:1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson:

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

4x Lower-Tris:

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

4x Upper-Tris:

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

5x Auftragspuffer:

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

*bei reduzierendem Auftragspuffer

Färbelösung:

Coomassie Brilliantblau R-250	1 g/l
Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Entfärbelösung I:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Entfärbelösung II:

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------

Aufbewahrungslösung:

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

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC-Puffer):IMAC-Laufpuffer (Tris-basierend)

Tris/HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM

IMAC-Elutionspuffer (Tris-basierend)

Tris/HCl pH 8,0	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazol	250 mM

IMAC-Regenerierungspuffer

NaCl	1 M
EDTA, pH 8,0	50 mM

Zinksulfatlösung

ZnSO ₄	10 mM
-------------------	-------

Sonstige Puffer:Anti-Phagenlösung

NaOH	100 mM
SDS	1 %

AP-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM
pH 8,8 mit HCl einstellen	

BBS/E-Puffer (für Panning und Bibliotheksgenerierung)

B(OH) ₃ , pH 8,0	200 mM
NaCl	160 mM
EDTA	1 mM

Benzonase-Puffer:

Tris	100 mM
MgCl ₂	5 mM

CD-Puffer

KH ₂ PO ₄	20 mM
K ₂ SO ₄	50 mM
pH 7,5 mit KOH einstellen	

Coating Buffer für *Strep*MAB-Immo

NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0	100 mM
---	--------

10 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid	98 % (v/v)
0,5 M EDTA	2 % (v/v)
Bromphenolblau	0.2 % (w/v)

French-Press-Aufschlusspuffer:

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

KSH-Puffer

Hepes, pH 7,5	20 mM
K ₂ SO ₄	50 mM

Periplasma-Aufschlußpuffer:

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

PBS:

KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaCl	115 mM
pH 7,4 stellt sich ein	

PBS/T:

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

PBS/T0.4:

PBS mit 0,4 % (v/v) Tween 20

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

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

TB-Puffer:

PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH 6,7 mit KOH einstellen	
MnCl ₂	55 mM
sterilfiltrieren	

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

(nach Schlapschy, 2004)

Einzelkolonien von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C generiert. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C gelagert und bis zu 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, falls nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika (Selektivmedium) angesetzt. Es wurden Volumina von 4 ml in 13 ml Kulturröhrchen, 50 ml in 100 ml Kulturkolben mit belüfteter Metallkappe und 2 l in 5 l Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:40 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert.

Vorkulturen für die Produktion von Proteinen (s. Abschnitt 2.3) wurden bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Produktion der Proteine erfolgte in 2 l

Kulturen unter Schütteln bei 200 rpm bei 22 °C (periplasmatisch) bzw. 30 °C (cytoplasmatisch). Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 (OD₅₅₀) bzw. 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines Ultrospec 2000/3000 Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurden 1,6 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 0,4 ml hitzesterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

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

2.2.2.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter Zellen

(nach Holla, 2012)

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli*-Zellen zunächst in eine transformations-kompetente Form überführt werden. In dieser Arbeit wurde die Transformations-Methode von Inoue eingesetzt (Inoue *et al.*, 1990). Mit dieser Methode können je nach *E. coli*-Stamm kompetente Zellen mit ca. 10⁷ bis 10⁸ Transformanden pro µg Plasmid-DNA erhalten werden.

50 ml SOB-Medium ohne Antibiotika wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 22 °C (JM83, TG1-F⁻) bzw. 30 °C (XL1-Blue) unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 (OD₆₀₀) wurde die Kultur 10 min auf Eis inkubiert, in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 3.000 rpm, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und die Suspension wie zuvor zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde in 8 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, mit 602 µl DMSO (wasserfrei) versetzt und vorsichtig gemischt (Endkonzentration 7 % DMSO (v/v)). Nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl chemisch kompetente Zellen mit 1 µl einer 1:10 Verdünnung der Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligierungsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 1 min auf 42 °C erhitzt, dann 2 min auf Eis inkubiert und anschließend in 2 ml LB-Medium überführt. Im Fall einer Selektion mit Chloramphenicol (Cam) wurde der Transformations-Ansatz für 45 min bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert und anschließend auf LB/Cam-Agar ausplattiert. Im Fall einer Selektion mit Ampicillin (Amp) war es möglich 100 µl des Transformations-Ansatzes unmittelbar nach

dem Hitzeschock auf LB/Amp-Agar auszuplattieren. Die Kultivierung der Plasmid-tragenden Zellen erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.2.2 Herstellung und Transformation elektrisch kompetenter Zellen

(nach Holla, 2012)

Für die Herstellung von hochkomplexen Phagemidbibliotheken wurden elektrisch kompetente *E. coli*-Zellen verwendet, da diese mit 10^9 bis 10^{10} Transformanden pro μg Plasmid-DNA deutlich effizienter sind als chemisch kompetente Zellen (s. Abschnitt 2.2.2.1).

Mit einer Einzelkolonie einer am Vortrag frisch ausgestrichenen Kultur XL1-Blue wurde eine Vorkultur in 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5 l LB-Medium in einem Verhältnis von 1:50 angeimpft und bei 26 °C, 180 rpm bis zu einer OD_{550} von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde auf vier sterile Zentrifugenbecher verteilt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (SLA-3000, 15 min, 4.000 rpm, 4 °C), die Überstände vollständig entfernt und die Zellpellets mit einem Liter einer 10 %igen Glycerinlösung gewaschen. Dazu wurden die Zellpellets zunächst vorsichtig in ca. 40 ml 10 % Glycerin resuspendiert, die restliche Waschlösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert (SLA-3000, 13 min, 4.000 rpm, 4 °C) und mit 10 % Glycerin gewaschen. Die zweifach gewaschenen Zellen wurden nach einem letzten Zentrifugationsschritt in einem Endvolumen von 2 ml 10 % Glycerin resuspendiert.

Für die Elektroporation wurden 10 μl des Ligierungsansatzes (s. Abschnitt 2.2.5.4) mit 100 μl elektrokompenten Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad) pipettiert. Die Zellen wurden in einem Elektroporator (Bio-Rad) für 6 ms jeweils einem Puls von 12.5 kV/cm ausgesetzt. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml eiskaltem SOC-Medium aus der Küvette gespült, in ein steriles Kulturröhrchen überführt, für 45 min bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert und anschließend auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert bzw. zur Präparation einer Phagemidbibliothek wie in Abschnitt 2.4.2.1 beschrieben weiter verwendet.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

(nach Schlapschy, 2004)

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

2.2.3.1 *Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab*

Zur Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden, bei der ortsgerichteten Mutagenese oder im Anschluss an Screening-Experimente erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA aus stationären 4 ml-Übernachtskulturen unter Verwendung der Plasmid-Isolierungs-Kits der Firmen Genomed (Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit) oder Qiagen (Qiaprep Spin MiniPrep Kit) nach Herstellerangaben präpariert. Hierbei lagen die Ausbeuten an Plasmid typischerweise zwischen 10 und 20 µg DNA in 75 µl H₂O bzw. 75 µl 1/10 TE-Puffer (TE-Puffer 1:10 in H₂O). Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 *Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab*

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

2.2.4 **Gelelektrophorese und Reinigung von DNA und Oligodesoxynukleotiden**

(nach Schlapschy, 2004)

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese unter Zugabe von Ethidiumbromid (Sambrook, 2001). Dieses Verfahren wurde im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden und im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.4.4) verwendet.

2.2.4.1 *Analytische Agarose-Gelelektrophorese*

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 0,7 bis 1,5 % (w/v) Suspension von Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 1/10'000 Volumen einer 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das nach Aushärten der Agarose erhaltene Gel war typischerweise 10,5 cm lang und 7,5 cm breit, mit einer Dicke von ca. 0,5 cm. Das erstarrte Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Geltasche mit 10 µl DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für 45 min durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente im UV-Licht (312 nm) visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden 0,7 bis 1,5 % (w/v) "Low Melting"-Agarosegele in TAE-Puffer wie in 2.2.4.1 beschrieben hergestellt. Das Gel wurde mit einem Geltaschenformer mit Taschen einer Breite von ca. 0,5 bis 2 cm hergestellt und nach dem Aushärten mit dem gesamten präparativen Restriktionsverdau bzw. mit dem gesamten PCR-Ansatz (50 bis 100 µl), welche zuvor mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden waren, beladen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 – 70 V für ca. 90 min durchgeführt. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (312 nm) erfolgte zur Vermeidung von Strahlenschäden der DNA mit verminderter Intensität. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben weiter verwendet.

2.2.4.3 Reinigung von linearer, doppelsträngiger DNA aus Gelfragmenten

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosestücken erfolgte im Anschluss an die präparative Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der Gelextraktion-Kits von Qiagen und JETsorb. Hierbei wurde entsprechend den Herstellerangaben vorgegangen und die DNA im letzten Schritt mit 20 bis 30 µl H₂O eluiert.

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

2.2.4.4 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden durch Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Ausgehend von kommerziellen Stocklösungen von 8,3 M Harnstoff und 25 % (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 wurden Mischungen mit 12-16 % (w/v) Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE hergestellt. Durch Zugabe von 40 µl TEMED (unter schnellem Rühren) und 1 ml 10 % (w/v) APS zu 100 ml dieser Mischung wurde die Polymerisation gestartet.

Die Auftrennung der Oligodesoxynukleotide erfolgte durch vertikale Gelelektrophorese in 1,5 mm dicken Gelen. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit entsprechenden Abstandshaltern durch Klammern fixiert, die polymerisierende Gellösung in die entstandene Gelkammer gefüllt und ein Geltaschenformer mit sechs Taschen eingebracht. Als Laufpuffer diente TBE.

Die Reinigung der verwendeten Oligodesoxynukleotide erfolgte ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes. Die Hälfte des in 40 µl H₂O

gelösten lyophilisierten Rohproduktes (20 µl) wurde mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung als möglichst schmale Bande auf zwei Taschen des 12-16 %igen Polyacrylamid/Harnstoffgels aufgetragen und die Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 40 W durchgeführt bis die Bromphenolblau-Front das Gelende erreicht hatte (ca. 4 h).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor dem fluoreszierenden Hintergrund sichtbar gemacht (*UV-Shadowing*) und die Hauptproduktbande mit einem Skalpell exakt ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung der Gelstücke wurden diese in eine 1 ml-Einwegspritze überführt, deren Spitze zuvor zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 ml TE-Puffer wurde das Gelstück durch die Bohrung gepresst und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Die Gelmasse wurde mit Hilfe einer Spin-X-Filtereinheit abgetrennt (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 5 min) und das Filtrat dreimal mit je 1 ml 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 400 µl eingengt wurde. Nach Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8, 4 µl 1 M MgCl₂ und 1 ml Ethanol (p.a.) wurde die DNA bei -20 °C für mindestens 1 h präzipitiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 30 min, 4 °C), das Präzipitat mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, im Vakuum für 2 min getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration der gereinigten Oligodesoxynukleotide wurden 2 µl der Lösung mit 398 µl TE-Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm gegen TE-Puffer gemessen. Die Extinktionskoeffizienten wurden dabei aus der Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen abgeschätzt (Adenin: 15,0 mM⁻¹cm⁻¹; Cytosin: 7,4 mM⁻¹cm⁻¹; Guanin: 11,8 mM⁻¹cm⁻¹; Thymin: 8,8 mM⁻¹cm⁻¹, Cantor *et al.*, 1970).

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 *Polymerase-Kettenreaktion*

(nach Schlapschy, 2004)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) wurde zur selektiven Amplifizierung von Genen, zur Synthese von Anticalin-Bibliotheken mittels überlappender Oligodesoxynukleotide und zur ortsgerichteten Einführung von Mutationen (*Site-directed Mutagenesis*) verwendet.

Amplifizierung eines Gens

Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (Primer) flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Bei Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase, die sich aufgrund ihrer *Proof-Reading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten Primer durch eine einzelne Phosphorthioatbindung am 3'-Terminus vor der 3'-5'-Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 10-100 ng Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden Primer. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer bzw. 10x *Pfu*-Puffer (beide Fermentas), 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie H₂O zu einem Endvolumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz wurde zunächst im Thermocycler für 1 min auf 94 °C erhitzt und dann 2,5 U *Taq*- bzw. *Pfu* DNA-Polymerase (beide Fermentas) zugegeben (*Hot Start*). Die PCR erfolgte in 20-30 aufeinanderfolgenden Zyklen, die aus folgenden drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der Primer an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des zu bildenden Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1 bis 5 min (in Abhängigkeit der Länge der zu amplifizierenden DNA und der verwendeten Polymerase). Abschließend wurde der Ansatz zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 72 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA entsprechend angesetzt, um eventuelle DNA-Kontaminationen nachzuweisen.

Synthese der ApoD-Bibliothek in einer *One-Pot* Gensynthese mit überlappenden Primern

Die in dieser Arbeit geplante ApoD Bibliothek wurde in einer *One-Pot*-Gensynthese mit neun überlappenden Primern hergestellt. Die Bibliothek wurde auf Basis der ApoD cDNA generiert und enthielt zusätzlich zu den randomisierten Positionen einige Mutationen zur Verbesserung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins sowie zur Einführung der *Bst*XI-Schnittstellen (Nasreen *et al.*, 2006; Neumaier unveröffentlichte Ergebnisse; s. Abschnitt 3.2.1). Zur Randomisierung der 18 Positionen in den Schleifenbereichen und der oberen Kavität von ApoD, wurden an entsprechenden definierten Positionen variable Basen in Form von NNK- bzw. NNS-Codons eingeführt. Hierbei entspricht N einer Mischung aller vier Basen A, C, G und T, K einer Mischung der beiden Basen G und T und S einer Mischung der Basen G und C. Sowohl NNK als auch NNS kodieren für jede natürliche Aminosäure sowie für das *Amber*-Stopcodon (TAG), für welches in den *E. coli supE*-Stämmen XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987) und TG1 (Sambrook, 2001) in 10 % der Fälle Glutamin eingebaut wird (Miller, 1992). Diese beiden Stämme wurden für die Generierung der Bibliothek, für die *Phage Display*-Selektionen und für Screening-Experimente verwendet.

Das Reaktionsvolumen der PCR zur Generierung der ApoD Bibliothek betrug 1,5 ml und enthielt 75 µl der flankierenden Primer SR-ApoD1a und SR-ApoD6 in einer Konzentration von 10 µM und jeweils 15 µl der überlappenden Primer SR-ApoD2, SR-ApoD3, SR-ApoD4, SR-ApoD5, SR-ApoD7, SR-ApoD8 und SR-ApoD9a in einer Konzentration von 1 µM. Zusätzlich enthielt der Ansatz 150 µl 10x *Taq*-Puffer (Fermentas) und 30 µl dNTPs (je 10 mM). Nach Auffüllen des Reaktionsvolumens mit H₂O zu 1,485 ml wurde der Reaktionsansatz zu je 99 µl auf 15 PCR-Reaktionsgefäße verteilt, im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt, 5 U der *Taq* DNA-Polymerase (Fermentas, 5 U/µl, 1 µl) zugegeben (*Hot Start*) und folgendes Temperatur/Zeit-Programm 20mal durchlaufen: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. *Annealing* der Primer an die DNA-Matrix bei 65 °C für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1.5 min. Abschließend wurde der Ansatz zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 72 °C inkubiert. Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt und konzentriert.

Ortsspezifische Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren

(nach Holla, 2012)

Durch die QuikChange Mutagenese (Stratagene) können Mutationen an definierten Positionen in doppelsträngige Plasmid-DNA eingeführt werden. Hierbei wird mit Primern, die die einzuführende Mutation für jeden der beiden DNA-Stränge enthalten, unter Verwendung der *UltraPfu* DNA-Polymerase (Stratagene) die Plasmid-DNA vervielfältigt und dabei mutiert. Anschließend wird die in *E. coli* produzierte, methylierte Matrizen-DNA mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, das ausschließlich methylierte DNA spaltet, verdaut (s. Abschnitt 2.2.5.2). Die, die Mutation enthaltene, amplifizierte Plasmid-DNA wird durch Transformation in einen geeigneten *E. coli*-Stamm, beispielsweise XL1-Blue, und nachfolgender Plasmidpräparation gewonnen (s. Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.3.1).

Der Mutageneseansatz enthielt folgende Reagenzien: 20 ng Plasmid-DNA isoliert aus einem *dam*⁺ *E. coli*-Stamm, wie z.B. XL-1 blue, je 30 pmol Primer, 5 µl 10x *PfuUltra* Puffer (Stratagene) und 1 µl dNTP-Mix (12,5 mM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP). Der Ansatz wurde mit H₂O auf 49 µl aufgefüllt. Nach 2 min bei 95 °C wurde 1 µl *PfuUltra* DNA-Polymerase (Stratagene) hinzugefügt und das folgende QuikChange Programm 12-16mal durchlaufen: 30 s 95 °C, 1 min 55 °C und 4 min 68 °C. Anschließend wurde der Ansatz direkt ohne vorherige Reinigung mit 2 µl *DpnI* (New England Biolabs) 1 bis 2 h bei 37 °C verdaut und im Anschluss die in der PCR amplifizierte, nicht methylierte DNA mit Hilfe des Cycle Pure Kits (PeqLab) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl H₂O. 5 µl der gereinigten DNA wurden in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert (s. Abschnitt 2.2.2.1). Die aus einzelnen Kolonien gewonnene Plasmid-DNA (s.

Abschnitt 2.2.3.1) wurde zur Verifizierung im Bereich des Strukturgens mit geeigneten Primern sequenziert (s. Abschnitt 2.2.6).

2.2.5.2 *Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen* (nach Schlapschy, 2004)

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden und zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und der angegebenen Temperatur. Falls erforderlich, wurde zusätzlich eine BSA Konzentration von 0,1 mg/ml in der Reaktionslösung eingestellt. Bei Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen. War der Unterschied der Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme allerdings zu groß, wurden die Reaktionen nacheinander unter schrittweiser Erhöhung der Salzkonzentration oder nach zwischenzeitlicher Entfernung des Enzyms und der Puffersalze durch ein Kit zur Reaktionsreinigung durchgeführt. Spaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Reaktionstemperaturen benötigten, wurden schrittweise durchgeführt. Hierbei wurde zunächst mit dem entsprechenden Enzym bei der niedrigeren Temperatur inkubiert, dann die Temperatur erhöht, das nächste Enzym zugegeben und bei dessen optimaler Reaktionstemperatur weiter inkubiert.

Bei analytischen Verdaus wurden typischerweise 0,5 µg Plasmid-DNA mit 1 bis 5 U der Restriktionsendonukleasen in einem Endvolumen von 20 µl für 1 h inkubiert. Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 1 bis 2 h durchgeführt. Hierfür wurden 2 bis 10 µg Plasmid-DNA und 20 U eines jeden Restriktionsenzymen eingesetzt. Gereinigte PCR-Fragmente wurden ebenso in einem 50 µl Ansatz mit 20 U des jeweiligen Restriktionsenzymen gespalten. Vor der weiteren Verwendung, beispielsweise zur Ligierung, wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.4.2) isoliert.

2.2.5.3 *Dephosphorylierung von DNA* (nach Schlapschy, 2004)

Zur Unterbindung intramolekularer Rezirkularisierung und der Bildung von Konkameren wurde bei der Konstruktion von Plasmiden das Vektorfragment mit der alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. Hierfür wurde 1 µl Alkalische Phosphatase ca. 1 h nach Beginn der präparativen Restriktionsspaltung (s. Abschnitt 2.2.5.2) direkt in den jeweiligen Puffer des Restriktionsansatzes zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und im Verlauf der Reinigung der DNA-Fragmente mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt (s. Abschnitt 2.2.4.2).

2.2.5.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

(nach Holla, 2012)

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

Für einen Standardansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl 2 μl 10x Puffer (Fermentas), 1 μl T4 DNA-Ligase (Fermentas, 1 U/ μl) und je 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Als Alternative wurden auch Ligierungen mit einem molaren Vektor:Insert-Verhältnis von 1:3 angesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur (RT) oder für etwa 16 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Zugabe des Insert ligiert. Die T4 DNA-Ligase wurde anschließend durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und 5 μl des Ligierungsansatzes für die Transformation von *E. coli*-Zellen (s. Abschnitte 2.2.2.1 und 2.2.2.2) verwendet.

Ligierung bei der Herstellung von Phagemidbibliotheken

Für die Herstellung der ApoD-Bibliothek wurden jeweils 20 pmol des geschnittenen Vektorfragments (1000 μl) mit je 20 pmol des geschnittenen PCR-Fragments (80 μl), welches den Pool an randomisierten Anticalin-Varianten repräsentierte, mit 400 μl 10x T4 DNA-Ligase Puffer (Promega) und 134 μl T4 DNA-Ligase (Promega, 3 U/ μl , $c_{\text{final}} = 0,1$ U/ μl) in einem Volumen von 4 ml für 72 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ligierungsansatz in 1 ml Aliquots auf vier sterile Greiner-Röhrchen aufgeteilt und mit dem gleichen Volumen (1 ml) 5 M NH_4OAc , einem 1/40 Volumen (25 μl) 10 mg/ml tRNA in TE und dem vierfachen Volumen (4 ml) Ethanol (p.a) gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (SS-34 mit Einsatz für dünnere Röhrchen, 20.000 g, 30 min, 4 °C) sedimentiert und vorsichtig mit je 2 ml 70 % Ethanol (p.a.) gewaschen. Die getrockneten DNA-Pellets wurden in insgesamt 320 μl H_2O zu einer finalen Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst und für 32 Elektroporationen mit jeweils 2 μg Ligierungsansatz verwendet.

2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

(nach Schlapschy, 2004)

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte sowie im Anschluss an *Phage Display* und Screening isolierte Plasmide wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985) nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des Instituts-eigenen ABI PRISM 310-Sequenzierautomat in Kombination mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit sequenziert.

Dieser Kit enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (AmpliTaq; Tabor & Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils

unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen als Fluorophor gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die naszierende DNA-Kette während der Polymerase-Reaktion abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Dadurch entsteht während der linearen PCR eine Serie unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die nach ihrer 3'-terminalen Base mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Diese DNA-Fragmente werden anschließend im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6) aufgetrennt und anhand ihrer Fluoreszenzgruppen detektiert. Die erhaltenen Rohdaten werden mit Hilfe der Software *DNA Sequencing Analysis 3.3* (Applied Biosystems) ausgewertet und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

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

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

(nach Schlapschy, 2004)

Durch Einsatz von Expressionsvektoren, auf denen das Strukturgen der zu produzierenden Anticaline als Fusion mit dem Gen für die bakterielle OmpA-Signalsequenz kodiert ist, erfolgte die Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli*, in dessen oxidierendem Milieu sich Disulfidbrücken ausbilden können (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden (s. Abschnitte 2.3.1.1 und 2.3.1.3). Die verwendeten A β -Fusionsproteine wurden im Cytoplasma von *E. coli* exprimiert und durch Aufschluss mit einer Hochdruckzelle gewonnen (s. Abschnitt 2.3.1.2).

2.3.1.1 *Periplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben*

(nach Schlehuber, 2001)

50 ml LB/Amp- bzw. LB/Amp/Cam-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83, BL21 oder TG1-F⁻ angeimpft und bei 30 °C, 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2 l LB/Amp- bzw. LB/Amp/Cam-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:40 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bei 22 °C, 200 rpm inkubiert. Durch regelmäßige Probennahme und Messung der OD₅₅₀ wurde das Wachstum kontinuierlich kontrolliert. Bei einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 1,5 wurde die Genexpression mit 200 µl Anhydrotetracyclin (2 mg/ml (w/v) in DMF) induziert. Die Induktionsdauer und -temperatur betrug in Abhängigkeit vom zu produzierenden Protein 2 h 30 min bei 22 °C (alle ApoD-Varianten), 3 h bzw. 5 h bei 22 °C (Lcn1'- und Lcn2'-Varianten) oder 12 h bei 20 °C (Lcn1'-Varianten). Alternativ wurden die Kulturen am Abend 1:1000 (2 ml in 2 l) angeimpft und über Nacht bei 22 °C, 200 rpm zu einer hohen OD₅₅₀ von bis zu 4,5 angezogen. Die Proteinexpression, induziert bei dieser hohen optischen Dichte, erfolgte für 5 h bei 22 °C.

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (SLA-3000, 5.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und die sedimentierten Zellen auf Eis in insgesamt 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert, in ein 50 ml Kunststoffröhrchen überführt, mit Lysozym zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 15 min, 4 °C, und dann SS-34, 15.000 rpm, 15 min, 4 °C). Der periplasmatische Extrakt wurde vor der Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins über Nacht bei 4 °C gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert. Für die Kulturen, die bei einer hohen optischen Dichte induziert bzw. die für 12 h exprimiert wurden, wurde das doppelte Volumen an Saccharose-Aufschlusspuffer verwendet. Zusätzlich wurden diese Kulturen im Anschluss an die 30minütige Inkubation zweimal direkt in SS-34 Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (SS-34, 15.000 rpm, 15 min, 4 °C).

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurde zusätzlich eine Gesamtzellprobe der Kultur im kleinen Maßstab hergestellt: 1 ml der Kultur wurde durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 2 min, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonalösung (12,5 U/ml in Benzonalpuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen unter vorsichtigem Mischen lysiert. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonalase hydrolysiert. Nach einstündiger Inkubation

auf Eis und Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) wurde das Gesamtzellprotein bei -20 °C eingefroren oder direkt mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.1.2 *Cytoplasmatische Proteinproduktion im Schüttelkolben*

Die Synthese der A β -Fusionsproteine und deren Kontrollproteine ohne das A β -Peptid erfolgte durch cytoplasmatische Produktion in *E. coli* JM83-Zellen, gefolgt vom Gesamtzellaufschluss mithilfe einer Hochdruckzelle (*French Press*). Dazu wurden 50 ml LB/Amp-Medium in einem Schüttelkolben angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 2 l LB/Amp-Medium in einem 5 l Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:40 angeimpft und bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 kultiviert. Nach Induktion mit 200 μ l Anhydrotetracyclin (2 mg/ml (w/v) in DMF) wurde die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C, 200 rpm kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (SLA-3000, 5.000 rpm, 15 min, 4 °C) vom Kulturmedium abgetrennt und in 20 ml *French-Press* Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert. Durch dreimaligen Durchgang durch die große Druckzelle (35 ml Probenvolumen) einer *French Press* wurden die Zellen bei 16.000 psi bis zum Erreichen eines klaren Lysates komplett aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile der resultierenden Suspension inklusive der Einschlusskörper wurden durch Zentrifugation (SS-34, 17.000 rpm, 20 min, 4 °C) abgetrennt. Der klare Überstand mit der löslichen Proteinfraction wurde sterilfiltriert und dann bei -20 °C gelagert oder direkt für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (s. Abschnitt 2.5.1.2) verwendet.

2.3.1.3 *Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter*

(nach Schlapschy, 2004)

Zur Herstellung größerer Mengen rekombinanter Proteine wurden die Bakterienzellen in einem 10 l Fermentergefäß in Mineralsalzmedium kultiviert, wobei Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurden (Schiweck & Skerra, 1995). Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden während des gesamten Verlaufs der Fermentation homöostatische Bedingungen gewährleistet. Als Wirtszellen wurde der *E. coli*-Stamm W3110 (Bachmann, 1972) verwendet.

Als Vorvorkultur wurden 2 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6 bis 8 h bei 37 °C, 220 rpm inkubiert. Diese Vorvorkultur wurde dann verwendet, um die eigentliche 400 ml Vorkultur im Verhältnis 1:1000 anzupfen. Die Anzucht dieser Vorkultur erfolgte für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm in 360 ml Mineralsalzlösung, der 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO₄, 400 μ l Antibiotika-Stammlösung und 400 μ l Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Zelldichte OD₅₅₀ der stationären Vorkultur betrug typischerweise 1,5 bis 2,0.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 l Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnet-rührer fixiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 30 °C temperiert und über einen Trichter mit 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO₄, je 8 ml der entsprechenden Antibiotika- sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung sowie 200 µl 30 %ige Antifoam A-Lösung versetzt. Die Belüftung erfolgte zunächst durch Druckluft, worauf dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" (Sättigungsdruck) zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert ≥ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak konstant bei pH 7,0 gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Medium wurde mit den gesamten 400 ml der stationären Vorkultur angeimpft. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und erneut 600 µl Antifoam A zugegeben.

Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose in folgenden Intervallen hinzu dosiert: ab OD₅₅₀ = 7,5 mit 28 ml/h, ab OD₅₅₀ = 12,5 mit 40 ml/h, ab OD₅₅₀ = 18,5 mit 60 ml/h und ab OD₅₅₀ = 22,5 mit 80 ml/h.

Weiterhin wurden der Kultur bei OD₅₅₀ = 13 nochmals je 4 ml Fe- und Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 20 bis 25 durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg/l Anhydrotetracyclin induziert, die Kultivierung für weitere 2 bis 2,5 h fortgesetzt und die Zellen nach Abkühlen auf 4 °C zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A-Rotor, 5.000 rpm, 30 min, 4 °C) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 1 l-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer durch Rühren für 10 min resuspendiert. Das eingesetzte Puffer-volumen betrug 2 ml l⁻¹ OD⁻¹. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg/ml Lysozym (20 mg/ml Lysozym-Stamm-lösung in Aufschlusspuffer) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (SLA-1500, 20 min, 11.500 rpm, 4 °C) grob von den Sphäroplasten getrennt und in einem zweiten Zentrifugationsschritt (SLA-1500, 40 min, 11.500 rpm, 4 °C) komplett von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde zweimal gegen 10 l Streptavidin-Puffer dialysiert. Ausgefallenes Protein und Partikel wurden im Anschluss durch Filtrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.4 Phagemidpräsentation, -selektion und -screening

2.4.1 Propagation von Helferphagen

(nach Schlehuber, 2001)

50 ml 2xYT-Medium wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtkultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue in 2xYT/Tet angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,3$ wurden 10 ml der Kultur abgenommen und in einen auf 37 °C vorgewärmten, zuvor sterilisierten 50 ml-Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Zellen wurden mit 2×10^{10} plaque forming units (pfu) VCS-M13 Helferphagen (Stratagene) entsprechend einer *multiplicity of infection* (moi) von 10 infiziert und für 30 min bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur auf eine Kanamycin-Konzentration von 25 µg/ml eingestellt und zur Produktion der Helferphagen für 8 h bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Im Anschluss an die 8 h wurde die Kultur zunächst im Wasserbad für 10 min auf 65 °C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt, in ein hitzesterilisiertes SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (SS-34, 12.000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand mit den Helferphagen wurde in ein 15 ml-Kunststoffröhrchen filtriert (0,45 µm) und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

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

2.4.2 Präparation rekombinanter Phagemide

Rekombinante Phagemide wurden ausgehend von den Phasmidvektoren pTlc27, pApoD19_IN90, einer löslichkeitsverbesserten Variante des Vektors pApoD19 (Vogt & Skerra, 2004), und pNGAL102 (Gebauer & Skerra, 2012) produziert. pTlc27 besitzt die für die Replikation und Verpackung als einzelsträngige Phasmid-DNA erforderliche

intergenische Region des filamentösen Phagen f1 und kodiert unter Kontrolle des streng regulierten Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems ($tet^{P/o}$, Skerra, 1994) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, einer Lcn1'-Variante, dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel, dem *Amber*-Stopcodon und einer C-terminalen, verkürzten Form des Phagenhüllproteins pIII entsprechend den Aminosäuren 217 bis 406 ($\Delta\Delta$ pIII). pApoD19_IN90 und pNGAL102 kodieren auf ähnliche Weise, allerdings ohne *Strep*-tag II, für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, einer ApoD- bzw. Lcn2'-Variante, dem *Amber*-Stopcodon, gefolgt von der ungekürzten Form des Phagenhüllproteins pIII entsprechend den Aminosäuren 3 bis 406 (pIII). Alle Phasmidvektoren tragen das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase als Resistenzmarker (*cat*).

2.4.2.1 Produktion von Phagemidbibliotheken

(nach Holla, 2012)

Zur Herstellung der naiven ApoD-Bibliothek wurden die Anticalin-Varianten in Form von Phasmidvektoren durch Elektroporation in Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue transformiert. Durch anschließende Infektion der transformierten Zellen mit Helferphagen und Induktion der Genexpression der ApoD-pIII-Fusionsproteine wurden Phagemide generiert, welche die ApoD-Varianten auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die Phagemide wurden in mehreren Schritten gereinigt.

Nach Elektroporation der Phasmid-DNA in Form gefällter Ligierungsansätze (s. Abschnitt 2.2.2.2, 31 Elektroporationen mit je 2 μ g DNA je 100 μ l *E. coli*-Zellen) wurde die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Zur Ermittlung der Diversität der Bibliothek wurde ein Aliquot dieser Zellsuspension abgenommen, Verdünnungen in LB-Medium bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-6} hergestellt und auf LB/Cam-Agarplatten ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wurde in 4 l 2xYT/Cam zu einer OD_{550} von 0,2 verdünnt und anschließend in zweimal 2 l bis zu einer OD_{550} von ca. 0,6 bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Nach Verdünnung der Zellsuspension zu einer OD_{550} von 0,2 wurde erneut eine Probe entnommen, Verdünnungen in LB-Medium bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} hergestellt und auf LB/Cam-Agarplatten ausplattiert. Bei einer OD_{550} von ca. 0,6 wurden die zwei 2 l Zellsuspensionen vereinigt und gemischt. Zwei 1 l Kulturen wurden zur Herstellung der Phagemide bzw. zur Herstellung von Glycerin-Kulturen verwendet. Die restlichen 2 l Zellsuspension wurden verworfen.

Zur Herstellung der Glycerin-Kulturen und Midi-Präparationen wurde 1 l Zellsuspension bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD_{550} von 2 inkubiert. Mit 20 ml dieser Zellsuspension wurde eine Midi-Präparationen in einem Volumen von 200 ml angesetzt, bei 37 °C, 200 rpm für 14 h inkubiert, in 4x 50 ml aufgeteilt, zentrifugiert und bei -20 °C als Zellpellet zur späteren Reinigung der Phasmid-DNA gelagert. Die restlichen 0,98 l Zellsuspension wurden bei einer OD_{550} von 2 zentrifugiert (SLA-3000, 15 min, 5.000 rpm, 4 °C), in 12 ml sterilem

2xYT/20 % Glycerin resuspendiert, auf Kryoröhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung der Phagemide wurde 1 l der Zellsuspension bei einer OD₅₅₀ von 0,6 mit $3,9 \times 10^{12}$ VCS-M13 Helferphagen, entsprechend einer moi von 10, infiziert. Zur Berechnung der benötigten Anzahl an Helferphagen wurde vorausgesetzt, dass eine OD₅₅₀ von 0,26 ca. $1,6 \times 10^8$ *E. coli* XL1-Blue-Zellen pro 1 ml Suspension entspricht. Nach 45minütiger Inkubation bei 37 °C, 200 rpm wurde eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt, für weitere 10 min bei 26 °C und 160 rpm inkubiert und schließlich die Synthese der ApoD-Fusionsproteine durch Zugabe von Anhydrotetracyclin in einer Endkonzentration von 25 µg/l induziert. Die Expression erfolgte für 7 h bei 26 °C, 160 rpm.

Im Anschluss an die Produktion der Phagemide wurde die Kultur in sterilen SLA-3000 Zentrifugenbecher zentrifugiert (SLA-3000, 18.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde mit einem 1/4 Volumen gekühltem, sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für 2 bis 5 h auf Eis gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation präzipitiert (SLA-3000, 18.000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand gründlich entfernt, das Präzipitat in 30 ml sterilem, gekühltem BBS/E mit 50 mM Benzamidin gelöst und in sterile SS-34 Röhrchen überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (SS-34, 40.000 g, 10 min, 4 °C), der Überstand filtriert (0,45 µm) und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen gekühltem, sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für 1 h auf Eis gefällt. Die zweifach gefällten Phagemide wurden auf sterile Kryoröhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Mit 3 Aliquots der frisch hergestellten Bibliothek wurde im Anschluss sofort ein *Phage Display*-Selektionsexperiment durchgeführt. Hierfür wurden die Phagemide in den 2 ml Reaktionsgefäßen zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 30 min, 4 °C) und nach vollständiger Entfernung des Überstandes in je 280 µl filtriertem, gekühltem PBS mit 50 mM Benzamidin gelöst. Die Lösungen wurden für 20 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile erneut zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der, die Phagemide enthaltene, Überstand wurde für die Affinitätsanreicherung verwendet (s. Abschnitt 2.4.3).

2.4.2.2 Amplifizierung selektierter Phagemide

(nach Holla, 2012)

Die Elutionsfraktionen der Phagemide aus den einzelnen *Phage Display*-Selektionszyklen (s. Abschnitt 2.4.3) wurden vor der nächsten Runde an Affinitätsanreicherung amplifiziert. Hierzu wurden 50 ml 2xYT/Cam-Medium mit einer stationären Übernachtskultur von *E. coli* XL1-Blue in einem Verhältnis von 1:100 bis 1:1000 angeimpft und bei 37 °C, 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Phagemide der Elutionsfraktion wurden kurz vor der Infektion auf 37 °C temperiert und dann zu 4 ml der exponentiell wachsenden Kultur

gegeben und bei 37 °C, 200 rpm für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (Sigma 4K10, 4.000 rpm, 5 min, 4 °C), in 1,2 ml LB-Medium resuspendiert und auf drei große LB/Cam-Agarplatten (Durchmesser: 14 cm) ausplattiert. Zusätzlich wurden 1 ml *E. coli* XL1-Blue-Zellen zu den nach der Elution in 100 µl PBS resuspendierten paramagnetischen Partikeln gegeben und analog bei 37 °C, 200 rpm inkubiert. Nach Entfernen der paramagnetischen Partikel wurde diese Zellsuspension auf eine weitere große LB/Cam-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 32 °C für 14 h. Der erhaltene Zellrasen wurde vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers unter Zugabe von 10 ml 2xYT/Cam-Medium pro Platte abgeschabt und vereinigt.

Nach Bestimmung der Zelldichte wurden 50 ml 2xYT/Cam-Medium mit der Zellsuspension zu einer OD₅₅₀ von 0,08 bis 0,1 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 kultiviert. Daraufhin wurde die Kultur mit $1,5 \times 10^{11}$ VCS-M13 Helferphagen, entsprechend einer moi von 10, infiziert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C, 200 rpm wurde eine Kanamycin-Endkonzentration von 70 mg/l eingestellt, für weitere 10 min bei 26 °C und 160 rpm inkubiert und schließlich die Synthese der Anticalin-Fusionsproteine durch Zugabe von Anhydrotetracyclin in einer Endkonzentration von 25 µg/l induziert. Die Expression erfolgte für 7 h bei 26 °C, 160 rpm.

Die Kultur wurde in sterile SS-34 Röhrchen überführt, zentrifugiert (SS-34, 12.100 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand in zwei neue, sterile SS-34 Röhrchen aufgeteilt und die Phagemide mit 1/4 Volumen vorgekühltem, sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl über Nacht auf Eis gefällt. Die Phagemide wurden durch Zentrifugation präzipitiert (SS-34, 18.000 g, 20 min, 4 °C), der Überstand gründlich entfernt und das Präzipitat in jeweils 1 ml sterilem, gekühltem BBS/E mit 50 mM Benzamidin gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden ungelöste Bestandteile mittels Zentrifugation abgetrennt (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der Phagemide enthaltene Überstand wurde jeweils in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Phagemide erneut durch Zugabe von 1/4 Volumen gekühltem, sterilem 20 % (w/v) PEG 8000, 15 % (w/v) NaCl für mindestens 30 min auf Eis gefällt. Anschließend wurden die gefällten Phagemide erneut präzipitiert (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 30 min, 4 °C) und nach vollständigem Entfernen des Überstandes in je 280 µl sterilem, gekühltem PBS mit 50 mM Benzamidin gelöst. Die Lösungen wurden für weitere 20 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der die Phagemide enthaltene Überstand wurde für die nächste Runde *Phage Display* verwendet (s. Abschnitt 2.4.3).

2.4.3 Affinitätsanreicherung rekombinanter Phagemide

(nach Holla, 2012)

Als Targets zur Selektion rekombinanter Phagemide aus den randomisierten Anticalin-Bibliotheken wurden biotinylierte A β -Peptide oder mit Digoxigenin (DIG)-markierte A β -Fusionsproteine (s. Abschnitt 2.5.5) in Kombination mit Streptavidin- bzw. anti-DIG-paramagnetischen Partikeln verwendet.

Affinitätsanreicherung an mit A β -Peptiden beladenen paramagnetischen Partikeln

Im ersten *Phage Display*-Experiment mit der randomisierten Lcn1'-Bibliothek unter Verwendung der kurzen biotinylierten Peptide A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio wurden die paramagnetischen Streptavidin-Partikel zunächst mit den Peptiden beladen, bevor diese zwecks Selektion mit der Phagemid-Bibliothek inkubiert wurden. Hierfür wurden 500 μ g Streptavidin-Partikel dreimal mit jeweils 500 μ l PBS/T (PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen. Dabei wurden die Partikel in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß durch Rotation für jeweils 1 min in Suspension gehalten und anschließend mit Hilfe eines Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes gesammelt, so dass der Überstand möglichst vollständig abgezogen werden konnte. Im Anschluss wurden die gewaschenen Partikel in 400 μ l einer äquimolaren Mischung der biotinylierten Peptide A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio (je 1 pmol/ μ l in PBS) resuspendiert und unter Rotation für 30 min bei RT inkubiert. Die Partikel wurden erneut dreimal mit 500 μ l PBS/T gewaschen und dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 400 μ l 2 % (w/v) BSA in PBS/T für 1 h bei RT rotiert. Parallel wurden 300 μ l Phagemidlösung mit 10^{11} bis 10^{12} der rekombinanten Phagemidpartikel (s. Abschnitte 2.4.2.1 und 2.4.2.2) mit 100 μ l 8 % (w/v) BSA in PBS/0,4 % Tween versetzt und für 1 h bei RT rotiert.

Nach diesem Blockierungsschritt wurden die mit A β -Peptiden beladenen Streptavidin-Partikel in dieser Phagemidlösung (400 μ l) resuspendiert und für 1 h bei RT rotiert. Um zu vermeiden, dass Phagemide durch die Interaktion zwischen dem *Strep*-tag II und Streptavidin auf den paramagnetischen Partikeln gebunden werden, wurden daraufhin 10 μ l einer Lösung von 4 mM D-Desthiobiotin in PBS zugegeben und die Suspension für weitere 15 min rotiert. Die extrem starke Bindung zwischen Streptavidin und der Biotingruppe ($K_D = 10^{-14}$ bis 10^{-15}) des Target-Peptids wurde hiervon nicht beeinflusst.

Zur Entfernung nicht gebundener Phagemide wurden die paramagnetischen Partikel zehnmal mit jeweils 500 μ l PBS/T gewaschen, mit Hilfe des Magneten gesammelt, und der Überstand abgezogen. Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte unter sauren Bedingungen durch 13minütige Rotation der resuspendierten Partikel in 350 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand, welcher die eluierten Phagemide enthielt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der pH-Wert durch Zugabe von 55 μ l 0,5 M Tris sofort neutralisiert. Zur Amplifizierung der Phagemide (s. Abschnitt 2.4.2.2) sowie

zur Titerbestimmung (s. Abschnitt 2.4.4) wurden exponentiell wachsende *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Elutionsfraktion und den zu analysierenden Waschfraktionen, sowie einer Probe der anfänglich eingesetzten Phagemidlösung infiziert.

Affinitätsanreicherung in Lösung

Alle weiteren Selektionsexperimente, sowohl mit der Lcn1'-Bibliothek als auch mit den ApoD- und Lcn2'-Bibliotheken, wurden „in Lösung“ durchgeführt, das heißt die Phagemide wurden zuerst mit den markierten A β -Peptiden bzw. A β -Fusionsproteinen inkubiert, und anschließend wurden die dabei gebildeten Komplexe aus Phagemid und A β -Target über die Biotin- bzw. Digoxigenin-Gruppe an den paramagnetischen Partikeln gebunden und abgetrennt.

Hierzu wurden bei jedem Selektionszyklus 500 μ g und ab Runde 2 – in einem zusätzlichen Ansatz (s. u.) - 250 μ g Streptavidin- bzw. Anti-DIG-Partikel wie oben beschrieben dreimal mit jeweils 500 μ l PBS/T gewaschen und daraufhin mit 400 μ l 2 % (w/v) Blockierungsreagenz (BSA bzw. Magermilchpulver) in PBS/T blockiert.

Parallel wurden 200 bis 300 μ l Phagemidlösung mit 10^{11} bis 10^{12} der rekombinanten Phagemidpartikel (s. Abschnitte 2.4.2.1 und 2.4.2.2, Volumen abhängig vom später eingesetzten Volumen des Zielproteins) zum Blockieren mit 100 μ l 8 % (w/v) Blockierungsreagenz in PBS/0,4 % Tween versetzt und für 1 h bei RT rotiert. Zwecks Abreicherung unspezifisch bindender Phagemide wurde die blockierte Phagemidlösung ab Selektionsrunde 2 mit 250 μ g der gewaschenen, blockierten paramagnetischen Partikel in Abwesenheit eines Targets für 30 min bei RT rotiert (negative Vorselektion). Im Anschluss wurden die paramagnetischen Partikel mit Hilfe des Magneten an der Wand des Reaktionsgefäßes gesammelt und der Überstand für die eigentliche Selektion verwendet.

Im Fall biotinylierter A β -Peptide wurden diese in einer Endkonzentration von 100 nM (Endvolumen 400 μ l, 40 pMol Peptid) zu der Phagemidlösung pipettiert und für 1 h bei RT unter Rotation inkubiert. Im Fall des DIG-markierten A β -Fusionsproteins Trx-A β 28 wurden die blockierten Phagemide zunächst zur Entfernung potentiell Thioredoxin-bindender Anticaline mit einem hohen Überschuss an 15 μ M Trx für 30 min bei RT rotiert und erst danach wurde DIG-markiertes Trx-A β 28 in einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben und die Mischung für eine weitere Stunde rotiert.

Die blockierten paramagnetischen Partikel (50 μ l) wurden direkt nach Entfernen des Blockierungsreagens in dem Gemisch aus markiertem A β -Target und Phagemiden resuspendiert und für 15 min (Streptavidin-Partikel) bzw. 30 min (anti-DIG-Partikel) bei RT rotiert. In diesem Schritt binden die markierten A β -Peptide/A β -Fusionsproteine allein oder in

Komplex mit A β -spezifischen Phagemiden an die paramagnetischen Partikel. Im Fall der Lcn1'-Bibliothek in Kombination mit Streptavidin- Partikeln wurde, wie auch oben beschrieben, 10 μ l einer Lösung von 4 mM D-Desthiobiotin in PBS zugegeben und die Suspension für weitere 15 min inkubiert. Die Anticalin-pIII-Fusionsproteine in den Phagemidbibliotheken der ApoD- und Lcn2'-Varianten enthielten kein *Strep*-tag II, weshalb dieser Schritt nicht notwendig war.

Wie bei der vorherigen Vorschrift wurden die paramagnetischen Partikel zur Entfernung nicht gebundener Phagemide zehnmal mit jeweils 500 μ l PBS/T gewaschen, mit Hilfe des Magneten gesammelt, und der Überstand abgezogen. Gebundene Phagemide wurden mit unterschiedlichen Methoden eluiert, wie im folgenden Absatz beschrieben. Zur Amplifizierung der Phagemide (s. Abschnitt 2.4.2.2) sowie zur Titerbestimmung (s. Abschnitt 2.4.4) wurden im Anschluss an die Elution exponentiell wachsende *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit den unterschiedlichen Phagemidfraktionen infiziert. Um ggf. Anticalin-Varianten mit sehr niedriger Dissoziationsrate ebenfalls zu amplifizieren, wurden zusätzlich die in 100 μ l PBS resuspendierten paramagnetischen Partikel nach dem letzten Elutionsschritt mit 1 ml exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Blue-Zellen gemischt, für 30 min bei 37 °C, 200 rpm inkubiert und nach Entfernen der paramagnetischen Partikel auf einer großer LB/Cam-Platte (Durchmesser 14 cm) ausplattiert.

Die „saure Elution“ erfolgte durch 13minütige Rotation der resuspendierten Partikel in 350 μ l 0,1 M Glycin/HCl pH 2,2. Nach Sammeln der Partikel am Magneten wurde der Überstand mit den eluierten Phagemiden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 55 μ l 0,5 M Tris sofort neutralisiert. Bei der „basischen Elution“ wurden die resuspendierten Partikel für 20 min in 400 μ l frisch hergestellter 0,1 M Triethylaminlösung (pH ~11,5: 700 μ l 99,5 % Triethylamin in 50 ml H₂O) unter Rotation inkubiert und der Überstand sofort mit 200 μ l 1 M Tris/HCl pH 7,4 neutralisiert. Bei der „denaturierenden Elution“ wurden die resuspendierten Partikel für 30 min in 400 μ l frisch hergestellter 4 M Harnstofflösung in PBS rotiert. Um die Konzentration des Denaturierungsreagens anschließend zu verringern wurde das Volumen des Überstandes durch Zugabe von PBS auf 2 ml erhöht. Bei der „kompetitiven Elution“, welche in Runde 3 und 4 einiger *Phage Display*-Experimente angewandt wurde, wurden die resuspendierten Partikel mit einem hohen Überschuss an nicht markiertem A β -Fusionsprotein (50 μ M Trx-A β 28; 360 μ l) für 1 h bei RT inkubiert.

Die eluierten Phagemide wurden schließlich amplifiziert (s. Abschnitt 2.4.2.2) und dem nächsten Selektionszyklus zugeführt. Zusätzlich wurden die Titer ausgewählter Fraktionen bestimmt (s. Abschnitt 2.4.4).

2.4.4 Titerbestimmung von Phagemidlösungen

(nach Schlehuber, 2001)

Um den Verlauf der Selektion beurteilen zu können, wurden nach jedem Anreicherungszyklus (s. Abschnitt 2.4.3) die Phagemidtitertiter der eingesetzten Phagemide, der Phagemide in ausgewählten Waschfraktionen sowie der Phagemide in der Elutionsfraktion bestimmt.

Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Phagemidlösungen in sterilem PBS hergestellt, wobei die Verdünnungsstufen in Abhängigkeit der analysierten Fraktion sowie der Selektionsrunde variierten. Zu 20 µl der auf 37 °C temperierten Phagemidverdünnungen wurden 180 µl einer exponentiell wachsenden *E. coli* XL1-Blue Kultur (s. Abschnitt 2.4.2.2) pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Bakterienkultur wurde zusätzlich ein Ansatz nur mit PBS hergestellt. Die Zellen wurden anschließend kurz auf Eis gestellt und 100 µl der Suspension auf LB/Cam-Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurde der Phagemidtitertiter durch Zählen der Kolonien als cfu/ml bestimmt und um den Verdünnungsfaktor korrigiert.

2.4.5 Kolonie-Filterstapel-Test

(nach Holla, 2012)

Die *Phage Display*-Selektionen mit A β -Peptiden bzw. A β -Fusionsproteinen führten zu einer relativen Anreicherung von Anticalin-Varianten aus den Bibliotheken. Um aus den Elutionsfraktionen schließlich diejenigen Varianten zu isolieren, die die höchste Bindungsaktivität für A β besaßen, wurde u.a. der Kolonie-Filterstapel-Test eingesetzt (Rauth *et al.*, 2010; Skerra *et al.*, 1991a). Hierzu wurden die selektierten Anticalin-Varianten als Fusion mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) aus *Streptococcus* G148 produziert, welche die funktionelle Immobilisierung der Fusionsproteine über die Interaktion mit humanem Serumalbumin (HSA) ermöglicht (Konig & Skerra, 1998).

Trx-A β 28 bzw. diverse A β -Peptide wurden als Liganden im Kolonie-Filterstapel-Test eingesetzt. Um Trx-A β 28 nachweisen zu können, wurden Konjugate mit Digoxigenin bzw. Biotin hergestellt (s. Abschnitt 2.5.5). Chemisch synthetisierte A β -Peptide besaßen bereits C-terminale Biotingruppen und mussten daher nicht weiter modifiziert werden.

Mit den infizierten *E. coli*-Zellen, welche nach den finalen Zyklen der *Phage Display*-Selektionen von den LB/Cam-Agarplatten abgeschabt wurden (s. Abschnitt 2.4.2.2), wurden 50 ml LB/Cam-Medium zu einer resultierenden OD₅₅₀ von 0,5 bis 1 inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C, 200 rpm für 10 h bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt und die Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits nach Herstellerangaben isoliert.

Die DNA wurde anschließend mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI geschnitten (s. Abschnitt 2.2.5.2) und das kleinere der beiden Fragmente durch präparative Agarose-

Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.4.2) abgetrennt und gereinigt. In gleicher Weise wurden die Vektoren pTlc28, pApoD12_IN90 und pNGAL124 geschnitten und das größere der beiden Fragmente isoliert. Diese Vektoren kodieren jeweils für die Lipocalin-Ausgangsvariante als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II und der ABD unter Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems. Zur Ligierung wurden jeweils 50 fmol der beiden DNA-Fragmente eingesetzt (s. Abschnitt 2.2.5.4). Mit 5 μ l des Ligierungsansatzes wurden 200 μ l kompetente Zellen des Stammes *E. coli* TG1-F⁻ transformiert (s. Abschnitt 2.2.2.1). Die durch *Phage Display*-Selektion angereicherten Teilbibliotheken wurden somit aus den Plasmidvektoren pTlc27, pApoD19_IN90 und pNGAL102 in die oben genannten Expressionsvektoren kloniert, so dass die Varianten als Fusionsprotein mit der ABD im Periplasma von *E. coli* produziert werden konnten.

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

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene, hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon P, Porengröße 0,45 μ m) konsekutiv für jeweils 5 min mit 20 ml Methanol, dann mit 20 ml Wasser und dann mit 20 ml PBS aktiviert. Anschließend wurde sie für 4 h bei RT in 10 ml 10 mg/ml HSA in PBS geschwenkt. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 10 ml 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS für 2 h bei RT gesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 10 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium, dem 200 μ g/l Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, geschwenkt. Anschließend wurde sie auf eine Induktionsplatte (LB/Amp-Agar plus 200 μ g/l Anhydrotetracyclin) gelegt.

Die vorbereitete, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin auf die hydrophobe Membran platziert. Zur Markierung der Orientierung wurden beide Membranen an drei bis vier Stellen mit einer Nadel durchstoßen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 14 h inkubiert. Während dieser Phase wurden die jeweiligen Anticalin-Varianten als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und mittels Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und HSA auf der unteren, hydrophoben Membran immobilisiert.

Danach wurde die obere, hydrophile Membran mit den Kolonien auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C für die spätere Amplifizierung der einzelnen Klone aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde abgenommen, dreimal für jeweils 5 min mit 20 ml PBS/T gewaschen und anschließend für 1 h in 8 ml einer 100 nM Lösung der Biotin- bzw. Digoxigenin-markierten A β -Peptide bzw. A β -Fusionsproteine in PBS/T unter Agitation

inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss dreimal für 5 min mit 10 ml PBS/T gewaschen. Um gebundene, biotinylierte A β -Moleküle nachzuweisen, wurde die Membran für 1 h mit 8 ml eines ExtrAvidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugates (1:5000 in PBS/T) unter Agitation inkubiert. Digoxigenin-markierte A β -Fusionsproteine wurden durch Inkubation in 8 ml eines Anti-DIG-Fab-Alkalische-Phosphatase-Konjugates (1:1500 in PBS/T) nachgewiesen. Die Membran wurde danach zweimal für 5 min mit 10 ml PBS/T und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Für die chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 μ l 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP, 50 μ g/ml in DMF) und 5 μ l Nitro Blue Tetrazolium (NBT, 75 μ g/ml in 70 % (v/v) DMF) zugesetzt waren, inkubiert bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Auf diese Weise wurde die Bindungsaktivität der von diesen Kolonien produzierten Anticalin-Varianten für A β nachgewiesen. Kolonien, die starke Farbsignale aufwiesen, wurden ausgewählt, ihre DNA isoliert (s. Abschnitt 2.2.3.1) und sequenziert (s. Abschnitt 2.2.6).

2.4.6 Screening-ELISA

Eine alternative Methode zum Kolonie-Filterstapel-Test (s. Abschnitt 2.4.5), welche im Anschluss an *Phage Display*-Selektionen zur Identifizierung von A β -spezifischen ApoD- und Lcn2'-Varianten verwendet wurde, ist der Screening-ELISA. Hierfür wurden Anticalin-Varianten im 96-Well Format exprimiert und auf ihre Bindungsaktivität für in der Mikrotiterplatte immobilisierte A β -Fusionsproteine getestet. Gebundene Anticaline wurden über ihren *Strep*-tag II nachgewiesen.

Wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben, wurde im Anschluss an die einzelnen *Phage Display*-Runden die DNA der angereicherten Varianten in Form einer Midi-Prep isoliert und das *Bst*XI-Insert aus der Phasmid-DNA präpariert. Dieses *Bst*XI-Insert wurde für den Screening-ELISA in die Vektoren zur Expression von löslichen Anticalinen pApoD_IN90 bzw. pNGAL98 kloniert. Die Ligierungsansätze wurden in den *E. coli*-Stamm TG1-F transformiert und auf LB/Amp-Agarplatten kultiviert. Von diesen Platten wurden Starterkulturen im 96-Well Format (Multiple Well Platten 96 round bottom, Sarstedt) in 100 μ l TB/Amp angesetzt und bei 37 °C, 700 rpm über Nacht in einem temperierbaren Schüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, mit verschließbarem Mikrotiterplattenaufsatz) inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit diesen Übernacht-Kulturen unter Verwendung des 96-Well Replikators neue Platten mit 100 μ l TB/Amp-Medium angeimpft. Die Platten wurden bei 22 bzw. 37 °C, 700 rpm bis zum Erreichen der exponentiellen Phase inkubiert. Bei einer OD₅₅₀ von ca. 0,5 (gemessen im 96-Well Format, korrigiert durch die Hintergrundabsorption) wurde die Expression der einzelnen Anticalin-Varianten mit aTc in einer Endkonzentration von 0,2 μ g/ml induziert. Die Temperatur wurde auf 20 °C reduziert und die Anticaline für 13 bis 17 h exprimiert. Parallel wurden 50 μ l der A β -Fusionsproteine bzw. Kontrollproteine in einer

Konzentration von 10 bis 100 µg/ml in PBS bei 4 °C über Nacht in der entsprechenden Anzahl Nunc MaxiSorp-Platten immobilisiert. Zum Erhalt der genetischen Information der analysierten Anticaline und zur späteren Amplifizierung positiver Varianten wurden die Starterkulturen mit 30 µl 87 % Glycerin in H₂O gemischt und bei -20 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Zellrohextrakte unter Zugabe von 40 µl BBS-Puffer mit 1 mg/ml Lysozym unter Schütteln bei 750 rpm für 1 h bei 4 °C präpariert und die löslichen Proteine freigesetzt (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Nach dem Aufschluss wurden die Lysate unter weiterem Schütteln für 1 h bei 4 °C mit 40 µl 10 % (w/v) BSA in PBS/0,5 % Tween blockiert (Endkonzentration: 2 % BSA, 0,1 % Tween). Unlösliche Bestandteile wurden im Anschluss durch Zentrifugation (5.000 rpm, 10 min, 4 °C) entfernt und die Lysate für den ELISA verwendet.

Für den ELISA wurden 60 µl der geblockten Lysate in eine mit Trx-Aβ28 immobilisierte und mit 3 % BSA in PBS/T blockierte ELISA-Platte transferiert und unter leichtem Schütteln (300 rpm) für 90 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Platten dreimal mit PBS/T gewaschen und gebundene Anticaline über den *Strep*-tag II mit 50 µl *Strep*-Tactin-AP (1:1500 in PBS/T) nachgewiesen. Nach 1 h Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden jeweils 100 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat gelöst in AP-Puffer zupipettiert. Die Platte wurde in das auf 37 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt. Nach fünfminütiger Äquilibration wurde die Absorption bei 405 nm als Endwert gemessen. Um intensivere Signale zu erhalten, wurden die Platten zusätzlich nach 1 h Inkubation bei 37 °C ein zweites Mal gemessen. Vielversprechende Varianten wurden in einem sekundären Screening-ELISA verifiziert (Bindung an Trx-Aβ28, keine Bindung an das Kontrollprotein Trx) und falls erfolgreich der DNA-Isolierung (s. Abschnitt 2.2.3.1) und Sequenzanalyse (s. Abschnitt 2.2.6) unterzogen.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Chromatographische Verfahren

2.5.1.1 *Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose* (nach Schlehuber, 2001)

Die Reinigung rekombinanter, mit einem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel fusionierter Proteine erfolgte aus der periplasmatischen *E. coli*-Zellfraktion mit Hilfe der Streptavidin (SA)-Affinitätschromatographie (Schmidt & Skerra, 2007).

Die Periplasmafraktion (s. Abschnitt 2.3.1) wurde zunächst über Nacht bei 4 °C gegen das ca. 100fache Volumen an Streptavidin-Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die

Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten und DNA filtriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997) wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (verfolgt anhand der Absorption bei 280 nm) mit Streptavidin-Puffer gespült. In Abhängigkeit vom Volumen an Periplasmafraktion und von der erwarteten Ausbeute an rekombinanten Proteinen wurden unterschiedliche Bettvolumina zur Chromatographie verwendet. Bei einem Bettvolumen von 2 ml wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flussrate von ca. 30 ml/h durchgeführt, bei einem Bettvolumen von 4 ml bei ca. 48 ml/h und bei einem Bettvolumen von 20 ml bei einer konstanten Flussrate von 90 bis 120 ml/h.

Die Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit Streptavidin-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats den Ausgangswert erreicht hatte. Die über das *Strep*-tag II gebundenen, rekombinanten Proteine wurden daraufhin mit einer Lösung von 2,5 mM D-Desthiobiotin in Streptavidin-Puffer eluiert und in unterschiedlichen Fraktionen gesammelt. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA (2'-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure) in Streptavidin-Puffer entfernt bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung zeigte. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit 100 mM Tris pH 11,5 gefolgt von Spülen mit Streptavidin-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden mittels SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und üblicherweise bei 4 °C bis zur weiteren Reinigung gelagert.

2.5.1.2 *Metallchelate-Affinitätschromatographie* (nach Schlehuber, 2001)

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindung von funktionellen Gruppen des Proteins, vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten, an immobilisierte Übergangsmetallionen. Vor allem künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen, beispielsweise in Form des Hexa-Histidin-tags (His₆), können aufgrund ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen zur Reinigung von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden (Hochuli, 1988; Skerra *et al.*, 1991b). In dieser Arbeit wurde hierfür eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner und Zn²⁺ als Übergangsmetallion eingesetzt. Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente das C-terminale His₆-tag.

Zur Isolierung von rekombinanten Proteinen aus 5 ml löslichem Cytoplasmaextrakt wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 8 ml verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Detektion der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm dokumentiert. Der cytoplasmatische Proteinextrakt (s. Abschnitt 2.3.1.2) wurde filtriert (0,45 µm) und direkt, ohne vorherige Dialyse, auf die Säule aufgetragen.

Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von ca. 120 ml/h betrieben und mit 80 ml, entsprechend 10 Säulenvolumina, Wasser gespült. Dann wurde die Säule mit 80 ml 10 mM ZnSO₄ beladen, erneut mit 80 ml Wasser gespült und schließlich mit 80 ml IMAC-Puffer äquilibriert.

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte bei einer reduzierten Flussrate von ca. 60 ml/h. Nachdem der cytoplasmatische Proteinextrakt auf die Säule aufgetragen worden war, wurde zunächst bis zum Erreichen der Basislinie mit IMAC-Puffer gespült. Im Anschluss wurden die an die Säule gebundenen Proteine durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit einem Volumen von 160 ml von einem Gradienten von 0 bis 250 mM Imidazol (IMAC-Elutionspuffer) eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 5 ml aufgefangen und mit EDTA zu einer Endkonzentration von 5 mM versetzt. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn²⁺-Ionen mit 80 ml IMAC-Regenerierungspuffer und anschließend mit 80 ml Wasser gespült.

Der Proteingehalt der unterschiedlichen Fraktionen und deren Reinheit wurden mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an reinem, rekombinatem Protein wurden vereinigt, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und üblicherweise bei 4 °C bis zur weiteren Reinigung gelagert.

2.5.1.3 Größenausschlusschromatographie (nach Holla, 2012)

Die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) ermöglicht die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe und Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes und zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen im Anschluss an die Affinitätschromatographie (s. Abschnitte 2.5.1.1 und 2.5.1.2) verwendet.

Die für die Größenausschlusschromatographie verwendeten Chromatographiepuffer wurden filtriert und durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum unter Rühren für 30 min bei RT entgast. Die Chromatographie wurde mit einem Äkta Purifier oder Äkta Explorer HPLC-System (GE Healthcare Europe GmbH) betrieben, wobei die Proteine durch Absorptionsmessung bei 280 nm mit Hilfe eines Durchflussdetektors detektiert wurden.

Je nach Menge und Größe des zu analysierenden oder präparierenden Proteins wurde eine Superdex 75 HR 10/30, eine Superdex 200 HR 10/30 oder eine Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade Säule unter Verwendung von üblicherweise PBS als Laufpuffer eingesetzt. Zur Reinigung von Proteinen für die CD-Spektroskopie wurde die Größenausschlusschromatographie direkt in CD-Puffer durchgeführt. Proteine für die Kristallographie wurden in der Regel in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 115 mM NaCl gereinigt. Die Säule wurde zunächst bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min (Superdex 75 oder 200 HR 10/30) oder 1 ml/min

(Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade) mit dem doppelten Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Danach wurde die Proteinlösung mittels einer 0,5 bzw. 2 ml Probenschleife auf die Säule appliziert und über einen Fraktionskollektor Fraktionen von 0,5 bzw. 1 ml gesammelt. Die Elution erfolgte mit dem einfachen Säulenvolumen Laufpuffer. Anschließend wurde die Säule jeweils mit einem einfachen Säulenvolumen H₂O und 0,5 M NaOH und mit einem doppelten Säulenvolumen H₂O regeneriert und in 20 % Ethanol gelagert.

Zur Bestimmung der molekularen Masse der Proteine wurden die Säulen mit globulären Standardproteinen kalibriert. Je nach Porengröße der verwendeten Säule (Superdex 75 oder Superdex 200) wurde eine Selektion der folgenden Standardproteine verwendet: Apo-Ferritin (440 kDa), β -Amylase (200 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa).

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Schlapschy, 2004)

Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling und Gregerson (Fling & Gregerson, 1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird hierbei durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen Masse des Proteins. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 12 %ige oder 15 %ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht.

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm und einer Dicke von 0,75 mm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten und einer Gummidichtung zusammengebaut. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt 1,25 ml 4x Lower-Tris, 2,5 ml einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid und 1,25 ml H₂O. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,25 μ l TEMED und 25 μ l 10 % (w/v) APS wurden 4,5 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet um Luftzutritt zu vermeiden und eine gleichmäßige Trenngelgrenzfläche zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol abgossen und das Gel mit Wasser gespült. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 μ l TEMED und 18 μ l 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde gemischt und auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Geltaschenformer mit zehn

Taschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Metallklammern und die Gummidichtung vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probentaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA bis zum Austreten des Bromphenolblau-Markers aus dem unteren Ende des Trenngels (ca. 2 h) betrieben. Daraufhin wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und für 30 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel in Aufbewahrungslösung gelagert.

2.5.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

(nach Holla, 2012)

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

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

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

Protein/Peptid	ε_{280} [M ⁻¹ cm ⁻¹]	MW [g mol ⁻¹]
Aβ40	1490	4329,8
MBP-Aβ40	69330	48753,9
MBP	66350	43900,6
Trx-Aβ28	15595	16471,5
Trx	14105	12787,6
Lcn1'	23470	17892,0
Lcn1_3.3-23	26930	17944,1
Lcn1*	18575	17925,1
ApoD_IN90	38180	19931,4
Lcn2'	31525	21738,7
Lcn2_US7	27055	21503,4

Tabelle 2: Molekulare Extinktionskoeffizienten (ε_{280}) und molare Massen (MW) einiger in dieser Arbeit verwendeter rekombinanter Proteine und des Aβ-Peptids. Bei der Berechnung des Extinktionskoeffizienten und der molaren Masse von Lcn1_3.3-23 wurde nicht berücksichtigt, dass dieses Anticalin als Dimer auftritt.

Die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} sowie die molekularen Massen MW wurden jeweils anhand der Aminosäuresequenzen mit Hilfe des *ProtParam Tools* auf der ExPasy Website (<http://expasy.org/tools/protparam.html>; Gasteiger *et al.*, 2003) errechnet. ProtParam berechnet den molaren Extinktionskoeffizienten gemäß der Edelhoch-Methode (Edelhoch, 1967), allerdings mit den von Pace (Pace *et al.*, 1995) bestimmten Extinktionskoeffizienten für Tyrosin und Tryptophan. Die Extinktionskoeffizienten und die molekularen Massen einiger in dieser Arbeit verwendeter Proteine sind im Folgenden zusammengefasst:

2.5.4 Konzentrierung von Proteinen

(nach Schlapschy, 2004)

Für verschiedene Experimente – insbesondere für die Proteinreinigung durch Größenausschlusschromatographie oder für die Kristallisation – waren Lösungen mit einem kleinen Volumen bzw. einer hohen Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein mittels einer Konzentratoreinheit (Amicon Ultra 4 oder 15) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (5, 10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, aggregiertes Protein präzipitiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 5 min, 14.000 rpm) und der Überstand weiter verwendet. Mittels eines Spin-X Sterilfilters wurde die Lösung filtriert (0,22 bzw. 0,45 μm) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die Konzentration einer 1:10 bzw. 1:100 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen und Proteinverluste zu vermeiden wurde der Proteingehalt des Filtrats ebenfalls untersucht.

2.5.5 Markierung von Proteinen mit Biotin oder Digoxigenin

Für *Phage Display*-Selektionen, für das anschließende Screening oder für die Bindungsanalyse im ELISA-Format wurden A β -Fusionsproteine mit Biotin oder Digoxigenin markiert. Hierfür wurden N-Hydroxysuccinimidester von Roche verwendet. Die aktivierten Estergruppen dieser Markierungsreagenzien reagieren unter milden Bedingungen mit freien Aminogruppen und führen damit zur selektiven Markierung von Lysin-Seitenketten bzw. dem N-Terminus. Der Aminocapronsäure-Spacer dient der Zugänglichkeit und ermöglicht somit die Detektion der Biotin- bzw. Digoxigenin-Gruppen auf dem markierten Protein.

D-Biotinyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester bzw. Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester wurden in einer Konzentration von 15 bis 30 mg/ml in wasserfreiem DMF oder DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Zur Markierung wurden die Proteine und der NHS-Ester in einem molaren Verhältnis von 1:2 gemischt und für 1 h bei RT rotiert. Um eine ausreichende Verdünnung der Lösungsmittel

DMF bzw. DMSO zu gewährleisten, wurde das Volumen des Proteins in PBS mindestens 20mal größer als das benötigte Volumen an NHS-Ester angesetzt. Nach Markierung der Proteine wurde der überschüssige NHS-Ester durch Zugabe eines 1/100 Volumens 1 M Tris/HCl pH 8,0 (finale Konzentration 10 mM) blockiert und im Anschluss durch Größenausschlusschromatographie (s. Abschnitt 2.5.1.3) von den markierten Proteinen abgetrennt. Die erfolgreiche Markierung der Proteine wurde anschließend mittels Western Blot (s. Abschnitt 2.6.1) unter Verwendung entsprechender, mit der Alkalischen Phosphatase konjugierter, Detektionsreagenzien analysiert.

Thioredoxin-A β 28 (Trx-A β 28), das für *Phage Display*-Selektionen mit Digoxigenin markiert wurde, wurde nach der Behandlung mit dem Digoxigenin-N-hydroxysuccinimidester zusätzlich für eine weitere Stunde in einem 50fachen molaren Überschuss an Iodacetamid inkubiert. Im Anschluss wurde die Markierungsreaktion wie oben beschrieben mit Tris gestoppt und das Protein durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Iodacetamid reagiert mit freien SH-Gruppen, z.B. in ungepaarten Cysteinen von Proteinen, und verhindert somit, dass im Verlauf der *Phage Display*-Selektion vorwiegend Anticaline mit ungepaarten Cysteinen über kovalente Disulfidbindungen mit Thioredoxin angereichert werden.

2.5.6 Lösen und Vorbereiten von A β -Peptiden

(nach Stine, 2003 und Zagorski, 1999)

Unterschiedliche Versionen des A β -Peptids wurden mit oder ohne C-terminale Biotingruppe als lyophilisierte Proben erworben. Zur Herstellung von vollständig monomeren Peptidpräparationen für ELISA- und Aggregationsexperimente bzw. für die Kristallisation wurde das synthetisch hergestellte A β 40 zunächst für 12 h bei RT in 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP) gelöst. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und A β 40 in einem geeigneten Volumen ddH₂O für 15 min im Ultraschallbad gelöst und mit einem Spin-X-Filter (0,45 μ m) filtriert. Die Konzentration der monomeren Peptidlösung wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt (s. Abschnitt 2.5.3). Um die Aggregation zu minimieren, wurde die Peptidlösung sofort in einer geeigneten Verdünnung in Wasser bzw. Reaktionspuffer im jeweiligen Experiment eingesetzt. Für jedes einzelne Experiment wurde A β 40 jeweils frisch präpariert. Die kurzen A β -Peptide wurden direkt, ohne HFIP-Behandlung, im entsprechenden Puffer gelöst.

2.6 Immunchemische Methoden

2.6.1 Western Blotting

(nach Schlapschy, 2004)

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch, wie z.B. einem Periplasma- oder Gesamtzellextrakt, sowie zur Analyse der erfolgreichen Markierung von Proteinen mit Biotin oder Digoxigenin (s. Abschnitt 2.5.5) wurde das Western Blotting angewandt. Das Proteingemisch wird hierbei zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben durchgeführt und das Trenngel und die Membran anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran. Bei Einsatz der hydrophoben Immobilon-P Membran musste diese vor Inkubation in Transferpuffer zunächst für mindestens 5 min in 20 ml Methanol aktiviert werden.

Für den Elektrotransfer wurden 4 Blatt Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektrobloßapparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 4 Blatt mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm²) betrieben. Die Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 10 min in 10 ml PBS/T geschwenkt und dann für mindestens 30 min mit 3 % (w/v) BSA in PBS/T blockiert. Bei Verwendung der Nitrocellulose-Membran war dieser Blockierungsschritt optional.

Immunchemischer Nachweis anhand des *Strep*-tag II

Um Proteine spezifisch über den *Strep*-tag II nachzuweisen, wurde die Membran zunächst für 1 h in einer 1:1500 Verdünnung eines *Strep*-Tactin- bzw. Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (AP)-Konjugates inkubiert und dann wie im Folgenden beschrieben angefärbt. Bei Verwendung von Streptavidin-Konjugaten zur Analyse von Zelllysaten wurde meist neben der Zielbande eine zweite Bande detektiert, welche dem *E. coli* Biotin-Carboxyl-Carrierprotein entsprach.

Immunchemischer Nachweis der Markierung von Proteinen mit Biotin oder Digoxigenin

Zur Analyse der erfolgreichen Markierung mit Biotin oder Digoxigenin wurden die markierten Proteine nach der Größenausschlusschromatographie im Western Blot analysiert. Biotin wurde hierbei durch einstündige Inkubation in ExtrAvidin-AP (1:5000 in PBS/T), Digoxigenin durch Inkubation in anti-Digoxigenin-Fab-AP (1:1500 in PBS/T) nachgewiesen.

Zur selektiven Anfärbung der rekombinanten Proteine wurde die Membran im Anschluss an die Inkubation mit dem jeweiligen Alkalische-Phosphatase-Konjugat zweimal für 5 min mit 10 ml PBS/T, zweimal für 5 min mit 10 ml PBS und einmal mit AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) gewaschen. Durch Inkubation in 20 ml AP-Puffer unter Zusatz von 10 µl NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 60 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht (Blake *et al.*, 1984). Nach Erreichen der gewünschten Intensität wurde die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.6.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

(nach Holla, 2012)

Die Bindungsaktivität von Anticalinen gegenüber Aβ-Peptiden und Aβ-Fusionsproteinen wurde mit Hilfe des ELISAs nachgewiesen. Im „direkten“ ELISA-Format wurde das Aβ-Fusionsprotein an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und gebundenes Anticalin über das *Strep*-tag II mit Hilfe einer chromogenen Enzymreaktion nachgewiesen. Im „Capture“-ELISA-Format wurde *Strep*MAB-Immo, ein *Strep*-tag II spezifischer Antikörper, an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert, um die Anticaline spezifisch über die Interaktion zwischen dem Antikörper und dem *Strep*-tag II zu immobilisieren. Die Interaktion mit markierten Aβ-Peptiden/Fusionsproteinen wurde im Anschluss über eine chromogene Enzymreaktion nachgewiesen.

„Direkter“ ELISA

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung einer Reihe bzw. Spalte auf der Mikrotiterplatte jeweils 50 µl Zielprotein bzw. Kontrollprotein in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Proteinlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde jede Vertiefung für 1 h mit jeweils 200 µl 3 % (w/v) BSA in PBS/T inkubiert. Die Vertiefungen wurden daraufhin fünfmal mit PBS/T gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden zunächst 50 µl PBS/T in jede Vertiefung vorgelegt und dann 50 µl der zu untersuchenden Anticalin-Varianten in PBS/T mit dem vorgelegten PBS/T in der zweiten Vertiefung gemischt. Ausgehend von dieser Mischung wurden 50 µl entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise eine Verdünnungsreihe in PBS/T hergestellt. Nach einstündiger Inkubation wurde wiederum fünfmal mit PBS/T gespült. Für den Nachweis der gebundenen Anticalin-Varianten über den *Strep*-tag II wurde entweder *Strep*-Tactin-AP oder Streptavidin-AP 1:1500 in PBS/T verdünnt und je 50 µl pro Vertiefung pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurden die Vertiefungen dreimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 100 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat gelöst in AP-Puffer zupipettiert. Die Platte wurde in

das auf 37 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt und nach fünfminütiger Äquilibrierung wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min aufgezeichnet.

„Capture“-ELISA

Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte jeweils 50 µl *StrepMAB*-Immo in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS bzw. in 100 mM NaH₂PO₄, pH 8,0 pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde jede Vertiefung für 1 h mit jeweils 200 µl 3 % (w/v) BSA in PBS/T inkubiert. Die Vertiefungen wurden daraufhin fünfmal mit PBS/T gespült und ausgeklopft. Zur gerichteten Immobilisierung der Anticaline wurde in jede Vertiefung einer Reihe bzw. Spalte 50 µl der jeweiligen Anticalin-Variante in einer Konzentration von 1 µM in PBS/T pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Die Vertiefungen wurden daraufhin fünfmal mit PBS/T gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden Verdünnungsreihen analog dem „direkten“ ELISA, allerdings mit den zu untersuchenden Biotin- bzw. Digoxigenin-markierten Zielmolekülen pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurde wiederum fünfmal mit PBS/T gespült. Für den Nachweis der gebundenen, markierten Zielmoleküle wurden das entsprechende AP-Konjugat in PBS/T verdünnt (Biotin: ExtrAvidin-AP 1:5000; Digoxigenin: anti-DIG-Fab-AP 1:1500) und je 50 µl pro Vertiefung pipettiert. Nach einstündiger Inkubation wurden der „Capture“-ELISA, wie für den „direkten“ ELISA beschrieben, gewaschen und mit p-Nitrophenylphosphat entwickelt.

Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante mittels ELISA

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



Die Dissoziationskonstante K_D ist definiert als:

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

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

$$(4) \quad [P] = [P]_t - [P \cdot L]$$

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

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

$$(6) \quad K_D = \frac{([P]_t - [P \cdot L])([L]_t - [P \cdot L])}{[P \cdot L]}$$

Unter der Annahme, dass $[P]_t \gg [P \cdot L]$, ergibt sich aus Gleichung (6) durch Auflösung nach $[P \cdot L]$

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

$[P \cdot L]$ wird indirekt als ligandengebundenes Protein anhand der katalytischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase quantifiziert. Somit verbleiben als anzupassende Parameter bei der Variation von $[L]_t$ die Gesamtkonzentration des immobilisierten Proteins $[P]_t$ sowie die Dissoziationskonstante K_D . Durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeit der gemessenen Absorptionsänderung ($\Delta E/\Delta t$ in $10^{-3}/\text{min} = \text{mOD}/\text{min}$) gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe $[L]_t$ und Anpassung der erhaltenen Kurve mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA) gemäß Gleichung (7) wurden die Parameter K_D sowie $[P]_t$ (entsprechend dem asymptotischen Maximalwert von $\Delta E/\Delta t$) bestimmt (Voss & Skerra, 1997).

Kompetitiver ELISA

Der kompetitive ELSA wurde analog dem „Capture“-ELISA durchgeführt; allerdings wurde im Anschluss an die gerichtete Immobilisierung der Anticaline eine Verdünnungsreihe von nicht markiertem Trx-A β 28 bzw. nicht markiertem A β -Peptid in Gegenwart einer konstanten Konzentration von biotinyliertem Trx-A β 28-Bio bzw. biotinyliertem A β -Peptid appliziert. Diese konstante Konzentration wurde entsprechend des halbmaximalen Signals im „Capture“-ELISA gewählt. Die Verdünnungsreihe des nicht markierten A β -Targets wurde bei einer mindestens 100-fach höheren Konzentration begonnen. Die konstante Menge des markierten A β -Targets wurden zunächst mit den Proben der Verdünnungsreihe des nicht markierten A β -Targets in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt und die Mischung dann in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte transferiert. Nach Entwicklung des kompetitiven ELISA mit

p-Nitrophenylphosphat gemäß der Vorschrift oben wurden die Daten anhand der sigmoidalen Gleichung (8) ausgewertet.

$$(8) \quad \Delta A = \frac{\Delta A_{max} - \Delta A_{min}}{1 + \left(\frac{[L]_t}{EC_{50}}\right)^p} + \Delta A_{min}$$

Die einzelnen Parameter sind: $[L]_t$ Konzentration des titrierten, nicht markierten Liganden, EC_{50} halbmaximale effektive Konzentration und p Steigung der Kurve, auch als Hill Koeffizient bezeichnet (Kim *et al.*, 2009a).

Aus dem durch den sigmoidalen Fit mittels KaleidaGraph Software bestimmten Wert für EC_{50} wurde durch Anwendung der Cheng Prusoff Gleichung (9) (Cheng & Prusoff, 1973) die Dissoziationskonstante K_D ermittelt.

$$(9) \quad K_D = \frac{EC_{50}}{1 + \left(\frac{[L]^*}{K_D^*}\right)}$$

Die Parameter hierbei sind: EC_{50} die durch sigmoidalen Fit bestimmte halbmaximale effektive Konzentration, $[L]^*$ die konstante Konzentration an biotinyliertem Liganden und K_D^* die Dissoziationskonstante des biotinylierten Liganden, die zuvor im „Capture“-ELISA bestimmt worden war.

2.6.3 Epitop-Mapping

Um die Bindungsspezifität der Lcn2'-Variante US7 exakt zu bestimmen wurde ein Epitop-Mapping mittels der SPOT-Methode (Frank, 2002) durchgeführt. Dazu wurde eine Membran mit punktwise immobilisierten Peptiden durch automatisierte Fluorenylmethoxycarbonyl-Festphasen-Peptidsynthese mit einem MultiPep RS Instrument hergestellt. Hierbei wurde die gesamte, 40 Aminosäuren umfassende A β 40-Sequenz in Hexameren, Dekameren und Pentadekameren jeweils um eine Aminosäure versetzt auf die Membran gespottet. Die C-Termini der einzelnen Peptide waren kovalent mit der Amino-PEG500 Cellulose-Membran verknüpft und die freien N-Termini abschließend acetyliert. Als Positivkontrolle wurde die Sequenz des *Strep*-tag II in gleicher Weise auf die Membran gespottet.

Durch Inkubation in einer Mischung aus 95 % Trifluoressigsäure und 3 % Triisopropylsilan wurden die Seitenketten für 2 h bei RT entschützt. Dann wurde die Membran viermal mit Dichlormethan, zweimal mit Dimethylformamid und zweimal mit Ethanol gewaschen und im Anschluss an der Luft getrocknet. Die so behandelte Membran wurde bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für das eigentliche Epitop-Mapping wurde die Membran zunächst einmal mit Ethanol und dreimal mit PBS gewaschen und dann für 1 h bei RT mit 3 % (w/v) BSA in PBS/T blockiert. Dann wurde die Membran dreimal mit PBS/T gewaschen und für 1 h bei RT in einer Lösung von 100 nM Lcn2_US7 bzw. Wildtyp-Lcn2' in PBS/T inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut gewaschen und zur Detektion der gebundenen Anticaline über den *Strep*-tag II für 1 h bei RT in einer 1:1500 Verdünnung von Streptavidin-AP inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T und einmalig mit AP-Puffer wurden die gebundenen Anticaline bzw. der *Strep*-tag II als Positivkontrolle durch Inkubation in 20 ml AP-Puffer unter Zusatz von 10 μ l NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 60 μ l BCIP (50 mg/ml in DMF) sichtbar gemacht (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

Durch Vergleich der Membranen, die mit Lcn2_US7 bzw. Wildtyp-Lcn2' als Negativkontrolle inkubiert wurden, konnte das Epitop des A β -spezifischen Anticalins abgeleitet werden.

2.7 Biophysikalische Methoden

2.7.1 CD-Spektroskopie

(nach Schlehuber, 2001)

Circulardichroismus (CD) tritt auf, wenn sich die Extinktionskoeffizienten ε_R und ε_L für die gegenläufigen, zirkular polarisierten Komponenten, in die sich linear polarisiertes Licht zerlegen lässt, beim Durchtritt durch ein optisch aktives Medium voneinander unterscheiden (Berova *et al.*, 2000). Bei der CD-Spektroskopie an Proteinen unterscheidet man einerseits die chiralen Absorptionseigenschaften der Peptidbindung im Fern-UV-Bereich (180 bis 270 nm) und andererseits die chiralen Absorptionseigenschaften der aromatischen Seitenketten im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm). CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindung geben Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins. Daher eignen sich Messungen der CD-Signale im Bereich zwischen 190 und 260 nm nicht nur zur Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt, ungeordnet) sondern auch zur Detektion von Konformationsänderungen, z. B. bei der thermischen Denaturierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die CD-Spektroskopie sowohl zur Abschätzung struktureller Auswirkungen von Aminosäuresubstitutionen in Anticalin-Varianten als auch zur Untersuchung der Proteinstabilität einzelner Varianten durch thermische Denaturierung eingesetzt.

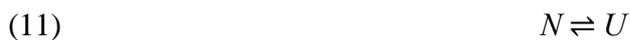
Zur Vorbereitung der Messung wurden die zu untersuchenden Anticalin-Varianten nach Reinigung durch Größenausschlusschromatographie in CD-Puffer (20 mM KH_2PO_4 pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 , s. Abschnitt 2.5.1.3) bei 280 nm quantifiziert, auf die für die Messung benötigte Konzentration eingestellt (10, 20 bzw. 25 μM) und mit einem Spin-X Filter filtriert (0,22 μm). Dann wurden 300 μl Proteinprobe in eine Spezialküvette aus Quarzglas mit einer Schichtdicke von 1 mm pipettiert, mit einem Deckel und Parafilm luftdicht verschlossen und in den temperierbaren Probenhalter des Jasco J-810 Spektropolarimeters gestellt. CD-Spektren zwischen 190 und 260 nm wurden durch Akkumulation von 16 bis 30 Einzelspektren (*Scanning mode*: continuous, *Scan speed* 100 nm/min, *Response* 4 s, *Bandwidth* 1 nm, *Data pitch* 0,1 nm) bei einer Proben temperatur von 20 bzw. 25 $^\circ\text{C}$ erhalten. Die bei der Messung der CD-Spektren ermittelten Werte für die Elliptizität (in mdeg) bei der Wellenlänge λ wurden für jede Variante nach Gleichung (10) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ (MRW = *Mean Residue Weight*, in $\text{deg cm}^2 \text{mol}^{-1}$) umgerechnet (Schmid, 1989):

$$(10) \quad [\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta_{(\lambda)} \cdot M_R}{1000 \cdot c \cdot d \cdot N_A}$$

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

Für die Messung des Entfaltungsüberganges wurde die Änderung des CD-Signals bei einer geeigneten Wellenlänge während der gesamten kontinuierlichen Aufwärmphase von 20 bzw. 25 $^\circ\text{C}$ bis 95 bzw. 100/102 $^\circ\text{C}$ (*Temperaturslope* 60 $^\circ\text{C}/\text{h}$, *Data pitch* 0,1 $^\circ\text{C}$, *Response* 4 s) verfolgt und die gemessene Elliptizität Θ gegen die Temperatur aufgetragen. Die Wellenlänge, bei der die maximale Differenz der Spektren des nativen Proteins bei 25 $^\circ\text{C}$ und des denaturierten Proteins bei 95 $^\circ\text{C}$ vorlag, wurde zur Messung des thermischen Entfaltungsüberganges verwendet.

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



Die Gleichgewichtskonstante K_U der Denaturierung ist definiert als:

$$(12) \quad K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f(u)}{1 - f(u)}$$

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

$$(13) \quad f(u) = \frac{K_U}{1 + K_U}$$

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

$$(14) \quad f(u) = \frac{y_{obs} - y_N}{y_U - y_N}$$

bestimmt werden. Die Parameter y_N und y_U bezeichnen dabei die Elliptizitätswerte des vollständig gefalteten bzw. entfalteten Zustands und können unter Annahme linearer prä- und posttransitioneller Steigungen der Denaturierungskurven jeweils folgendermaßen als Funktion der Temperatur ausgedrückt werden:

$$(15) \quad y_N = m_N T + b_N$$

$$(16) \quad y_U = m_U T + b_U$$

Die Parameter b_N und b_U stehen für die Ordinatenabschnitte der Basislinien von nativem und denaturiertem Zustand am absoluten Nullpunkt, während m_N und m_U die Steigungen der jeweiligen Basislinien in Abhängigkeit von der Temperatur beschreiben. Durch Gleichsetzen von Gleichung (13) und (14) und Auflösen der Beziehung nach y_{obs} ergibt sich:

$$(17) \quad y_{obs} = \frac{y_U K_U + y_N}{1 + K_U}$$

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

$$(18) \quad K_U = \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]$$

Unter Substitution von K_U , y_N und y_U in Gleichung (17) durch die Gleichungen (15), (16) und (18) erhält man (Brumano *et al.*, 2000):

$$(19) \quad y_{obs} = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \left\{ \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\}}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]}$$

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

Aufgrund der hohen Thermostabilität von Lcn1* und seinen Varianten mit T_m -Werten, die teilweise über $90 \text{ }^\circ\text{C}$ liegen, konnte bei einer praktikablen Erhitzung bis $102 \text{ }^\circ\text{C}$ die posttransitionelle lineare Phase allerdings nicht immer erreicht werden, was eine Bestimmung aller sechs Parameter aus den Rohdaten schwierig machte. Aus diesem Grund wurden bei der thermischen Analyse einiger Lcn1*-Varianten in Abschnitt 3.3.7.3 die Werte für die Steigungen der posttransitionellen Geraden (m_U) auf null gesetzt und in einigen Fällen auch die Werte der entsprechenden y-Achsen-Abschnitte (b_U) als konstante Werte abgeschätzt und zur Bestimmung der anderen Parameter verwendet.

Um die Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen Anticalin-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven schließlich nach Gleichung (14) unter Verwendung der aus der nicht-linearen Regression nach Gleichung (19) gewonnenen Parameter b_N , b_U , m_N und m_U auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Hierbei entsprach 0 dem vollständig gefalteten und 1 dem vollständig entfalteten Protein. Die so erhaltenen normierten Entfaltungskurven konnten anschließend nach Gleichung (20), welche sich aus den Gleichungen (13) und (18) ergibt, angepasst werden:

$$(20) \quad f(u) = \frac{\exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]}{1 + \exp \left[\frac{\Delta H_m}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]}$$

Die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) $\Delta G_U^{25^\circ\text{C}}$ kann bei Annahme einer temperaturunabhängigen Entfaltungsenthalpie H_m unter Verwendung der *van't Hoffschen* Reaktionsisochore (18) mit der Schmelztemperatur T_m für $T = 298,15 \text{ K}$ berechnet werden:

$$(21) \quad \Delta G_U^{25^\circ\text{C}} = -RT \ln K_U^{25^\circ\text{C}}$$

2.7.2 Fluoreszenzspektroskopische Analyse der chemischen Denaturierung mit Guanidiniumchlorid

(nach Müller, 1995)

Neben der thermischen Denaturierung wurden ausgewählte Lcn1-Varianten zusätzlich durch chemische Denaturierung mit dem chaotropen Salz Guanidiniumchlorid (Gdn•HCl) untersucht.

Die chemische Denaturierung der Lcn1-Varianten wurde im Bereich von 0 bis 6 M Gdn•HCl anhand der proteineigenen Tyr/Trp-Fluoreszenz verfolgt. Durch Denaturierung ändert sich die Zugänglichkeit des Lösungsmittels zu den fluoreszierenden Seitenketten, was in einer Änderung der Intensität sowie der Wellenlänge der Proteinfluoreszenz resultiert. Durch Auftragen der Fluoreszenzsignale gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel wurde die Stabilität der einzelnen Varianten aus der angepassten Denaturierungskurve abgeleitet (Schlehuber, 2001). Zum Ausgleich von Schwankungen in der Proteinkonzentration wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte über das Verhältnis zum Signal am isosbestischen/isofluoreszenten Punkt, an dem der Wert der Absorption bzw. Fluoreszenz im Verlauf einer Reaktion konstant bleibt, korrigiert (Koide *et al.*, 1998).

Für die Messung der chemischen Denaturierung wurden die Lcn1-Varianten Lcn1^{*}, Lcn1^{*}[K114V], Lcn1^{*}[K114W] und Lcn1^{*}[C61S/C153S] zunächst in KSH-Puffer (20 mM Hepes, 50 mM K₂SO₄, pH 7,5 mit KOH) durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Als Denaturierungsmittel wurde Gdn•HCl der Qualität „*Molecular Biology Grade, Ultrapure*“ verwendet. Zur Herstellung einer 7 M Stammlösung in KSH-Puffer wurden die entsprechenden Substanzen eingewogen und in einem möglichst kleinen Volumen ddH₂O unter leichtem Erwärmen auf dem Magnetrührer gelöst. Nach Erreichen von RT wurde der pH-Wert der Lösung mit KOH auf 7,5 eingestellt, das Volumen mit H₂O auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt und die Lösung filtriert (0,45 µm). Die exakte Konzentration der Gdn•HCl-Stammlösung wurde durch Messung des Brechungsindex (Pace, 1986) mit einem Refraktometer bestimmt.

Die zu analysierenden Lcn1^{*}-Varianten wurden in einer Endkonzentration von 1 µM und einem Endvolumen von 0,5 ml mit unterschiedlichen Konzentrationen Gdn•HCl gemischt und für 48 h bei 20 °C inkubiert. Hierbei wurden im Übergangsbereich der Denaturierungskurve möglichst viele Messwerte angesetzt. Nach 48 h Stunden wurde die Fluoreszenz der Proben im FluoroMax-3 bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm, Schlitzweiten von 7,5 nm, einer Integrationszeit von 10 s und einer Temperatur von 20 °C bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen gemessen. Die beiden Emissionswellenlängen entsprachen dem Minimum des Differenzspektrums zwischen der nativen und der denaturierten Proteinspezies zur Bestimmung der Denaturierung und der Wellenlänge des isosbestischen Punktes des jeweiligen Proteins zur Korrektur der Messwerte (Lcn1^{*}, Lcn1^{*}[K114V] und Lcn1^{*}[C61S/

C153S]: je 365/328 nm, Lcn1* [K114W]: 373/340 nm). Als Blindwert für die Fluoreszenzmessung diente ein Ansatz mit der gleichen Konzentration an Gdn•HCl jedoch ohne das entsprechende Protein, welcher unter identischen Bedingungen angesetzt und inkubiert wurde. Vor Messung der Fluoreszenz wurde die genaue Gdn•HCl-Konzentration jeder einzelnen Probe refraktometrisch nachbestimmt. Hierfür wurde die Differenzen der Brechungsindizes der Probenlösungen und des KSH-Puffers, Δn_{GdnHCl} , bestimmt und die genaue Gdn•HCl-Konzentration $[D]$ – unter Vernachlässigung des Proteingehaltes – nach dem Modell von Pace (Pace, 1986) errechnet:

$$(22) \quad [D] = 55,147 \cdot \Delta n_{GdnHCl} + 38,68 \cdot \Delta n_{GdnHCl}^2 - 91,6 \cdot \Delta n_{GdnHCl}^3$$

Die Fluoreszenzwerte zur Analyse der Denaturierung (365 bzw. 373 nm) wurden nach der Messung entsprechend dem Verhältnis am isosbestischen Punkt korrigiert (328 bzw. 340 nm), die korrigierten Daten in Abhängigkeit der Gdn•HCl aufgetragen und die Stabilität durch nicht lineare Regression der korrigierten Messdaten bestimmt.

Gemäß der thermischen Denaturierung (s. Abschnitt 2.7.1) wurden die Kurven der chemischen Denaturierung unter Annahme eines Zweizustandsmodells der Entfaltung analysiert. Die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung ist daher definiert als

$$(12) \quad K_U = \frac{[U]}{[N]}$$

Unter Zuhilfenahme der Proteinfluoreszenz F kann dieses Gleichgewicht in Abhängigkeit der Konzentration an Denaturierungsmittel $[D]$ verfolgt werden (23). Hierbei entspricht F_n dem Fluoreszenzsignal des nativen Proteins und F_u dem Fluoreszenzsignal des vollständig denaturierten Proteins.

$$(23) \quad K_U = \frac{[U]}{[N]} = \frac{F_n - F}{F - F_u}$$

Die freie Energie der Entfaltung an jedem Punkt des Übergangsbereichs kann somit berechnet werden aus

$$(24) \quad \Delta G_{n-u} = -RT \ln \frac{F_n - F}{F - F_u}$$

Die Bereiche vor und nach dem Übergangsbereich einer typischen Denaturierungskurve, die sogenannten prä- und posttransitionellen Steigungen der Denaturierungskurve, verlaufen

nahezu linear und können durch folgende zwei Geradengleichungen ((25), (26)) beschrieben werden. Hierbei definieren m_n und m_u die beiden Steigungen der Geraden und b_n und b_u die jeweiligen y-Achsenabschnitte.

$$(25) \quad F_n = m_n[D] + b_n$$

$$(26) \quad F_u = m_u[D] + b_u$$

Wird die freie Energie der Entfaltung in Abhängigkeit von $[D]$ aufgetragen, so liegen die Datenpunkte nach dem Modell von Pace auf einer Geraden, die folgendermaßen beschrieben werden kann:

$$(27) \quad \Delta G_{n-u} = \Delta G_{n-u}^{H_2O} - m[D]$$

Die Steigung m ist in diesem Fall ein Maß für die Kooperativität der Entfaltung während der Achsenabschnitt $\Delta G_{n-u}^{H_2O}$ die freie Energie der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels darstellt. Durch Kombination der Beziehungen (24), (25), (26) und (27) und Auflösen nach F erhält man folgende Gleichung:

$$(28) \quad F = \frac{(m_n[D] + b_n) + (m_u[D] + b_u) \exp \left[-\frac{\Delta G_{n-u}^{H_2O} - m[D]}{RT} \right]}{1 + \exp \left[-\frac{\Delta G_{n-u}^{H_2O} - m[D]}{RT} \right]}$$

Diese Beziehung erlaubt die Anpassung der zweistufigen Denaturierungskurve unter gleichzeitiger Berücksichtigung der prä- und posttransitionellen Effekte sowie der Kooperativität. Mit dieser Gleichung wurden die Parameter $\Delta G_{n-u}^{H_2O}$ und m mit ihren relativen Fehlern bestimmt.

Zum Vergleich der chemischen Stabilität der unterschiedlichen Lcn1*-Varianten wurde die Konzentration an Denaturierungsmittel bestimmt, bei der 50 % des Proteins entfaltet vorliegt ($[D]_{1/2}$). Bei einem 1:1 Verhältnis von nativem und denaturiertem Protein gilt $\Delta G_{n-u} = 0$ und Gleichung (27) vereinfacht sich zu

$$(29) \quad \Delta G_{n-u}^{H_2O} = m[D]_{1/2}$$

Um die gewonnen Denaturierungskurven zu skalieren, d.h. um den Anteil an ungefaltetem Protein $f(u)$ in Abhängigkeit von $[D]$ darzustellen, wurde zunächst eine nicht-lineare Regression der Denaturierungskurve mit Gleichung (28) durchgeführt und dabei die Werte für die Parameter b_n , m_n , b_u und m_u bestimmt. Durch Einsetzen der Parameter in Gleichung (25)

und (26) und durch Beziehung (30) konnte der Anteil an ungefaltetem Protein $f(u)$ anhand der gemessenen Fluoreszenz für jeden Wert $[D]$ berechnet werden.

$$(30) \quad f(u) = \frac{F_n - F}{F_n - F_u}$$

Die mathematische Auswertung der skalierten Entfaltungskurve erfolgte nach folgender Formel:

$$(31) \quad f(u) = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta G_{n-u}^{H2O} - m[D]}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_{n-u}^{H2O} - m[D]}{RT}\right)}$$

2.7.3 Fluoreszenzanisotropie

(nach Holla, 2012)

Die Fluoreszenzanisotropie beruht auf der Korrelation der Depolarisation von eingestrahltm polarisiertem Licht mit der effektiven Molekülgröße eines Fluorophors und ermöglicht somit quantitative Bindungsprotein/Ligand-Interaktionsstudien in Lösung. Fluoreszierende Moleküle absorbieren bevorzugt Photonen, deren elektrischer Feldvektor parallel zum Übergangs-Dipolmoment des Fluorophors ausgerichtet ist. Nach Einstrahlung von polarisiertem Licht gelangen daher in erster Linie diejenigen Moleküle in einen angeregten Zustand, die die entsprechende Orientierung aufweisen. Kommt es während der Lebensdauer des angeregten Zustandes zu keiner wesentlichen Änderung in der Ausrichtung des Fluorophors, so weist auch das emittierte Licht Polarisation auf. Aufgrund der Rotation des Fluorophors durch Brown'sche Molekularbewegung ergibt sich jedoch eine stochastische Umorientierung des Emissions-Dipolmoments, so dass die Polarisation des emittierten Lichts in Abhängigkeit von der Fluoreszenz-Lebensdauer abnimmt, sich also dessen Anisotropie verringert (Lakowicz, 2006).

Zur Messung der Fluoreszenzanisotropie einer Probe wird diese mit vertikal polarisiertem Licht (v) angeregt und die Fluoreszenzintensität durch einen Analysator bestimmt. Dieser Analysator hat in Bezug auf den Polarisator eine parallele (I_{vv}) oder eine senkrechte (I_{vh}) Ausrichtung. Die Fluoreszenzanisotropie A ist definiert als:

$$(32) \quad A = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot I_{vh}}$$

Um verfälschende Einflüsse des Geräts zu eliminieren, wird die Probe zusätzlich mit horizontal polarisiertem Licht (h) angeregt und die Intensitäten der horizontal und vertikal polarisierten Komponenten I_{hh} und I_{hv} des emittierten Lichts ermittelt. Im Idealfall sollten diese gleich groß sein, in der Realität weichen sie jedoch voneinander ab, insbesondere da Monochromatoren in der Regel verschiedene Transmissionseffizienzen für vertikal und horizontal polarisiertes Licht aufweisen. Der resultierende Korrekturfaktor, der G -Wert, berechnet sich gemäß folgender Formel:

$$(33) \quad G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}}$$

Unter Berücksichtigung dieses G -Werts berechnet sich die Anisotropie entsprechend folgender Formel:

$$(34) \quad A = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}}$$

Einen wichtigen Einfluss auf die Fluoreszenzanisotropie hat, neben Molekülschwingungen und Konformationsänderungen, die Eigenrotation der Fluorophore, da sich vor allem dadurch während der Lebensdauer des Fluoreszenzfarbstoffes die Orientierung der Fluorophore und damit die Polarisationssebene des emittierten Lichts ändert. Kleine Moleküle mit einer inhärent hohen Rotationsfrequenz haben deshalb eine geringere Fluoreszenzanisotropie als größere Moleküle. Durch Messung der Anisotropie kann bei der Titration eines fluoreszenzmarkierten Proteins mit einem unmarkierten Bindungspartner die Dissoziationskonstante der Komplexbildung bestimmt werden, da sich bei Komplexbildung aufgrund der Größenzunahme die Rotationsgeschwindigkeit verringert und sich damit die gemessene Anisotropie erhöht. Um den größtmöglichen Effekt zu erzielen, wird daher bevorzugt der kleinere der beiden Bindungspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Für die Anisotropie-Titrations wurde N-terminal Fluorescein-markiertes A β (16-28) Peptid (Flu-A β (16-28)) als Ligand verwendet. Von den zu untersuchenden Lcn1'-Varianten wurden 150 μ l Verdünnungsreihen im Bereich von 400 μ M bis 50 nM pipettiert. 140 μ l der einzelnen Verdünnungen wurden mit 20 μ l einer 8 μ M Lösung Flu-A β (16-28) zu einer Endkonzentration von 1 μ M gemischt. Die Proben wurden lichtgeschützt für 60 min bei RT inkubiert und die Anisotropie im Anschluss in einem Perkin-Elmer LS 50B Fluoreszenz-Photometer mit eingebauten Polarisatoren bestimmt. Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 522 nm mit der Einstellung *Anisotropy* bei 25 °C durchgeführt (Schlitzweiten: je 10 nm, Integrationszeit: 10 s). Zunächst wurde der G -Wert ermittelt und anschließend die Anisotropie-Werte der

Proben bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Werte für I_{vv} und I_{vh} im Bereich von 100 bis 800 mAU lagen. Aus drei Messwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Bestimmung der Dissoziationskonstante:

Bei der Anisotropiemessung lässt sich die Komplexbildung aus Protein und Liganden durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (s. Abschnitt 2.6.2). Die Auflösung der Gleichung (6) nach $[P \cdot L]$ ergibt folgende gemischt quadratische Gleichung:

$$(35) \quad [P \cdot L] = \frac{[L]_t + [P]_t + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([L]_t + [P]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t[L]_t}$$

Für $[L]$ lässt sich durch Einsetzen von Gleichung (35) in (5) folgende Gleichung ableiten:

$$(36) \quad [L] = \frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} + \sqrt{\frac{([L]_t + [P]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t[L]_t}$$

Die gemessene Gesamtanisotropie A_t ergibt sich anteilig aus der Anisotropie des markierten Liganden, des A β -Peptids, A_L und der des Komplexes A_K :

$$(37) \quad A_t = \frac{[L]}{[L]_t} \cdot A_L + \frac{[P \cdot L]}{[L]_t} \cdot A_K$$

Durch Einsetzen von Gleichung (35) und (36) in (37) ergibt sich folgender Zusammenhang für die gemessene Anisotropie:

$$(38) \quad A_t = \left[\left(\frac{[L]_t - [P]_t - K_D}{2} \right) + \sqrt{\frac{([L]_t + [P]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t[L]_t} \right] \cdot \frac{A_L}{[L]_t} + \left[\left(\frac{[L]_t + [P]_t + K_D}{2} \right) - \sqrt{\frac{([L]_t + [P]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t[L]_t} \right] \cdot \frac{A_K}{[L]_t}$$

Die gemessenen Anisotropiewerte wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen. Die Anpassung der Werte für K_D , A_L und A_K kann mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph durch nichtlineare Regression gemäß Gleichung (38) erfolgen.

Eine alternative Methode zur Bestimmung der K_D -Werte aus der gemessenen Anisotropie ist der Fit durch nicht-lineare Regression mit KaleidaGraph Software gemäß einer sigmoidalen Gleichung:

$$(39) \quad A_t = \frac{A_L - A_K}{1 + \left(\frac{[P]_t}{EC_{50}}\right)^p} + A_K$$

Hierbei entsprechen A_t der gemessenen Gesamtanisotropie, A_L der Anisotropie des markierten A β -Peptids als Ligand und A_K der Anisotropie des Komplexes. EC_{50} entspricht der durch sigmoidalen Fit bestimmten halbmaximalen effektiven Konzentration und $[P]_t$ der Konzentration des titrierten Anticalins.

Aus dem durch den sigmoidalen Fit bestimmten Wert für EC_{50} kann die Dissoziationskonstante K_D wie folgt mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes und den Bilanzgleichungen ermittelt werden. Hierbei wird eine fixe Konzentration des markierten Liganden ($[L]_t^{fix}$) und eine variierende Konzentration des Proteins mit bekanntem Wert für EC_{50} (also $[P]_t^{EC_{50}}$) angenommen (persönliche Mitteilung, Prof. Dr. Arne Skerra).

Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz ist die Dissoziationskonstante K_D definiert als:

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

Für die Bedingungen bei EC_{50} bei variierter Proteinkonzentration gilt:

$$(40, 41) \quad [P]^{EC_{50}} = K_D \quad \Rightarrow \quad [L]^{EC_{50}} = [P \cdot L]^{EC_{50}}$$

Unter Anwendung der Stoffbilanzen folgt:

$$(42) \quad [L]_t = [L] + [P \cdot L]$$

Unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen, d.h. bei fixer Ligandenkonzentration und variierter Proteinkonzentration gilt:

$$(43) \quad [L]_t^{fix} = [L]^{EC_{50}} + [P \cdot L]^{EC_{50}} = [L]^{EC_{50}} + [L]^{EC_{50}}$$

$$(44) \quad [L]^{EC_{50}} = \frac{[L]_t^{fix}}{2} = [P \cdot L]^{EC_{50}}$$

$$(45) \quad [P]_t = [P] + [P \cdot L]$$

Unter den hier gegebenen Bedingungen gilt:

$$(46) \quad [P]_t^{EC50} = [P]^{EC50} + \frac{[L]_t^{fix}}{2} = K_D + \frac{[L]_t^{fix}}{2}$$

Nach der Dissoziationskonstante aufgelöst ergibt sich:

$$(47) \quad K_D = [P]_t^{EC50} - \frac{[L]_t^{fix}}{2}$$

Oder allgemeiner ausgedrückt:

$$(48) \quad K_D = EC_{50} - \frac{[fluoreszierender Analyt]}{2}$$

2.7.4 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

(nach Schlapschy, 2004)

Für die quantitative Analyse der Bindung zwischen den selektierten Anticalinen und den Liganden A β 40 (Lcn2_US7), MBP-A β 40 (Lcn2_US7) und NAc-A β (16-28)GG (Lcn1_3.3-23) wurden Messungen zur Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) mit den Systemen BIACORE T100 und BIACORE X (BIACORE, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Diese optisch-refraktometrische Biosensor-Technologie ermöglicht die Messung von biomolekularen Interaktionen in Echtzeit und erlaubt so die Bestimmung der kinetischen Daten der biomolekularen Komplexbildung und Dissoziation (Myszka, 2000). Hierbei wird einer der Bindungspartner, der Ligand, auf dem Sensorchip – einer mit Gold bedampften und mit einem Hydrogel beschichteten Glasoberfläche – immobilisiert, während der andere Bindungspartner, der Analyt, diese Oberfläche überspült. Durch Bindung des Analyten an den immobilisierten Liganden kommt es zu einer Anreicherung von Protein an der Chip-Oberfläche und somit zu einem Anstieg im Brechungsindex, was als Änderung des Plasmon-Resonanzwinkels detektiert werden kann. Diese Änderung des Resonanzwinkels wird in Echtzeit verfolgt und kann als Sensorgramm dargestellt und zur Bestimmung der kinetischen Parameter verwendet werden.

Während die Messungen mit der A β -spezifischen Lcn2'-Variante Lcn2_US7 und MBP-A β 40 ausschließlich am BIACORE X am Lehrstuhl erfolgten, wurde die Interaktion von Lcn2_US7 und A β 40 sowohl am BIACORE X als auch am BIACORE T100 bei der Pieris AG analysiert.

Bei den zur Messung und zur Verdünnung der Lcn2'-Varianten verwendeten Laufpuffern handelte es sich um filtrierten (0,22 μ m) und entgasten PBS/P (PBS mit 0,005 % (v/v) Surfactant P20) oder PBS/T0.005 Puffer (PBS mit 0,005 % (v/v) Tween 20). Mittels Aminkopplung wurden A β 40, welches zunächst entsprechend Abschnitt 2.5.6 gelöst worden war, bzw. MBP-A β 40 kovalent an die aktivierte Carboxymethyl-Dextran-Matrix der Sensorchip-Oberfläche immobilisiert. Für Messungen mit dem BIACORE T100 Instrument (A β 40) wurden BIACORE CM5 Chips (BIACORE, Uppsala, Schweden) verwendet, für Messungen mit dem BIACORE X Instrument (A β 40, MBP-A β 40) CMD 2001 Chips von XanTec (XanTec Bioanalytics, Düsseldorf). Durch Injektion der Anticaline in unterschiedlichen Konzentrationen wurde deren Interaktion mit den A β -Liganden in Echtzeit gemessen. Hierbei wurde durch die BIACORE *Control Software* ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom über die Sensorchip-Oberfläche gewährleistet, wobei entweder Laufpuffer, die zu untersuchende Proteinlösung oder entsprechende Regenerierungslösungen gezielt durch eine oder mehrere Flusszellen geleitet wurden.

Für eine effiziente, kovalente Beladung der Sensorchips mit den A β -Molekülen ist eine Anreicherung der Peptide/Proteine durch ionische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche notwendig (*pre-concentration effect*). Daher wurden die zu immobilisierenden Liganden in einem Puffer appliziert, bei dessen pH-Wert das Protein bzw. Peptid positiv geladen vorlag. Der pH-Wert des Puffers war also niedriger als der pI-Wert des jeweiligen Liganden. Nachdem der geeignete pH-Wert des Puffers bestimmt worden war, wurde die Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche der Sensorchips zunächst durch Derivatisierung mit einer 1:1 Mischung von 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid als Hydrochlorid) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert. Durch diese Aktivierung wurden N-Hydroxysuccinimidester-Gruppen generiert, die im Anschluss kovalente Bindungen mit freien Aminogruppen der Lysin-Seitenketten bzw. des N-Terminus des Liganden eingehen können. Zur Immobilisierung von A β 40 (pI = 5,31) und MBP-A β 40 (pI = 5,05) wurde jeweils 10 mM Natriumacetat pH 4,5 verwendet. Nach ausreichender Liganden-Immobilisierung wurden verbliebene NHS-Estergruppen durch Injektion von 1 M Ethanolamin abgesättigt. Kontrollkanäle wurden in der gleichen Weise aktiviert und deaktiviert, jedoch ohne Immobilisierung eines Liganden. Nach erfolgreicher Aktivierung, Immobilisierung und Deaktivierung wurde das jeweilige Regenerierungsreagenz injiziert und der Sensorchip im Anschluss bis zur Einstellung einer konstanten Basislinie, d.h. einem vernachlässigbaren Drift, mit Puffer gespült. Alle Messungen wurden bei 25 °C und einem kontinuierlichen Pufferfluss von 20 - 30 μ l/min durchgeführt. Für die Interaktionsanalyse

wurden Verdünnungsreihen des jeweiligen Anticalins in beide Flusszellen (mit und ohne immobilisierten Liganden) injiziert (Assoziation) und danach durch kontinuierlichen Pufferfluss für einige Minuten gewaschen (Dissoziation). Die Regenerierung erfolgte durch wiederholte Injektionen von 10 mM Glycin/HCl, 500 mM NaCl pH 2,2 (BIAcore X) bzw. 10 mM Glycin/HCl, 500 mM NaCl pH 1,8 (BIAcore T100). Um das Mischen der Regenerierungs- und der Analytlösung zu verhindern, wurde das Fluidics-System nach jedem Regenerierungsschritt gewaschen und Puffer vor dem eigentlichen Analyten injiziert (Myszka, 1999).

Die Messungen mit der A β -spezifischen Lcn1'-Variante Lcn1_3.3-23 erfolgten mit dem BIAcore T100 System und HBS-EP+ Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% Surfactant P20, pH 7,4) als Laufpuffer. Hierbei wurde das Anticalin ähnlich den ELISA-Experimenten mit Hilfe von *StrepMAB-Immo* auf dem BIAcore CM5 Sensorchip immobilisiert und das Peptid NAc-A β (16-28)GG als Analyt appliziert. Zur Immobilisierung wurde *StrepMAB-Immo* in einer Konzentration von 50 μ g/ml in 10 mM Natriumacetat pH 5,0 und einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert und durch Amin-Kopplung über Standard NHS/EDC-Chemie kovalent an die Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche des CM5-Sensorchips gebunden. Die Lcn1'-Varianten wurden in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml und einer Flussrate von 5 μ l/min appliziert und durch Interaktion mit *StrepMAB-Immo* spezifisch gebunden. Zur Bestimmung der kinetischen Daten wurde das Peptid NAc-A β (16-27)-GG in unterschiedlichen Konzentrationen mit einer Flussrate von 30 μ l/min injiziert und die Assoziation und Dissoziation aufgezeichnet. Aufgrund der Sensitivität von *StrepMAB-Immo* gegenüber sauren und basischen Bedingungen war eine Regenerierung der Sensorchip-Oberfläche in diesem Aufbau nicht möglich.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die Bindungsdaten zunächst zweifach korrigiert: durch Subtraktion des Signals im Kontrollkanal ohne immobilisierten Liganden und durch Subtraktion des Durchschnittswertes von drei unabhängigen Pufferinjektionen (Myszka, 1999). Im Anschluss wurden die Bindungskurven entsprechend einem 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der T100 *Evaluation Software* V2.0.3 oder der BIAcore X *BIA Evaluation Software* V 4.1. (Karlsson *et al.*, 1991) ausgewertet. Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) wurden durch globalen Fit aus dem gesamten Datensatz abgeleitet und zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D verwendet ($K_D = k_{off}/k_{on}$). Die Halbwertszeit wurde zu $t_{1/2} = \ln 2/k_{off}$ berechnet.

2.7.5 Thioflavin T-Aggregation Assay

Unterschiede in der A β 40-Fibrillenbildung sowie die Fähigkeit der Anticaline zur Inhibierung der A β 40-Aggregation wurden mit Hilfe der Thioflavin T-Fluoreszenz analysiert. Thioflavin T (ThT) ist ein kationischer Benzothiazolfarbstoff, welcher spezifisch mit Fibrillen

interagiert. Diese Interaktion führt zur Entstehung eines neuen Anregungsmaximums bei 450 nm mit einem Emissionsmaximum bei 482 nm, welches zur zeitlichen und qualitativen Analyse des Verlaufs der Fibrillenbildung genutzt werden kann (LeVine, 1993; Naiki *et al.*, 1989).

Um einheitliche monomere Peptidproben zu erhalten, wurde im Thioflavin T-Aggregation Assay eingesetztes A β 40 zunächst mit HFIP in Lösung gebracht (s. Abschnitt 2.5.6). Monomeres A β 40 wurde im Anschluss in einer Endkonzentration von 1 mg/ml (231 μ M) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in Anwesenheit oder Abwesenheit der A β -spezifischen Lcn2'-Variante US7 bzw. der Kontrollproteine Wildtyp-Lcn2' und BSA unter Rühren bei 37 °C inkubiert. Hierfür wurden die Proben in 1,5 ml DNA LoBind Eppendorf Reaktionsgefäßen angesetzt und auf einem Magnetrührer mit winzigen Magnetrührstäbchen bei 500 rpm gerührt. Alle Proben wurden im Dreifachansatz analysiert. Die Kontrollproteine wurden ausschließlich in äquimolaren Konzentrationen zu A β 40 eingesetzt, Lcn2_US7 wurde dagegen in unterschiedlichen molaren Verhältnissen auf die Fähigkeit zur Inhibierung der A β -Aggregation getestet.

Zur Fluoreszenzmessung wurden in periodischen Abständen 20 μ l der bei 37 °C rührenden Lösungen entnommen und mit 180 μ l einer 55,6 μ M ThT-Lösung in 0,5x PBS gemischt. Die Fluoreszenz wurde in einem FluoroMax-3 Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm, einer Emissionswellenlänge von 482 nm, Schlitzweiten von 1,955 nm und einer Integrationszeit von 20 s gemessen. Durch Auftragen der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit wurde der Effekt der Proteine auf die A β -Aggregation analysiert.

2.8 Proteinkristallographische Methoden

(nach Giese, 2015)

2.8.1 Identifizierung von Kristallisationsbedingungen

Zur Ermittlung geeigneter initialer Kristallisationsbedingungen für die selektierten Anticaline bzw. Anticalin•Peptid-Komplexe wurde das Prinzip der „Sparse Matrix“-Suche (Jancarik & Kim, 1991) angewandt. Dabei wurden laborinterne Sätze and Fällungsmitteln verwendet: der Lorenz Basic Screen (LBS für Lcn1_3.3-23) oder der Vector Screen (für Lcn2_US7). Beide Screens bestehen aus 480 (5 x 96) Bedingungen. Beim Lorenz Basic Screen setzen sich diese aus verschiedenen kommerziell erhältlichen Screens wie dem Index Screen, dem PEG/Ion Screen oder dem Crystal Screen von Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA) zusammen, was zu teilweise redundanten Bedingungen führt.

Der Vector Screen ist dagegen fortschrittlicher, da er in Bezug auf Kristallisationserfolg optimiert wurde. Hierfür wurde die Proteindatenbank PDB nach den erfolgreichsten Kristallisationsbedingungen durchsucht (Peat *et al.*, 2005). Die Bedingungen wurden nach

Häufigkeit und Ähnlichkeit klassifiziert und mit Bedingungen aus kommerziellen Screens verglichen. Die 96 Bedingungen mit den meisten Treffern wurden für den Vector Screen 1 verwendet. Weitere Bedingungen wurden auf die Vector Screens 2 bis 5 verteilt.

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode als sitzende Tropfen in 96-Well CrystalQuick-Platten durchgeführt (McPherson, 2008). Hierzu wurden mit Hilfe eines FreedomEvo Kristallisationsroboters (TECAN) 0,1 bis 0,25 µl einer konzentrierten Protein- bzw. Komplexlösung mit jeweils dem gleichen Volumen an Fällungspuffer vermischt und gegen 100 µl der jeweils identischen Reservoirlösung äquilibriert. Die Platten wurden mit transparenter Klebefolie verschlossen und die Kristallisation mit Hilfe eines RockImager-Systems über mehrere Monate bei 20 °C verfolgt.

2.8.2 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Treffer aus den initialen Screens wurden identifiziert und durch Variation unterschiedlicher Parameter (u.a. Konzentration des Fällungsmittels, pH-Wert, Pufferkomponente, Zusatz von Additiven) hinsichtlich ihrer Größe und Streufähigkeit optimiert. Diese sogenannten Fine Screens wurden in 24-Well CrysChem Platten durch Mischen von 1 µl Proteinlösung und 1 µl Reservoirlösung und Äquilibrierung gegen 1 ml Reservoirlösung als hängende Tropfen angesetzt. Dabei wurden die Tropfen auf silanisierten Deckgläschen gemischt, diese umgedreht auf dem Reservoir plziert und mit einer Öl/Vaseline-Mischung abgedichtet. Die Platten wurden bei 20 °C gelagert und regelmäßig bezüglich ihrer Kristallbildung analysiert.

2.8.3 Sammlung von Röntgenbeugungsdaten, Datenauswertung und Strukturlösung

Nach erfolgreicher Kristallisation der Anticalin-Varianten bzw. der Anticalin•Peptid-Komplexe wurde die weitere Strukturlösung inklusive des Einfrierens der Kristalle, der Datensammlung am Synchrotron, der Auswertung der Datensätze und der Strukturlösung mittels molekularen Ersatz von Dr. Andreas Eichinger fortgesetzt (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

2.9 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen und zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE und der Sequenzeditor SEQED aus dem GCG-Programmpaket (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt. Die Berechnung der molekularen Massen von Proteinen sowie deren molekularer Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des *ProtParam-Tools* auf dem *ExPASy Server* (Gasteiger *et al.*, 2003).

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen sowie relevante Publikationen wurden durch die Verwendung folgender im *World Wide Web* zugänglichen Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank	http://www.rcsb.org/pdb
ExPASy Server	http://www.expasy.ch
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Gele aus der SDS-PAGE Analyse wurden mit Hilfe eines Scanners und des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild lediglich hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Die graphische Auswertung von Messwerten erfolgte mit dem Programm KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA).

Die Auswertung von BIACORE-Kurven erfolgte mit Hilfe der Programme BIACORE T100 *Evaluation Software* V2.0.3, BIACORE X *BIA Evaluation Software* V 4.1. (Karlsson *et al.*, 1991) oder *Scrubber 2* (<http://www.biologic.com.au>).

Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mit dem Programm PyMOL™ Molecular Graphics System (DeLano, 2002) durchgeführt. Die Überlagerung von Anticalin-Strukturen anhand definierter c_{α} -Atompositionen wurde mit Hilfe der „*pair_fit*“-Funktion in PyMOL durchgeführt. Interaktionsflächen wurden mit Hilfe von „Contact“ im CCP4 Programmpaket (Collaborative Computational Project, 1994) oder vom PISA-Internetdienst (Krissinel & Henrick, 2007) ermittelt.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Anticalinen mit Spezifität für das Amyloid- β Peptid. Hierfür wurden bereits existierende Phagemidbibliotheken auf Basis der humanen Lipocaline Lcn1 (Tlc) und Lcn2 (NGAL) für Selektionsexperimente durch *Phage Display* eingesetzt. Zusätzlich wurde eine weitere Anticalin-Bibliothek auf Grundlage des humanen ApoD geplant, hergestellt und zur Selektion verwendet. Selektierte Lipocalinvarianten wurden bezüglich ihrer Proteineigenschaften, ihrer Bindungsaktivität für A β -Peptide bzw. deren Fusionsproteine und ihres Potentials zur Inhibierung der A β -Aggregation charakterisiert.

3.1 Konstruktion und Herstellung unterschiedlicher A β -Zielmoleküle

Zur Selektion A β -spezifischer Anticaline und zur weiteren Charakterisierung potentieller Anticalin-Kandidaten wurden verschiedene A β -Peptide und A β -Proteine verwendet (Abbildung 5).

Neben A β 40 und dessen verkürzten Peptidfragmenten wurden auch Fusionsproteine geplant und hergestellt. Diese Fusionsproteine wurden in *E. coli* mit guten Ausbeuten exprimiert und dienten als Quelle für lösliche, monomere Formen des jeweiligen A β -Fragments (s. Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3).

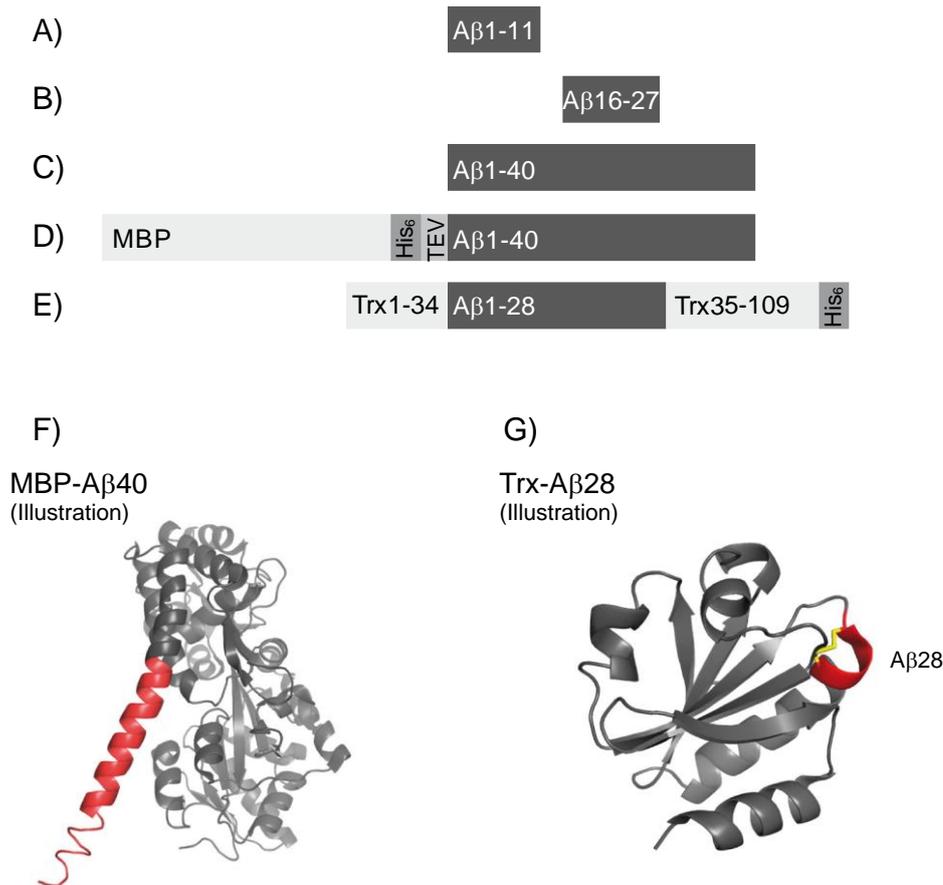


Abbildung 5: Aβ-Peptide und Aβ-Fusionsproteine zur Selektion und Charakterisierung von Aβ-spezifischen Anticalinen. Das Peptid Aβ40 (C) und dessen verkürzte Versionen, das N-terminale Peptidfragment Aβ(1-11) (A) und das zentrale Peptidfragment Aβ(16-27) (B), wurden als synthetische Peptide eingesetzt. Rekombinante Fusionsproteine aus dem Maltose-Bindungsprotein und Aβ(1-40) (MBP-Aβ40, D) bzw. aus Thioredoxin und Aβ(1-28) (Trx-Aβ28, E), bei dem die Aβ-Sequenz in den Loop des aktiven Zentrums von Thioredoxin inseriert wurde, wurden am Lehrstuhl für Biologische Chemie geplant, kloniert und exprimiert. Beide Fusionsproteine tragen ein His₆-tag zur Proteinreinigung. MBP-Aβ40 enthält zwischen der Sequenz von MBP-His₆ und der von Aβ40 zusätzlich die Erkennungssequenz für die Protease des Tabakmosaikvirus (*Tobacco Etch Virus*, TEV), welche die Spaltung des Aβ40-Peptids von dem Fusionsprotein ermöglicht. Die möglichen Strukturen der Aβ-Fusionsproteine sind in (F) und (G) illustriert. Hierbei dient in (F) die Struktur des Fusionsproteins des Maltose-Bindungsproteins mit dem ersten Exon von Huntingtin, einem ebenfalls amyloiden Protein, als Modell (Kim *et al.*, 2009c). In (G) ist lediglich das aktive Zentrum des Thioredoxins, in welches die Sequenz von Aβ(1-28) inseriert wurde, hervorgehoben (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Arne Skerra, generiert mit Pymol (DeLano, 2002)).

3.1.1 Aβ-Peptide

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Anticaline mit Spezifität für lösliche, monomere Formen von Aβ generiert werden. Zur Selektion bzw. Charakterisierung der selektierten Anticaline wurde die natürlich am häufigsten vorkommende Isoform Aβ40 verwendet, da mit

diesem Peptid, im Gegensatz zur noch schneller aggregierenden Variante A β 42 (Harper & Lansbury, 1997), relativ stabile monomere Peptidpräparationen erhalten werden können. Weiterhin wurden kurze Versionen, insbesondere das N-terminale Fragment A β (1-11) sowie das zentrale Peptidfragment A β (16-27), in den Selektionsexperimenten eingesetzt, da in zahlreichen Studien gezeigt worden war, dass Antikörper oder Antikörperfragmente mit Spezifität für den N-terminalen bzw. zentralen Bereich von A β vermehrt positive Effekte auf A β -Last, A β -Toxizität und Gedächtnisleistung *in vitro* und in Tiermodellen hatten.

In einem *in vitro* Vergleich von drei durch Immunisierung von Mäusen generierten Antikörpern waren diejenigen Antikörper mit Spezifität für den N-terminalen Bereich fähig, A β -Peptide zu solubilisieren und die Peptid-vermittelte Toxizität in neuronaler Zellkultur zu reduzieren. Antikörper, die gegen den zentralen Bereich gerichtet waren, hatten ebenfalls die Eigenschaft, A β zu solubilisieren, wohingegen Antikörper mit Spezifität für den C-terminalen Bereich keine positiven Effekte zeigten (Solomon *et al.*, 1997). Vergleichbare Ergebnisse wurden in Experimenten mit transgenen Mäusen erhalten (Bard *et al.*, 2003; 2000; McLaurin *et al.*, 2002). Hierbei waren peripher applizierte Antikörper mit Spezifität für den N-terminalen Bereich geeignet, A β -Plaques im Gehirn der Mäuse aufzulösen und die A β -Last zu reduzieren. Antikörper gegen den zentralen bzw. C-terminalen Bereich hatten keinen derartigen Effekt. Andere Studien zeigten dagegen, dass die periphere Applikation des Antikörpers m266, welcher ein zentrales A β -Epitop bindet, zum Ausstrom von A β aus dem Gehirn und somit zu einer Reduktion der A β -Last und zur Verbesserung der Gedächtnisleistung in transgenen Mäusen führt (DeMattos *et al.*, 2001; Dodart *et al.*, 2002). Die Verwendung von scFv-Fragmenten mit Epitopen im zentralen Bereich lieferte vergleichbare Ergebnisse (Frenkel *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Zameer *et al.*, 2006).

Die A β -Peptide wurden als chemisch synthetisierte, lyophilisierte Präparationen von unterschiedlichen Herstellern bezogen. Zur Immobilisierung der Peptide zwecks *Phage Display*-Selektion und zur Detektion im ELISA wurden diese bei der Synthese mit einer C-terminalen Biotingruppe versehen. Bei den kurzen Peptiden wurde diese Biotingruppe über Ethylendiamin direkt an die C-terminale Carboxylgruppe des jeweiligen Spacers (GlyGlyLys in A β (1-11), GlyGly in A β (16-27)) gekoppelt, welcher zur besseren sterischen Zugänglichkeit eingebaut worden war. Weiterhin besaßen die kurzen Peptide einen freien Lysinrest (als Bestandteil der nativen A β -Sequenz in A β (16-27) oder als Bestandteil des Spacers in A β (1-11)), um die Konjugation mit alternativen Markierungsreagenzien bzw. die Immobilisierung auf einem Sensorchip durch Aminkopplung zu ermöglichen. Bei A β 40 selbst wurde Biotin nicht direkt an den C-Terminus sondern an die Seitenkette eines zusätzlichen, C-terminalen Lysinrests gekoppelt. Weiterhin wurde eine N-terminal mit Fluorescein markierte Version des zentralen Peptids (Flu-A β (16-28)) für Fluoreszenzanisotropie-Experimente verwendet. Das A β 40-Peptid, welches für den Aggregationsassay und zur Kristallisation eingesetzt wurde, war hingegen nicht modifiziert.

3.1.2 Fusion von A β 40 mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP-A β 40)

Die Fusion mit anderen Proteinen, die selbst hohe Löslichkeit aufweisen, ist eine häufig angewandte Methode zur Expression von aggregationsanfälligen Proteinen in *E. coli*. Der wohl am häufigsten eingesetzte Fusionspartner in diesem Zusammenhang ist das Maltose-Bindungsprotein (MBP) von *E. coli* (Sun *et al.*, 2011). Gemäß dieser Strategie wurde ein Fusionsprotein aus A β 40 und MBP als Alternative zu den A β -Peptiden gentechnisch hergestellt und zur späteren Charakterisierung der selektierten Anticaline eingesetzt. Die Fusion von MBP N-terminal mit A β 40 bzw. A β 42 wurde auch von anderen Gruppen erfolgreich angewandt (Caine *et al.*, 2007; Hortschansky *et al.*, 2005).

Für die Expression des Fusionsproteins MBP-A β 40 und, als Kontrollprotein, MBP alleine wurden die Plasmide pASK75-MBP-Abeta40 bzw. pASK75-MBPhis von Dr. Michael Schneider in unserem Labor konstruiert. Analog dem publizierten Konstrukt von Hortschansky *et al.* (2005) kodiert pASK75-MBP-Abeta40 für ein Fusionsprotein aus MBP, gefolgt von einem His₆-tag, der Erkennungssequenz für die Protease des Tabakmosaikvirus (TEV), und der Sequenz von A β 40. In der TEV-Proteaseschnittstelle, welche die Abspaltung der A β -Sequenz nach der Reinigung des Fusionsproteins ermöglicht, wurde der Glycinrest in der P1'-Position der kanonischen Proteaseschnittstelle (ENLYFQ/G; Kapust *et al.*, 2002) durch die N-terminale Aminosäure des A β -Peptids, Aspartat, ersetzt. pASK75-MBPhis kodiert für das MBP-Strukturgen mit einem C-terminalen His₆-tag. Beide Strukturgene stehen unter Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994) und ermöglichen die Expression von ausreichenden Mengen der rekombinanten Proteine im Cytoplasma von *E. coli*.

Das Fusionsprotein MBP-A β 40 wie auch MBP wurden im 2 l-Maßstab im *E. coli*-Stamm JM83 produziert. Die Proteinreinigung erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie. Die Analyse durch SDS-PAGE (Abbildung 6) zeigte, dass das Fusionsprotein nach der Induktion des Promotors beträchtlich überexprimiert wurde und in hohen Ausbeuten im Gesamtzellextrakt vorlag. Durch schrittweise Reinigung mit Hilfe des His₆-tag, gefolgt von Größenausschlusschromatographie wurde das rekombinante Protein in einer hohen Reinheit von >95 % erhalten. Aufgrund der fehlenden Cysteinreste in MBP-A β 40 war kein Unterschied im Laufverhalten der gereinigten Proteinprobe unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen festzustellen. Die Reinigung von MBP-A β 40 und MBP mittels Größenausschlusschromatographie ergab, dass beide Proteine hauptsächlich als monomere Spezies mit theoretischen Molekulargewichten von 48,8 kDa bzw. 43,9 kDa eluierten (Abbildung 6B).

Zur Affinitätsanalyse in ELISA-Experimenten wurde MBP-A β 40 (und auch MBP) mit Biotin oder Digoxigenin kovalent gekoppelt. Zur Bestimmung der kinetischen Daten der

identifizierten A β -spezifischen Anticaline durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurde nicht markiertes MBP-A β 40 kovalent auf dem Sensorchip immobilisiert.

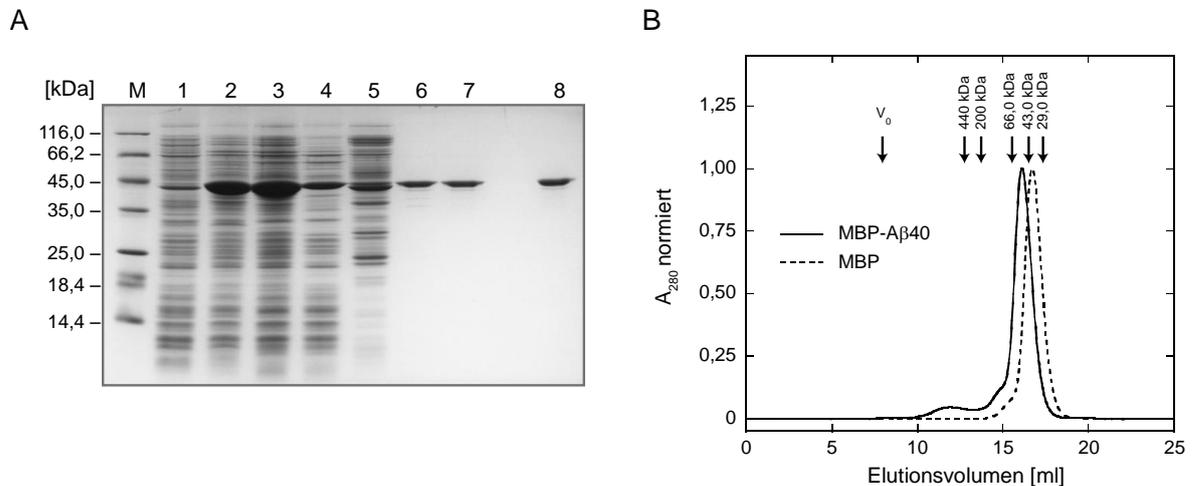


Abbildung 6: SDS-PAGE (A) und SEC (B) von cytoplasmatisch in *E. coli* exprimiertem MBP-A β 40 und MBP. (A) M: Proteingrößenmarker in kDa; 1: *E. coli* Gesamtzellextrakt vor Induktion der Genexpression von MBP-A β 40; 2: *E. coli* Gesamtzellextrakt 3 h nach Induktion; 3: Cytoplasmaextrakt; 4: Durchlauf der IMAC; 5: Wirtszell-Elutionsfraktion der IMAC; 6: eluiertes rekombinantes MBP-A β 40 aus der IMAC; 7: eluiertes monomeres MBP-A β 40 aus der SEC unter reduzierenden Bedingungen; 8: wie Spur 7 unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Die überlagerten Elutionsprofile von MBP-A β 40 (durchgezogen) und MBP (gestrichelt) zeigen, dass beide Proteine als Monomere (apparente Molmassen: 44,8 bzw. 31,3 kDa; theoretische Molmassen: 48,8 bzw. 43,9 kDa) von der Superdex 200 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen) eluierten. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (V_0) und die Elutionsmaxima der Eichproteine Apo-Ferritin (440 kDa), β -Amylase (200 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) an.

3.1.3 Insertion von A β (1-28) in den „Active-Site Loop“ von Thioredoxin (Trx-A β 28)

Ein zweites A β -Fusionskonstrukt, das zuvor von (Moretto *et al.*, 2007) erfolgreich für die aktive Immunisierung von Mäusen verwendet worden war, nutzt den Einbau unterschiedlicher A β -Fragmente in die Peptidschleife des aktiven Zentrums des bakteriellen Thioredoxins (Trx). Thioredoxin A ist ein kleines, gut lösliches und strukturell sehr stabiles Enzym, das in großen Mengen in *E. coli* vorkommt und durch seine Disulfidbrücke im aktiven Zentrum als Oxidoreduktase eine entscheidende Rolle in der Regulation des bakteriellen Redox-Gleichgewichts spielt. Der kurze Sequenzabschnitt Cys-Gly-Pro-Cys im aktiven Zentrum von Trx bildet einen über eine – als Bestandteil des katalytischen Zyklus reversibel geschlossene – Disulfidbrücke verknüpften kurzen Loop, der dem Lösungsmittel zugänglich ist. Diese Position eignet sich daher zur Insertion und zum Display von unterschiedlichsten

Peptidsequenzen, was auch im Rahmen der so genannten Peptid-Aptamer-Technologie erfolgreich genutzt wird (Borghouts *et al.*, 2005).

Mit dem Ziel der Generierung von Antikörpern gegen oligomere Formen von A β wurden von Moretto *et al.* (2007) Konstrukte verwendet, die eine, vier bzw. acht Kopien des N-terminalen A β (1-15)-Fragments in der Thioredoxin Schleifenregion inseriert hatten. Nach Immunisierung von Mäusen mit den tetrameren und oktameren Trx(A β 15)_{4/8}-Konstrukten konnten Antikörper mit Spezifität für oligomere und fibrilläre A β -Formen isoliert werden, die daraufhin in Tierversuchen auch signifikant verminderte A β -Pathologie in transgenen Mäusen vermittelten.

Mit dem Ziel der Generierung von Anticalinen gegen den N-terminalen oder zentralen Bereich monomerer A β -Peptide wurde in dieser Arbeit ein ähnliches Trx-Fusionsprotein verwendet. Hierfür wurde von Dr. Michael Schneider in unserem Labor eine Kopie der Sequenz von A β (1-28), welche N- und C-terminal von je drei Glycinresten als Linker flankiert war, in die Schleifenregion von Thioredoxin inseriert (Trx-A β 28). Zusätzlich trug das Hybridprotein einen His₆-tag zur Proteinreinigung. Zur Expression des unmodifizierten Trx als Kontrollprotein wurde das Plasmid pASK75his-Trx konstruiert, welches für Thioredoxin mit einem C-terminalen His₆-tag kodiert. Auf diesem Plasmid wurde anschließend das synthetische DNA-Fragment für A β (1-28) inseriert (Abbildung 5). Beide Vektoren ermöglichen wiederum unter Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotors/Operators die cytoplasmatische Expression der rekombinanten Proteine.

Analog zu MBP-A β 40 wurden Trx-A β 28 und auch Trx im *E. coli*-Stamm JM83 exprimiert und durch Metallchelate-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt.

Wie durch SDS-PAGE nachgewiesen wurde (Abbildung 7A), war auch die Expression des Fusionsproteins Trx-A β 28 nach Induktion der Genexpression mit Anhydrotetracyclin stark ausgeprägt. Das Protein war bereits nach dem ersten Reinigungsschritt mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie zu >99 % rein. In der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 7B) eluierten Trx-A β 28 und Trx jeweils als Monomere mit theoretischen Molekulargewichten von 16,5 bzw. 12,8 kDa.

Zur Selektion von A β -spezifischen Anticalinen mittels *Phage Display* wurde Trx-A β 28 mit Digoxigenin kovalent gekoppelt und anschließend zudem mit Iodacetamid umgesetzt, wodurch die freien Thiol-Gruppen im aktiven Zentrum von Trx maskiert wurden. Für den Kolonie-Filterstapel-Test und für ELISA-Experimente wurden Trx und Trx-A β 28 mit Digoxigenin oder Biotin markiert, aber nicht mit Iodacetamid geschützt.

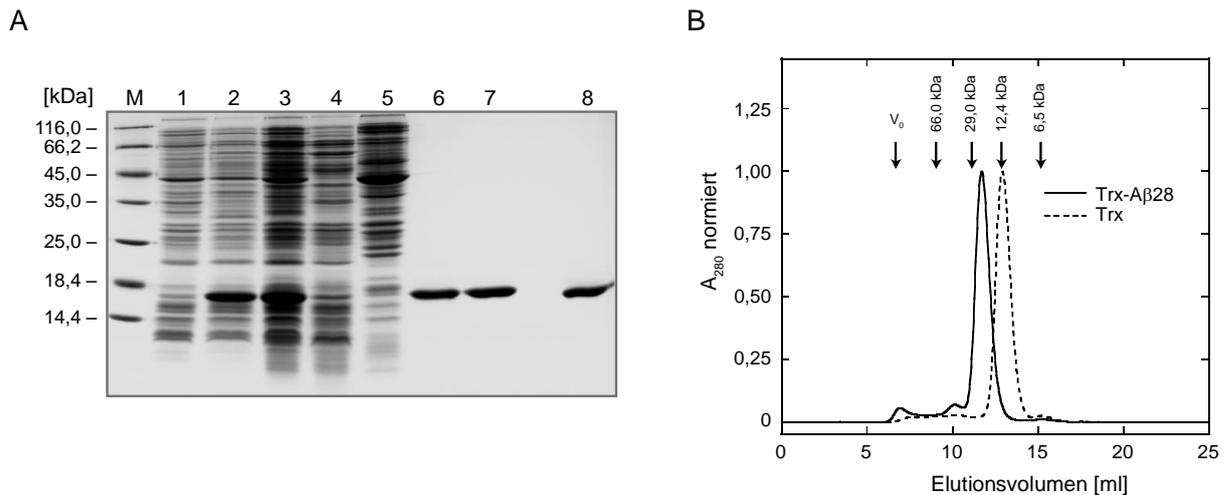


Abbildung 7: SDS-PAGE (A) und SEC (B) von cytoplasmatisch in *E. coli* exprimiertem Trx-A β 28 und Trx. (A) M: Proteingrößenmarker in kDa; 1: *E. coli* Gesamtzellextrakt vor Induktion der Genexpression von Trx-A β 28; 2: *E. coli* Gesamtzellextrakt 3 h nach Induktion; 3: Cytoplasmaextrakt; 4: Durchlauf der IMAC; 5: Wirtszell-Elutionsfraktion der IMAC; 6: eluiertes rekombinantes Trx-A β 28 aus der IMAC; 7: eluiertes monomeres Trx-A β 28 der SEC unter reduzierenden Bedingungen; 8: wie Spur 7 unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Die überlagerten Elutionsprofile von Trx-A β 28 (durchgezogen) und Trx (gestrichelt) zeigen, dass beide Proteine als Monomere (apparente Molmassen: 21,7 bzw. 13,6 kDa; theoretische Molmassen: 16,5 bzw. 12,8 kDa) von der Superdex 75 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen) eluierten. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (V_0) und die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) an.

Durch Konstruktion der Vektoren für die beiden Fusionsproteine MBP-A β 40 und Trx-A β 28 war die Expression von A β -Fragmenten in hohen Ausbeuten und löslicher Form in *E. coli* möglich. Allerdings blieb die Frage nach der konkreten Konformation von A β in diesen Konstrukten offen. Die beiden Modelle in Abbildung 5 geben Hinweise auf die hypothetische Struktur der beiden Fusionsproteine, wobei im Einklang mit den Resultaten der Größenausschlusschromatographie von einer gefalteten Konformation für den Fusionspartner MBP bzw. Trx ausgegangen werden kann. In MBP-A β 40, ist das A β -Peptid, welches lediglich über den N-Terminus mit dem Maltose-Bindungsprotein verbunden ist, relativ flexibel und kann vermutlich unterschiedliche Konformationen annehmen. Im Gegensatz dazu führt der Einbau des A β -Peptids in den Loop von Thioredoxin zu einer verminderten Flexibilität. Die möglichen Peptidkonformationen werden hierbei durch die Gerüststruktur des gefalteten Thioredoxins eingeschränkt. Der Einbau des Glycin-Linkers auf beiden Seiten der A β (1-28)-Sequenz sollte jedoch eine gewisse Flexibilität erlauben. Die gemäß Abbildung 5 geplanten A β -Varianten, die synthetischen Peptide sowie die rekombinanten Fusionsproteine, lagen als hochreine Proben vor und wurden durch SDS-PAGE abschließend vergleichend analysiert (Abbildung 8).

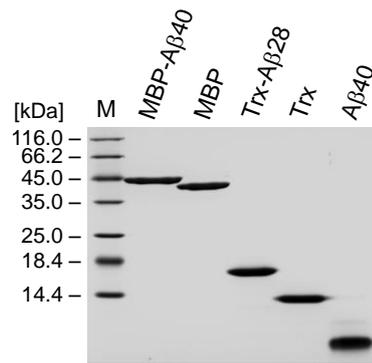


Abbildung 8: SDS-PAGE von A β 40 und den A β -Fusionsproteinen mit ihren jeweiligen Kontrollproteinen. Die Proteinbanden entsprechen den monomeren Proteinfractionen nach SEC unter reduzierenden Bedingungen. A β 40 wurde zunächst mit HFIP behandelt und dann in einem entsprechenden Volumen an PBS gelöst.

3.2 Design und Herstellung von Anticalin-Bibliotheken

Zur Selektion von Anticalinen mit Spezifität für A β wurden drei unterschiedliche Anticalin-Bibliotheken eingesetzt. Die beiden Phagemidbibliotheken auf Basis des humanen Lcn1 und des humanen Lcn2 waren bereits als konservierte Phagemidpräparationen vorhanden und konnten direkt zur *Phage Display*-Selektion verwendet werden. Eine weitere Bibliothek auf Grundlage des humanen ApoD wurde auf Grund der in unserem Labor gelösten ApoD-Kristallstruktur (PDB: 2HZR, Eichinger *et al.*, 2007) geplant, hergestellt und ebenfalls für die *Phage Display*-Selektion eingesetzt. Auf die einzelnen Bibliotheken, ihre randomisierten Positionen sowie zusätzliche Mutationen soll im Folgenden eingegangen werden. Zur Illustration der Vorgehensweise bei der Planung und Herstellung einer typischen Bibliothek wird die Verwendung von ApoD in diesem Kapitel - entgegen der chronologischen Reihenfolge der *Phage Display*-Experimente - zuerst beschrieben.

3.2.1 Planung und Herstellung der ApoD-basierten Anticalin-Bibliothek

3.2.1.1 Löslichkeitsoptimierung von ApoD

ApoD ist ein humanes Glycoprotein, das im Periplasma von *E. coli* in gefalteter und unglycosylierter Form exprimiert werden kann (Vogt & Skerra, 2001). Im Gegensatz zur bakteriellen Expression anderer Lipocaline, wie z.B. des humanen Lcn1 (Breustedt *et al.*, 2005), kommt es bei ApoD allerdings zu einer Lyse der bakteriellen Zellen, was als toxischer Effekt zu bewerten ist. Darüber hinaus zeigt das rekombinante Protein eine starke Tendenz zur Aggregation und zur unspezifischen Adsorption an Gefäßmaterialien (Vogt & Skerra, 2001).

Die fehlende Glycosylierung im bakteriell exprimierten ApoD ist vermutlich ein wichtiger, jedoch nicht der alleinige Grund für dieses Verhalten (Nasreen *et al.*, 2006). Cluster hydrophober Seitenketten, die an der Oberfläche dieses Lipocalins exponiert und unter anderem verantwortlich für die Interaktion mit dem *High Density Lipoprotein* (HDL) oder auch mit Zellmembranen sind, spielen sehr wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle für die Aggregationstendenz. Aus diesem Grund wurde ApoD von Dr. Amber Nasreen und Dr. Hyun Jin Kim am Lehrstuhl für Biologische Chemie mit dem Ziel der Herstellung einer besser löslichen Variante einem Engineering unterzogen (Nasreen *et al.*, 2006). Auf Grundlage der Kristallstruktur (s.o., Eichinger *et al.*, 2007) und mit Hilfe des pTUM4-Systems zur Überexpression der periplasmatischen Faltungshelfer DsbA, DsbC, FkpA und SurA (Schlapschy *et al.*, 2006) wurden diese Arbeiten von Prof. Dr. Arne Skerra und Irmgard Neumaier fortgesetzt und letztlich eine hervorragend lösliche, gut exprimierte ApoD-Variante erhalten. Diese trug gegenüber der nativen Sequenz die folgenden Aminosäuresubstitutionen: $\Delta 1$, $\Delta 2$, L23P, P133V, N134A, C116S, F3E, L5A, F92A, I117T, I118S, L120S, F121H.

Die von Nasreen *et al.* (2006) anfänglich verwendete ApoD-Variante unterschied sich in vier Positionen vom humanen Wildtyp-Protein: L23P, P133V und N134A zum Einführen der beiden internen *Bst*XI-Schnittstellen, die die zentrale Sequenzkassette flankieren, sowie C116S zum Austausch des ungepaarten Cysteinrests. Ausgehend von dieser Variante wurden hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche ausgetauscht, Mutationen kombiniert und die Ausbeute und Löslichkeit der neuen Varianten mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Die beste Variante (W99H/I118S/L120S) zeichnete sich durch eine dreifach verbesserte Ausbeute und durch das Auftreten eines wohldefinierten Monomer-Peaks in der Größenausschlusschromatographie aus. Allerdings eluierte dieses Monomer verzögert von der Säule und zeigte zudem Inhomogenität, was als Anlass für weiteres Engineering genommen wurde. Zur Vermeidung von Inhomogenitäten in den ApoD-Präparationen, die aus inkonsistenter Spaltung der OmpA-Signalsequenz resultierten, wurden zunächst die beiden N-terminalen Reste Gln und Ala deletiert (ApoD_IN79). Diese Version wurde schließlich erfolgreich kristallisiert und führte zur Aufklärung der Kristallstruktur (Eichinger *et al.*, 2007).

Ausgehend davon wurden 11 weitere Varianten mit unterschiedlichen Mutationen generiert. In der besten Variante, ApoD_IN90, wurde His99 in die ursprüngliche Aminosäure Trp rückmutiert und die neuen Mutationen F3E, L5A, F92A, F121H und I117T eingeführt. ApoD_IN90 zeichnet sich durch erhöhte Ausbeute an monomerem Protein, vernachlässigbare Aggregationstendenz und normales Elutionsverhalten in der Größenausschlusschromatographie aus. Die Bindungsaktivität für die natürlichen Liganden, Progesteron und Arachidonsäure, wurde durch die eingeführten Mutationen nicht nennenswert beeinflusst. Aufgrund der deutlich verbesserten Proteineigenschaften wurde ApoD_IN90 als Basis für die ApoD-Bibliothek in dieser Arbeit verwendet.

3.2.1.2 Auswahl der in der Bibliothek zu randomisierenden Positionen

Durch Vergleich einer früheren in unserer Arbeitsgruppe geplanten ApoD-Bibliothek (Vogt, 2003; Vogt & Skerra, 2004) mit der nachträglich gelösten Kristallstruktur (Eichinger *et al.*, 2007) wurden hier auf Basis der verbesserten Variante ApoD_IN90 die folgenden 18 Positionen, die über den oberen Teil der Kavität und die Schleifensegmente #1, #2 und #3 verteilt sind, randomisiert: Thr34, Thr35, Phe36, Glu37, Asn38, Glu60, Arg62, Asn68, Ile70, Phe89, Ser90, Trp91, Met93, Ala96, Ser113, Thr115, Val123 und Phe125 (Abbildung 9).

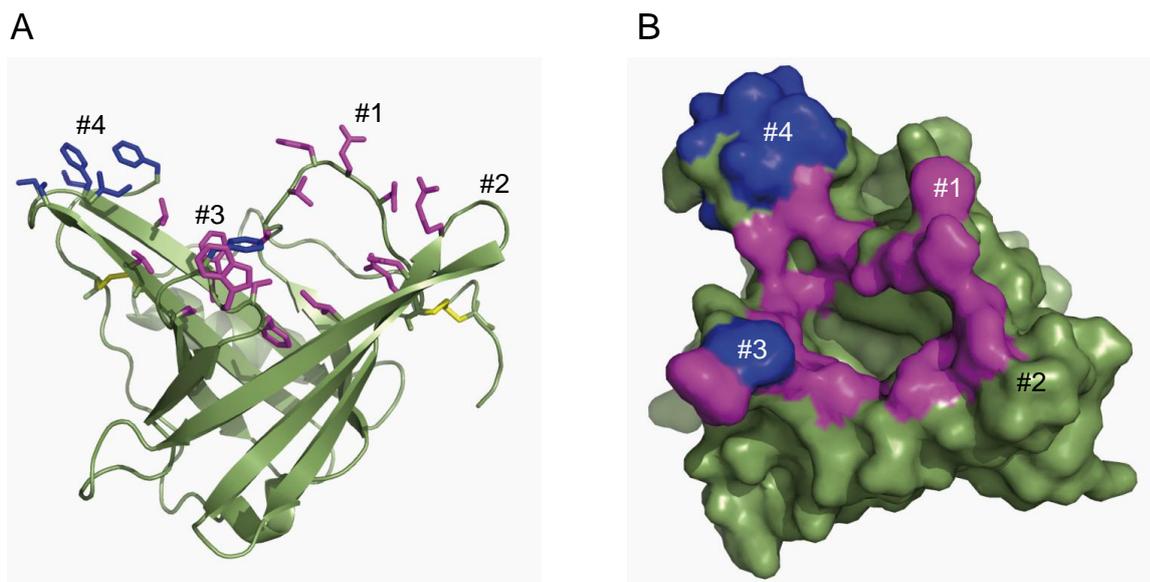


Abbildung 9: Struktur des ApoD (PDB: 2HZQ) als Bändermodell in Seitenansicht (A) und als Oberflächendarstellung mit Blick in die Anticalin-Kavität (B). Die vier Peptidschleifen am Eingang der Bindungstasche sind in beiden Darstellungen markiert. (A) Die in der neuen Zufallsbibliothek randomisierten Positionen sind als Stäbe in magenta dargestellt. Positionen, die zur Verbesserung der Löslichkeit mutiert wurden sind blau, die beiden Disulfidbrücken gelb markiert. (B) Der Blick auf die Oberfläche der ApoD-Bibliothek veranschaulicht die Lage der randomisierten Positionen (magenta) im oberen Bereich der Bindungstasche.

Bei Wahl der zu randomisierenden Positionen wurde u.a. darauf geachtet, dass die Seitenketten der ausgewählten Aminosäuren in das Innere der β -Fass-Struktur gerichtet sind. Eine Ausnahme war hierbei Phe36 in Loop #1. Dieser Rest zeigt in der Wildtyp-ApoD-Struktur zwar nach außen, kann aber aufgrund seiner Position im flexiblen Loop #1 leicht nach innen klappen und wurde daher für die Randomisierung ebenfalls ausgewählt. Weitere in Loop #1 randomisierte Aminosäuren waren Thr34, Thr35, Glu37 und Asn38. Glu60, Asn68 und Ile70 liegen auf den β -Strängen C und D und zeigen jeweils mit ihren Seitenketten in die Kavität. Im Gegensatz dazu wurden Leu61 und Val67, welche benachbart auf den gleichen β -Strängen liegen, nicht zur Randomisierung ausgewählt, da ihre Seitenketten in der β -Fass-Struktur nach außen gerichtet sind. Arg62 ist die einzige in Loop #2 randomisierte Position, da der Abstand

der anderen Reste in dieser Schleife zum Zentrum der Lipocalin-Tasche zu groß scheint, um zur Komplexierung eines relativ kleinen Liganden, wie dem A β -Peptid, maßgeblich beizutragen. Phe89, Ser90, Trp91 und Met93 befinden sich in Loop #3. Lediglich Position Phe92 wurde in dieser Schleife nicht randomisiert, da dieser aromatische Rest zur Generierung der verbesserten Variante ApoD_IN90 ausgetauscht worden war (F92A). Loop #4 (Ile117-Ser120) wurde nicht verändert, da die meisten hydrophoben Aminosäuren in diesem Schleifensegment zur Generierung der löslichkeitsverbesserten Variante ApoD_IN90 bereits mutiert worden waren. Die restlichen randomisierten Reste, Ala96, Ser113, Thr115, Val123 und Phe125, befinden sich im oberen Bereich der β -Stränge F, G und H und weisen mit ihren Seitenketten zur zentralen Achse der β -Fass-Struktur. Zusätzlich zu diesen randomisierten Positionen umfasst die Bibliothek alle Mutationen der verbesserten Variante ApoD_IN90 (Δ 1, Δ 2, L23P, P133V, N134A, C116S, F3E, L5A, F92A, I117T, I118S, L120S, F121H). Wie in ApoD_IN90 wurden auch in der Bibliothek die beiden Disulfidbrücken (Cys8-Cys114, Cys41-Cys165) erhalten. Abbildung 10 zeigt ein Sequenzschema der verwendeten ApoD-Bibliothek und illustriert die in Abschnitt 3.2.1.3 beschriebene Gensynthese aus neun überlappenden Oligodesoxynukleotiden.

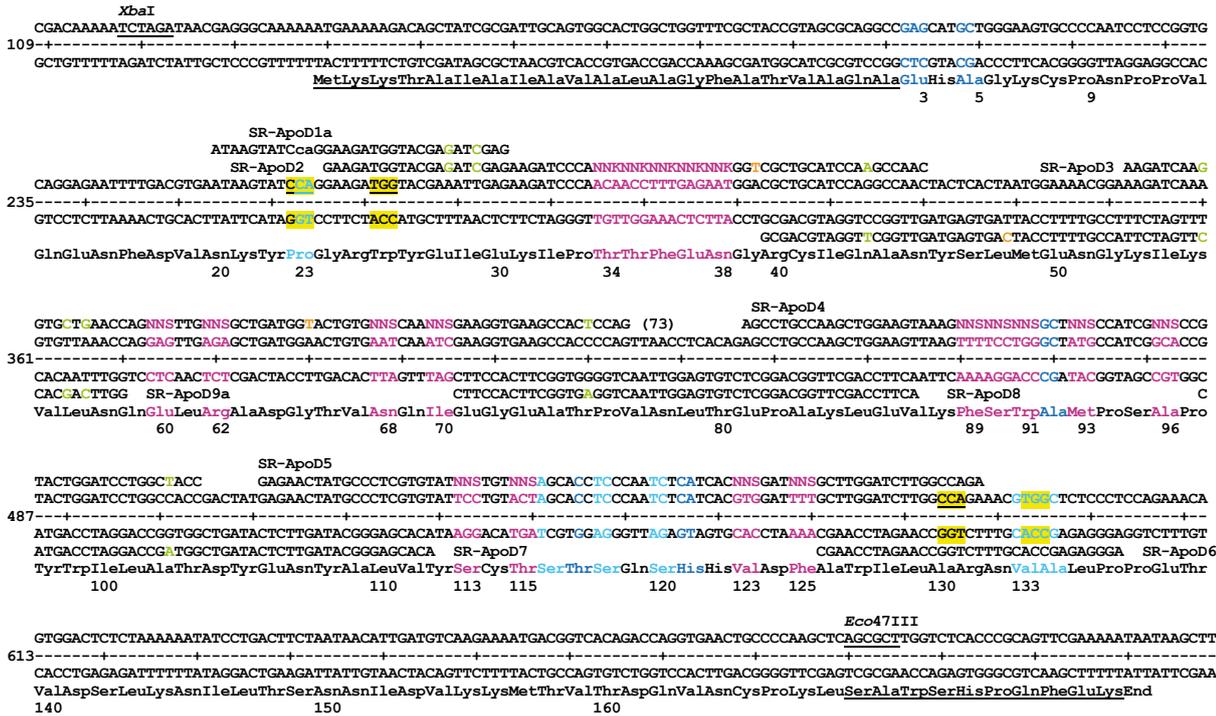


Abbildung 10: Illustration der Gensynthese der ApoD-Bibliothek auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäuresequenz. Abgebildet ist das Strukturgen für das rekombinante ApoD-Protein inklusive OmpA-Signalsequenz und *Strep*-tag II (unterstrichen) auf dem Expressionsvektor pApoD_IN90. Die Positionen der 18 randomisierten Reste sind beziffert und in der Farbe Magenta markiert. Die vier zur Randomisierung verwendeten Oligodesoxynukleotide mit den degenerierten NNK- bzw. NNS-Codons sind oberhalb der Sequenz aufgeführt. Die drei reversen Primer zum Füllen der Lücken im Verlauf der Gensynthese durch PCR-Assembly sowie die zwei flankierenden Oligodesoxynukleotide zur Amplifizierung des randomisierten Genprodukts sind ebenfalls dargestellt. Die beiden *Bst*XI-Schnittstellen (gelb) dienen zur Klonierung der randomisierten Genkassette. Hierfür wurden die Mutationen L23P, P133V und N134A eingeführt. Mutationen nach Nasreen *et al.* (2006) sind cyan gefärbt, zusätzliche Mutationen in der verbesserten Variante ApoD_IN90 blau. Stille Mutationen zur Unterstützung der Gensynthese (z.B. zur Erhöhung des G/C-Gehalts oder zur Vermeidung von Oligo-G/C-Abschnitten) sind hellgrün dargestellt, stille Mutationen zur Verbesserung des Codon Usage orange.

3.2.1.3 Herstellung der ApoD-Anticalin-Bibliothek

Zur Herstellung der ApoD-Bibliothek wurde zunächst die *Xba*I/*Eco*47III-Kassette, welche das gesamte Lipocalin-Strukturgen umfasst, aus dem Vektor pApoD_IN90 (pASK75-hApoDM4delta1-2-H99W-F3E-L5A-F92A-I117T-F121H) auf den Vektor pApoD19 subkloniert. Die so generierten Phasmide kodierten für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, der ApoD-Variante mit den löslichkeitsverbessernden Mutationen, dem *Amber*-Stopcodon und dem Phagenhüllprotein pIII (Aminosäuren 3 bis 406). In der Dissertation von Dr. Martin Vogt wurden Fusionskonstrukte von ApoD mit dieser

unverkürzten Form pIII des Phagenhüllproteins mit denen der verkürzten Versionen Δ pIII (68 bis 406) und $\Delta\Delta$ pIII (217 bis 406) verglichen. Hierbei wurde gezeigt, dass die Fusion mit dem kompletten pIII-Protein zu vermindertem proteolytischem Abbau und zu erhöhter Ausbeute an funktionellen ApoD-präsentierenden Phagemiden führte.

Mit Hilfe von neun überlappenden Oligodesoxynukleotiden wurde die ApoD-Bibliothek in einer PCR-Reaktion generiert. Ähnlich der von Beste *et al.* (1999) verfolgten PCR-Assemblystrategie wurden Mutationen an den ausgewählten Positionen mittels degenerierter NNK- bzw. NNS-Codons in den Oligodesoxynukleotiden (SR-ApoD2, SR-ApoD3, SR-ApoD4 und SR-ApoD5, Abbildung 10) eingeführt. N entspricht einer Mischung aller vier Basen A, C, G und T, K einer Mischung von G und T und S einer Mischung von C und G. Die Lücken wurden mit drei dem nicht-kodierenden Strang entsprechenden Oligodesoxynukleotiden überbrückt (SR-ApoD7, SR-ApoD8, SR-ApoD9a). Das gesamte Strukturgen wurde mit zwei flankierenden Oligodesoxynukleotiden (SR-ApoD1a, SR-ApoD6) amplifiziert. NNK/NNS kodieren für alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren sowie für das *Amber*-Stopcodon (TAG), welches in *E. coli supE*-Stämmen teilweise als Glutamin translatiert wird (Miller, 1992). Der für das *Phage Display* verwendete *E. coli*-Stamm XL-1 Blue (Bullock *et al.*, 1987) trägt diesen Genotyp.

Das in der Gensynthese hergestellte PCR-Fragment mit einer Länge von 353 bp wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bst*XI geschnitten und in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pApoD19_IN90 inseriert. Zur Herstellung der ApoD-Bibliothek wurden 20 pmol des Vektors mit 20 pmol des Inserts ligiert (s. Abschnitt 2.2.5.4) und zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt. Die Kultur wurde im Anschluss sowohl zur Herstellung der Phagemide (s. Abschnitt 2.4.2.1) als auch zur Präparation der Plasmid-DNA im Midi-Maßstab (s. Abschnitt 2.2.3.2) eingesetzt. Durch Auszählen der Transformanden wurde die Komplexität der Bibliothek zu $1,1 \times 10^9$ unabhängigen Klonen bestimmt. Die so erreichte Diversität war ausreichend, um Selektionsexperimente durchzuführen. Unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge erschien sie jedoch verhältnismäßig niedrig, was auf mangelnde Ligierungseffizienz und nur mäßige Transformationskompetenz der hergestellten Zellen ($1,0 \times 10^9 \mu\text{g}^{-1}$) zurückzuführen war.

Zur Phagemidproduktion wurde die Kultur zunächst mit VCS-M13 Helferphagen infiziert und daraufhin die Genexpression des Fusionsproteins aus ApoD und dem Phagenhüllprotein pIII mit Anhydrotetracyclin induziert. Rekombinante Phagemide wurden gemäß den Abschnitten 2.4.2.1, 2.4.3 und 3.4.1 produziert, gereinigt und unmittelbar zur Selektion verwendet.

3.2.2 Beschreibung der verwendeten Lcn1'-Anticalin-Bibliothek

Basierend auf der Sequenz des humanen Tränenlipocalins wurde eine andere Anticalin-Bibliothek von Prof. Dr. Arne Skerra und Dr. Amber Nasreen geplant und hergestellt. Wegen des bekannten proteolytischen Abbaus der N-terminalen vier Aminosäurereste (His-His-Leu-Leu, persönliche Mitteilung Prof. Dr. Bernhard Redl, Innsbruck) wurden diese aus dem für Lcn1 kodierenden Strukturgen deletiert. Zur Herstellung der Bibliothek wurden 18 Aminosäurepositionen in den vier Schleifenregionen des Lcn1 randomisiert (Abbildung 11): neun in Loop #1 (Arg26, Glu27, Phe28, Pro29, Glu30, Met31, Asn32, Leu33, Glu34), drei in Loop #2 (Leu56, Ile57, Ser58), zwei in Loop #3 (Asp80, Lys83) und vier in Loop #4 (Glu104, Leu105, His106, Lys108). Im Gegensatz zu den auf ApoD- und Lcn2' basierenden Anticalin-Bibliotheken (s. Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.3) wurden sowohl der ungepaarte Cysteinrest Cys101 als auch die Disulfidbrücke Cys61-Cys153 in der hier verwendeten Lcn1'-Bibliothek gegen Serinreste ausgetauscht (C61S/C101S/C153S). Durch die Mutationen R111P und K114W wurde zudem die C-terminale *Bst*XI-Schnittstelle eingeführt und eine hydrophobe sperrige Seitenkette (Trp114) im Inneren der Bindungstasche eingebaut, um den tieferen Teil der geräumigen Bindungstasche des Lcn1 zu verschließen. In späteren Experimenten zur Analyse der Thermostabilität des Lcn1 zeigte sich ein stabilisierender Effekt dieses Aminosäureaustausches (s. Abschnitt 3.3.7). Zur Unterscheidung von der ursprünglichen Lcn1-Sequenz wurde die Basis-Variante mit den beschriebenen fixen Mutationen (Δ 1-4 His-His-Leu-Leu, C61S, C101S, C153S, R111P, K114W, *Strep*-tag II) als Lcn1' bezeichnet.

Die Lcn1'-Bibliothek wurde gemäß der zuvor für das Bilin-Bindungsprotein veröffentlichten zweistufigen PCR-Strategie hergestellt (Beste *et al.*, 1999; Skerra, 2001). Hierbei wurden in einem ersten Schritt mit jeweils zwei Oligodesoxynukleotidpaaren mit degenerierten Basentriplets an den zu mutierenden Positionen zwei PCR-Fragmente hergestellt, von denen eines die randomisierten Bereiche von Loop #1 und #2 und das andere die Bereiche von Loop #3 und #4 enthielt. In einem zweiten PCR-Schritt wurde mit den beiden isolierten PCR-Fragmenten mit zwei flankierenden Primern zur Amplifizierung und einem dritten Primer zum Überbrücken der Lücke zwischen den beiden Fragmenten das gesamte *Bst*XI-Fragment amplifiziert. Wie auch bei der ApoD-Bibliothek (s. Abschnitt 3.2.1.3) enthielten die Oligodesoxynukleotide zur Herstellung der Lcn1'-Bibliothek degenerierte NNS-Codons. Das randomisierte *Bst*XI-Fragment wurde nach der Gensynthese in den Vektor pTlc27 subkloniert, welcher für ein Fusionsprotein aus Lcn1' mit einem C-terminalen *Strep*-tag II, dem *Amber*-Stopcodon und der verkürzten Form des Phagenhüllproteins Δ Δ pIII (Aminosäuren 217 bis 406) kodiert. Die in dieser Arbeit verwendete Lcn1'-Bibliothek war eine bei der Pieris AG, Freising, hergestellte Version mit einer Komplexität von 4×10^9 .

```

AGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGCTCAGACGAGGAGATTGAGGATGTGTCAGGGACGTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
118 TCTATTGCCTCCCGTTTTTTTACTTTTCTGTCTGATAGCGCTAACGTCAACGGTGCACCGCAAAAGCGATGGCATCGGTCCGGCGGAGTCTGCTCCTAAGTCTACACAGTCCCTGCACC
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaAlaSerAspGluGluIleGlnAspValSerGlyThrTrp
MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAlaAlaSerAspGluGluIleGlnAspValSerGlyThrTrp
5 10

Bio-TATCTGAAGGCCATGACCGTGGAC
AAGGCCATGACCGTGGACNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS
TATCTGAAGGCCATGACCGTGGACAGGGAGTTCCTTGAGATGAATCTGGATCCGGTGCACCCATGACCCCTCAGACCCCTGGAAGGGGGCAACCTGGAAGCCAAGGTACCATGCTGATA
241 ATAGACTTCCGGTACTGCCACTTCCCTCAAGGGACTCTACTTAGACCTTAGCCACTGTGGGTACTGGGAGTGTGGGACCTTCCCCCGTTGGACCTTCGGTTCAGTGGTACGACTAT
CTTCGGTTCCAGTGGTACNNSNNS
TyrLeuLysAlaMetThrValAspArgGluPheProGluMetAsnLeuGluSerValThrProMetThrLeuThrThrLeuGluGlyGlyAsnLeuGluAlaLysValThrMetLeuIle
20 26 30 34 40 50 56 57

GACGAGCCGGGAAAATACACGGCCNNSGGGGCNSCAGTGGCATAACATC
AGTGGCCGGAAGCCAGGAGTGAAGCCGCTCTGGAGAAAACCTGACGAGCCGGGAAAATACACGGCCGACGGGGCAGCACGCTGGCATAACATCAGGTGCACACCTGAAGGACCACTAC
361 TCAACGGCCAGGGTCTCCACTTCCGGCAGGACCTCTTTGACTGCTCGGCCCTTTATGTCCGGCTGCCCGCTCGTGACCGTATGTAGTAGTCCAGCGTGCACCTTCTGGTGTATG
NNSCCGGCCAGGGTCTCCAC
CGCCAGGGTCTCCACTTCCGGCAGGACCTCTTTGACTACTCGGCCCTTTATG
SerGlyArgSerGlnGluValLysAlaValLeuGluLysThrAspGluProGlyLysTyrThrAlaAspGlyGlyLysHisValAlaTyrIleIleArgSerHisValLysAspHisTyr
58 60 61 70 80 83 90

ATCTTTTACTCTGAGGGCAGCTCCACGGGAAGCCGGTCCCGGGGTGGCTCTCGTGGGCAGAGACCCCAAGAACCACTGGAAGCCTTGGAGGACTTTGAGAAAGCCGAGGACCCCGC
481 TAGAAAATGACTCCCGCTGAGGTTGCCCTTCGGCCAGGGTCCCCACACCGAGCACCCGCTCTCTGGGGTCTTGTGGACCTTCGGAACCTCCTGAAACTCTTTCGGCGTCTCCGGCG
TAGAAAATGACTCCCGNNSNNSNNSCCNNSGGCCAGGCTCCCCACACCGAGC
AGGGTCCCCACACCGAGCACCCGT-Bio
IlePheTyrSerGluGlyGluLeuHisGlyLysProValProGlyValTrpLeuValGlyArgAspProLysAsnAsnLeuGluAlaLeuGluAspPheGluLysAlaAlaGlyAlaArg
101 104 106 108 111 114 120 130

GGACTCAGCAGGAGCATCCTCATCCCCAGGCAGAGCGAAACCAAGCTCTCCAGGGAGCGCTTGGTCTACCCGAGTTCGAAAAATAAAGCTTGACCTGTGAAGTAAAAATGGCG
601 CCTGAGTCGCTCCTCGTAGGAGTAGGGTCCGCTCGCTTGGTCGAGAGGTCCTCGGAACACAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTATTATTCGAATGGACACTTCACTTTTACCGC
GlyLeuSerThrGluSerIleLeuIleProArgGlnSerGluThrSerSerProGlySerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEnd
140 150 153
    
```

Abbildung 11: Darstellung der verwendeten Lcn1'-Bibliothek auf Ebene der Nukleotid- und Aminosäuresequenz. Abgebildet ist das Strukturgen von Lcn1' (Aminosäure 5-157 des humanen Lcn1 mit den im Text beschriebenen fixen Mutationen) inklusive OmpA-Signalsequenz und *Strep*-tag II (unterstrichen). 18 Aminosäurepositionen (magenta) in den vier Peptidschleifen am Eingang der Bindungstasche wurden bei der Herstellung der Bibliothek mit den dargestellten Oligodesoxynukleotiden mittels degenerierter NNS-Codons randomisiert. Die *Bst*XI-Schnittstellen (gelb) dienten der Klonierung der randomisierten Genkassette, wobei zur Einführung der C-terminalen *Bst*XI-Schnittstelle die Mutationen R111P/K114W eingeführt wurden. Die drei Cysteinreste (Cys61, Cys101 und Cys153) des humanen Lcn1 wurden jeweils zu Serin mutiert (grün).

3.2.3 Beschreibung der verwendeten Lcn2'-Anticalin-Bibliothek

Die Lcn2-basierte Anticalin-Bibliothek wurde, ausgehend von der klonierten cDNA (Breustedt *et al.*, 2006), ähnlich der Gensynthese der ApoD-Bibliothek in einer PCR-Reaktion mit acht überlappenden kodierenden und zwei kurzen flankierenden Oligodesoxynukleotiden hergestellt. Zur Einführung der N-terminalen *Bst*XI-Schnittstelle wurde zunächst die Substitution Q28H vorgenommen. Die native Disulfidbrücke zwischen Cys76 und Cys175 wurde erhalten, der einzelne ungepaarte Cysteinrest an Position 87 wurde dagegen zu Serin ausgetauscht (C87S). Zur Unterscheidung von der ursprünglichen Lcn2-Sequenz wurde diese Basis-Variante mit den beschriebenen fixen Mutationen (Q28H, C87S) sowie dem C-terminalen *Strep*-tag II als Lcn2' bezeichnet.

Durch strukturelle Analyse und Vergleich der Bindungsmechanismen verschiedener Lcn2-basierter Anticaline in Komplex sowohl mit Proteinliganden, wie dem humanen CTLA-4

Zur Mutagenese der ausgewählten Aminosäuren wurden Oligodesoxynukleotide mit degenerierten NNK-Codons verwendet (Abbildung 12). Das randomisierte *Bst*XI-Fragment wurde nach der Gensynthese in den Vektor pNGAL102 subkloniert und zur Herstellung der Phagemidbibliothek verwendet. pNGAL102 kodiert für ein Fusionsprotein aus Lcn2' ohne den C-terminalen *Strep*-tag II, gefolgt von einem *Amber*-Stopcodon, und dem Phagenhüllprotein pIII (Aminosäuren 3 bis 406). Die Bibliothek wurde in einer Komplexität von 10^{10} einzelnen Transformanden bei der Pieris AG, Freising, hergestellt und für unterschiedliche *Phage Display*-Selektionen, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, eingesetzt.

3.3 Selektion A β -bindender Lcn1'-Varianten

3.3.1 *Phage Display*-Selektion von Lcn1'-Varianten mit biotinylierten A β -Targets

Im ersten *Phage Display*-Experiment wurde die Selektion mit der in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Lcn1'-Bibliothek und einer äquimolaren Mischung der beiden biotinylierten Peptide A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.3). Zur Affinitätsanreicherung wurden Streptavidin-Partikel mit einer 1 μ M Mischung der beiden Peptide beladen. Zum Entfernen von ungebundenen Peptiden wurden die Partikel im Anschluss gewaschen und dann mit 2 % BSA in PBS/T blockiert. Parallel wurden ca. 10^{11} der PEG-präzipitierten Phagemide ebenfalls blockiert und daraufhin mit den paramagnetischen Partikeln inkubiert. Durch anschließende Inkubation mit D-Desthiobiotin wurden diejenigen Anticaline, die durch Interaktion zwischen Streptavidin und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel gebunden waren, eluiert. Nicht gebundene Phagemide wurden durch zehnmaliges Waschen der paramagnetischen Partikel entfernt.

Die Elution der gebundenen Phagemide erfolgte schließlich durch Inkubation in 100 mM Glycin/HCl pH 2,2 (saure Elution). Der pH-Wert der eluierten Phagemidlösung wurde unmittelbar durch Zugabe von 0,5 M Tris neutralisiert, um eine Beeinträchtigung der Infektivität der Phagemide zu vermeiden (Barbas *et al.*, 2004). Die so eluierten Phagemide wurden durch Infektion von *E. coli* XL1-Blue amplifiziert und dem nächsten Selektionszyklus zugeführt. Insgesamt wurden fünf Selektionszyklen durchlaufen. Zur Analyse der einzelnen Zyklen wurde der Phagemidtiter ausgewählter Waschfraktionen sowie der Elutionsfraktion bestimmt und in einem Diagramm im Verhältnis zu den eingesetzten Phagemiden aufgetragen (Abbildung 13). Hierbei wurde eine deutliche Anreicherung der Anticaline um mehr als drei Größenordnungen im Verlauf der Selektionszyklen beobachtet. Phagemide, die in den Selektionszyklen 3, 4 und 5 eluiert wurden, wurden anschließend im Kolonie-Filterstapel-Test bezüglich ihrer Bindungseigenschaft gegenüber A β analysiert.

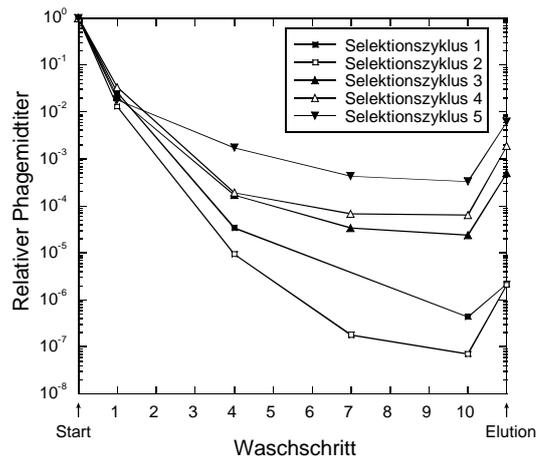


Abbildung 13: Überlagerung der Elutionsprofile der einzelnen Anreicherungszyklen im Verlauf der *Phage Display*-Selektion von A β -spezifischen Lcn1'-Varianten. Streptavidin-Partikel wurden zunächst mit einer äquimolaren Mischung aus A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio beladen und dann mit den Lcn1'-Phagemiden inkubiert. Nach zehn Waschschriffen wurden die gebundenen Phagemide mit 100 mM Glycin/HCl pH 2,2 eluiert. Die Titer der eingesetzten Phagemide (Zugabe), ausgewählter Waschfraktionen (1, 4, 7 und 10) sowie der Elutionsfraktion (Elution) wurden bestimmt und als Quotient der in jedem Selektionszyklus eingesetzten Phagemide (relativer Phagemidtitel) halblogarithmisch aufgetragen.

3.3.2 Identifizierung von A β -spezifischen Lcn1'-Varianten im Kolonie-Filterstapel-Test und Sequenzanalyse

Die effiziente und parallele Durchmusterung einer großen Anzahl an Lcn1'-Varianten bezüglich ihrer Liganden-Bindungseigenschaften erfolgte im Anschluss an die Phagemid-selektion mit Hilfe des Kolonie-Filterstapel-Test (s. Abschnitt 2.4.5; Rauth *et al.*, 2010; Skerra *et al.*, 1991a). Das Prinzip dieses Assays ist in Abbildung 14 illustriert.

Zur periplasmatischen Expression der selektierten Lcn1'-Varianten als Fusionsproteine mit der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) wurden die *Bst*XI-Kassetten der in den Selektionszyklen 3, 4 und 5 eluierten Phagemide in den analog geschnittenen Vektor pTlc28 inseriert. Für den Kolonie-Filterstapel-Test wurde der *E. coli* Stamm TG1-F⁻ verwendet, da dieser Stamm das *Amber*-Stopcodon, welches bei der Randomisierung zugelassen worden war, als Glutamin translatiert und zudem eine kurze Generationszeit aufweist. Die Bakterienzellen wurden mit dem Ligierungsprodukt transformiert und der Test gemäß Abschnitt 2.4.5 durchgeführt.

Hierbei kommt es im Verlauf der langen Induktionszeit zu einer partiellen Lyse der bakteriellen Zellen, wodurch Proteine aus dem Periplasma selektiv freigesetzt werden. Nach Diffusion durch eine hydrophile Membran, die die Kolonien trägt und definierte Porengröße und niedrige Proteinbindungskapazität besitzt, werden die Fusionsproteine spezifisch mittels

Wechselwirkung zwischen HSA und der ABD auf der unteren, hydrophoben Membran gebunden. Die so immobilisierten Anticalin-Varianten können dann ähnlich einem Western Blot auf ihre Bindungsaktivität für unterschiedliche Liganden getestet werden.

Kolonien, die nach Inkubation mit den biotinylierten A β -Peptiden ein positives Signal hervorriefen, wurden auf der hydrophilen Membran identifiziert, amplifiziert und weiter analysiert.

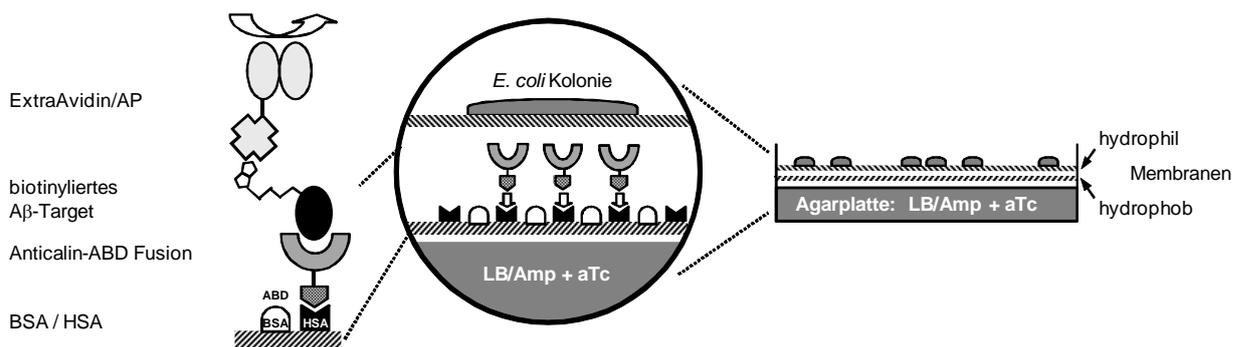


Abbildung 14: Prinzip des Kolonie-Filterstapel-Tests zur Identifizierung von A β -spezifischen Anticalinen. Fusionsproteine aus der ABD und dem Pool der im *Phage Display* angereicherten Anticalin-Varianten wurden von einzelnen *E. coli* Kolonien exprimiert und über die Wechselwirkung zwischen HSA und der ABD auf der hydrophoben Membran immobilisiert. Zur Identifizierung von A β -spezifischen Anticalinen wurde die Membran daraufhin separiert und mit den biotinylierten A β -Peptiden inkubiert. Gebundene Peptide wurden schließlich durch Inkubation mit einem ExtrAvidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat durch chromogene Farbreaktion detektiert. Kolonien, die ein starkes Farbsignal hervorriefen, wurden auf der hydrophilen Membran identifiziert, amplifiziert und weiter analysiert.

Im Gegensatz zum *Phage Display*-Experiment wurden im Kolonie-Filterstapel-Test die beiden Peptide separat eingesetzt, d.h. die Membranen wurden entweder mit 100 nM A β (1-11)-Bio oder mit 100 nM A β (16-27)-Bio inkubiert. Gebundene Peptide wurden durch ein ExtrAvidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, das die Biotin-Gruppe, nicht aber das *Strep-tag* II bindet, nachgewiesen. Bei Verwendung biotinylierter Liganden kann es allerdings im Fall verstärkter Zelllyse zu einem Hintergrundsignal kommen, das durch das *E. coli* eigene *Biotin Carboxyl Carrier Protein* hervorgerufen wird. Aus diesem Grund wurden die Liganden im weiteren Verlauf dieser Arbeit für den Kolonie-Filterstapel-Test, soweit möglich, mit dem alternativen Markierungsreagenz Digoxigenin modifiziert.

In Abbildung 15 sind die entwickelten Membranfilter nach Selektionszyklus 3 und 5 dargestellt. Die Membranen, die mit dem Peptid A β (16-27)-Bio inkubiert wurden, zeigten deutliche Farbsignale. Im Gegensatz dazu konnten nach Inkubation mit dem Peptid A β (1-11)-

Bio unabhängig vom Selektionszyklus keinerlei Signale detektiert werden. Kolonien, die ein deutliches Signal hervorriefen, wurden auf der hydrophilen Membran zugeordnet und in einem nachfolgenden Filterstapeltest mit beiden Peptiden getestet (Abbildung 15C und D).

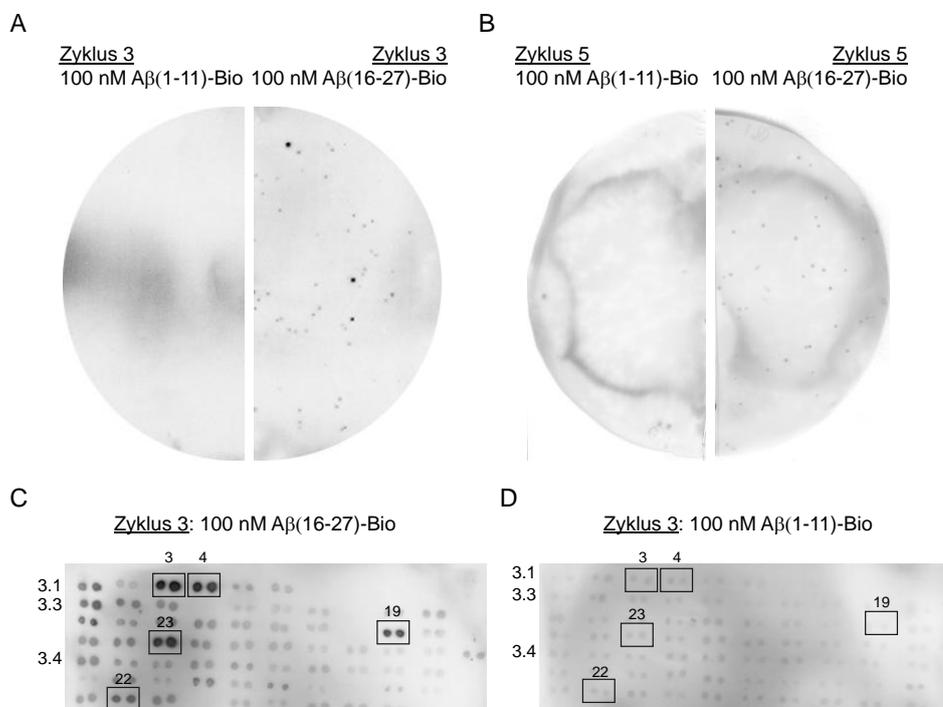


Abbildung 15: Kolonie-Filterstapel-Test zur Identifizierung von Aβ-spezifischen Lcn1'-Varianten. (A) und (B) zeigen primäre Filter nach Selektionszyklus 3 und 5, welche konsekutiv mit 100 nM Aβ(1-11)-Bio (linke Hälfte) bzw. mit 100 nM Aβ(16-27)-Bio (rechte Hälfte) und ExtrAvidin-AP inkubiert wurden. Die Membranfilter, die mit dem Peptid Aβ(16-27)-Bio inkubiert wurden, zeigen deutliche Farbsignale, die in ihrer Intensität variieren. Die wenigen schwachen Farbsignale auf der linken Membran in (B) stellen Artefakte dar, da sie den Löchern, die zu Markierungszwecken gestanzt wurden, entsprechen. (C) und (D) zeigen einen sekundären Filter mit Varianten, die nach Selektionszyklus 3 identifiziert wurden. Positive Kolonien aus dem primären Test wurden als Duplikate auf zwei identische Membranen gespottet und bezüglich ihrer Bindung gegenüber beiden Peptiden getestet (Aβ(16-27)-Bio in (C), Aβ(1-11)-Bio in (D)). 3.1, 3.3 und 3.4 bezeichnen jeweils die Membran aus dem primären Assay; 3, 4, 19, 23 und 22 bezeichnen die Kolonien, die anschließend durch Sequenzierung analysiert wurden.

Die Sequenzanalyse 20 ausgewählter Varianten lieferte vier unterschiedliche Sequenzen, wobei drei der vier Varianten mehrfach auftraten (4x Lcn1_3.3-23, 1x Lcn1_4.1-16, 9x Lcn1_4.1-25 und 6x Lcn1_5.1-22; Abbildung 16). Lcn1_3.3-23 wurde ausschließlich auf Filtern nach Selektionszyklus 3 identifiziert. Drei der Varianten (Lcn1_4.1-16, Lcn1_4.1-25, Lcn1_5.1-22) trugen ein bis zwei Cysteinreste in Loop #1 und #2. Solche zusätzlichen Cysteinreste führen häufig zu reduzierten Proteinausbeuten, zum Auftreten von Disulfid-

isomeren und zur verstärkten Dimerisierung oder gar Oligomerisierung bzw. Aggregation und sind daher bei der Selektion nicht erwünscht. Da allerdings nur eine Variante ohne Cystein identifiziert wurde (Lcn1_3.3-23), wurden die drei anderen Anticaline dennoch zunächst weiter charakterisiert. In drei der Varianten traten zudem Mutationen außerhalb der randomisierten Bereiche auf: E69Q in Lcn1_3.3-23 und H97Y in Lcn1_4.1-25. Weiterhin wurde jeweils eine stille Mutation bei Asp72 in Lcn1_4.1-16 und Lcn1_4.1-25 gefunden, was höchstwahrscheinlich auf die relativ hohe Fehlerrate der zur Synthese der Bibliothek verwendeten *Taq* DNA-Polymerase (Tindall & Kunkel, 1988) zurückzuführen ist.

Lcn1' :	GCCATGACCGTGGACAGGGAGTTCCTCGAGATGAATCTGGAATCGGTGACACCCATGACCCCTCAGCACCCCTGGAAGGGGGCAACCTGGAAGCCAAGGTCACC
	AlaMetThrValAspArgGluPheProGluMetAsnLeuGluSerValThrProMetThrLeuThrThrLeuGluGlyGlyAsnLeuGluAlaLysValThr
	21 26 34 54
Bibliothek:NNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS.....
3.3-23:GGCACGTTCCCAGGCTGAGGCAGACG.....
	GlyThrPheProArgLeuArgGlnThr
4.1-16:GTGTGCTACCGGACCTCTCGGGGGCC.....
	ValCysTyrArgAspLeuCysGlyAla
4.1-25:GTGTACGGCACCCGCTGTGTAGCTTG.....
	IleAlaCysGluAspGlyAlaArgPhe
5.1-22:ATCGCGTGCAGGACGGCCAGGTTC.....
	IleAlaCysGluAspGlyAlaArgPhe
Lcn1' :	ATGCTGATAAGTGGCCGGTCCAGGAGGTGAAGGCCCTCTGGAGAAAACCTGACGAGCCGGGAAAATACACGGCCGACGGGGCCAGCACGTGGCATAATC
	MetLeuIleSerGlyArgSerGlnGluValLysAlaValLeuGluLysThrAspGluProGlyLysTyrThrAlaAspGlyGlyLysHisValAlaTyrIle
	55 56 58 61 80 83 88
Bibliothek:NNSNNSNNS.....NNS.....NNS.....
3.3-23:CGGTACCAC.....C.....ACC.....CAG.....
	ArgTyrHis Gln Thr Gln
4.1-16:CTGGCGCAG.....T.....TCG.....GGC.....
	LeuAlaGln Ser Gly
4.1-25:AACGACGG.....T.....CGC.....AGC.....
	AsnAspArg Arg Ser
5.1-22:TGCCGCAGC.....CTC.....ACG.....
	CysArgSer Leu Thr
Lcn1' :	ATCAGGTGCGCAGTGAAGGACCCTACTATCTTTTACTCTGAGGGCGAGCTCCACGGGAAGCCGGTCCAGGGGTGTTGG
	IleArgSerHisValLysAspHisTyrIlePheTyrSerGluGlyGluLeuHisGlyLysProValProGlyValTyr
	89 101 104 106 108 114
Bibliothek:NNSNNSNNS.....NNS.....
3.3-23:CTCTACTTC.....CCC.....
	LeuTyrPhe Pro
4.1-16:CAGACGAAC.....TAC.....
	GlnThrAsn Tyr
4.1-25:T.....ATCAGAAG.....AAC.....
	IleLysLys Asn
5.1-22:Tyr.....CGCTTCCGC.....CTC.....
	ArgLeuArg Leu

Abbildung 16: Sequenzanalyse der gegen β -Peptide selektierten Lcn1'-Varianten. Dargestellt sind die DNA- und die Aminosäuresequenzen der *Bst*XI-Kassetten des Lcn1'-Wildtyps und der vier Lcn1'-Varianten. Die in der Bibliothek randomisierten Bereiche sind magenta gefärbt, die die Genkassette flankierenden *Bst*XI-Schnittstellen gelb. Die zu Serin ausgetauschten nativen Cysteinreste (Cys61, Cys101) sind grün markiert. Drei der vier Varianten besitzen Cysteine in den Schleifenregionen (orange). Zusätzlich zu den randomisierten Positionen wurden in Lcn1_3.3-23, Lcn1_4.1-25 und Lcn1_4.1-16 weitere Punktmutationen detektiert.

3.3.3 Produktion potentiell β -spezifischer Lcn1'-Varianten und Analyse von Oligomerisierungsverhalten und Bindungseigenschaften

Zur funktionellen Expression der Anticaline im Periplasma von *E. coli* wurde die *Bst*XI-Kassette der ausgewählten Varianten in das Expressionsplasmid pTlc26 inseriert. pTlc26

kodiert unter Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems für das Lcn1'-Strukturgen mit der OmpA-Signalsequenz und dem C-terminalen *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel.

Die Expression der Lcn1'-Varianten erfolgte unter Standardbedingungen (22 °C, OD₅₅₀ = 0,5, 3 h) im Periplasma von *E. coli* JM83 gefolgt von Streptavidin (SA)-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie. Mit Ausbeuten von 200 µg/l (Lcn1_4.1-16, Lcn1_5.1-22) bis 750 µg/l (Lcn1_3.3-23) wurden die hohen Ausbeuten von 7,5 mg/l für Lcn1' nicht erreicht. Lcn1_4.1-25 lieferte zu niedrige Ausbeuten, um eine Charakterisierung durch Größenausschlusschromatographie zu ermöglichen.

Im Gegensatz zu Lcn1', welches ausschließlich als stabiles Monomer (bei einem Volumen von 11 ml) von der S75 Säule eluierte, traten die drei untersuchten Lcn1'-Varianten in unterschiedlichen Oligomerisierungs- und Aggregatzuständen auf (Abbildung 17). Die Hauptfraktion von Lcn1_3.3-23 war ein Dimer (bei einem Volumen von 9,2 ml), ca. 15 % eluierten als Monomer, und weitere Oligomerisierungszustände waren ebenfalls nachweisbar.

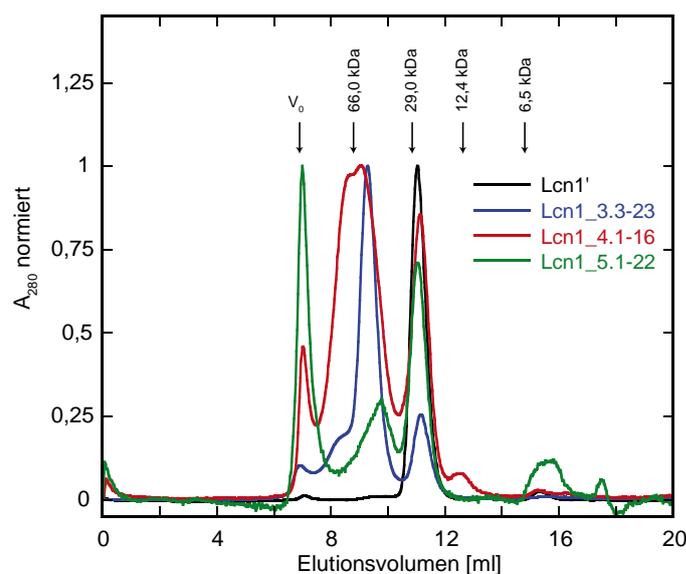


Abbildung 17: SEC zur Analyse des Oligomerisierungsverhaltens der in *E. coli* periplasmatisch exprimierten Lcn1'-Varianten. Die überlagerten Elutionsprofile von Wildtyp-Lcn1' (schwarz), Lcn1_3.3-23 (blau), Lcn1_4.1-16 (rot) und Lcn1_5.1-22 (grün) zeigen, dass die Anticaline in unterschiedlichen Oligomerisierungs-/Aggregatzuständen von der Superdex 75 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen) eluierten. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (v_0) und die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) an.

Zur Analyse der Bindungsaktivität der Lcn1'-Varianten gegenüber A β (16-27)-Bio wurden ELISAs mit adsorbiertem *Strep*MAB-Immo durchgeführt, bei dem die rekombinanten Proteine anhand des *Strep*-tag II in gerichteter Weise schonend immobilisiert wurden. Durch

Detektion des gebundenen Peptids mit einem ExtrAvidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurde für die Monomerfraktion von Lcn1_4.1-16 schwache Bindungsaktivität für A β (16-27)-Bio mit einer Dissoziationskonstante von $5,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ nachgewiesen (Abbildung 18A). Die Monomer- und Dimerfraktionen von Lcn1_3.3-23 zeigten demgegenüber deutlich höhere Affinitäten mit submikromolaren Dissoziationskonstanten von $106 \pm 25 \text{ nM}$ und $64 \pm 17 \text{ nM}$ (Abbildung 18B). Lcn1_5.1-22 (Daten nicht gezeigt) und Wildtyp-Lcn1' (Abbildung 18) wiesen dagegen keinerlei Bindungsaktivität auf.

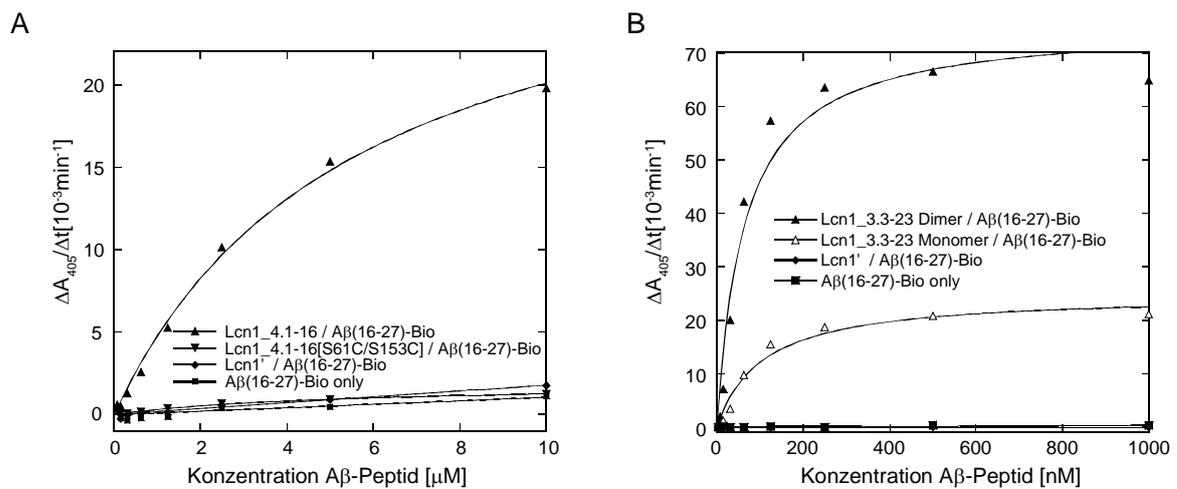


Abbildung 18: „Capture“-ELISA zur Untersuchung der Bindungsaktivität der Lcn1'-Varianten Lcn1_4.1-16 (A) und Lcn1_3.3-23 (B) gegenüber A β (16-27)-Bio. Der für das *Strep*-tag II spezifische Antikörper *Strep*MAB-Immo wurde in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ in einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Im Anschluss wurden die gereinigten Lcn1'-Varianten ($1 \mu\text{M}$) über den *Strep*-tag II gerichtet immobilisiert. Die Platten wurden mit Verdünnungsreihen von A β (16-27)-Bio inkubiert und gebundene Peptide durch ExtrAvidin-AP, gefolgt von einer chromogenen Reaktion mit pNPP, nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die Konzentration des A β -Peptids aufgetragen. Die Anpassung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph nach Gleichung (7). Lcn1_4.1-16 (A) wies mikromolare Affinität mit einer Dissoziationskonstante von $5,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ zu A β (16-27)-Bio auf. Durch Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke (Lcn1_4.1-16[S61C/S153C]) wurde diese Bindungsaktivität ausgelöscht. Lcn1_3.3-23 (B) wies dagegen submikromolare Affinitäten zu A β (16-27)-Bio auf mit Dissoziationskonstanten von $106 \pm 25 \text{ nM}$ bzw. $64 \pm 17 \text{ nM}$ für das Monomer bzw. das Dimer.

Interessanterweise zeigte das Lcn1_3.3-23 Monomer im Vergleich zum Dimer ein um den Faktor 3 reduziertes maximales Signal (25 im Vergleich zu 75), was in Kombination mit der starken Dimerisierungstendenz dieses Anticalins vermuten ließ, dass die im ELISA beobachtete Bindung von zwischenzeitlich dimerisiertem Protein und nicht von der reinen Monomerfraktion verursacht wurde. Diese Annahme konnte im weiteren Verlauf der Arbeit durch Ansätze zur Monomerisierung von Lcn1_3.3-23 (s. Abschnitt 3.3.5.1) bestätigt werden.

Da Lcn1_3.3-23 trotz der Tendenz zur Dimerisierung die aktivste A β -spezifische Variante darstellte, wurde dieses Anticalin im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer charakterisiert (s. Abschnitt 3.3.4).

Aufgrund der niedrigen Proteinausbeuten und der Tendenz zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Varianten Lcn1_4.1-16, Lcn1_4.1-25 und Lcn1_5.1-22 wurden unterschiedliche Ansätze zur Optimierung des proteinbiochemischen Verhaltens durchgeführt. Durch Einsatz des Plasmids pTUM4 zur Koexpression der periplasmatischen Faltungshelfer DsbA, DsbC, FkpA und SurA (Schlupschy *et al.*, 2006) konnten die Proteinausbeuten leicht erhöht werden, das Oligomerisierungsverhalten der Anticaline wurde allerdings nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Durch Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke Cys61-Cys153 in Lcn1_4.1-16 wurde dagegen die Ausbeute deutlich erhöht (>6fach) und das Elutionsverhalten in der Größenausschlusschromatographie zur Elution in einem einzigen symmetrischen Peak (bei einem Volumen von 10,5 ml) verschoben (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde durch die Stabilisierung des Monomers die Bindungsaktivität gegenüber A β (16-27)-Bio komplett aufgehoben (Abbildung 18A), was die weitere Untersuchung dieser Variante hinfällig machte.

Da Lcn1_3.3-23 höhere Affinität für A β (16-27) besaß und nach Expression in *E. coli* deutlich höhere Ausbeuten lieferte, erschien dieses Anticalin trotz seiner Tendenz zur Dimerisierung als die vielversprechendste A β -spezifische Lcn1'-Variante. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich mit dieser Lcn1'-Variante gearbeitet, was neben der funktionellen Charakterisierung (s. Abschnitt 3.3.4) auch Versuche zur Generierung eines stabilen Monomers einschloss (s. Abschnitt 3.3.5).

Zur Herstellung größerer Mengen an funktionellem Lcn1_3.3-23 wurden unterschiedliche Expressionsbedingungen verglichen. Neben der Standardmethode in *E. coli* JM83 mit Induktion bei OD₅₅₀ = 0,5 und Expression für 3 h bei 22 °C wurde die Induktion auch bei einer höheren OD₅₅₀ von 3 bis 4, gefolgt von Expression bei 20 °C über Nacht (üN) in *E. coli* JM83, sowie Fermentation im 8 l-Fermenter in *E. coli* W3110 durchgeführt.

Lcn1_3.3-23 konnte mit allen drei Methoden ohne störende Lyse der bakteriellen Zellen exprimiert und durch Streptavidin-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie zu einem Reinheitsgrad von >95 % gereinigt werden (Abbildung 19). Allerdings kam es hierbei zu deutlichen Unterschieden in den Ausbeuten an funktionellem Anticalin. Während in der Standard-Expression Ausbeuten von ca. 0,75 mg/l erreicht wurden, waren die Ausbeute in der üN-Expression und im Fermenter deutlich erhöht (7 und 8 mg/l).

Zusätzlich wurde eine Stabilitätsanalyse der Monomer- und Dimerfraktionen von Lcn1_3.3-23 durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass das Lcn1_3.3-23-Monomer kein stabiles Monomer darstellt, sondern nach mehrtägiger Lagerung bei 4 °C Dimerbildung zeigt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ist die Dimerfraktion sehr stabil und ließ keine Anzeichen

von Aggregation bzw. Degradation auch nach wochenlanger Lagerung bei 4 °C oder nach Einfrieren der Proteinprobe bei -80 °C erkennen (Daten nicht gezeigt).

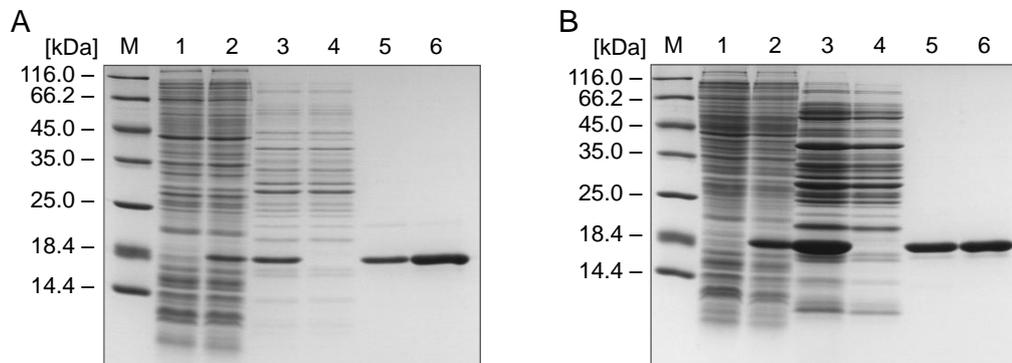


Abbildung 19: SDS-PAGE der Expression und Reinigung von Lcn1_3.3-23 exprimiert unter Standardbedingungen (A) bzw. üN bei einer höheren OD (B); M: Proteingrößenmarker in kDa; 1: *E. coli* Gesamtzell-extrakt vor Induktion der Genexpression; 2: Gesamtzellextrakt bei Ernte; 3: Periplasmaextrakt; 4: Durchlauf der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 5: Elution der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 6: Dimer-Peak der SEC; alle Proben unter reduzierenden Bedingungen. Aufgrund der Abwesenheit eines Cysteinrests in Lcn1_3.3-23 war eine Charakterisierung dieses Protein unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht notwendig.

3.3.4 Funktionelle Charakterisierung der Variante Lcn1_3.3-23

3.3.4.1 Bestimmung der Affinität von Lcn1_3.3-23 im ELISA

Zur Analyse der Bindungsaktivität des Lcn1_3.3-23 Dimers an die verschiedenen zur Verfügung stehenden A β -Targets (A β 40, Trx-A β 28, MBP-A β 40, s. Abschnitt 3.1) wurden weitere ELISAs mit den entsprechenden biotinylierten Substanzen durchgeführt. Aufgrund der starken Dimerisierungstendenz der Lcn1_3.3-23 Monomerfraktion wurde ausschließlich die dimere Proteinfraktion aus der SEC in diesen Experimenten eingesetzt. Hierbei wurde zunächst der ELISA mit A β (16-27)-Bio wiederholt (Abbildung 20A) und die Bindung an das zentrale A β -Peptid bestätigt ($K_D = 104 \pm 21$ nM).

In den ELISAs mit A β 40 und MBP-A β 40 wurden vergleichbare Affinitäten von $38,4 \pm 1,5$ und $32,1 \pm 1,0$ nM für beide Targets festgestellt (Abbildung 20B, C). Die Affinität für das Fusionprotein Trx-A β 28 war dagegen zehnmal niedriger mit einer K_D von 344 ± 42 nM (Abbildung 20D), was möglicherweise auf eine veränderte Konformation des von Lcn1_3.3-23 erkannten Epitops nach Insertion in den *Active Site Loop* des Thioredoxins zurückzuführen ist. Die fehlende Bindung von Wildtyp-Lcn1' an die unterschiedlichen A β -Peptide und A β -Fusionsproteine war schon in früheren ELISAs gezeigt worden und ist hier nicht mehr dargestellt. Für die Kontrollproteine (MBP, Trx und Ovalbumin) wurde keinerlei Bindungsaktivität detektiert.

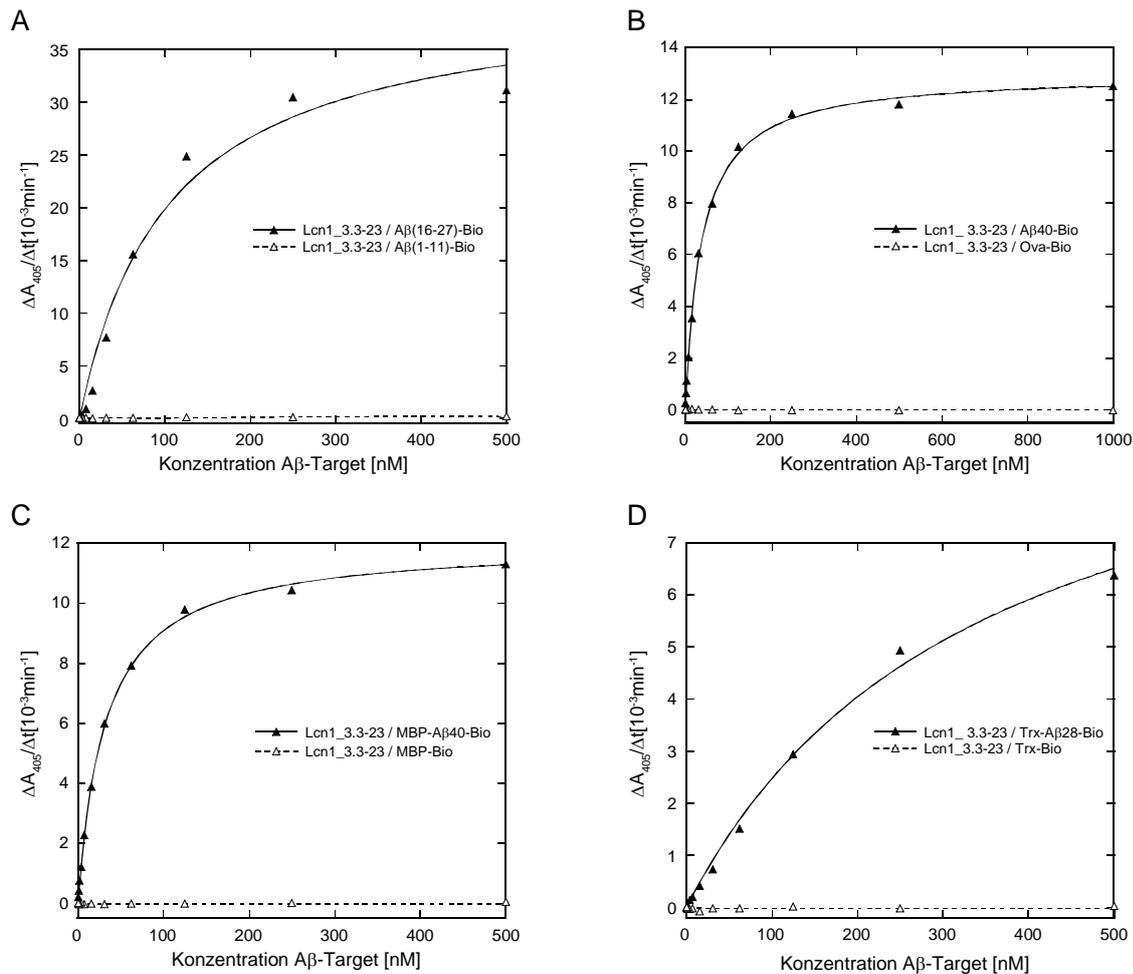


Abbildung 20: Untersuchung der Bindung des Lcn1_3.3-23 Dimers an die A β -Reagenzien A β (16-27)-Bio und A β (1-11)-Bio (A), A β 40-Bio (B), MBP-A β 40-Bio (C) und Trx-A β 28-Bio (D) mittels „Capture“-ELISA und Detektion der gebundenen biotinylierten Peptide/Proteine durch ein ExtrAvidin-AP-Konjugat. Für das N-terminale Peptid A β (1-11)-Bio (A) sowie für die biotinylierten Kontrollproteine Ovalbumin (B), MBP (C), und Trx (D) wurde keine Bindung von Lcn1_3.3-23 beobachtet.

Als weitere Methode zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde ein kompetitiver ELISA im „Capture“-Format mit A β (16-27) durchgeführt (Abbildung 21). Hierbei wurde das mittels *StrepMAB*-Immo immobilisierte Lcn1_3.3-23 Dimer mit einer Mischung aus 200 nM A β (16-27)-Bio, entsprechend dem halbmaximalen Signal im Standard-ELISA, und einer Verdünnungsreihe des fluoreszenzmarkierten Peptids Flu-A β (16-28) mit einer Startkonzentration von 4 μ M inkubiert. Gebundenes biotinyliertes Peptid wurden mit ExtrAvidin-AP nachgewiesen und die Abnahme des Signals gegen den Konzentrationsanstieg an Flu-A β (16-28) halblogarithmisch aufgetragen. Durch Anpassung der Daten an die sigmoidale Gleichung (8) wurde die EC_{50} zu 322 ± 53 nM bestimmt. Durch Anwendung der Gleichung von Cheng & Prusoff (1973) (9) unter Verwendung der Dissoziationskonstante aus dem

ersten „Capture“-ELISA ($K_D^* = 64 \pm 17$ nM) wurde die Affinitätskonstante K_D zu 78 ± 21 nM berechnet.

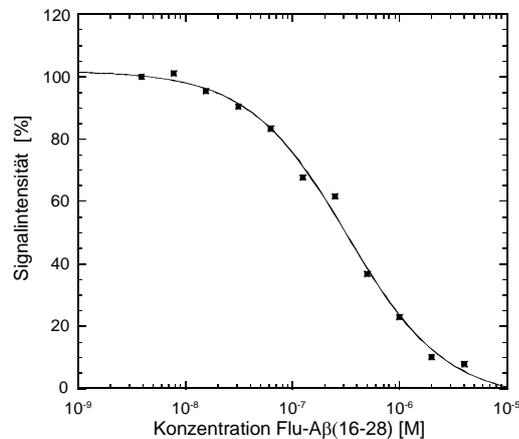


Abbildung 21: Analyse der Bindungsaktivität des Lcn1_3.3-23 Dimers gegenüber Aβ(16-27)-Bio im kompetitiven ELISA. Entsprechend dem „Capture“-ELISA wurde Lcn1_3.3-23 mittels *Strep*MAB-Immo in der Mikrotiter-Platte immobilisiert. Im Anschluss wurde die Platte mit einer Mischung aus einer konstanten Konzentration von 200 nM Aβ(16-27)-Bio und einer Verdünnungsreihe von Flu-Aβ(16-28) inkubiert. Gebundenes Aβ(16-27)-Bio wurde durch ExtrAvidin-AP, gefolgt von der chromogenen Reaktion mit pNPP, nachgewiesen. Das prozentuale Signal wurde gegen die Konzentration an Flu-Aβ(16-28) halblogarithmisch aufgetragen und die Messdaten mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph nach der sigmoidalen Gleichung (8) angepasst.

3.3.4.2 Bestimmung der kinetischen Daten von Lcn1_3.3-23 mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Zur Ermittlung der kinetischen Daten für die Bindung zwischen Lcn1_3.3-23 und Aβ(16-27) wurde die Methode der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) verwendet. Ähnlich dem ELISA wurde auch in diesem SPR-Experiment das Anticalin gerichtet mit Hilfe von *Strep*MAB-Immo als Ligand auf dem Sensorchip immobilisiert und auf Bindung an unterschiedliche Peptide, welche als Analyten in der flüssigen Phase appliziert wurden, mit einem Biacore-System analysiert.

Die Anticalin-Varianten Lcn1', Lcn1_3.3-23 Dimer und Lcn1_3.3-23 Monomer wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml über die *Strep*MAB-Immo-Oberfläche (~17.000 RU) appliziert und in den Flusszellen 2, 3 und 4 mittels des *Strep*-tag II immobilisiert (~983 RU, ~1364 RU, ~1151 RU). Zur Bestimmung der kinetischen Daten wurde das Peptid NAc-Aβ(16-27)-GG in einer Konzentration von 1,69 µM mit einer Flussrate von 30 µl/min injiziert und die Assoziation und Dissoziation jeweils für 5 min aufgezeichnet (Abbildung 22).

Zur verlässlichen Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und der Dissoziation (k_{off}) werden in der Regel Verdünnungsreihen des Analyten über die Oberfläche mit dem Liganden geleitet. Hierbei muss der Chip normalerweise zwischen den einzelnen Messzyklen regeneriert werden, um den Analyten vor Injektion der nächsten Analytkonzentration komplett von der Oberfläche zu entfernen. Allerdings gab es keine zuverlässigen Regenerierungsbedingungen für die mit *Strep*MAB-Immo derivatisierte Oberfläche, da sowohl saure als auch basische Lösungen zu einem raschen Aktivitätsverlust des Antikörpers führen. Aus diesem Grund wurde der Chip nicht regeneriert, was aufgrund der unvollständigen Dissoziation der A β -Peptide zu einer Verringerung der Bindungskapazität führte. Das stark reduzierte Resonanzsignal in zwei direkt aufeinanderfolgenden Injektionen von 1,69 μ M NAc-A β (16-27)-GG in Abbildung 22 verdeutlicht dies.

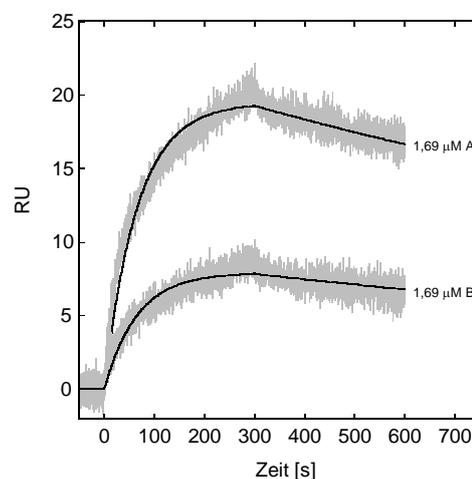


Abbildung 22: Quantitative Analyse der Interaktion von Lcn1_3.3-23 mit dem Peptid NAc-A β (16-27)-GG durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Auf dem Sensorchip kovalent gebundener *Strep*MAB-Immo (\sim 17.000 RU) diente zur gerichteten Immobilisierung des Lcn1_3.3-23 Dimers (\sim 1364 RU). Zur Bestimmung der kinetischen Daten wurde NAc-A β (16-27)-GG wiederholt in einer Konzentration von 1,69 μ M injiziert (A, B). Bei einer Flussrate von 30 μ l/min wurden die Assoziation und die Dissoziation jeweils für 5 min in einem Biacore-Instrument aufgezeichnet. Die Bestimmung der kinetischen Daten der Interaktion erfolgte durch Anpassung der Messkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der Software *Scrubber 2*. Hierbei wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} global gefittet. Das maximale Signal R_{max} wurde wegen der unvollständigen Dissoziation und der dadurch hervorgerufenen verringerten Bindungskapazität im zweiten Messzyklus lokal gefittet.

Eine exakte kinetische Analyse mit einer Verdünnungsreihe des Peptids war daher mit diesem Aufbau nicht möglich. Durch Anpassung der Bindungskurven in Abbildung 22, welche zunächst durch Subtraktion des Signals im Kontrollkanal ohne immobilisierten Liganden und durch Subtraktion des Durchschnittswertes von drei unabhängigen Pufferinjektionen

korrigiert worden waren, an ein 1:1 Langmuir Bindungsmodell konnte die Dissoziationskonstante als Quotient k_{off}/k_{on} dennoch abgeschätzt werden. Durch globalen Fit der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} und lokalen Fit des stark variierenden maximalen Signals R_{max} wurde eine Dissoziationskonstante von 54,5 nM für das Lcn1_3.3-23 Dimer bestimmt ($k_{on} = 8,75 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 4,77 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$), was in Übereinstimmung mit dem ELISA-Ergebnis stand (s. Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4.1). Auch in dem SPR-Experiment war das Bindungssignal für das Monomer im Vergleich zum Dimer reduziert (Daten nicht gezeigt). Lcn1' als Negativkontrolle in Flusszelle 2 wies keine Bindung an NAc-A β (16-27)-GG auf.

In einem weiteren SPR-Setup mit direkt auf dem Sensorchip immobilisiertem Lcn1_3.3-23 Dimer wurden die nicht amyloiden Peptide *Flag* (DYKDDDDK, Hopp *et al.*, 1988) und *c-Myc* (EQKLISEEDL, Evan *et al.*, 1985) als Negativkontrollen appliziert. Für beide Peptide wurde keinerlei Bindung detektiert.

Eine alternative SPR-Methode zur Analyse der kinetischen Daten in Fällen, in denen eine Regenerierung der Liganden-Oberfläche schwierig ist, ist die sogenannte „kinetische Titration“ (Karlsson *et al.*, 2006). Hierbei werden steigende Konzentrationen an Analyt in dicht aufeinanderfolgenden Zyklen - ohne Regenerierung - injiziert und die Daten gemäß einem entsprechenden mathematischen Modell ausgewertet. Das Peptid NAc-A β (16-27)-GG wurde hierfür in den Konzentrationen 105,5 nM, 211 nM, 422 nM, 844 nM und 1688 nM für jeweils 120 s über alle vier Flusszellen injiziert. Die Dissoziation der ersten vier Konzentrationsstufen erfolgte für 90 s, die Dissoziation in der höchsten Konzentrationsstufe für 900 s. Der Laufpuffer wurde ebenfalls fünfmal entsprechend dem obigen Zyklus injiziert und der Mittelwert als Nullwert zur Korrektur der Daten verwendet. Zur weiteren Korrektur wurde das Signal im Kontrollkanal subtrahiert. Die so korrigierten Daten des Lcn1_3.3-23 Dimers zeigten deutlich das von Karlsson *et al.* (2006) beschriebene „Sägezahn“-Profil (Abbildung 23). Dieses charakteristische Bindungsmuster entsteht durch eine unvollständige Dissoziation des Analyten vor Injektion der nächsthöheren Konzentration. Durch Anpassung der Daten mit Hilfe der *BIA Evaluation Software* wurde eine Dissoziationskonstante von 30,3 nM bestimmt ($k_{on} = 9,74 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{off} = 2,95 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$), was in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen SPR-Messungen stand.

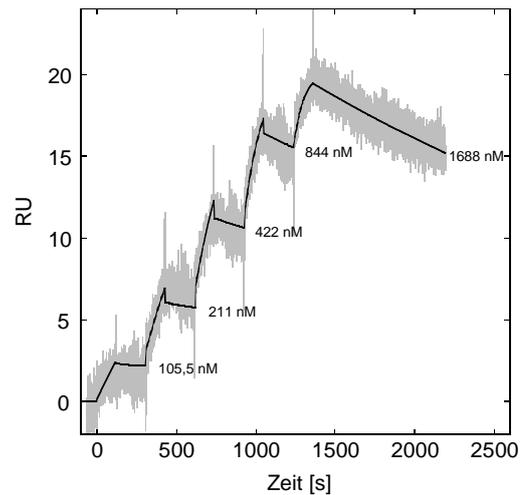


Abbildung 23: „Kinetische Titration“ zur Analyse der Bindungsaktivität des über *StrepMAB*-Immobilisierten Lcn1_3.3-23 Dimers an NAc-A β (16-27)-GG. Fünf Konzentrationen des A β -Peptids NAc-A β (16-27)-GG wurden bei einer Flussrate von 30 μ l/min in konsekutiven Zyklen von der niedrigsten zur höchsten Konzentration injiziert. Die Daten zeigen das charakteristische „Sägezahn“-Profil und wurden gemäß dem Modell der „kinetischen Titration“ mit Hilfe der *BIA Evaluation Software* ausgewertet.

3.3.4.3 Bestimmung der Affinität von Lcn1_3.3-23 mittels Fluoreszenzanisotropie

Sowohl bei den ELISA- als auch bei den SPR-Experimenten zur Bestimmung der Affinität zwischen Lcn1_3.3-23 und A β (16-27) wurde einer der Bindungspartner, hier jeweils Lcn1_3.3-23, auf einer festen Phase, d.h. der Mikrotiter-Platte oder dem CM5-Sensorchip, immobilisiert. Zur Ermittlung der tatsächlichen Affinität in Lösung, also ohne Einfluss von Effekten der festen Phase, wurde die Fluoreszenzanisotropie verwendet. Diese Methode beruht auf der Korrelation der Depolarisation von eingestrahlt polarisiertem Licht mit der Rotationsdiffusion bzw. Größe eines Fluorophors und ermöglicht somit Bindungsstudien in Lösung (Lakowicz, 2006).

Aufgrund der umgekehrten Proportionalität zwischen der molaren Masse eines Moleküls und seiner Rotationsgeschwindigkeit in Lösung ist es empfehlenswert, zur Messung der Anisotropie den kleineren der Bindungspartner mit dem Fluorophor zu markieren, da sich so bei der Komplexbildung der maximale Effekt ergibt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit A β (16-28) mit einer N-terminalen Fluorescein-Gruppe (Flu-A β (16-28)) eingesetzt. Durch Inkubation von 1 μ M Flu-A β (16-28) mit einer Verdünnungsreihe des Lcn1_3.3-23-Dimers, bzw. mit Lcn1' als Kontrolle, wurde die Anisotropie bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 522 nm in Abhängigkeit von der Anticalin-Konzentration bestimmt.

Mit steigender Konzentration an Lcn1_3.3-23 konnte ein Anstieg der Anisotropie gemessen werden (Abbildung 24). Im Gegensatz dazu blieb der Wert im Fall von Lcn1' konstant, womit

die fehlende Bindungsaktivität von Lcn1' für das A β -Peptid bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Zudem ließ sich aus dieser Beobachtung schließen, dass es im analysierten Zeitraum zu keiner signifikanten Selbstassoziation oder Aggregation des verkürzten A β -Peptids kam. Durch Anpassung der Daten an den Anisotropie-Fit (38) (Abbildung 24, durchgezogene Linie) wurde eine Dissoziationskonstante von $4,26 \pm 1,06 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Anpassung der gleichen Daten gemäß der sigmoidalen Gleichung (39) (Abbildung 24, gepunktete Linie) ergab eine Halbwertskonzentration EC_{50} von $4,65 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Dieser sigmoidale Fit berücksichtigt allerdings nicht, dass die freie Proteinkonzentration nicht der Gesamtkonzentration des Proteins entspricht, weswegen zur Ermittlung der tatsächlichen Dissoziationskonstante die Halbwertskonzentration gemäß Gleichung (48) korrigiert werden muss. Die so aus dem sigmoidalen Fit abgeleitete Dissoziationskonstante von $4,15 \mu\text{M}$ stimmt sehr gut mit der Dissoziationskonstante aus dem Anisotropie-Fit ($4,26 \mu\text{M}$) überein.

Allerdings war die so in Lösung ermittelte Affinität um einen Faktor von 50-100 schwächer als die in ELISA- und SPR-Experimenten bestimmten apparenten Dissoziationskonstanten (s. Abschnitte 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Ein ungünstiger Einfluss der N-terminalen Fluorescein-Gruppe könnte u.a. zu diesem Affinitätsunterschied beitragen.

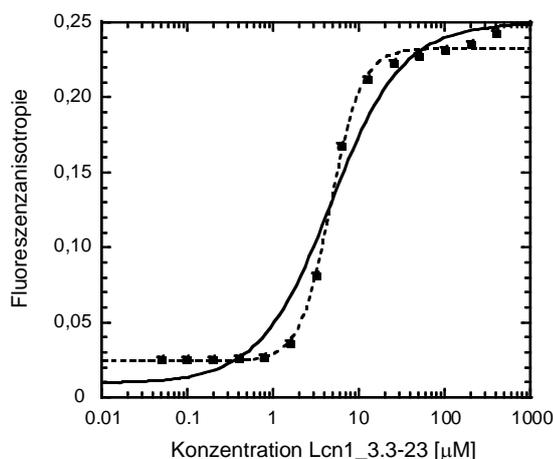


Abbildung 24: Fluoreszenzanisotropie-Messung zur Bestimmung der Affinität zwischen dem dimeren Anticalin Lcn1_3.3-23 und dem markierten Peptid-Liganden Flu-A β (16-28) in Lösung. Eine Verdünnungsreihe von Lcn1_3.3-23 wurde in separaten Ansätzen jeweils mit einer konstanten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Flu-A β (16-28) für 1 h im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 522 nm bei einer Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Anpassung der Messpunkte erfolgte sowohl gemäß Gleichung (38) (Anisotropie-Fit, durchgezogene Linie) als auch durch Gleichung (39) (sigmoidaler Fit, gepunktete Linie). Die gegebenenfalls nach Korrektur erhaltenen K_D -Werte (siehe Abschnitt 2.7.3) waren mit $4,26 \mu\text{M}$ bzw. $4,15 \mu\text{M}$ nahezu identisch.

3.3.5 Versuche zur Monomerisierung der Variante Lcn1_3.3-23

3.3.5.1 Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke

Da Lcn1_3.3-23 eine unerwünschte Tendenz zur Dimerisierung aufweist, wurden unterschiedliche Versuche zur Monomerisierung dieser Variante durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde die native Disulfidbrücke dieses Lipocalins (Cys61-Cys153) wieder eingeführt (Lcn1_3.3-23[S61C/S153C]). Hierfür wurde zunächst die *Bst*XI-Kassette von Lcn1_3.3-23 in den gleichermaßen geschnittenen Vektor pTlc22 subkloniert, welcher (außerhalb der Kassette) an Position 153 für das native Cystein kodiert. Im Anschluss wurde Serin an Position 61 durch ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide SR-3 und SR-4 durch Cystein ersetzt. Die beiden Varianten Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] wurden im 2 l-Schüttelkolben unter Standardbedingungen (s. Abschnitt 3.3.3) exprimiert und bezüglich ihrer Ausbeuten, ihres Oligomerisierungsverhaltens und ihrer Bindungsaktivität für A β (16-27)-Bio verglichen.

Wie schon für Lcn1_4.1-16 beschrieben (s. Abschnitt 3.3.3) wurde auch bei Lcn1_3.3-23 die Ausbeute durch Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke deutlich gesteigert (von 0,75 mg/l auf 5 mg/l). Zusätzlich eluierte fast das komplette Protein als stabiles Monomer in der Größenausschlusschromatographie, ohne jegliche Anzeichen von Aggregation und mit maximal 5 % des Proteins in der Dimerfraktion (Abbildung 25A). Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke im monomeren Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] wurde anhand der erhöhten elektrophoretischen Mobilität dieser Proteinfraction unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Allerdings war Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] ebenfalls nicht mehr fähig, A β (16-27)-Bio im ELISA zu binden (Abbildung 25B). Der komplette Verlust der Bindungsaktivität als Folge der Monomerisierung von Lcn1_3.3-23 lässt vermuten, dass das A β -Peptid entweder am Dimer-Interface zwischen zwei Lcn1_3.3-23 Molekülen gebunden wird oder dass die Lcn1-Variante im Dimer eine signifikant andere Konformation einnimmt. Die hier gezeigten Daten bestätigten erneut die Annahme, dass die schwachen Bindungssignale der Lcn1_3.3-23 Monomerfraktion in ELISA- und SPR-Experimenten (s. Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4.2) von bereits dimerisiertem Protein stammten.

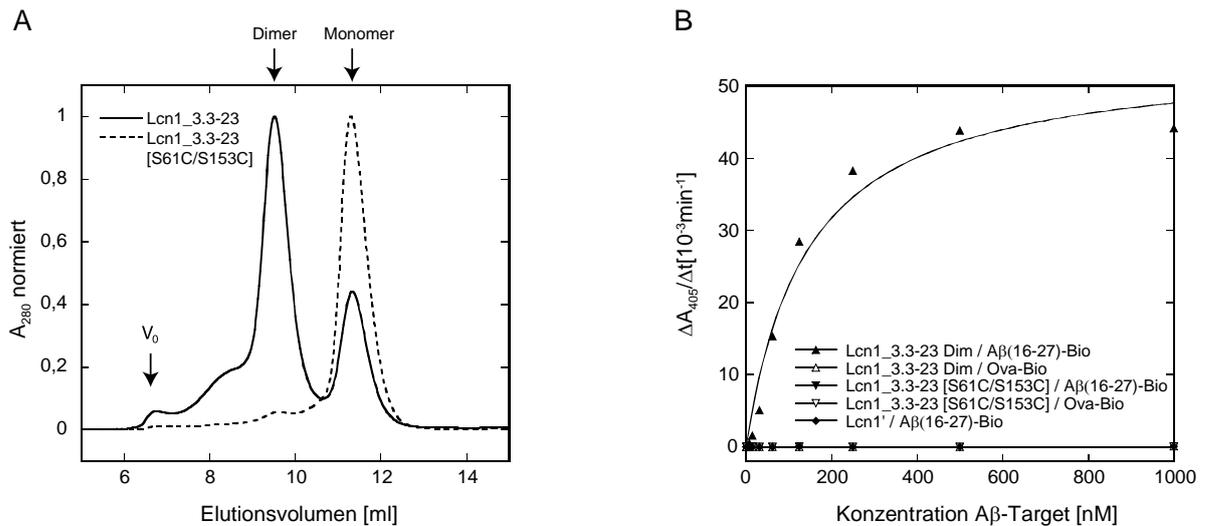


Abbildung 25: Vergleich von Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] in SEC (A) und ELISA (B). (A) Die Überlagerung der Elutionsprofile der periplasmatisch exprimierten Proteine auf der Superdex 75 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen) zeigt, dass die Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke zur Monomerisierung von Lcn1_3.3-23 führt. (B) Die monomere Variante Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] wies im Gegensatz zum Lcn1_3.3-23 Dimer keinerlei Bindungsaktivität für Aβ(16-27)-Bio auf, was im „Capture“-ELISA mit Extravidin-AP als Detektionsreagenz gezeigt wurde.

3.3.5.2 Herstellung und Analyse chimärer Varianten basierend auf Lcn1_3.3-23

Da nicht nur Lcn1_3.3-23, sondern auch zahlreiche andere Lcn1'-basierte Varianten eine Tendenz zur Dimerisierung aufwiesen, wurde ein zweiter Ansatz zur Monomerisierung von Lcn1_3.3-23 in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Schlapschy in unserem Labor verfolgt. Mit dem Ziel aufzuklären, welche Regionen bzw. Positionen in Lcn1' für das Dimerisierungsverhalten primär verantwortlich sind, wurden chimäre Varianten aus dem Anticalin und Lcn1' mit unterschiedlichen Loop-Kombinationen bzw. Einzelmutanten mit einzelnen Mutationen von Dr. Martin Schlapschy mit seinem Assistenten Klaus Wachinger geplant, in *E. coli* produziert und bezüglich ihres Monomer:Dimer-Verhältnisses analysiert. Alle Varianten, die in diesem Zusammenhang hergestellt wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Variante Lcn1_3.3-23[P111R] betont beispielsweise die Bedeutung von Position 111, welche zur Einführung der C-terminalen *Bst*XI-Schnittstelle von Arg in Pro mutiert worden war (Abbildung 11). Rückmutierung dieser Position zum Arginin der Wildtyp-Sequenz in Lcn1_3.3-23[P111R] führte zu einer verstärkten Dimerisierung des Proteins. Dieses Verhalten stand im Einklang mit Untersuchungen von anderen Gruppen, bei denen aus der Tränenflüssigkeit isoliertes natürliches Lcn1 in der Größenausschlusschromatographie als Dimer eluierte (Glasgow *et al.*, 1999; Redl *et al.*, 1992).

Chimäre Varianten	Mon:Dim	Bemerkung
Lcn1_3.3-23(wt-loop#2#3#4)	nur Mon	Loop #1 von Lcn1_3.3-2, Loop #2, #3 und #4 von Lcn1'
Lcn1_3.3-23(wt-loop#1)	3:1	Loop #1 von Lcn1', Loop #2, #3 und #4 von Lcn1_3.3-23
Lcn1_3.3-23(wt-loop#3#4)	nur Mon	Loop #1 und #2 von Lcn1_3.3-23, Loop #3 und #4 von Lcn1'
Lcn1_3.3-23(wt-loop#1#2)	3:2	Loop #1 und #2 von Lcn1', Loop #3 und #4 von Lcn1_3.3-23
Lcn1_3.3-23(wt-loop#4)	10:1	Loop #1, #2 und #3 von Lcn1_3.3-2, Loop #4 von Lcn1'
Lcn1_3.3-23(wt-loop#1#2#3)	3:1	Loop #1, #2 und #3 von Lcn1', Loop #4 von Lcn1_3.3-23
Punktmutanten von Lcn1_3.3-23	Mon:Dim	Bemerkung
Lcn1_3.3-23[V53A]	1:2	Position in β -Strang C, 3 Aminosäuren vor Loop #2 Austausch hat stabilisierenden Effekt auf Monomer (Daten PIERIS)
Lcn1_3.3-23[P109A]	3:2	Position in C-terminalen Bereich von Loop #4 Thr109 führt zu Multimerisierung, T109A reduziert Multimerisierung (PIERIS)
Lcn1_3.3-23[L124E]	1:2	Kristallkontakt zwischen N-terminalen Bereichen der α -Helices zweier Moleküle Austausch führt zur Abstoßung durch negative Ladung und Abstoßung durch Entfernen hydrophober Interaktionen
Lcn1_3.3-23[I146K]	1:3	Kristallkontakt zwischen β -Strang I zweier Moleküle Austausch führt zur Abstoßung durch positive Ladung und Abstoßung durch Entfernen hydrophober Interaktionen
Lcn1_3.3-23[L145P/I146K]	1:20	entsprechend I146K, Pro145 exponiert Lys146 und erhöht Abstoßung
Lcn1_3.3-23[L104E]	2:1	N-terminale Position in Loop #4
Lcn1_3.3-23[Y105L]	2:3	Position in N-terminalen Bereich von Loop #4
Lcn1_3.3-23[F106H]	2:3	Position in N-terminalen Bereich von Loop #4
Lcn1_3.3-23[P108A]	3:1	Position in C-terminalen Bereich von Loop #4
Lcn1_3.3-23[P108V]	1:2	Position in C-terminalen Bereich von Loop #4
Lcn1_3.3-23[P108K]	1:3	Position in C-terminalen Bereich von Loop #4
Lcn1_3.3-23[P111R]	1:9	BstXI-Schnittstelle, Arg in wt Lcn1, Arg erhöht Dimerisierung drastisch im Einklang mit natürlichem Auftreten von wt Lcn1 als Dimer

Tabelle 3: Zusammenfassung der zur Analyse des Dimerisierungsverhaltens generierten Lcn1_3.3-23 Varianten. Ausgehend von Lcn1_3.3-23 wurden unterschiedliche Loops (einzelne Loops bzw. Loop-Kombinationen) aus dem Wildtyp-Lipocalin Lcn1' in das Anticalin rücktransplantiert bzw. einzelne Aminosäureaustausche in Lcn1_3.3-23 eingeführt. Das Verhältnis zwischen Monomer und Dimer (Mon:Dim) sowie die rationale Grundlage einiger der eingefügten Punktmutationen sind aufgeführt. Die beiden in dieser Arbeit genauer charakterisierten Varianten sind hervorgehoben.

Durch Analyse der chimären Varianten mit unterschiedlichen Kombinationen der Loops aus dem Wildtyp-Lipocalin Lcn1' und dem Anticalin Lcn1_3.3-23 wurde die Bedeutung von Loop #4 auf das Monomer:Dimer-Verhältnis deutlich. Hierbei eluierten die beiden Varianten Lcn1_3.3-23(wt-loop#2#3#4) und Lcn1_3.3-23(wt-loop#3#4) ausschließlich als Monomer. Die Anticalin-Variante Lcn1_3.3-23(wt-loop#4), in welcher nur Loop #4 gegen die Wildtyp-Sequenz ausgetauscht worden war, eluierte zu ca. 90 % als Monomer (Abbildung 26a). Diese chimären Variante (Lcn1_3.3-23(wt-loop#4)) wurde zur weitergehenden Charakterisierung ausgewählt, da sie im Vergleich zu Lcn1_3.3-23 die kleinste Zahl an Mutationen aufwies. Zusätzlich wurden Varianten mit Punktmutationen in diesem Schleifensegment generiert. Hierbei erschien die Variante Lcn1_3.3-23[P108A], welche ein im Vergleich zu Lcn1_3.3-23 umgekehrtes, wesentlich günstigeres Monomer:Dimer-Verhältnis von 3:1 aufwies, am interessantesten und wurde daher ebenfalls genauer charakterisiert (Abbildung 26A).

Durch die Experimente mit den chimären Varianten wurde somit zwar die Bedeutung von Loop #4 für die Dimerisierung von Lcn1_3.3-23 deutlich; ein genereller Dimerisierungsmechanismus bzw. für die Dimerisierung verantwortliche Schlüsselpositionen in dem Anticalin konnten allerdings aus diesen Studien nicht abgeleitet werden.

Die Analyse der Lcn1_3.3-23-Varianten im „Capture“-ELISA gegenüber A β (16-27)-Bio (Abbildung 26B) zeigte, dass durch Austausch von Loop #4 und der damit einhergehenden Monomerisierung von Lcn1_3.3-23 die Bindungsaktivität für das Target praktisch komplett aufgehoben wurde. Wie schon aus den Ergebnissen für das monomere Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] vermutet, legt dieses Ergebnis erneut nahe, dass das A β -Peptid höchstwahrscheinlich am Interface zwischen zwei Lcn1_3.3-23 Monomeren gebunden wird. Das Bindungsverhalten von Lcn1_3.3-23[P108A] gegenüber A β (16-27)-Bio war dagegen vergleichbar mit dem des ursprünglichen Anticalins. Auch hier wurde ein verringertes Signal für die Monomerfraktion im Vergleich zur Dimerfraktion detektiert. Wie bereits diskutiert (s. Abschnitte 3.3.3, 3.3.4.2 und 3.3.5.1), wurde dieses Signal vermutlich nicht durch Bindung des reinen Monomers, sondern durch Bindung einer Fraktion des Anticalins, welche dimerisiert war, hervorgerufen.

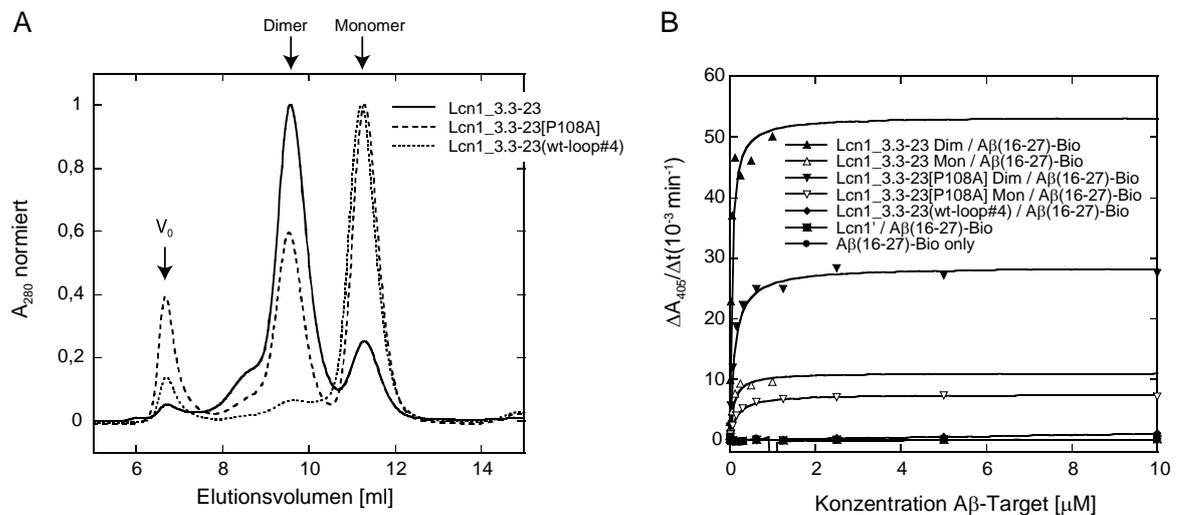


Abbildung 26: Vergleich der Varianten Lcn1_3.3-23, Lcn1_3.3-23[P108A] und Lcn1_3.3-23(wt-loop#4) in SEC (A) und „Capture“-ELISA (B). (A) Die Überlagerung der normierten Elutionsprofile der periplasmatisch exprimierten Proteine auf der Superdex 75 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen) veranschaulicht die unterschiedlichen Monomer:Dimer:Aggregat-Verhältnisse. (B) Im „Capture“-ELISA mit biotinyliertem A β (16-27)-Bio als Target und Extravidin-AP als Detektionsreagenz zeigt die monomere Variante Lcn1_3.3-23(wt-loop#4) keinerlei Bindungsaktivität für das Target. Lcn1_3.3-23[P108A] besitzt dagegen eine zu Lcn1_3.3-23 ähnliche Bindungsaktivität. Auch hier wurde für die Monomerfraktion ein reduziertes Signal detektiert.

3.3.6 Physikochemische Untersuchungen von Lcn1_3.3-23 und dessen Varianten

3.3.6.1 Analyse der Sekundärstruktur von Lcn1_3.3-23 mittels CD-Spektroskopie

In der A β -spezifischen Variante Lcn1_3.3-23 waren im Vergleich zum Wildtyp-Protein Lcn1' 17 Aminosäuren verändert. Zur qualitativen Analyse der damit einhergehenden strukturellen Änderungen wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von 190 bis 260 nm aufgenommen. In diesem Bereich kommt es hauptsächlich zur Absorption durch die Peptidbindung, womit eine Aussage über den Anteil sowie die Art der Sekundärstruktur eines Proteins getroffen werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Spektren für α -Helix, β -Faltblatt und Random Coil-Strukturen kann der jeweilige Anteil aus dem CD-Spektrum abgeschätzt werden (Johnson, 1988).

Zur Analyse des Sekundärstrukturgehalts der Anticaline Lcn1', Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] wurde die gemessene Elliptizität Θ gemäß Gleichung (10) auf die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen (Abbildung 27). Der Vergleich der Spektren ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten Varianten. Alle drei Spektren zeigten das für β -Faltblattproteine charakteristische Minimum bei einer Wellenlänge von ca. 207 nm, was daraufhin wies, dass in allen Varianten die für Lipocaline typische β -Fass-Struktur erhalten war und dass das Lcn1'-Gerüst den Austausch von 17 bzw. 19 Aminosäuren gut toleriert hatte.

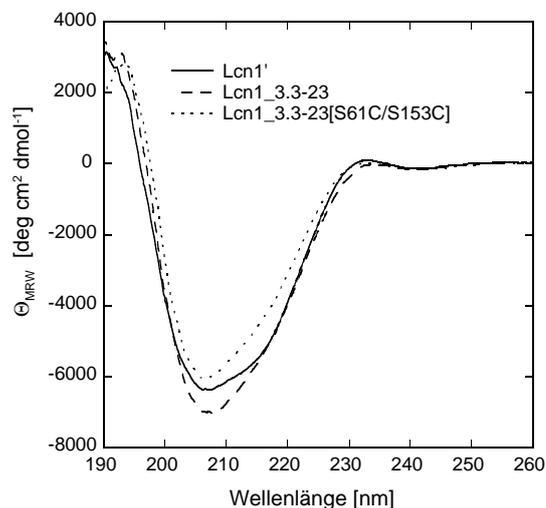


Abbildung 27: CD-Spektren von Lcn1' und den Varianten Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C]. Zur Analyse der Sekundärstruktur wurden die CD-Spektren der Anticaline in einer Konzentration von 10 μM im Fern-UV-Bereich von 190 bis 260 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in 20 mM KH_2PO_4 pH 7,5, 50 mM K_2SO_4 bei 20 $^\circ\text{C}$. Die experimentell ermittelte Elliptizität Θ (in deg) wurde zum Vergleich der Einzelspektren gemäß (10) in die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet.

3.3.6.2 Analyse der thermischen Stabilität von Lcn1_3.3-23 mittels CD-Spektroskopie

Da sich die CD-Spektren nativer Proteine im Fern-UV von den Spektren entfalteter Proteine mit ihrem typischen Random-Coil-Minimum bei Wellenlängen um 195 nm) deutlich unterscheiden (Greenfield, 2006), bietet diese Spektroskopie eine hervorragende Möglichkeit zur Analyse von Faltungs- oder Konformationsübergängen in Proteinen. Zu diesem Zweck wurden die Proteinproben kontinuierlich aufgeheizt (1 °C/min) und das CD-Signal bei einer konstanten Wellenlänge aufgezeichnet. Die so erhaltenen Denaturierungskurven wurden gemäß dem Zwei-Zustandsmodell der Entfaltung ausgewertet (Schlehuber & Skerra, 2002).

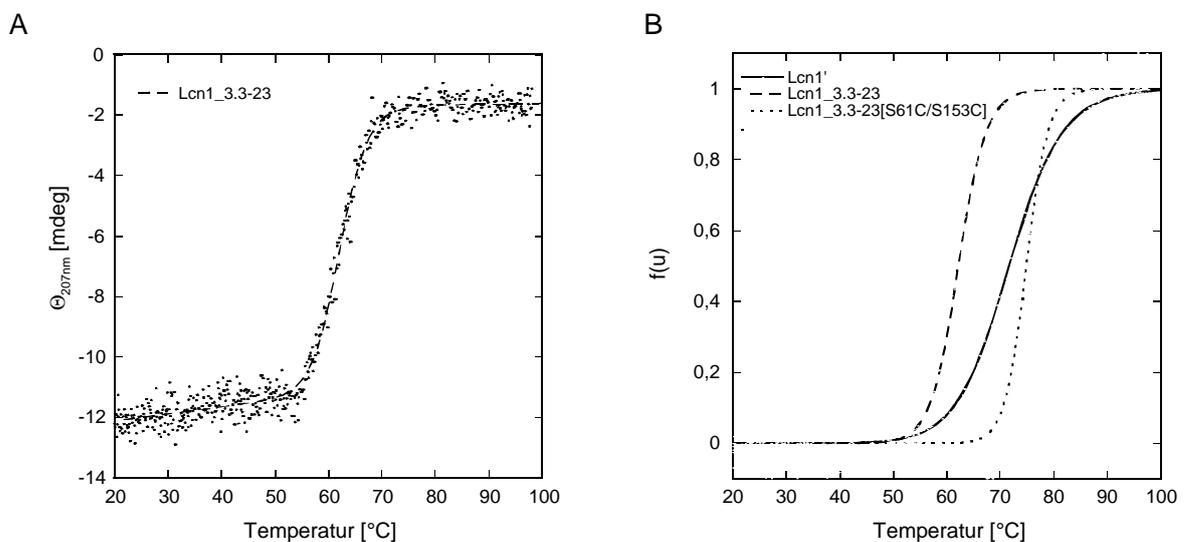


Abbildung 28: Thermische Stabilitätsanalyse von Lcn1', Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] mittels CD-Spektroskopie. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m wurde die Elliptizität der Anticaline (10 μ M) bei einer Wellenlänge von 230 nm für Lcn1' bzw. 207 nm für Lcn1_3.3-23 und Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] in einem Temperaturbereich von 20 bis 98 °C aufgezeichnet. (A) Am Beispiel von Lcn1_3.3-23 ist eine typische Entfaltungskurve dargestellt. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurve entsprechend einem Zwei-Zustandsmodell gemäß Gleichung (19) angepasst. (B) Zum Vergleich der Denaturierungsübergänge der unterschiedlichen Lcn1'-Varianten wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung (14) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Die so erhaltenen normierten Entfaltungskurven wurden anschließend nach Gleichung (20) angepasst. Im Vergleich zur Ausgangsvariante Lcn1' war die A β -spezifische Variante Lcn1_3.3-23 destabilisiert, wogegen die Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke in Lcn1_3.3-23[S61C/S153] eine drastische Stabilisierung dieser Variante bewirkte. Die Entfaltungskurven des Wildtyp-Proteins und der Lcn1_3.3-23-Varianten besitzen deutliche Unterschiede in der Kooperativität der Entfaltung, was an der Steigung der Kurven deutlich wird.

Wie aus den gemessenen Entfaltungskurven deutlich wird (Abbildung 28), denaturierte Lcn1_3.3-23, wie für ein kleines Eindomänen-Protein erwartet, in einem einstufigen Übergang mit einer hohen Kooperativität. Allerdings war die Denaturierung von Lcn1_3.3-23

und auch von Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] irreversibel, was in einem weißen Präzipitat in der Küvette zum Ausdruck kam und die Analyse der Renaturierung sowie die Bestimmung der thermodynamischen Parameter für diese beiden Varianten nicht möglich machte.

Die Denaturierungskurven wurden gemäß Abschnitt 2.7.1 ausgewertet und die Schmelztemperaturen für die einzelnen Varianten bestimmt. Die beiden Lcn1_3.3-23-Varianten wurden bei einer Wellenlänge von 207 nm gemessen, da diese Wellenlänge die maximale Differenz zwischen dem nativen und dem denaturierten Protein aufwies. Da das Wildtyp-Protein Lcn1' bei dieser Wellenlänge allerdings eine hohe Streuung der Datenpunkte aufwies, wurde die Denaturierung für Lcn1' bei 230 nm gemessen. Aus der Überlagerung der normierten Kurven (Abbildung 28B) wurde deutlich, dass die A β -spezifische Variante Lcn1_3.3-23 im Vergleich zu Lcn1' ($T_m = 71,7 \pm 0,1$ °C) eine um fast 10 °C reduzierte Schmelztemperatur von $62,2 \pm 0,1$ °C aufwies. Im Gegensatz dazu führte die Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke in Lcn1_3.3-23[S61C/S153C] zu einer deutlichen Stabilisierung dieser Variante, welche mit einer Schmelztemperatur von $74,9 \pm 0,1$ °C sogar stabiler war als die Ausgangsvariante Lcn1'. Dieser Effekt der nativen Disulfidbrücke auf die Stabilität von Lcn1_3.3-23 verdeutlicht die wichtige strukturelle Rolle, die diese Bindung für Lcn1 und Lcn1-basierte Anticaline spielt. Der deutliche Unterschied in der Kooperativität der Entfaltung zwischen dem Wildtyp-Protein Lcn1' und den Lcn1_3.3-23-Varianten, welcher in der Steigung der Kurven zum Ausdruck kommt, kann höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen zur Messung verwendeten Wellenlängen begründet werden.

Im Anschluss an diese Messung wurde eine ausführlichere Studie zur Stabilisierung von Lcn1 als Proteingerüst durchgeführt, welche im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird.

3.3.7 Protein-Engineering zur Stabilisierung von Lcn1 als Gerüst für die Selektion von Anticalinen

Das humane Lcn1 stellt aufgrund seiner hohen Thermostabilität mit einer Schmelztemperatur von mehr als 90 °C grundsätzlich ein besonders geeignetes Gerüst für die Anticalin-Technologie dar. Allerdings kommt es aufgrund der Mutagenese der Liganden-Bindungs-tasche, der Entfernung der nativen Disulfidbrücke und der Einführung der BstXI-Schnittstellen zu deutlichen Stabilitätseinbußen bei den Varianten. Deshalb wurde das Ziel verfolgt, Aminosäurepositionen zu identifizieren, deren Austausch einen stabilisierenden Effekt auf das Lcn1-Proteingerüst und somit auch auf Lcn1-basierte Proteinbibliotheken hat.

Ausgehend von der Version Lcn1* (Δ 1-4HisHisLeuLeu/C101S, *Strep*-tag II; Breustedt *et al.*, 2005) wurden 26 unterschiedliche Varianten von Markus Moosmeier und Sabine Emden in unserem Labor generiert und analysiert. In dem hier beschriebenen abschließenden Teil dieses Projektes wurden 16 vielversprechende Varianten sowie die Ausgangsvariante erneut

exprimiert, gereinigt (s. Abschnitt 3.3.7.1) und unter identischen Bedingungen bezüglich ihrer thermischen Stabilität vergleichend charakterisiert (s. Abschnitte 3.3.7.3 und 3.3.7.4). Vier ausgewählte Varianten wurden zusätzlich durch Denaturierung mit Gdn•HCl hinsichtlich ihrer chemischen Stabilität analysiert (s. Abschnitt 3.3.7.5).

3.3.7.1 Rationale Planung, Expression und Reinigung der Lcn1*-Varianten

Neben zwei Varianten, welche auf experimentellen Beobachtungen beruhten und unter anderem die Rolle der nativen Disulfidbrücke auf die Stabilität des Lcn1-Gerüsts analysierten (Lcn1*[D95A], Lcn1*[C61S/C153S]), basierten die anderen 14 analysierten Varianten (Abbildung 29) auf drei Theorien, die in der Diskussion genauer erläutert werden (s. Abschnitt 4.2). Die erste Gruppe von Mutationen, Lcn1*[K20I], Lcn1*[E50V], Lcn1*[D95G], Lcn1*[K20M], Lcn1*[K114V], Lcn1*[K114W] und Lcn1*[E69V], beruhte auf der Verwendung von „Knowledge-based potentials“ zur Vorhersage von Proteinstabilitäten (Sippl, 1995; Wiederstein & Sippl, 2005). Die vorgenommenen Aminosäureaustausche entstammten einer bioinformatischen Analyse in der Gruppe von Prof. Dr. Manfred Sippl, Universität Salzburg, sowie Vorschlägen von Prof. Dr. Arne Skerra, gestützt auf experimentellen und strukturellen Daten mit anderen Lcn1-basierten Anticalinen.

Basierend auf Vergleichsstudien von Proteinen aus mesophilen und thermophilen Organismen (Argos *et al.*, 1979; Menendez-Arias & Argos, 1989; Reetz *et al.*, 2006) wurden in der zweiten Strategie Glycinreste mit einem hohen kristallographischen B-Faktor durch Alanin ersetzt: Lcn1*[G59A], Lcn1*[G81A], Lcn1*[G82A], Lcn1*[G47A] und Lcn1*[G103A].

In einem dritten Ansatz wurden Lipocalin-Konsensusmotive verwendet (Adam *et al.*, 2008), um zwei weitere potentiell stabilisierte Varianten zu generieren. In Lcn1*[DE7-8NF] wurden die beiden N-terminalen Aminosäurepositionen 7 und 8 ausgetauscht, in Lcn1*[HVKD92-95DYDS] wurde der Loop zwischen β -Strang F und G am geschlossenen Ende der β -Fass-Struktur mit dem entsprechenden Loop aus dem β -Lactoglobulin des Schweins ersetzt.

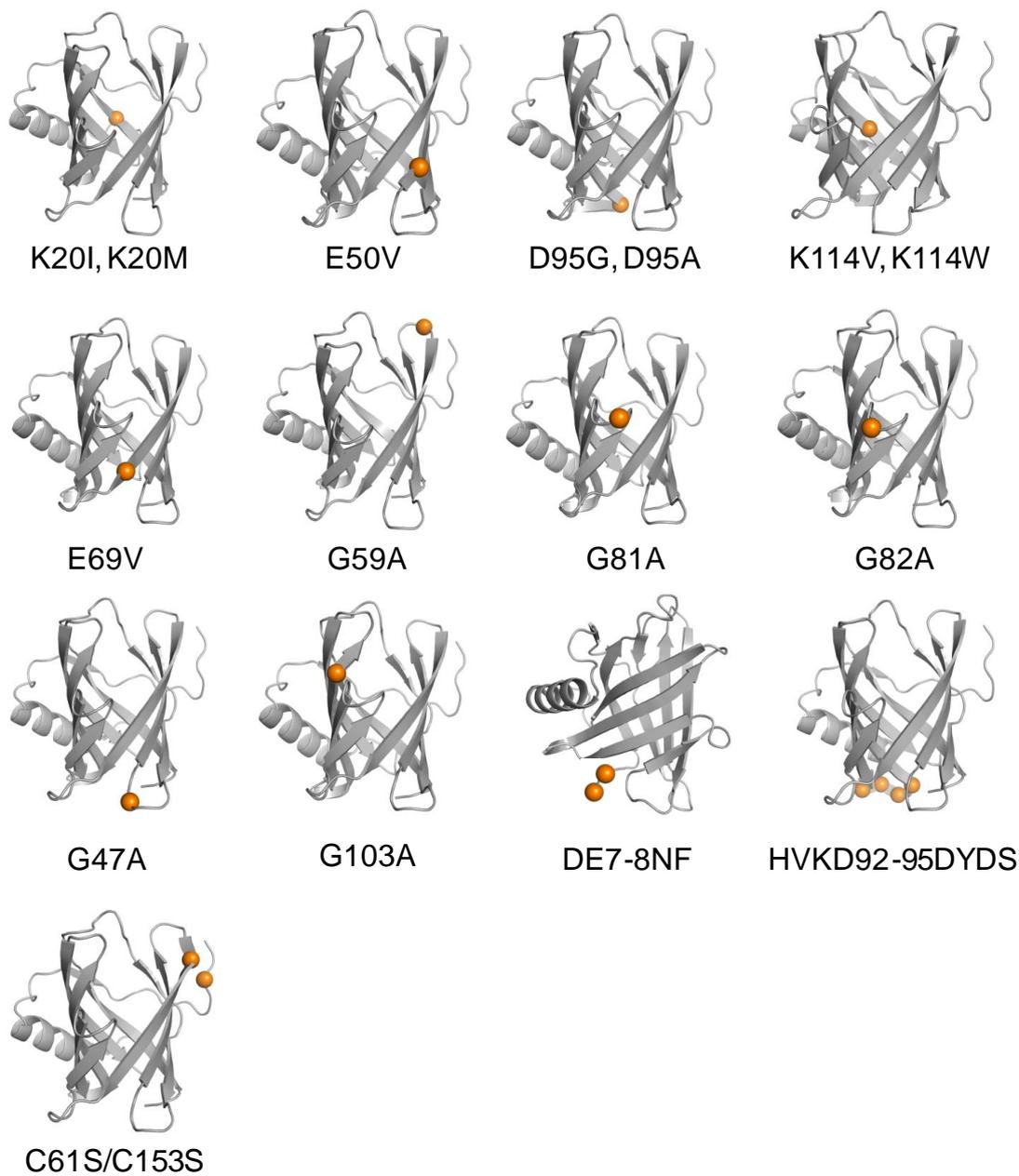


Abbildung 29: Darstellung der 16 analysierten Lcn1*-Varianten anhand der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 3EYC (Breustedt *et al.*, 2009). Das Lcn1-Proteingerüst ist als graues Bändermodell und die mutierten Positionen sind als orange Kugeln dargestellt. Der N-Terminus mit den Positionen Asp7 und Glu8 ist in der Kristallstruktur des Wildtyp-Lcn1 nicht gelöst, weswegen lediglich die Lokalisierung der entsprechenden Aminosäurereste hervorgehoben wurde.

Zur vergleichenden Analyse der Stabilität der 16 Lcn1*-Varianten und des Wildtyp-Proteins, wurden diese unter Standardbedingungen im Periplasma von *E. coli* JM83 exprimiert (22 °C, Induktion bei OD₅₅₀ = 0,5 für 3 h) und durch Streptavidin-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Größenausschlusschromatographie wurde jeweils direkt in

dem für den Stabilitäts-Test verwendeten Puffer durchgeführt; CD-Puffer für die thermische Denaturierung und KSH-Puffer für die chemische Denaturierung (s. Abschnitte 2.7.1 und 2.7.2). Die Mehrheit der Varianten lieferte hervorragende Ausbeuten von 6 bis 9 mg an affinitätsgereinigtem Protein pro Liter Bakterienkultur. Lediglich Lcn1*[K20I] (3,5 mg/l) und Lcn1*[K20M], Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] (je 1 mg/l) wiesen deutlich reduzierte Ausbeuten auf.

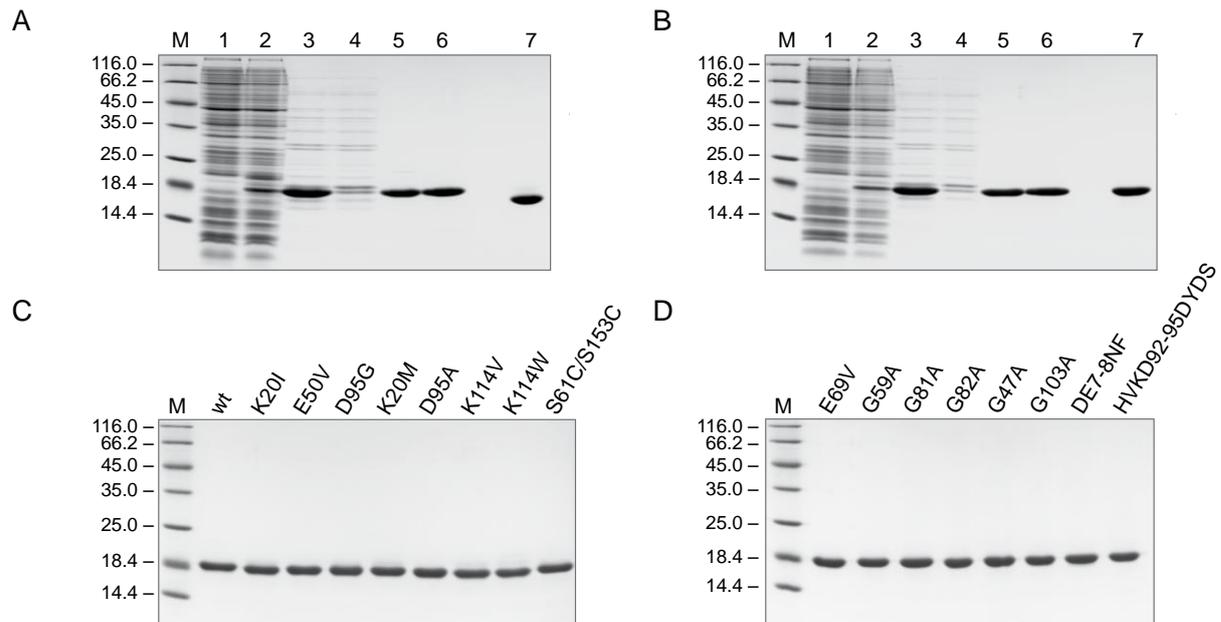


Abbildung 30: SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung der 17 Lcn1*-Varianten einschließlich des Wildtyp-Proteins. (A) Lcn1*(wt) und (B) Lcn1*[C61S/C153S]; M) Proteingrößenmarker in kDa; 1) *E. coli* Gesamtzellextrakt vor Induktion der Genexpression; 2) *E. coli* Gesamtzellextrakt bei Ernte; 3) Periplasmaextrakt; 4) Durchlauf der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 5) Elution der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 6) Monomerpeak der Größenausschlusschromatographie, 7) analog 6) unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (C, D) SDS-PAGE der Monomerfraktionen aller 17 Lcn1*-Varianten unter reduzierenden Bedingungen im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie.

Alle Varianten waren bereits nach der Einschnitt-Reinigung mit Hilfe des *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) zu >98 % rein (Abbildung 30A, B) und eluierten hauptsächlich als Monomer in der Größenausschlusschromatographie (>95 % für die meisten analysierten Varianten; Daten nicht gezeigt). Der Austausch von Lysin an Position 114 hatte einen deutlichen Effekt und führte neben dem Monomer als Hauptfraktion zum Auftreten einer Dimerfraktion in den Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] (ca. 15 % des Gesamtproteins; Daten nicht gezeigt). Die Monomerfraktionen der einzelnen Varianten wurden vereinigt und durch SDS-PAGE bezüglich ihrer Reinheit charakterisiert (Abbildung 30C). Durch die erhöhte Mobilität im SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde

die korrekte Ausbildung der nativen Disulfidbrücke gezeigt (exemplarisch für Lcn1* in Abbildung 30A, Spur 7). Die Variante Lcn1*[C61S/C153S], in welcher alle Cysteinreste gegen Serin ausgetauscht worden waren, zeigte dagegen, wie erwartet, diesen charakteristischen Shift im SDS-PAGE nicht (Abbildung 30B, Spur 7).

3.3.7.2 CD-Spektren der Lcn1*-Varianten

Zur qualitativen Analyse der Proteinfaltung der Lcn1*-Varianten wurden CD-Spektren im Bereich von 190 bis 260 nm aufgenommen. Hierbei wurden Spektren sowohl für die nativen als auch die renaturierten Proteine nach vollständiger thermischer Denaturierung gemessen (Abbildung 31).

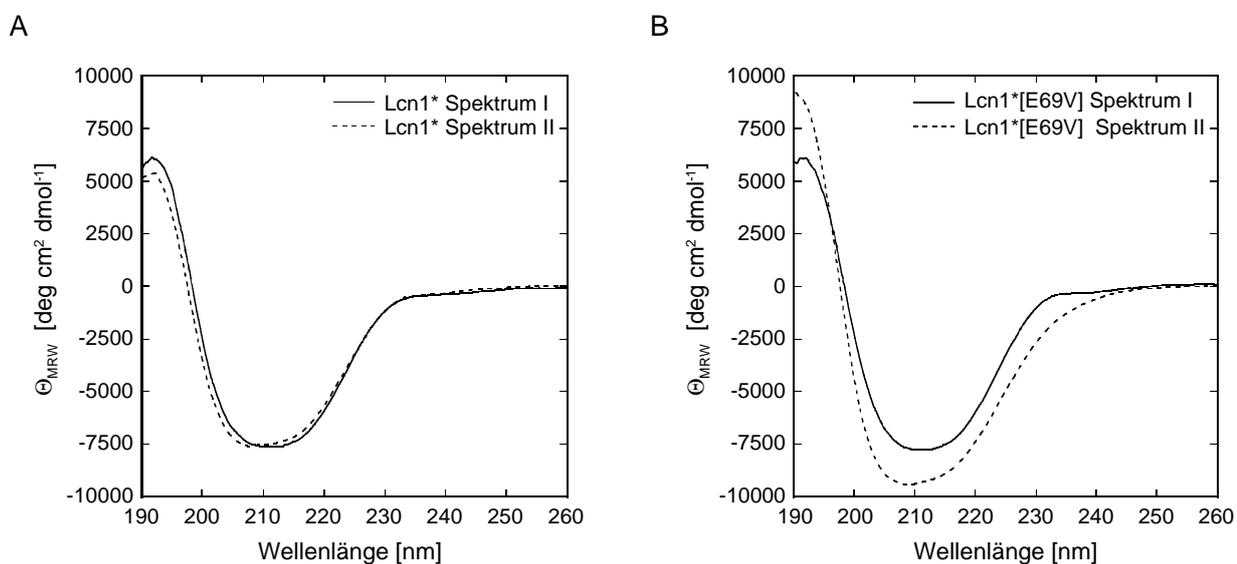


Abbildung 31: Exemplarische CD-Spektren der Varianten Lcn1* (A) und Lcn1*[E69V] (B). Zur Analyse der Sekundärstruktur des nativen (Spektrum I, durchgezogen) und des renaturierten Proteins (Spektrum II, gestrichelt) wurden die CD-Spektren der Lcn1*-Varianten bei einer Konzentration von 10 μM von 190 bis 260 nm aufgenommen. Die Messung erfolgte in CD-Puffer bei einer Temperatur von 25 °C. Die experimentell ermittelte Elliptizität Θ (in deg) wurde zum Vergleich der Einzelspektren gemäß Gleichung (10) in die molare Elliptizität pro Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet.

Die Spektren aller Lcn1*-Varianten, inklusive Lcn1*[C61S/C153S], wiesen positive maximale CD-Signal bei Wellenlängen <200 nm und breite Minima im Bereich um 210 nm auf, was für β -Faltblattproteine typisch ist (Johnson, 1988). Somit wurde gezeigt, dass das Einfügen der unterschiedlichen Mutationen bzw. das Entfernen der nativen Disulfidbrücke keinen drastischen Einfluss auf die Sekundär- und vermutlich auch Tertiärstruktur des Lcn1*-Gerüsts hatte. Die Mehrheit der analysierten Varianten wies eine annähernd perfekte

Überlagerung der Spektren der nativen und der renaturierten Proteine auf, was auf eine reversible Renaturierung hinwies (exemplarisch für Lcn1*, Abbildung 31A). Im Gegensatz dazu hatten die CD-Signale für Lcn1*[D95A], Lcn1*[E69V] und Lcn1*[G59A] nach einem Zyklus an Denaturierung/Renaturierung etwas höhere Intensität als für das native Protein (exemplarisch für Lcn1*[E69V], Abbildung 31B). Diese Beobachtung deutet an, dass diese drei Varianten nach Expression und Reinigung möglicherweise in einem Gleichgewicht an korrekt gefaltetem und partiell fehlgefaltetem Protein vorlagen, welches durch den Denaturierungs-/Renaturierungszyklus zu einem höheren Anteil an korrekt gefaltetem Protein verschoben wurde. Zur genaueren Interpretation dieses Phänomens sind allerdings weiterführende Studien notwendig, insbesondere im Hinblick auf die Denaturierungs- und Renaturierungskinetik.

3.3.7.3 Stabilitätsanalyse mittels thermischer Denaturierung

Zur Analyse des Einflusses der in Abschnitt 3.3.7.1 beschriebenen Mutationen auf die thermische Faltungstabilität der einzelnen Lcn1*-Varianten wurden die Übergangstemperaturen vom nativen zum denaturierten Zustand durch CD-Spektroskopie bestimmt. Hierfür wurden die Proteinproben in einer Konzentration von 10 μM kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ von 25 auf 102 $^{\circ}\text{C}$ aufgeheizt und das CD-Signal bei einer konstanten Wellenlänge von 230 nm für die Variante Lcn1*[C61S/C153S] bzw. 214 nm für alle anderen Varianten aufgezeichnet. Zur Untersuchung der Reversibilität des Entfaltungsprozesses wurden die Proben nach einminütiger Inkubation bei 102 $^{\circ}\text{C}$ unter Aufzeichnung des CD-Signals mit der gleichen Geschwindigkeit wieder auf 25 $^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Die Werte der Elliptizität wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Kurven gemäß Gleichung (19) entsprechend einem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet.

Mit Ausnahme von Lcn1*[C61S/C153S] wurden für alle Varianten bei 214 nm typische Denaturierungskurven mit einem einstufigen Übergang und einer hohen Kooperativität im Denaturierungsbereich gemessen. Die angepassten Graphen der Denaturierungs- und Renaturierungskurven und die daraus abgeleiteten Übergangstemperaturen für die Entfaltung bzw. Rückfaltung sind in Abbildung 32 und Tabelle 4 zusammengefasst. Lcn1*[C61S/C153S] war im Vergleich zu Lcn1* erheblich destabilisiert und wies bei einer Wellenlänge von 214 nm einen mehrstufigen Entfaltungsübergang auf. Bei einer Wellenlänge von 230 nm denaturierte Lcn1*[C61S/C153S] zwar in einer typischen zweistufigen Denaturierungskurve, die deutliche Destabilisierung im Vergleich zu Lcn1* wurde aber auch bei dieser Wellenlänge bestätigt.

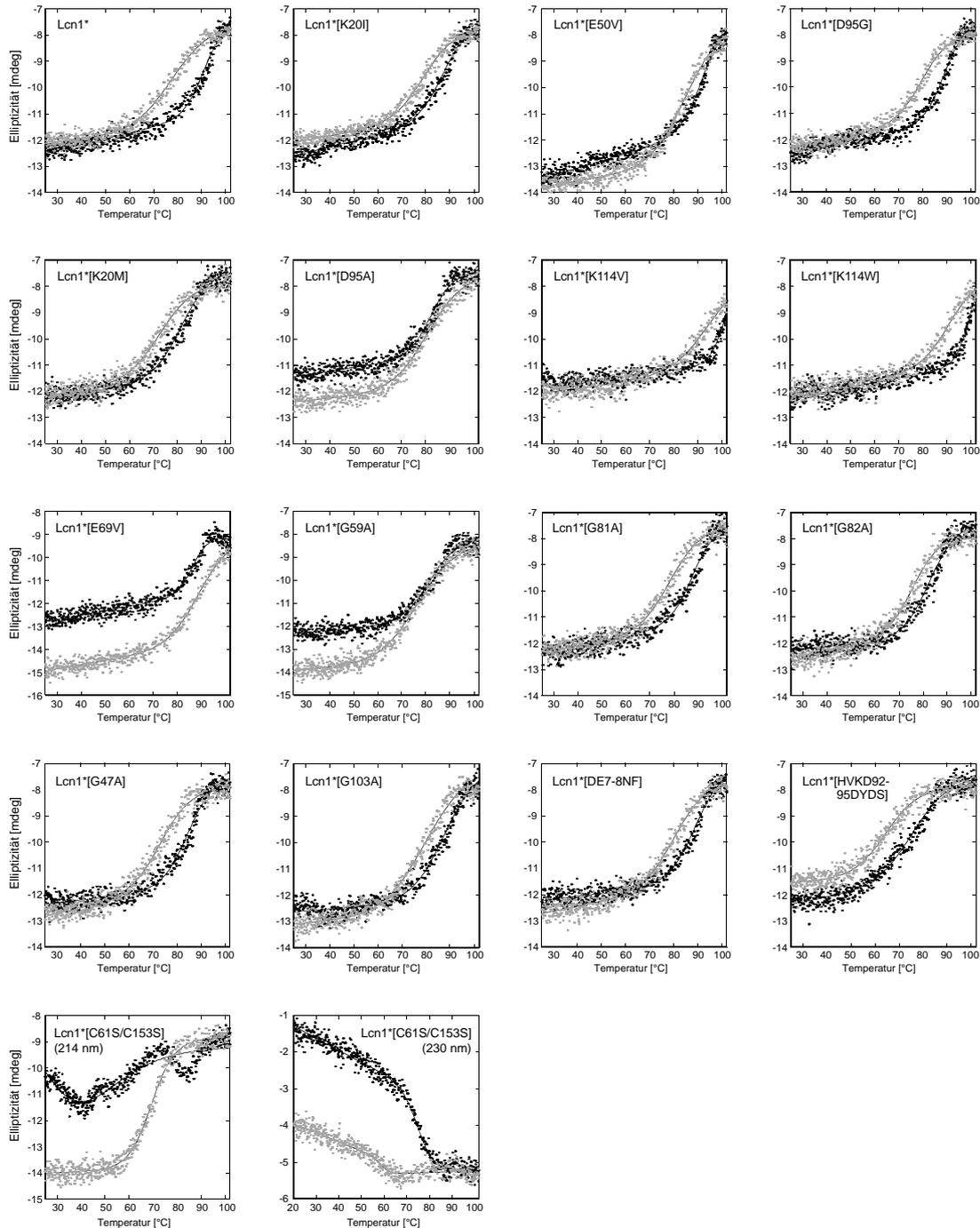


Abbildung 32: Analyse der thermischen Denaturierung/Renaturierung der 17 Lcn1*-Varianten einschließlich der Ausgangsvariante mittels CD-Spektroskopie. Zur Bestimmung der Übergangstemperaturen der Denaturierung T_m und der Renaturierung T_m^{ref} wurde die Änderung der Elliptizität der Anticaline (10 μ M) bei einer Wellenlänge von 214 und zusätzlich bei 230 nm für Lcn1*[C61S/C153S] in einem Temperaturbereich von 25 bis 102 $^{\circ}$ C aufgezeichnet. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurven (schwarz) sowie die Renaturierungskurven (grau) entsprechend einem Zwei-Zustandsmodell gemäß Gleichung (19) angepasst.

Für die Mehrheit der analysierten Varianten wurde das eingesetzte Proteins durch kontinuierliche Reduktion der Temperatur praktisch quantitativ rückgefaltet, was in den nahezu identischen Elliptizitätswerten der nativen und renaturierten Proteinproben deutlich wurde und in guter Übereinstimmung mit der in Abschnitt 3.3.7.2 schon beschriebenen Deckungsgleichheit der Spektren vor und nach Denaturierung/Renaturierung war. Allerdings kam es in den meisten Fällen bezüglich des Denaturierungs-/Renaturierungs-Übergangs (T_m) zu einer Hysterese, was auf noch unvollständige Gleichgewichtseinstellung unter den gewählten experimentellen Bedingungen hindeutete.

Im Einklang mit den Beobachtungen aus Abschnitt 3.3.7.2 wurde ein leichter Anstieg im Betrag der Elliptizitätsamplitude für die Varianten Lcn1*[D95A], Lcn1*[E69V] und Lcn1*[G59A] nach der Renaturierung detektiert. Im Gegensatz zu den Varianten mit der nativen Disulfidbrücke Cys61-Cys153 war eine vollständige Renaturierung von Lcn1*[C61S/C153S] nicht möglich, weshalb die thermodynamischen Parameter für diese Variante nicht bestimmt wurden.

Variante	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m^{ref} [°C]	T_m [°C] (Gdn•HCl)	ΔT_m [°C] (Gdn•HCl)
Lcn1*	91,37 ± 0,15	-	78,52 ± 0,33	73,78 ± 0,35	-
Lcn1*[K20I]	88,40 ± 0,31	-2,97	80,02 ± 0,26	70,35 ± 0,32	-3,43
Lcn1*[E50V]	92,36 ± 0,13	0,99	85,79 ± 0,19	74,08 ± 0,24	0,30
Lcn1*[D95G]	89,76 ± 0,23	-1,61	80,65 ± 0,24	73,21 ± 0,32	-0,57
Lcn1*[K20M]	82,28 ± 0,26	-9,09	73,82 ± 0,37	66,47 ± 0,40	-7,31
Lcn1*[D95A]	82,78 ± 0,22	-8,59	81,76 ± 0,31	70,05 ± 0,25	-3,73
Lcn1*[K114V]	101,36 ± 0,18	9,99	95,52 ± 0,29	91,85 ± 0,20	18,07
Lcn1*[K114W]	99,41 ± 0,12	8,04	91,97 ± 0,24	90,03 ± 0,18	16,25
Lcn1*[C61S/C153S]	75,73 ± 0,27	-15,64	* 59,50 ± 0,64	n.d.	n.d.
Lcn1*[E69V]	86,67 ± 0,21	-4,70	89,93 ± 0,41	73,31 ± 0,43	-0,47
Lcn1*[G59A]	82,15 ± 0,27	-9,22	77,50 ± 0,31	65,67 ± 0,44	-8,11
Lcn1*[G81A]	88,31 ± 0,18	-3,06	79,28 ± 0,26	71,01 ± 0,35	-2,77
Lcn1*[G82A]	83,05 ± 0,24	-8,32	76,73 ± 0,25	69,67 ± 0,29	-4,11
Lcn1*[G47A]	85,08 ± 0,26	-6,29	74,27 ± 0,29	68,35 ± 0,44	-5,43
Lcn1*[G103A]	88,39 ± 0,20	-2,98	80,79 ± 0,34	68,96 ± 0,49	-4,82
Lcn1*[DE7-8NF]	89,60 ± 0,35	-1,77	81,33 ± 0,29	73,61 ± 0,28	-0,17
Lcn1*[HVKD92-95DYDS]	76,93 ± 0,39	-14,44	65,16 ± 0,47	60,33 ± 0,40	-13,45

* nicht vollständig renaturiert

Tabelle 4: Zusammenfassung der Übergangstemperaturen für die Entfaltung (T_m) und Rückfaltung (T_m^{ref}) der 17 Lcn1*-Varianten einschließlich der Ausgangsvariante. Neben der Entfaltung und Rückfaltung in CD-Puffer wurde zusätzlich die Entfaltung der Proteine in 0,75 M Gdn•HCl in CD-Puffer gemessen (s. Abschnitt 3.3.7.4). Zum Vergleich der einzelnen Varianten sind zusätzlich die Differenzwerte (ΔT_m) zur Ausgangsvariante Lcn1* angegeben.

Zum direkten graphischen Vergleich der Denaturierungsübergänge der einzelnen Lcn1*-Varianten wurden die entsprechend Abschnitt 2.7.1 ermittelten Parameter b_n , b_u , m_n und m_u verwendet, um den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ in Abhängigkeit von der Temperatur

zu bestimmen (Gleichungen ((14), ((15), ((16)). Für Lcn1*[C61S/C153S] wurde die Messung bei 230 nm verwendet, da bei dieser Wellenlänge ein einstufiger Übergang zu beobachten war. Die so normierten Werte wurden im Anschluss gemäß Gleichung (20) angepasst und sind in Abbildung 33 dargestellt.

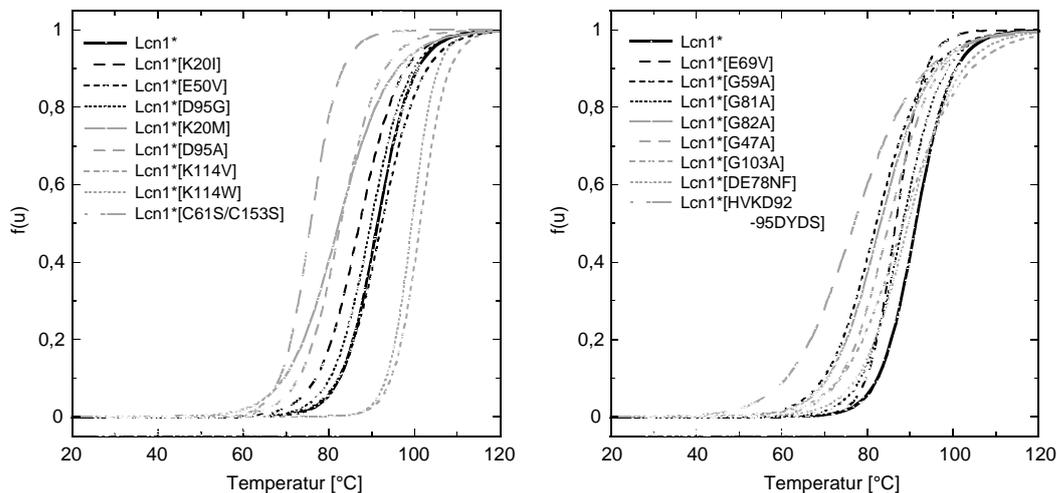


Abbildung 33: Normierte Entfaltungskurven der Lcn1*-Varianten sowie der Ausgangsvariante. Dazu wurden die in Abbildung 32 dargestellten Denaturierungskurven (für Lcn1*[C61S/C153S] die Kurve bei 230 nm) nach Gleichung (14) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert und die so erhaltenen Kurven nach Gleichung (20) angepasst. Die Messung der Denaturierung erfolgte im Temperaturbereich von 25 bis 102 °C. Die Ausgangsvariante Lcn1* (schwarze, durchgezogene Linie) wies hohe Thermostabilität auf. Lediglich die zwei Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] hatten deutlich erhöhte Schmelztemperaturen, während die Varianten Lcn1*[HVKD92-95DYDS] sowie Lcn1*[C61S/C153S] am stärksten destabilisiert waren.

Aus diesen Messungen wurde die hohe Thermostabilität der Ausgangsvariante Lcn1* mit einer Schmelztemperatur von $91,4 \pm 0,2$ °C ersichtlich. Der Vergleich zeigte, dass die Denaturierungskurven bei der Mehrheit der Varianten annähernd mit der von Lcn1* übereinstimmten (z.B. Lcn1*[E50V]) oder zu niedrigeren Temperaturen verschoben waren (z.B. Lcn1*[K20M]). Lediglich die beiden Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W], in welchen Lysin an Position 114 substituiert worden war, waren mit Schmelztemperaturen von $101,4 \pm 0,2$ °C bzw. $99,4 \pm 0,1$ °C deutlich stabilisiert. Im Gegensatz dazu war sowohl die Konsensusvariante Lcn1*[HVKD92-95DYDS], in welcher Loop FG am geschlossenen Ende der β -Fass-Struktur ausgetauscht worden war, als auch die Variante Lcn1*[C61S/C153S], in welcher die native Disulfidbrücke entfernt worden war, deutlich destabilisiert (T_m -Werte von $76,9 \pm 0,4$ °C bzw. $75,7 \pm 0,3$ °C). Das Ergebnis der thermischen Denaturierung von Lcn1*[C61S/C153S] unterstrich abermals die große Bedeutung der Disulfidbrücke für die Stabilität des Lcn1-Gerüsts. Unterschiede in der Kooperativität des Entfaltungsprozesses, welche in der Steilheit der Kurven im Übergangsbereich zum Ausdruck kamen, können aus

den Enthalpie-Werten des Denaturierungsüberganges ΔH_m (zusammengefasst in Tabelle 5) abgeleitet werden.

Variante	T_m [°C]	ΔH_m [kJ mol ⁻¹]	$\Delta G_u^{25^\circ}$ [kJ mol ⁻¹]	λ [nm]
Lcn1*	91,37 ± 0,15	259,2 ± 7,7	47,2 ± 1,4	214
Lcn1*[K20I]	88,40 ± 0,31	195,0 ± 8,7	34,2 ± 1,5	214
Lcn1*[E50V]	92,36 ± 0,13	235,2 ± 5,8	43,3 ± 1,1	214
Lcn1*[D95G]	89,76 ± 0,23	244,1 ± 9,9	43,6 ± 1,8	214
Lcn1*[K20M]	82,28 ± 0,26	173,3 ± 7,0	27,9 ± 1,1	214
Lcn1*[D95A]	82,78 ± 0,22	228,8 ± 9,9	37,2 ± 1,6	214
Lcn1*[K114V]	101,36 ± 0,18	369,2 ± 22,5	75,3 ± 4,6	214
Lcn1*[K114W]	99,41 ± 0,12	411,7 ± 20,3	82,2 ± 4,1	214
Lcn1*[C61S/C153S]	75,73 ± 0,27	n.a.	n.a.	230
Lcn1*[E69V]	86,67 ± 0,21	331,1 ± 18,8	56,7 ± 3,2	214
Lcn1*[G59A]	82,15 ± 0,27	179,3 ± 7,6	28,8 ± 1,2	214
Lcn1*[G81A]	88,31 ± 0,18	231,8 ± 6,9	40,6 ± 1,2	214
Lcn1*[G82A]	83,05 ± 0,24	181,1 ± 7,0	29,5 ± 1,1	214
Lcn1*[G47A]	85,08 ± 0,26	195,5 ± 8,2	32,8 ± 1,4	214
Lcn1*[G103A]	88,39 ± 0,20	155,2 ± 3,3	27,2 ± 0,6	214
Lcn1*[DE7-8NF]	89,60 ± 0,35	191,8 ± 8,2	34,2 ± 1,6	214
Lcn1*[HVKD92-95DYDS]	76,93 ± 0,39	134,4 ± 6,2	19,9 ± 0,9	214

Tabelle 5: Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter abgeleitet aus den thermischen Entfaltungskurven der Lcn1*-Varianten in CD-Puffer. Die thermische Denaturierung der einzelnen Varianten wurde durch Messung der Elliptizität dokumentiert (Abbildung 32) und die so erhaltenen Rohdaten nach Gleichung (19) angepasst (s. Abschnitt 2.7.1). Dargestellt sind die Schmelztemperaturen T_m , die Werte für die Enthalpie des Entfaltungsüberganges ΔH_m , die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen $\Delta G_u^{25^\circ C}$ sowie die Wellenlänge λ , bei welcher die Denaturierung gemessen wurde. Aufgrund der Irreversibilität der Denaturierung von Lcn1*[C61S/C153S] wurden die thermodynamischen Parameter für diese Variante nicht bestimmt.

3.3.7.4 Stabilitätsanalyse durch thermische Denaturierung in Gegenwart von Gdn•HCl

Wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben wurden die Rohdaten der thermischen Denaturierungskurven mit Hilfe eines 6-Parameter-Fits ausgewertet (Gleichung (19)). Hierbei wurde eine lineare Abhängigkeit des CD-Signals von der Temperatur in den prä- und posttransitionellen Bereichen der Entfaltungskurve angenommen (Brumano *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Thermostabilität von Lcn1* und seinen Varianten wurde die posttransitionelle lineare Phase allerdings nicht immer erreicht, weswegen die Steigungen der posttransitionellen Geraden (m_U) und in einigen Fällen auch die Werte der entsprechenden y-Achsen-Abschnitte (b_U) als konstante Werte abgeschätzt werden mussten (2.7.1). Die so ermittelten Schmelztemperaturen T_m (Tabelle 4) waren daher zwar gute Schätzwerte für die jeweiligen Übergangstemperaturen, waren jedoch potentiell noch mit Fehlern behaftet. Infolgedessen wurden in einem zweiten Experiment die Entfaltungskurven der einzelnen Varianten durch Zugabe eines chemischen Denaturierungsmittels zu niedrigeren Temperaturen verschoben.

Zur Ermittlung der hierfür optimalen Konzentration an Harnstoff oder Gdn•HCl wurden Vorversuche mit Lcn1* durchgeführt. Dazu wurde Lcn1* mit 6 M Harnstoff bzw. 6 M Gdn•HCl in CD-Puffer zu Endkonzentrationen von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff bzw. 0,5, 0,75, 1 und 2 M Gdn•HCl gemischt (Abbildung 34).

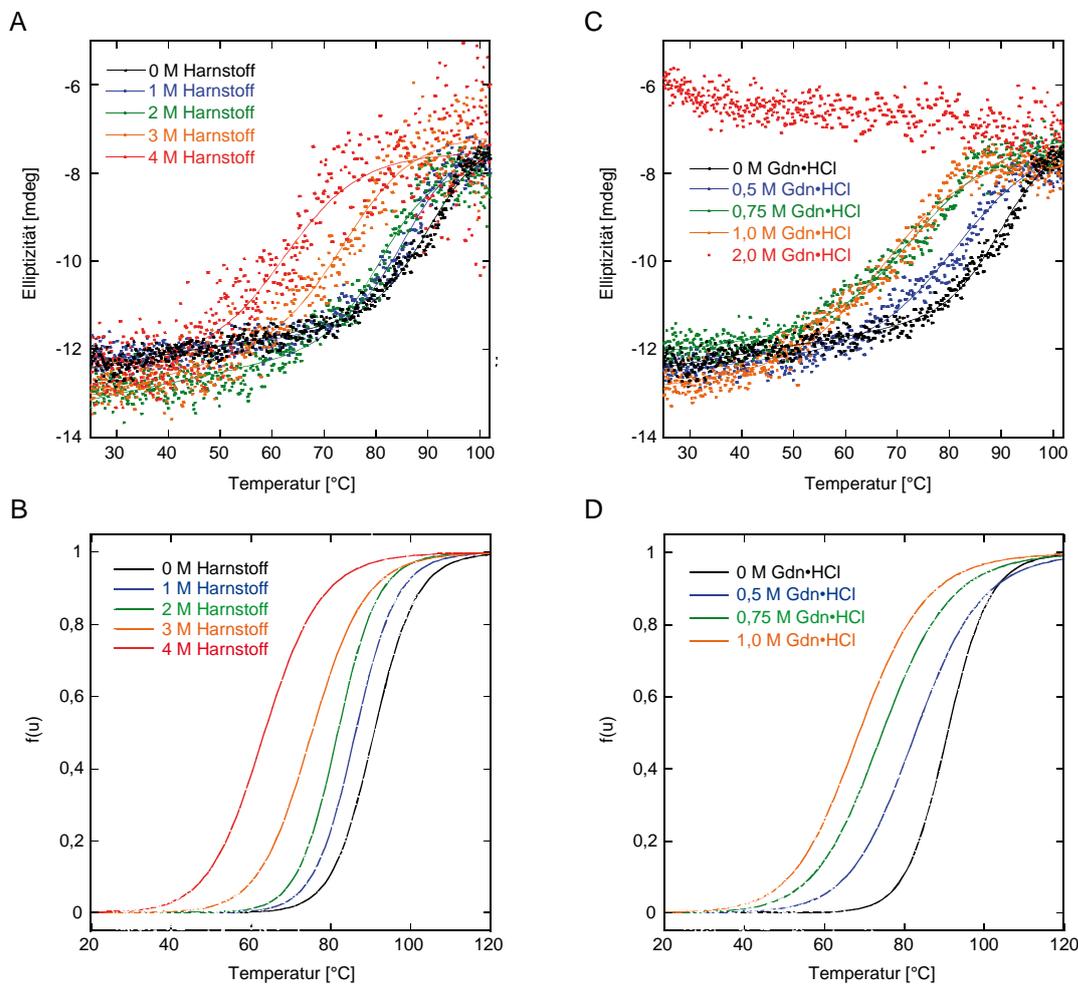


Abbildung 34: Thermische Entfaltung von Lcn1* unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Denaturierungsmittel. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration an Denaturierungsmittel wurde 10 μ M Lcn1* unter Zugabe von 1, 2, 3 und 4 M Harnstoff (A, B) bzw. 0,5, 0,75, 1 und 2 M Gdn•HCl (C, D) aufgeheizt und die Änderung der Elliptizität Θ bei einer Wellenlänge von 214 nm verfolgt. Die gemessenen Elliptizitätswerte wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurven einem Zwei-Zustandsmodell gemäß Gleichung (19) angepasst (A, C). Zur Normierung (B, D) wurden die einzelnen Kurven nach Gleichung (14) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ normiert und die so erhaltenen Kurven nach Gleichung (20) angepasst. Die Messung der Denaturierung erfolgte zwar nur im Temperaturbereich von 25 bis 102 °C, zur besseren Anschaulichkeit überspannten die Abzissen der normierten (und extrapolierten) Graphen aber den Bereich von 20 bis 120 °C.

Die Graphen in Abbildung 34 zeigen, dass durch Zugabe der Denaturierungsmittel die Kurven, wie erwartet, zunehmend zu niedrigeren Schmelztemperaturen verschoben wurden. Hierbei wurden Differenzen in den Entfaltungsübergängen von bis zu 27,5 °C bei 4 M Harnstoff bzw. 22,2 °C bei 1 M Gdn•HCl detektiert. Weiterhin wurde der unterschiedliche Denaturierungseffekt der beiden chaotropen Substanzen deutlich. Während Konzentrationen von mindestens 2 M Harnstoff für eine signifikante Verschiebung der Entfaltungskurven notwendig waren, lag bei der gleichen Konzentration an Gdn•HCl bereits das gesamte Protein denaturiert vor (vgl. Abbildung 34B). Die Renaturierung von Lcn1* in Gegenwart der Denaturierungsmittel wurde aufgrund der deutlich verstärkten Hysterese und der zu beobachtenden teilweise unvollständigen Renaturierung nicht weiter analysiert. Aufgrund der geringeren Streuung der Datenpunkte in den Studien mit Gdn•HCl sowie der höheren chemischen Stabilität von Gdn•HCl (Harnstoff zerfällt langsam in Cyanat und Ammoniak; Hagel *et al.*, 1971), wurde eine Konzentration von 0,75 M Gdn•HCl für die vergleichende Studie der Lcn1*-Varianten gewählt.

Die Kurven in Abbildung 35 zeigen trotz Zugabe von 0,75 M Gdn•HCl für alle analysierten Varianten einstufige thermische Entfaltungskurven. Die Variante Lcn1*[C61S/C153S] lag aufgrund ihrer niedrigen chemischen Stabilität (s. Abschnitt 3.3.7.5) bei Raumtemperatur allerdings bereits fast vollständig denaturiert vor und wurde daher in diese Analyse nicht einbezogen. Im Vergleich zu den Graphen in Abbildung 32 waren die Entfaltungskurven unter Gdn•HCl-Zugabe jeweils deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Kurven wurden erneut gemäß dem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet und die Schmelztemperaturen und die Temperaturdifferenzen im Vergleich zu Lcn1* in Tabelle 4 zusammengefasst. Aufgrund der nicht reversiblen Renaturierung in 0,75 M Gdn•HCl wurden die thermodynamischen Parameter ΔH_m , und $\Delta G_u^{25^\circ\text{C}}$ nicht bestimmt. Zum vereinfachten graphischen Vergleich wurden die Kurven wiederum auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ normiert (Abbildung 36).

Wie in Abschnitt 3.3.7.3 für CD-Puffer beschrieben, denaturierte auch in Gegenwart von 0,75 M Gdn•HCl die Mehrheit der Varianten in einem Temperaturbereich, der dem von Lcn1* entsprach oder zu niedrigeren Temperaturen verschoben war. Lediglich die beiden Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] waren signifikant stabilisiert, wobei die Differenzen der Übergangstemperaturen mit 0,75 M Gdn•HCl höher waren als in CD-Puffer (Tabelle 4). Temperaturdifferenzen von +18 bzw. +16 °C in 0,75 M Gdn•HCl standen Differenzen von +10 bzw. +8 °C in CD-Puffer gegenüber, was darauf hindeutete, dass 0,75 M Gdn•HCl auf die beiden Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] einen weniger destabilisierenden Effekt hatte als auf Lcn1*. In Übereinstimmung mit dieser Interpretation wurde für diese beiden Varianten auch eine im Vergleich zu Lcn1* erhöhte chemische Stabilität in Gdn•HCl detektiert (s. Abschnitt 3.3.7.5). Interessanterweise gab es außer

Lcn1* [C61S/C153S] keine Variante, welche in Gegenwart von 0,75 M Gdn•HCl im Vergleich zu Lcn1* deutlich mehr destabilisiert war als in CD-Puffer.

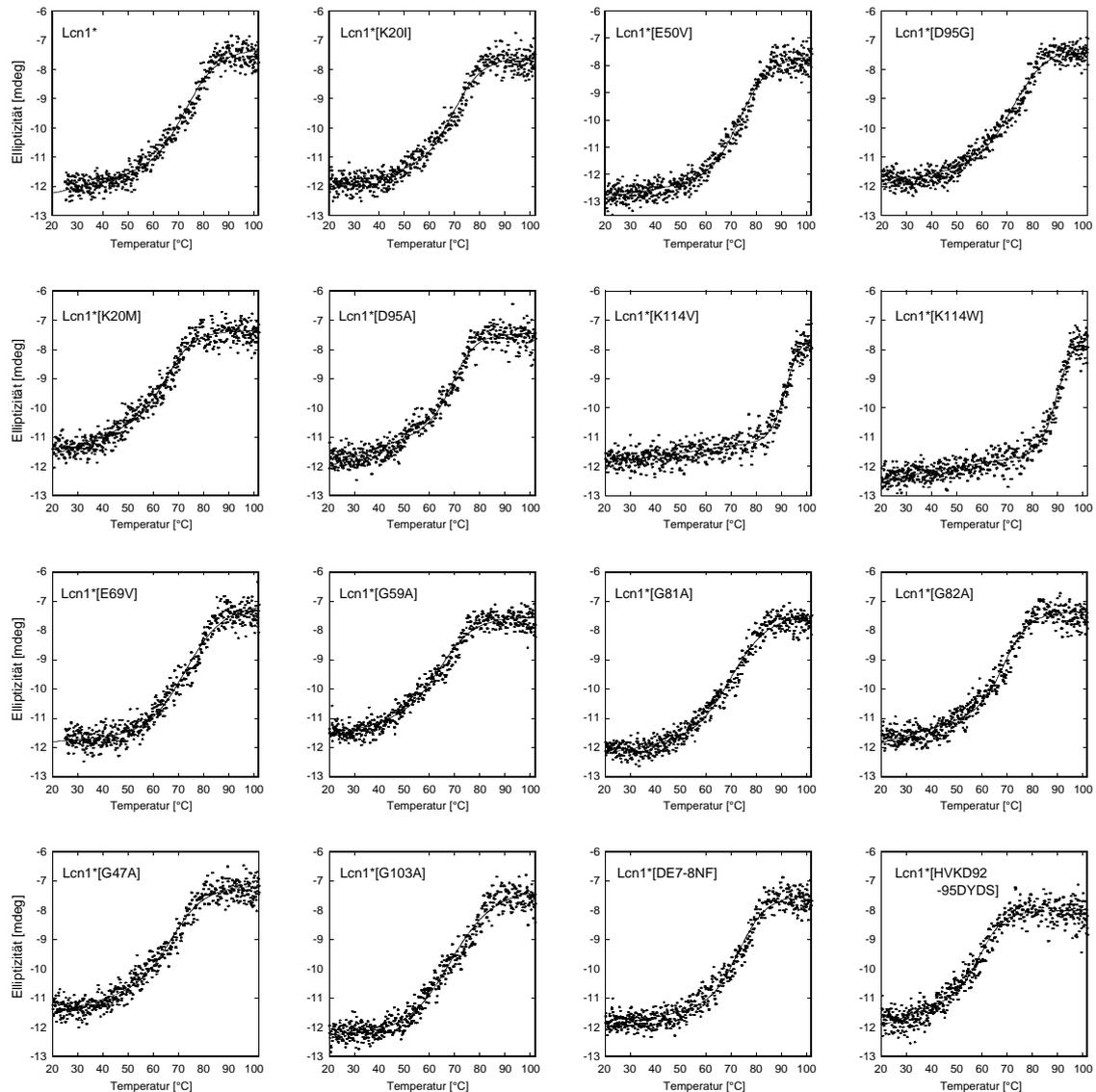


Abbildung 35: Analyse der thermischen Denaturierung der 16 Lcn1*-Varianten (alle außer Lcn1* [C61S/C153S]) in Gegenwart von Gdn•HCl. Die Lcn1*-Varianten wurden bei einer Konzentration von 10 μ M in 0,75 M Gdn•HCl in CD-Puffer von 20 oder 25 $^{\circ}$ C bis 102 $^{\circ}$ C aufgeheizt und die Änderung der Elliptizität Θ bei einer Wellenlänge von 214 nm aufgezeichnet. Die gemessenen Elliptizitätswerte wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurven einem Zwei-Zustandsmodell gemäß Gleichung (19) angepasst. Die Renaturierung der Proteine wurde nicht analysiert, da unter Gdn•HCl-Zugabe die Hysterese der Kurven deutlich verstärkt und die Renaturierung teilweise unvollständig war. Die entsprechenden Übergangstemperaturen der Entfaltung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

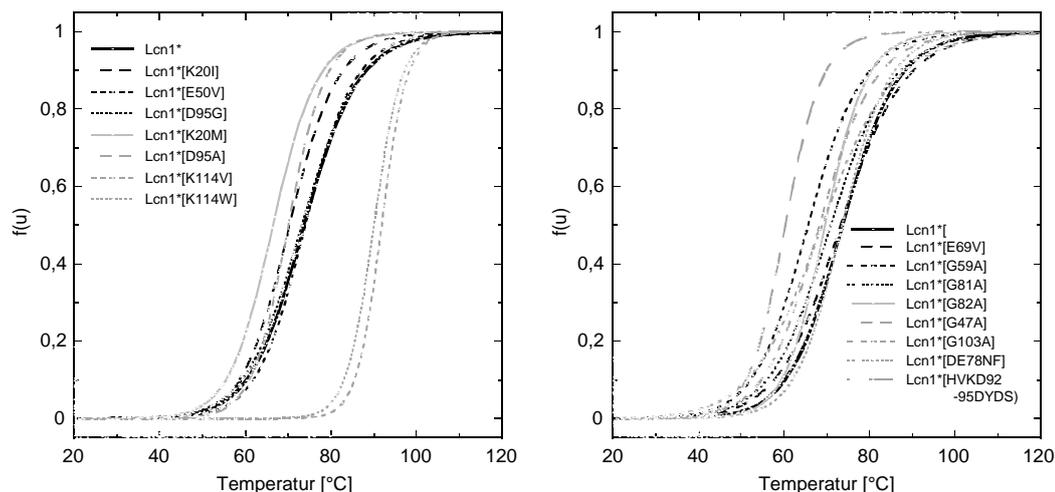


Abbildung 36: Thermische Denaturierung der Lcn1*-Varianten in Gegenwart von 0,75 M Gdn•HCl. Zur Normierung wurden die einzelnen in Abbildung 35 dargestellten Denaturierungskurven nach Gleichung (14) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert und die so erhaltenen Kurven nach Gleichung (20) angepasst. Die Messung der Denaturierung erfolgte im Temperaturbereich von 20 oder 25 °C bis 102 °C, zum Zweck der Anschaulichkeit überspannen die Abzissen der Graphen jedoch den Bereich von 20 bis 120 °C. Die Ausgangsvariante Lcn1* ist als schwarze, durchgezogene Linie dargestellt.

3.3.7.5 Stabilitätsanalyse mittels chemischer Denaturierung

Neben der Analyse der thermischen Stabilität wurden die Varianten Lcn1*, Lcn1*[K114V], Lcn1*[K114W] und Lcn1*[C61S/C153S] zusätzlich bezüglich ihrer chemischen Stabilität durch Denaturierung mit Gdn•HCl untersucht (s. Abschnitt 2.7.2). Aufgrund der für die CD-Spektroskopie benötigten höheren Proteinkonzentration (10 μ M gegenüber 1 μ M) wurde die Fluoreszenzspektroskopie als Alternative zur Analyse der chemischen Stabilität gewählt. Hierbei wurde die proteineigene Tyr/Trp-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an Gdn•HCl gemessen und die Entfaltungskurve gemäß einem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet (Pace, 1986). Zur Bestimmung der exakten Konzentrationen an Gdn•HCl in den jeweiligen Proteinproben wurden die Brechungsindices mit Hilfe eines Refraktometers gemessen (Muller & Skerra, 1993) und die Gdn•HCl-Konzentration nach Gleichung (22) berechnet. Die Lcn1*-Varianten (Endkonzentration 1 μ M) wurden in steigenden Konzentrationen an Gdn•HCl für 48 h bei 20 °C inkubiert und anschließend, nach Einstellung des Gleichgewichts, im Fluoreszenzspektrometer bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und Emissionswellenlängen von 365 nm (für Lcn1*, Lcn1*[K114V] und Lcn1*[C61S/C153S]) bzw. 373 nm (für Lcn1*[K114W]) vermessen.

Zur Korrektur der Streuung der Messwerte aufgrund schwankender Proteinkonzentrationen wurde zusätzlich das Fluoreszenzsignal am isosbestischen/isofluoreszenten Punkt (328 nm für Lcn1*, Lcn1*[K114V] und Lcn1*[C61S/C153S] bzw. 340 nm für Lcn1*[K114W]) bestimmt.

Dieser Punkt entspricht der Wellenlänge, bei welcher sich die Fluoreszenzwerte der nativen und der denaturierten Proteinproben unabhängig von der Gdn•HCl-Konzentration nicht unterscheiden (Koide *et al.*, 1998). Zur Bestimmung dieser Wellenlänge wurden Spektren bei unterschiedlichen Gdn•HCl-Konzentrationen aufgenommen und überlagert (Abbildung 37A). Im Verlauf der Denaturierung kam es hierbei zu einer Verschiebung der Emissionsspektren zu größeren Wellenlängen (Rotverschiebung) und zu einem Anstieg im Fluoreszenzsignal. Der durch Korrektur des Fluoreszenzsignals mit Hilfe des isosbestischen Punktes erreichte Effekt auf die Genauigkeit der Denaturierungskurve ist in Abbildung 37B veranschaulicht.

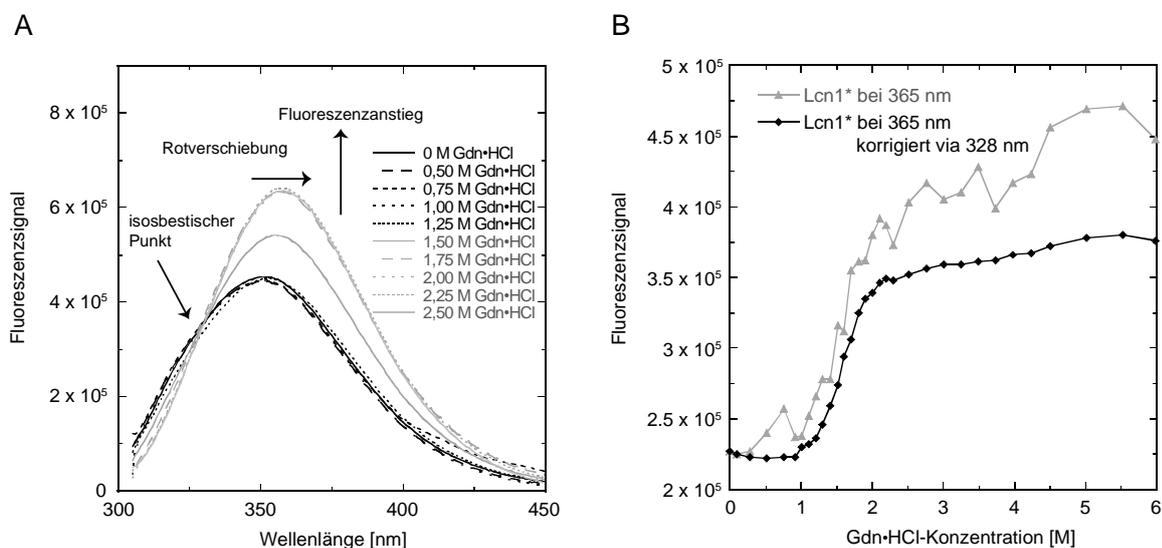


Abbildung 37: Bestimmung des isosbestischen Punktes (A) und Korrektur einer Denaturierungskurve mit Hilfe der anhand dessen korrigierten Messwerte (B). (A) Durch Überlagerung der Fluoreszenzspektren von Lcn1* in unterschiedlichen Gdn•HCl-Konzentrationen wurde der isosbestische Punkt bei einer Wellenlänge von 328 nm bestimmt. Im Verlauf der Denaturierung kam es zu einer deutlichen Rotverschiebung des Maximums und zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. (B) Der Vergleich der Originalmesswerte der Denaturierungskurve von Lcn1* gemessen bei 365 nm (grau) mit den entsprechenden korrigierten Werten (schwarz, in diesem Fall korrigiert anhand der Fluoreszenzwerte bei 328 nm) zeigt anschaulich den Effekt der Korrektur mit Hilfe des isosbestischen Punktes.

Abbildung 38 zeigt für jede der analysierten Varianten typische zweistufige Denaturierungskurven mit vergleichbaren Kooperativitätswerten m im Übergangsbereich. Wie schon bei der thermischen Denaturierung (s. Abschnitt 3.3.7.3), erwiesen sich auch in dieser chemischen Analyse die Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] stabilisiert. Mit 2,8 bzw. 2,6 M Gdn•HCl waren die Konzentrationen an Denaturierungsmittel, die zur Entfaltung des Proteins zu 50 % notwendig waren ($[D]_{1/2}$), im Vergleich zu Lcn1* mit 1,6 M Gdn•HCl deutlich erhöht. Der Austausch von Lysin an Position 114 gegen Valin bzw. Tryptophan hatte somit

nicht nur einen positiven Effekt auf die thermische sondern auch auf die chemische Stabilität des Lcn1*-Proteingerüsts. Ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.7.3 hatte die Entfernung der nativen Disulfidbrücke in Lcn1*[C61S/C153S] einen nachteiligen Effekt auf die chemische Stabilität. Mit einem $[D]_{1/2}$ -Wert von 0,6 M Gdn•HCl war Lcn1*[C61S/C153S] deutlich destabilisiert. Die Werte für die Kooperativität der Entfaltung m , für die Entfaltungsenthalpie ΔG_{n-u}^{H20} sowie für die gemäß Gleichung (29) berechnete Konzentration $[D]_{1/2}$ können für die einzelnen analysierten Varianten Tabelle 6 entnommen werden. Das erhöhte Fluoreszenzsignal der Variante Lcn1*[K114W] ist offensichtlich auf den zusätzlichen Tryptophanrest an Position 114 zurückzuführen (Abbildung 38A).

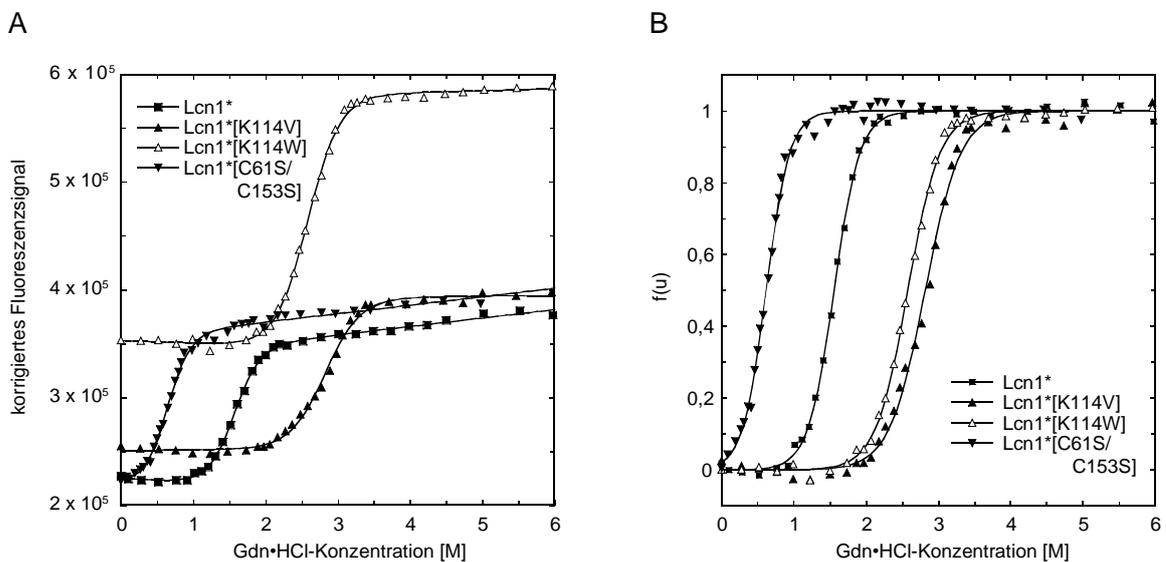


Abbildung 38: Messung der chemischen Stabilität der Varianten Varianten Lcn1*, Lcn1*[K114V], Lcn1*[K114W] und Lcn1*[C61S/C153S] durch Entfaltung in Gdn•HCl bei 20 °C. (A) Zur Bestimmung der chemischen Stabilität wurde die korrigierte Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Gdn•HCl-Konzentration aufgetragen und der Graph gemäß Gleichung (28) angepasst. (B) Zum besseren Vergleich der Denaturierungsübergänge wurden die einzelnen Entfaltungskurven nach Gleichung (30) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert. Die so erhaltenen normierten Kurven wurden anschließend nach Gleichung (31) ausgewertet.

Variante	m[kJ mol ⁻¹ M ⁻¹]	D _{1/2} [M]	ΔG _{N→D} ^{H20} [kJ mol ⁻¹]
Lcn1*	13,7 ± 0,7	1,6 ± 0,8	21,3 ± 1,1
Lcn1*[K114V]	10,0 ± 0,8	2,8 ± 0,3	28,3 ± 2,2
Lcn1*[K114W]	11,0 ± 0,5	2,6 ± 0,2	28,5 ± 1,2
Lcn1*[C61S/C153S]	15,1 ± 1,2	0,6 ± 0,1	9,3 ± 1,2

Tabelle 6: Ergebnisse der Gdn•HCl-Denaturierung der Varianten Lcn1*, Lcn1*[K114V], Lcn1*[K114W] und Lcn1*[C61S/C153S].

3.4 Selektion Aβ-bindender ApoD-Varianten

3.4.1 Phage Display, Screening und Sequenzanalyse potentieller Aβ-spezifischer ApoD-Varianten

Als Alternative zu Lcn1-basierten Anticalinen wurde das humane ApoD als weiteres Lipocalin-Gerüst für die Selektion auf Bindungsaktivität für Aβ-Peptide bzw. Aβ-Fusionsproteine ausgewählt. Aufgrund seiner schlitzartigen Bindungstasche (Eichinger *et al.*, 2007) sowie der beschriebenen Anreicherung von ApoD in Alzheimer-Plaques (Desai *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2003) erschien dieses Lipocalin zur Generierung von Aβ-spezifischen Anticalinen besonders gut geeignet. Aus diesem Grund wurde die in Abschnitt 3.2.1 beschriebene Phagemidbibliothek für Selektionen mit verschiedenen Aβ-Peptiden bzw. Aβ-Fusionsproteinen und unter Verwendung unterschiedlicher Elutionsmethoden eingesetzt.

Mit dem Ziel der Selektion von Anticalinen mit Spezifität für den N-terminalen Bereich des Aβ-Peptids wurde in einem ersten Ansatz das biotinylierte Peptid Aβ(1-11)-Bio in einer finalen Konzentration von 100 nM verwendet. Zur Vermeidung von Aviditätseffekten und zur Selektion von Anticalinen mit hoher Affinität wurden, im Gegensatz zu der für die Lcn1'-Bibliothek beschriebenen Strategie (s. Abschnitt 3.3.1), die paramagnetischen Streptavidin-Partikel nicht mit dem Peptid beladen, sondern die Komplexbildung zunächst in Lösung durchgeführt, bevor die Komplexe aus Aβ-spezifischen ApoD-Varianten und den biotinylierten Peptiden auf mit Streptavidin beladenen paramagnetischen Partikeln immobilisiert wurden.

Zur Abreicherung von unspezifischen, hydrophoben ApoD-Varianten wurde ab dem zweiten Selektionszyklus eine negative Vorselektion vorgenommen. Hierfür wurden die Phagemide vor Zugabe des Aβ-Peptids zunächst mit einem zusätzlichen Aliquot an paramagnetischen Streptavidin-Partikeln inkubiert und erst der Überstand für die eigentliche Selektion verwendet. In insgesamt fünf Selektionszyklen mit Aβ(1-11)-Bio kam es zu einer deutlichen Anreicherung von Phagemiden (nicht gezeigt).

Zur Identifizierung einzelner A β -spezifischer ApoD-Varianten wurde die *Bst*XI-Genkassette der in den Selektionszyklen 4 und 5 eluierten Phagemide auf dem Vektor pApoD12_IN90 subkloniert und ein Kolonie-Filterstapel-Test (s. Abschnitt 2.4.5) mit A β (1-11)-Bio durchgeführt. Hierbei wurden einige wenige Farbsignale auf den primären Filtern identifiziert, deren weitere Analyse auf einem sekundären Filter mit dem A β -Peptid sowie Ovalbumin als Negativkontrolle allerdings unspezifische Kreuzreaktivität mit beiden Molekülen zeigte (nicht gezeigt). Unter Einsatz zweier unterschiedlicher Bibliotheken, der Lcn1'-Bibliothek (s. Abschnitt 3.3.1) und der ApoD-Bibliothek, wurde somit gezeigt, dass der N-terminale Bereich des A β -Peptids zur Generierung von A β -spezifischen Anticalinen weniger gut geeignet ist.

In einer zweiten Kampagne wurde das mit Digoxigenin markierte Fusionsprotein Trx-A β 28-DIG in der Selektion eingesetzt. Unter Verwendung von paramagnetischen Partikeln, welche mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper gekoppelt waren, wurde die Selektion im Prinzip wie für A β (1-11)-Bio beschrieben in Lösung durchgeführt. Allerdings wurden die Phagemide zur Abreicherung von unerwünschten Thioredoxin-Bindern im Anschluss an den Blockierungsschritt bzw. im Anschluss an die negative Vorselektion zusätzlich mit einem 150fachen Überschuss an nicht markiertem Trx inkubiert bevor das eigentliche Target, Trx-A β 28-DIG, in einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben wurde. Vergleichbar mit der Selektion mit A β (1-11)-Bio wurde auch hier eine deutliche Anreicherung von Phagemiden detektiert (nicht gezeigt).

Zur Identifizierung einzelner Trx-A β 28-spezifischer ApoD-Varianten wurde der Kolonie-Filterstapel-Test mit den in *Phage Display* Zyklen 4 und 5 eluierten Phagemiden durchgeführt (Abbildung 39). Hierbei wurden nach konsekutiver Inkubation mit 100 nM Trx-A β 28-DIG und einem anti-DIG-Fab-AP-Konjugat zahlreiche Farbsignale auf den primären Filtern identifiziert, welche im sekundären Filter spezifisch mit Trx-A β 28-DIG, jedoch nicht mit den Kontrollproteinen Trx-DIG bzw. Ova-DIG interagierten. Zusätzlich wurde in einer Kontrolle auch Bindungsaktivität zwischen der Ausgangsvariante ApoD_IN90 und Trx-A β 28-DIG, nicht aber mit Trx-DIG oder Ova-DIG, detektiert. Allerdings wurde dies weder im Screening-ELISA noch in ELISA-Experimenten mit gereinigten ApoD-Varianten bestätigt.

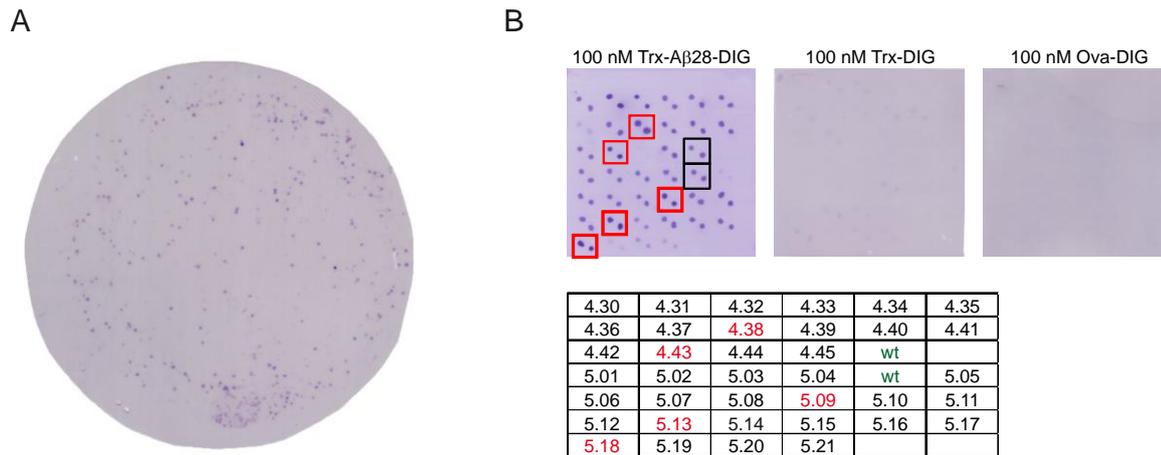


Abbildung 39: Kolonie-Filterstapel-Test zur Identifizierung von Trx-A β 28-spezifischen ApoD-Varianten. (A) Ein primärer Filter nach Selektionsrunde 4, welcher mit 100 nM Trx-A β 28-DIG inkubiert wurde, zeigt zahlreiche Farbsignale. (B) Ein sekundärer Filter, in welchem positive Varianten erneut auf Bindung von Trx-A β 28-DIG bzw. Bindung der Kontrollproteine Trx-DIG und Ova-DIG getestet wurden. Die Nummern 4.30 bis 4.45 bezeichnen Varianten nach Zyklus 4 und 5.01 bis 5.21 stehen für Varianten nach Zyklus 5. Zusätzlich wurde Wildtyp ApoD_IN90 als Negativkontrolle (schwarze Rahmen) eingesetzt. Die rot umrandeten Varianten wurden ausgewählt und einer Sequenzanalyse unterzogen.

12 Varianten, die ein starkes Signal für Trx-A β 28, aber vernachlässigbare Signale für Trx und Ova aufwiesen, wurden ausgewählt und einer Sequenzanalyse unterzogen. Hierbei wurden viermal die Wildtyp-Sequenz sowie sechs mutierte Sequenzen identifiziert (Abbildung 40).

Der Vergleich der Sequenzen zeigte, dass es im Verlauf der Selektion zu einer starken Anreicherung der basischen Aminosäuren Lys und Arg gekommen war. Mit einem Durchschnitt von 7,3 Lys- bzw. Arg-Resten an den 18 randomisierten Positionen (etwa 40 %) waren diese beiden Aminosäuren deutlich überrepräsentiert. Zusätzlich trat in ApoD_4.6 jeweils eine Mutation zu Lys bzw. Arg außerhalb der randomisierten Bereiche auf. Die Sequenzanalyse von zufällig ausgewählten Varianten der naiven, für die Selektion eingesetzten ApoD-Bibliothek zeigte keine derartige Tendenz (nicht gezeigt), was andeutet, dass die beobachtete Anreicherung basischer Aminosäuren in der Natur des A β -Zielproteins oder in der Vorgehensweise bei der Selektion begründet lag. Da ein niedriger pH-Wert die Elution von Proteinen mit positiven Ladungen begünstigt und da eine ähnliche Anreicherung basischer Aminosäuren bei der *Phage Display*-Selektion am Lehrstuhl für Biologischen Chemie auch mit anderen Bibliotheken und anderen Zielmolekülen beobachtet worden war, wurde die Selektion gegen Trx-A β 28-DIG im Anschluss an die initiale Charakterisierung der in diesem Selektionsexperiment identifizierten Anticaline unter Verwendung alternativer Elutionsmethoden wiederholt.

	GTGAATAAGTAT	Cca	GGAAGATGC	TACGAAATG	GAGAAGATCCCA	CAACCTTTGAGAAT	GGACGCTGCATCCAGCCCACTACTCACTGATG	GGAAAAACGGAAAGATCAAA																													
	ValAsnLysTyrProGlyArgTrpTyrGluIleGluLysIlePro	Thr	Thr	Phe	Glu	Asn	Gly	Arg	Cys	Ile	Gln	Ala	Asn	Tyr	Ser	Leu	Met	Glu	Asn	Gly	Lys	Ile	Lys														
Bibliothek													
4.6													
4.21													
4.24													
4.43, 5.13,18													
5.9													
5.14													
	GTGTTAAACCAGGAGTTG	AGAGCTGATGGA	ACTGTGAATCAAATC	GAAGGTGAAGCCACCC	CAGTTAACCTCACAGAGCC	TGCCAAGCTGGAAGTTAAG	TTTTCTGGgcTATG																														
	ValLeuAsnGlnGluLeu	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Asn	Gln	Ile	Glu	Gly	Glu	Ala	Thr	Pro	Val	Asn	Leu	Thr	Glu	Pro	Ala	Lys	Phe	Ser	Trp	Ala	Met								
Bibliothek							
4.6							
4.21							
4.24							
4.43, 5.13,18							
5.9							
5.14							
	CCATCGGCA	CCGTACTGGATCCTG	GCCACCGACTATG	GAGAACTATG	CCCTCGTGTATCC	TGTACTsGCAc	CTCCAACTCs	TCACGTGGATTTT	GCTTGGATCTTGG	CcAGA																											
	ProSer	Ala	Pro	Tyr	Trp	Ile	Leu	Ala	Thr	Asp	Tyr	Glu	Asn	Tyr	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Cys	Thr	Ser	Thr	Ser	Gln	Ser	His	His	Val	Asp	Phe	Ala	Trp	Ile	Leu	Ala	Arg
Bibliothek	
4.6	
4.21	
4.24	
4.43, 5.13,18	
5.9	
5.14	

Abbildung 40: Sequenzanalyse potentieller Aβ-spezifischer ApoD-Varianten nach Selektion auf Bindung von Trx-Aβ28 mit saurer Elution. Dargestellt sind die DNA- und die Aminosäuresequenzen von Wildtyp ApoD_IN90 und den selektierten Varianten (s. Abbildung 39). In der Bibliothek randomisierte Positionen sind magenta, löslichkeitsverbessernde Mutationen in der Ausgangsvariante ApoD_IN90 cyan und die zur Klonierung der randomisierten Kassetten verwendeten *Bst*XI-Schnittstellen gelb markiert. Die basischen Aminosäuren Lys und Arg, welche verstärkt angereichert wurden, sind blau hervorgehoben. Variante ApoD_4.43 trat insgesamt dreimal auf, die anderen Varianten wurden in nur je einer Kopie identifiziert.

Alle Varianten außer ApoD_5.9, welches einen freien Cysteinrest in Loop #4 trug, wurden in löslicher Form exprimiert und bezüglich ihres Oligomerisierungsverhaltens sowie ihrer Bindungsaktivität analysiert (s. Abschnitt 3.4.2).

Als Alternative zum Kolonie-Filterstapel-Test wurde im Anschluss an die Selektion gegen Trx-Aβ28 zusätzlich ein Screening-ELISA durchgeführt. Hierfür wurde die *Bst*XI-Kassette der eluierten Phagemide aus Selektionsrunde 5 auf dem Expressionsvektor pApoD_IN90 subkloniert, der Ligierungsansatz zur Transformation des *Amber*-Suppressorstamm TG1-F eingesetzt und der Screening-ELISA wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben mit immobilisiertem Trx-Aβ28 durchgeführt. Durch Nachweis der gebundenen ApoD-Varianten anhand des *Strep*-tag II wurden einige Anticaline identifiziert, deren Signalintensitäten mindestens um den Faktor 2 über dem Hintergrundsignal lagen (nicht gezeigt).

Allerdings waren alle von den ApoD-Varianten stammenden Signale niedriger als das Signal von Lcn1_3.3-23 (s. Abschnitt 3.3.4), welches als Positivkontrolle eingesetzt worden war. Diese niedrigen Signale ließen vermuten, dass die selektierten ApoD-Varianten ebenfalls niedrige Affinität für Trx-A β 28 besaßen. Die darauffolgende Sequenzanalyse der Varianten mit den stärksten Signalen lieferte ausschließlich Sequenzen mit Verschiebungen im Leserahmen, nämlich einer Deletion im Bereich von Loop #3 und einer Insertion vor Loop #4 (nicht gezeigt). Diese Kombination aus Deletion und Insertion ermöglichte zwar den Nachweis anhand des *Strep*-tag II; aufgrund des falschen Leserahmens zwischen Loop #3 und #4 ist jedoch Fehlfaltung der Varianten und dadurch vermittelte unspezifische Interaktion mit Trx-A β 28 sehr wahrscheinlich.

In weiteren *Phage Display*-Experimenten wurde die oben beschriebene Selektion gegen Trx-A β 28-DIG mit wenigen Änderungen wiederholt. Anstelle von BSA wurde hierbei Magermilchpulver als Blockierungsreagenz verwendet. Weiterhin wurden als alternative Elutionsmethoden die basische Elution sowie die Elution mit Harnstoff durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.3). Im Gegensatz zu den vorhergehenden Selektionen kam es hierbei zu keiner deutlichen Anreicherung der Phagemide und insgesamt zu sehr niedrigen Elutionstitern. Magermilchpulver, das eine höhere Stringenz als BSA aufweist, schien somit als Blockierungsreagenz für die ApoD-Bibliothek zu stark, weswegen die beiden Selektionsexperimente mit 2 % (w/v) BSA anstelle von 2 % (w/v) Magermilchpulver als Blockierungsreagenz wiederholt wurden. Hierbei wurden mit beiden Elutionsmethoden die üblichen Elutionstitern und eine deutliche Anreicherung von Phagemiden im Verlauf von vier Selektionszyklen erreicht (nicht gezeigt).

Angesichts des oben beschriebenen falsch positiven Signals von Wildtyp ApoD_IN90 im Kolonie-Filterstapel-Test wurden diesmal bloß Screening-ELISAs zur Durchmusterung der aus den Selektionsexperimenten gegen Trx-A β 28-DIG eluierten ApoD-Varianten durchgeführt. In den sekundären ELISA-Screens (s. Abbildung 41), in welchen Trx als Negativkontrolle eingesetzt wurde, wurden mehrere ApoD-Varianten identifiziert, die ein spezifisches Bindungssignal für Trx-A β 28 aufwiesen. Allerdings waren auch diesmal alle Signale deutlich niedriger als das von Lcn1_3.3-23, was erneut auf nur schwache Bindungsaktivität hinwies.

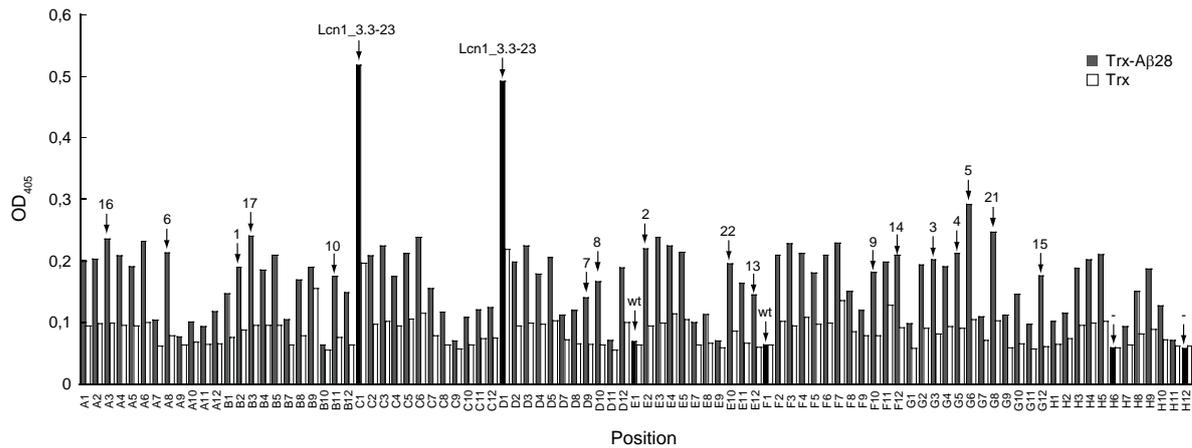


Abbildung 41: Sekundärer Screening-ELISA zur Charakterisierung von potentiellen A β -spezifischen ApoD-Varianten aus den Selektionen gegen Trx-A β 28-DIG mit 2 % (w/v) Magermilchpulver bzw. 2 % (w/v) BSA als Blockierungsmittel und basischer Elution bzw. Elution mit Harnstoff. Im „direkten“ ELISA-Format wurden Trx-A β 28 (dunkle Säulen) sowie Trx als Negativkontrolle (weiße Säulen) in ELISA-Platten immobilisiert. Die Interaktion der ApoD-Varianten, welche als Periplasmaextrakte im Mikrotiterplatten-Maßstab präpariert wurden und das *Strep*-tag II trugen, mit den immobilisierten Proteinen wurde durch *Strep*-Tactin-AP anhand der chromogenen Farbreaktion mit pNPP nachgewiesen. Kontrollen, wie Lcn1_3.3-23 als Positiv- und ApoD_IN90 (wt) als Negativkontrolle, sind markiert. Varianten, die sequenziert wurden, sind beziffert.

24 Varianten, die ein ausgeprägtes Verhältnis zwischen den Bindungssignalen für Trx-A β 28 und Trx aufwiesen, wurden sequenziert (Tabelle 7). Das Alignment aller intakten Sequenzen ist im Anhang dargestellt. In den 24 Varianten wurden 17 unterschiedliche Sequenzen identifiziert, wobei in den beiden Selektionen mit Magermilchpulver als Blockierungsreagenz jeweils nur eine Variante auftrat, was auf eine starke Anreicherung hinweist (4x ApoD_313-1, beziffert als 1, 4 und 5 im sekundären Screening-ELISA in Abbildung 41; 5x ApoD_313-2, beziffert als 2, 3, 16 und 17 im sekundären Screening-ELISA in Abbildung 41). Im Gegensatz dazu trat nach Selektion mit BSA als Blockierungsreagenz jede Variante nur einmal auf. Insgesamt wiesen 6 der Varianten aus der Selektion mit BSA als Blockierungsreagenz mehrfache Verschiebungen im Leserahmen auf. Mit unterschiedlichen Kombinationen aus Deletionen und Insertionen bzw. mehrfachen Deletionen besaßen alle diese Varianten einen intakten C-Terminus, was ihren Nachweis über den C-terminalen *Strep*-tag II ermöglichte. 7 der insgesamt 11 intakten Varianten (2 Varianten aus der Selektion mit Magermilchpulver als Blockierungsreagenz, 5 aus der Selektion mit BSA als Blockierungsreagenz) besaßen wenigstens ein Cystein und 7 Varianten wiesen zusätzlich die Punktmutation E81K außerhalb der randomisierten Bereiche auf. Trotz der Verwendung von alternativen Elutionsmethoden war der Anteil an basischen Aminosäuren immer noch hoch (25 - 42 %). Ausgewählte ApoD-Varianten wurden exprimiert und bezüglich ihres Oligomerisierungsverhaltens analysiert (s. Abschnitt 3.4.2).

Variante	Häufigkeit	Blockierung/Elution	Fehler im Leserahmen	Punktmutationen	Lys+Arg/ Mutationen gesamt	Cys Anzahl und Lokalisierung
1	4x (1, 4, 5, 26)	Skim / Harnstoff		E81K	6/19	2x: Loop 1+3
2	5x (2, 3, 16, 17, 23)	Skim / Basisch		E81K 2x stille Mutation	7/19	1x: Loop 3
6	1x	BSA / Basisch	Ins + Del	E81K		
7	1x	BSA / Basisch	Del + Ins	E81K		
8	1x	BSA / Harnstoff	Del + Ins			
9	1x	BSA / Harnstoff		V67M E73V	5/20	
10	1x	BSA / Harnstoff		W99C	8/19	1x: PM
13	1x	BSA / Harnstoff		E81K	7/19	
14	1x	BSA / Harnstoff	2x Del + 2x Ins			
15	1x	BSA / Harnstoff		E81K	8/19	1x: Loop 3
21	1x	BSA / Basisch		Q59R 1x stille Mutation	6/19	1x: Loop 3
22	1x	BSA / Harnstoff		E81K E106G Y112C	7/21	3x: Loop 3+4+PM
29	1x	BSA / Basisch	Del + Ins	Y108		
30	1x	BSA / Harnstoff			5/18	1x: Loop 3
32	1x	BSA / Basisch		V77G	7/19	
33	1x	BSA / Harnstoff		E81K	8/19	
34	1x	BSA / Harnstoff	3x Del			

Tabelle 7: Zusammenfassung der Sequenzanalyse potentieller A β -spezifischer ApoD-Varianten nach Selektion gegen Trx-A β 28 mit alternativen Elutionsmethoden. (Skim = Magermilchpulver)

3.4.2 Produktion und Charakterisierung der ApoD-Varianten

Aufgrund der starken Lyse der bakteriellen Zellen während der sekretorischen Expression von ApoD_IN90 im 2l-Maßstab im *E. coli*-Stamm JM83, wurden die Ausgangsvariante und alle selektierten ApoD-Varianten mit pTUM4 koexprimiert. pTUM4 bewirkt die Überexpression von periplasmatischen Faltungshelfern (Schlupschy *et al.*, 2006) und führte nach Koexpression bei 22 °C zu reduzierter Zelllyse und zu erhöhten Ausbeuten an den rekombinanten ApoD-Varianten. Die Analyse der Expression und Reinigung von ApoD_IN90 mittels SDS-PAGE (Abbildung 42) dokumentiert die Überexpression der Faltungshelfer DsbA, DsbC, FkpA und SurA im Periplasmaextrakt (Spur 4). Die korrekte Ausbildung der beiden Disulfidbrücken in ApoD_IN90 sowie die Abwesenheit von Disulfid-isomeren wird anhand der einzelnen Proteinbande mit erhöhter Mobilität unter nicht reduzierenden Bedingungen deutlich (Spur 7).

Die Analyse des Oligomerisierungsverhaltens der selektierten ApoD-Varianten durch Größenausschlusschromatographie zeigte, dass im Gegensatz zum monomeren ApoD_IN90 (Abbildung 43B) die Mehrheit der Varianten aus der Selektion gegen Trx-A β 28-DIG in Kombination mit saurer Elution als Aggregat (>95 %, Abbildung 43A) eluierte. Lediglich ApoD_4.21 eluierte zu ca. 40 % als Monomer und wurde daher erneut exprimiert und im präparativen Maßstab durch SEC an der Superdex 75 HR 10/30 gereinigt (Abbildung 43C). Die weitere Charakterisierung der Monomerfraktion von ApoD_4.21 mittels „Capture“-

ELISA und Fluoreszenztitration ergab allerdings keinerlei Bindungsaktivität für Trx-A β 28 (nicht gezeigt).

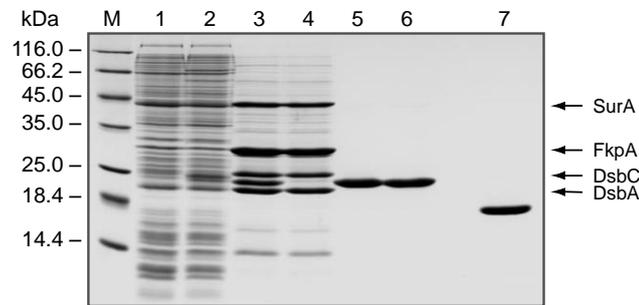


Abbildung 42: SDS-PAGE zur Analyse der Koexpression von ApoD_IN90 mit pTUM4 und der Reinigung durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und SEC. Die von pTUM4 überexprimierten Faltungshelferproteine sind als deutliche Banden im Periplasmaextrakt zu erkennen und neben dem Gel bezeichnet. M) Proteingrößenmarker in kDa; 1) *E. coli* Gesamtzellextrakt vor Induktion der Genexpression; 2) *E. coli* Gesamtzellextrakt bei Ernte; 3) Periplasmaextrakt; 4) Durchlauf der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 5) Elutionsfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 6) Monomer-Peak aus der SEC, 7) wie Spur 6, unter nicht reduzierenden Bedingungen.

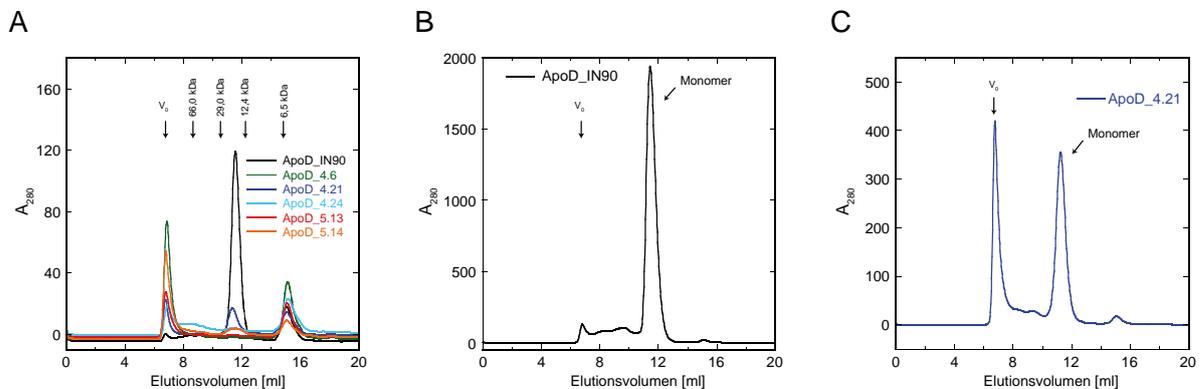


Abbildung 43: SEC zur Analyse des Oligomerisierungsverhaltens der ApoD-Varianten aus der Selektion gegen Trx-A β 28-DIG mit saurer Elution. (A) Die überlagerten Elutionsprofile im analytischen Maßstab (Superdex 75 HR 10/30, 24 ml Bettvolumen) zeigen, dass die Mehrheit der Varianten als Aggregat nahe dem Ausschlussvolumen eluierte. Der Peak bei einem Volumen von ca. 15 ml entspricht dem zur Elution von der Streptavidin-Säule verwendeten Desthiobiotin. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (V_0) sowie die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) an. (B) Im präparativen Maßstab eluierte ApoD_IN90 hauptsächlich als Monomer. (c) Im präparativen Maßstab eluierte die selektierte Variante ApoD_4.21 zu ca. 40 % als Monomer.

Nach der Selektion gegen Trx-A β 28 in Kombination mit alternativen Blockierungs- und Elutionsreagenzien war keine vorwiegend monomere Variante zu identifizieren. Die meisten Varianten eluierten als Aggregat und wiesen darüberhinaus im Vergleich zu ApoD_IN90 sehr niedrige Ausbeuten auf (Abbildung 44A, B). Lediglich ApoD_313-1 aus der Selektion mit Magermilchpulver und Harnstoff eluierte zu ca. 50 % als Dimer. Die SDS-PAGE-Analyse unter nicht reduzierenden Bedingungen ergab, dass es sich hierbei um ein Cysteinverbrücktes, kovalentes Dimer handelte (nicht gezeigt). Zur Monomerisierung dieser Variante wurden die beiden neuen Cysteinreste (Cys36 in Loop #1, Cys91 in Loop #3; vgl. Tabelle 7) gegen Alanin ausgetauscht (ApoD_313-1[C36A/C91A]), was allerdings keinen positiven Effekt auf das SEC-Elutionsprofil dieser ApoD-Variante hatte (Abbildung 44C). Die SDS-PAGE der Dimerfraktion zeigte, dass ApoD_313-1[C36A/C91A] trotz der Substitutionen immer noch als kovalentes Disulfid-Dimer eluierte (nicht gezeigt).

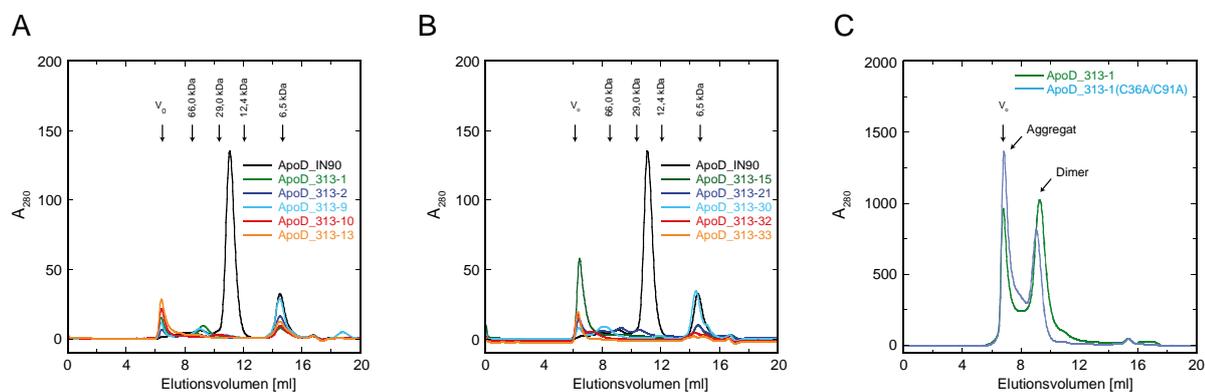


Abbildung 44: SEC zur Analyse des Oligomerisierungsverhaltens der ApoD-Varianten aus der Selektion gegen Trx-A β 28-DIG mit alternativen Elutionsmethoden. (A, B) Die überlagerten Elutionsprofile im analytischen Maßstab (Superdex 75 HR 10/30, 24 ml Bettvolumen) zeigen, dass die meisten Varianten als Aggregate eluierten. Die Peaks bei einem Volumen von ca. 15 ml entsprechen dem zur Elution von der Streptavidin-Säule verwendeten Desthiobiotin. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (V_0) und die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) an. (C) ApoD_313-1 (grün) eluierte zu ca. 50 % als Dimer. Austausch der beiden neuen Cysteinreste in Loop #1 und Loop #3 gegen Ala (ApoD_313-1[C36A/C91A], blau) hatte keinen positiven Effekt auf das Elutionsprofil.

Die Analyse der Dimerfraktionen von ApoD_313-1 und ApoD_313-1[C36A/C91A] im „Capture“-ELISA mit immobilisiertem *StrepMAB*-Immo zeigte sehr niedrige Bindungsaktivität für biotinyliertes Trx-A β 28 mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 20 μ M (nicht gezeigt). Aufgrund dieser schwachen Bindung an Trx-A β 28 und der unerwünschten Dimerbildung wurde von der weiteren Charakterisierung dieser Variante abgesehen. Die Ausgangsvariante ApoD_IN90 zeigte keinerlei Bindungsaktivität für biotinyliertes Trx-A β 28 (nicht gezeigt).

3.5 Selektion A β -bindender Lcn2'-Varianten

3.5.1 *Phage Display*-Selektion mit Digoxigenin-markiertem Trx-A β 28

In einem dritten Ansatz wurde die in Abschnitt 3.2.3 beschriebene Lcn2'-Bibliothek zur Selektion von A β -spezifischen Anticalinen eingesetzt.

In insgesamt vier unterschiedlichen Ansätzen (Tabelle 8) wurden je 100 nM Trx-A β 28-DIG als Target für die Selektion in Lösung, gefolgt von der Abtrennung gebundener Phagemide mit funktionalisierten paramagnetischen Partikeln verwendet. Wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, wurde zunächst mit einem 150fachen Überschuss an nicht markiertem Trx kompetiert, um Thioredoxin-Binder aus der Bibliothek zu entfernen. Zur Reduktion von unspezifisch bindenden Anticalinen wurde zusätzlich ab Selektionszyklus 2 die oben beschriebene negative Vorselektion mit paramagnetischen Partikeln durchgeführt.

	A (Ac)	B (Co)	C (UB)	D (US)
Bibliothek	Lcn2' (Lcn2 'New')			
Target	Trx-A β 28-DIG (Kompetition mit 15 μ M Trx; nicht markiert)			
Selektionsmethode	"in Lösung", anti-DIG magnetische Partikel			
Blockierungsreagenz	2 % BSA (R1-4)			2 % BSA (R1-2) 2 % Skim (R3-R6)
Elutionsmethode	Glycin/HCl pH 2,2 (R1-4)	Glycin/HCl pH 2,2 (R1-2) 50 μ M Trx-A β 28 (R3-4)	4 M Harnstoff (R1-4)	4 M Harnstoff (R1-6)
Sonstiges	negative Vorselektion mit magnetischen Partikeln ab R2			

Tabelle 8: Zusammenfassung der hier mit der Lcn2'-Bibliothek durchgeführten *Phage Display*-Selektionen auf A β -spezifische Anticaline. Die in Klammern angegebenen Bezeichnungen stehen für die Elutions- bzw. Elutions- und Blockierungsmethode (Ac = acidic, Co = competitive, UB = Urea/BSA, US = Urea/Skim).

In den Selektionen A, B und C wurde mit 2 % BSA blockiert und es wurde eine deutliche Anreicherung eluierter Phagemide in vier Zyklen beobachtet. In A und C wurde die Elutionsmethode in allen vier Zyklen beibehalten, saure Elution in A und denaturierende Elution mit Harnstoff in C. Dagegen wurde in Selektion B nach den ersten beiden Runden mit saurer Elution zur kompetitiven Elution mit nicht markiertem Trx-A β 28 (50 μ M) gewechselt.

In einem vierten Ansatz (D) wurde bei Elution mit Harnstoff das Blockierungsreagenz im Verlauf der Selektion variiert. Zur Vermeidung einer zu starken Abreicherung der Phagemide in den ersten beiden Selektionszyklen wurde 2 % BSA zum Blockieren verwendet, während ab Selektionsrunde 3 2 % Magermilchpulver eingesetzt wurde. Aufgrund der höheren Stringenz von Magermilchpulver kam es in Runde 3 zu einem starken Abfall im relativen Titer der eluierten Phagemide, weswegen sechs anstelle der generell üblichen vier Selektionszyklen durchlaufen wurden (Abbildung 45). Der Vergleich mit Selektion C, wobei

abgesehen vom Blockierungsreagenz identische Bedingungen verwendet wurden und ein deutlicher Anstieg der eluierten Phagemide zwischen Runde 2 und 3 zu beobachten war (Abbildung 45), zeigt, dass der bei D auftretende Abfall im Phagemidtitel durch den Wechsel des Blockierungsreagenz hervorgerufen wurde.

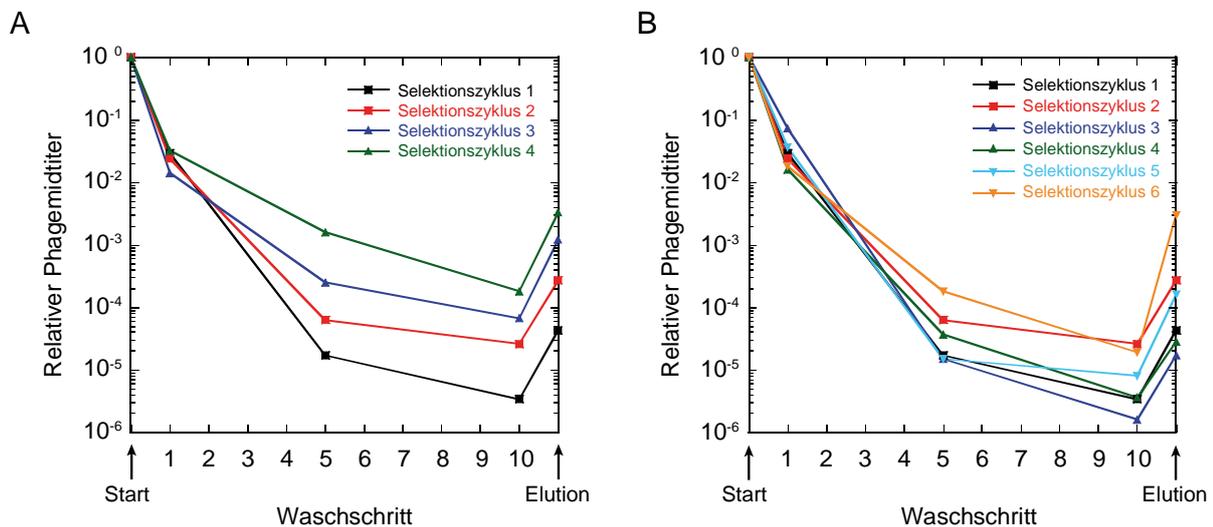


Abbildung 45: Überlagerung der Elutionsprofile der einzelnen Selektionszyklen im Verlauf der Anreicherung von Trx-A β 28-spezifischen Lcn2'-Varianten mittels *Phage Display* unter den Selektionsbedingungen C und D. Nach zehn Waschschriffen wurden die gebundenen Phagemide hierbei mit 4 M Harnstoff eluiert. Die Titer der eingesetzten Phagemide (Start), ausgewählter Waschfraktionen (1, 5 und 10) und der Elutionsfraktion (Elution) wurden bestimmt und als Bruchteil der jeweils insgesamt eingesetzten Phagemide (relativer Phagemidtitel) halblogarithmisch aufgetragen. (A) Verlauf von Selektion C unter Verwendung von 2 % BSA zum Blockieren. (B) Verlauf von Selektion D, wobei ab dem dritten Zyklus 2 % Magermilchpulver anstelle von BSA zum Blockieren verwendet wurde.

3.5.2 Identifizierung von Lcn2'-Varianten im Kolonie-Filterstapel-Test und Screening-ELISA

Zur Identifizierung von Trx-A β 28-spezifischen Lcn2'-Varianten wurde der jeweilige Pool der eluierten Phagemide aus allen vier Selektionsexperimenten mittels Kolonie-Filterstapel-Test und Screening-ELISA analysiert (Abbildung 46, Abbildung 48). Für den Kolonie-Filterstapel-Test wurden die *Bst*XI-Kassetten der in Zyklus 4 eluierten Phagemide aus den Selektionen A, B und C sowie die *Bst*XI-Kassette der in Zyklus 6 eluierten Phagemide aus Selektion D auf dem Vektor pNGAL124 subkloniert und der Test gemäß Abschnitt 2.4.5 mit 100 nM Trx-A β 28-DIG — bzw. Trx-DIG und Ova-DIG als Negativkontrollen — durchgeführt. Für den Screening-ELISA (Abbildung 48) wurden die entsprechenden *Bst*XI-Kassetten auf dem Vektor pNGAL98 subkloniert.

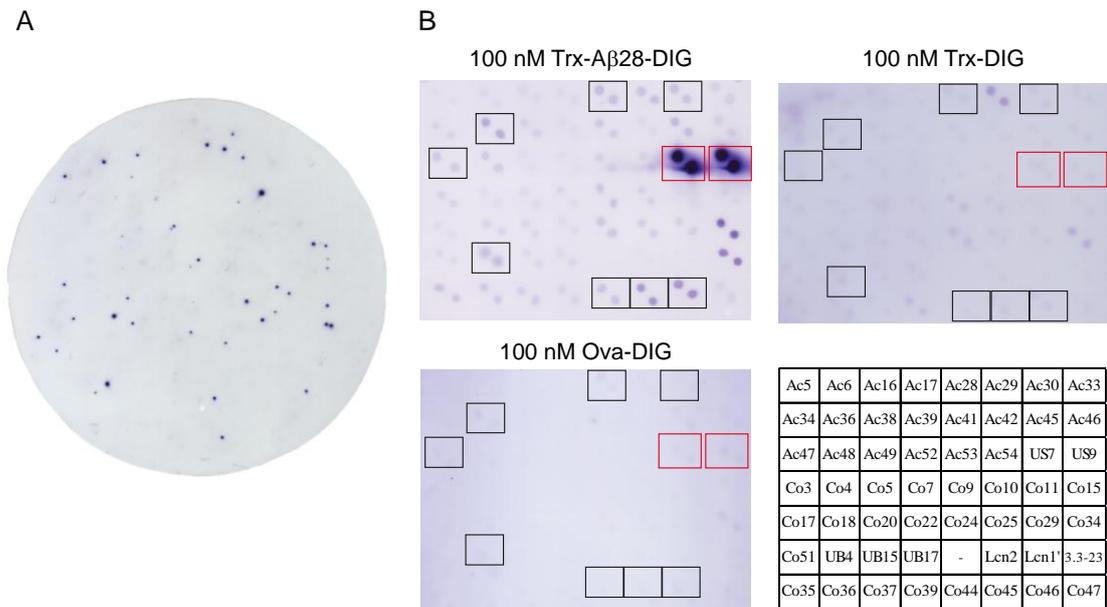


Abbildung 46: Kolonie-Filterstapel-Test zur Identifizierung von Trx-A β 28-spezifischen Lcn2'-Varianten. Der primäre Filter (A) im Anschluss an Selektion D zeigt wenige, intensive Farbsignale nach Inkubation mit 100 nM Trx-A β 28-DIG. Im sekundären Filter (B) wurden positive Varianten aller vier Selektionsansätze auf Bindung von Trx-A β 28-DIG gegenüber den Kontrollproteinen Trx-DIG und Ova-DIG getestet. Ac (acidic), Co (competitive), UB (Urea/BSA) und US (Urea/Skim) stehen für die gewählten Methoden bei den Selektionen (Tabelle 8). Die intensiven Signale der Varianten aus Selektion D wurden im sekundären Filter bestätigt (US7, US9, rote Kästen), alle anderen Varianten zeigten dagegen nur schwache Signale. Die Wildtyp-Lipocaline Lcn2' und Lcn1' wiesen keine Bindung auf. Mit Kästen markierte Varianten wurden sequenziert.

Auf den primären Filtern des Kolonie-Filterstapel-Tests im Anschluss an Selektion A, B und C wurden zahlreiche, sehr schwache Farbsignale identifiziert (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurden auf den Filtern nach Selektion D zwar wenige, allerdings sehr intensive Farbsignale detektiert (Abbildung 46A). Die Kolonien, die diesen intensiven Farbsignalen entsprachen, wurden auf dem Filter identifiziert, gepickt und vermehrt. Allerdings wuchsen nur zwei dieser Kolonien an, was höchstwahrscheinlich auf Lyse der bakteriellen Zellen auf den Filtern zurückzuführen ist. Die beiden Varianten Lcn2_US7 und Lcn2_US9 waren somit die einzigen Varianten aus Selektion D, die auf einem sekundären Filter genauer analysiert wurden (Abbildung 46B). Hierbei wurde das intensive Bindungssignal für Trx-A β 28-DIG bestätigt und gleichzeitig fehlende Bindung der Kontrollproteine Trx-DIG und Ova-DIG nachgewiesen. Einige der analysierten Varianten aus den anderen drei Selektionen zeigten auch im sekundären Filter schwache Bindungssignale. Die in Abbildung 46B markierten Varianten wurden amplifiziert und sequenziert. Hierbei wurden für die Varianten Lcn2_US7 und Lcn2_US9 identische Sequenzen gefunden (Abbildung 47).

Strain	Sequence	Amino Acid
Bibliothek	AACCAATCCATGGGAAGTGGTATGTGGTAGGTCGCAGGGAATGCAATTCTCAGAGAAGACAAGACCCGCAAAGATGTATGCCACCATCTATGAGCTGAAAGAAGCAAGAGCTACAAT	AsnGlnPheHisGlyLysTrpTyrValValGlyLeuAlaGlyAsnAlaIleLeuArgGluAspLysAspProGlnLysMetTyrAlaThrIleTyrGluLeuLysGluAspLysSerTyrAsn
Ac28NNK.....NNKNNK.....NNK.....NNK.....NNK.....NNK.....GlyGlu.....MetPhe.....
Ac30GGT.....AGGTGG.....G.....GGG.....CTT.....GlyArgTrpGly.....GlyLeu.....
Ac36TAT.....ATGTGT.....TCG.....AAT.....TyrMetCys.....SerAsn.....
Ac47CAT.....GCTATG.....TAG.....ATG.....HisAlaMetGlnMet.....
Co36CTG.....TGGCAT.....GAT.....TGT.....LeuTrpHisAspCys.....
Co44CAT.....TGTGAG.....TGT.....CGT.....HisCysGluCysArg.....
Co45 (2x)TAT.....TTGATG.....GTT.....GAT.....TyrLeuMetValAsp.....
UB4ACT.....ATTGGG.....AAG.....TAT.....G.....ThrIleGlyLysTyr.....Glu.....
US7 (6x)GTT.....AAGTCT.....TGG.....TAT.....ValLysSerTrpTyr.....
Bibliothek	GTCACCTCCGTCCTTTAGGAAAAGAAGTGTGACTACTGGATCAGGACTTTTGTTCAGGTTCCAGCCAGCGAGTTCACGCTGGCCAACATTAAAGATTACCCCTGGATTAACGAGTTAC	ValThrSerValLeuPheArgLysLysLysCysAspTyrTrpIleArgThrPheValProGlySerGlnProGlyGluPheThrLeuGlyAsnIleLysSerTyrProGlyLeuThrSerTyr
Ac28NNK.....NNK.....NNKNNK.....NNK.....NNK.....NNK.....NNK.....NNK.....GlyTrpValGlnLeuTrpAsnGluMetTyrGlyMetTyrGly.....
Ac30GCT.....TGG.....GTTTGG.....AGG.....ATG.....TAG.....AlaTrpValTrpArgMetGlnMetValArgGly.....
Ac36GCG.....GGG.....TGGGT.....TTG.....GGT.....CAG.....AlaGlyTrpGlyLeuGlyGlnLysGlnGly.....
Ac47ATG.....GTG.....TTGTTT.....GTG.....ATG.....GTT.....T.....MetValLeuPheValMetValLysPheLysLysGly.....
Co36TGT.....GTT.....CTTAGT.....CGC.....TGT.....CGG.....CysValLeuSerAlaCysArgThrGlyArgMet.....
Co44TAT.....GCT.....TGGTGT.....CTG.....TTG.....GTG.....TyrGlyTrpCysLeuLeuValGlnSerLysCys.....
Co45 (2x)ACG.....AAG.....TAGCTG.....ATT.....TGG.....GTT.....G.....ThrLysGlnValIleTrpValAsnLeuLysTyr.....
UB4AAG.....AAG.....ATGGGG.....TAT.....GGG.....CAG.....TCT.....GTG.....TGT.....CTG.....LysLysMetGlyTyrGlyGlnSerValCysLeu.....
US7 (6x)TCG.....GGG.....GGGACT.....CAT.....AAG.....AGG.....AGG.....CGG.....AGG.....GCT.....SerGlyGlyThrHisLysArgArgArgArgAla.....
Bibliothek	CTCCTCCGAGTGGTGCACCAACTACAACCAGCATGCCTATGCTTCTTCAAGAAAGTTCTCTCAAACAGGGAGTACTTCAAGATCACCCCTCTACGGGAGAACCAAGGAGCTGACTTCGGAA	LeuValArgValValSerThrAsnTyrAsnGlnHisAlaMetValPhePheLysLysValSerGlnAsnArgGluTyrPheLysIleThrLeuTyrGlyArgThrLysGluLeuThrSerGlu
Ac28NNK.....NNK.....NNK.....NNK.....ArgLeuLeuGlu.....
Ac30GTG.....AGG.....CAT.....CGG.....ValArgHisArg.....
Ac36ATG.....TGT.....TGG.....CTG.....MetCysTrpLeu.....
Ac47CCT.....GTG.....AGG.....GGG.....ProValArgGly.....
Co36GGG.....ATG.....TGG.....TCG.....GlyMetTrpSer.....
Co44CCG.....ACG.....CTT.....CAG.....ProThrLeuGln.....
Co45 (2x)ACG.....TTG.....CTG.....TGG.....ThrLeuLeuTrp.....
UB4ACG.....GTG.....GTG.....TGG.....ThrValValTrp.....
US7 (6x)GTG.....CAG.....TCG.....AAT.....ValGlnSerAsn.....

Abbildung 47: Sequenzanalyse der im Kolonie-Filterstapel-Test bzw. Screening-ELISA identifizierten, potentiell A β -spezifischen Lcn2'-Varianten. Dargestellt sind die DNA- und die korrespondierenden Aminosäuresequenzen von Wildtyp-Lcn2' und den Varianten. Die in der Bibliothek randomisierten Positionen sind magenta, das zu Serin ausgetauschte freie Cystein des natürlichen Lipocalins grün und die zur Klonierung der randomisierten Kasette verwendeten *Bst*XI-Schnittstellen gelb hervorgehoben. Cysteincodons und *Amber*-Stopcodons, die durch die gezielte Zufallsmutagenese eingeführt worden waren, sind orange bzw. blau markiert. Mit Ausnahme von Co45 aus der Selektion B (2x) und US7 aus der Selektion D (6x) traten alle sequenzierten Varianten in nur einer Kopie auf.

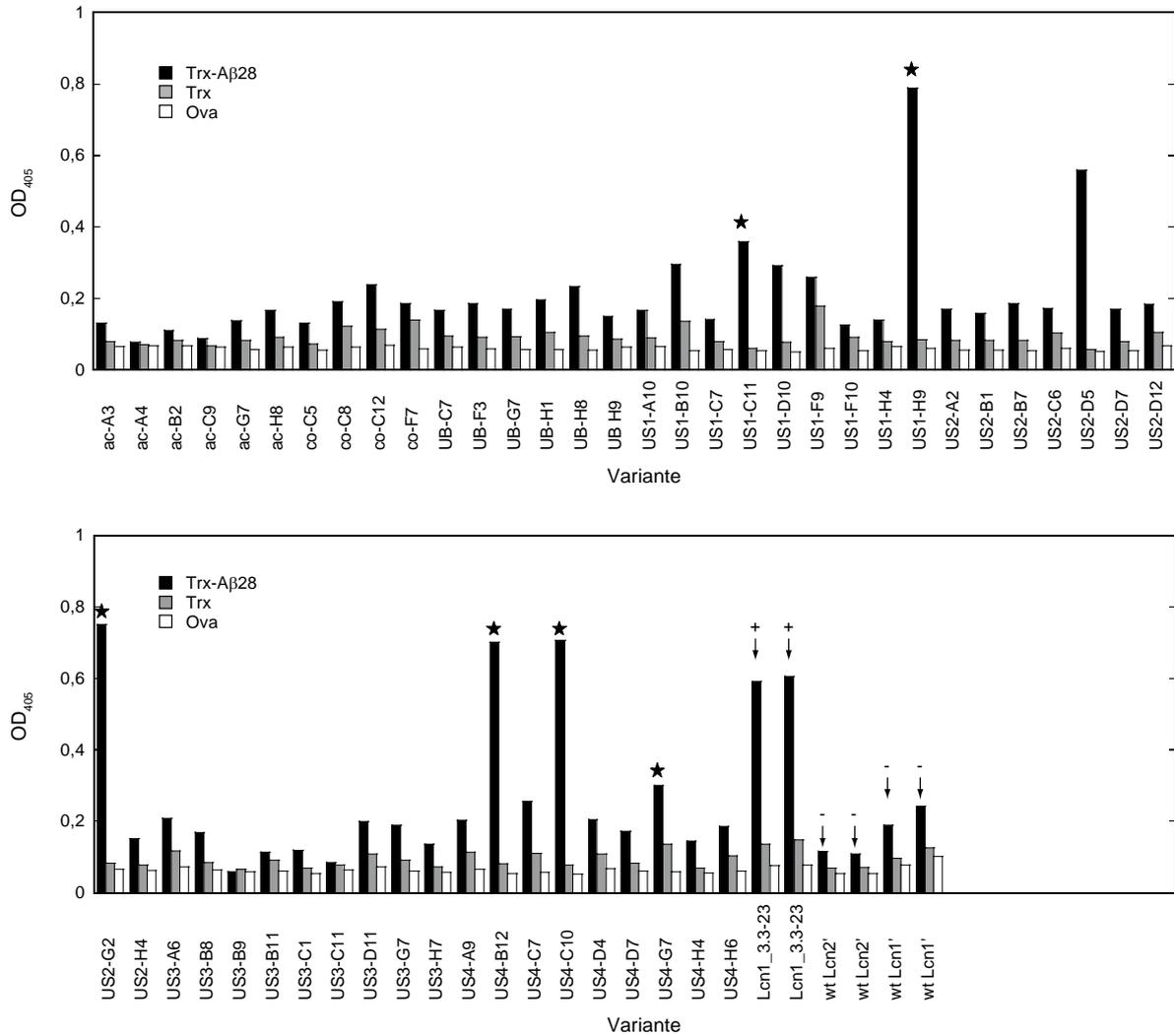


Abbildung 48: Sekundärer Screening-ELISA zur Identifizierung von A β -spezifischen Lcn2'-Varianten. Im „direkten“ ELISA-Format wurden Trx-A β ₂₈ (schwarz) und die Kontrollproteine Trx (grau) und Ova (weiß) in ELISA-Platten immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Lcn2'-Varianten, welche als Periplasmaextrakte im Mikrotiterplatten-Maßstab präpariert wurden, erfolgte über das C-terminale *Strep*-tag II. Lcn1_3.3-23 als Positivkontrolle und Wildtyp-Lcn2' sowie Wildtyp-Lcn1' als Negativkontrollen sind mit Pfeilen markiert. Mit einem Stern gekennzeichnete Varianten wurden sequenziert.

Als Alternative zum Kolonie-Filterstapel-Test wurde ein Screening-ELISA durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.6). Aus dem Pool der eluierten Phagemide nach Selektion A, B und C wurden nur wenige Varianten mit Signalen knapp über dem Hintergrund detektiert. Da die Analyse dieser Varianten im sekundären Screening-ELISA keine großen Unterschiede in den Signalen für Trx-A β ₂₈ gegenüber den Negativkontrollen Trx und Ova lieferte (Abbildung 48), wurde von einer weiteren Charakterisierung abgesehen. Im Gegensatz dazu wurden in Übereinstimmung mit den Befunden aus dem Kolonie-Filterstapel-Test nach Selektion D auch im ELISA einige starke Signale identifiziert, welche spezifisch für Trx-A β ₂₈ waren und

mitunter sogar stärkere Intensitäten als die Positivkontrolle Lcn1_3.3-23 aufwiesen. Folglich wurden die in Abbildung 48 mit Sternen markierten Varianten (US1-C11, US1-H9, US2-G2, US4-B12, US4-C10 und US4-G7) sequenziert, wobei sich zeigte, dass die vier intensivsten Signale der zuvor schon im Kolonie-Filterstapel-Test identifizierten Variante Lcn2_US7 entsprachen.

Die Sequenzanalyse von insgesamt 15 Varianten, die nach dem Kolonie-Filterstapel-Test bzw. dem Screening-ELISA ausgewählt wurden, lieferte 9 unterschiedliche Sequenzen (Abbildung 47). Hierbei kam es in Selektion D zu einer starken Anreicherung der Variante Lcn2_US7, welche insgesamt sechsmal auftrat. In 4 der anderen Varianten wurde jeweils ein *Amber*-Stopcodon detektiert. 3 Varianten trugen mindestens zwei zusätzliche Cysteinreste, weswegen von ihrer weiteren Charakterisierung abgesehen wurde. Die anderen 6 Varianten wurden exprimiert und bezüglich ihres Oligomerisierungsverhaltens und ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert (s. Abschnitt 3.5.3).

3.5.3 Produktion und Charakterisierung von potentiell A β -spezifischen Lcn2'-Varianten

Aufgrund der *Amber*-Stopcodons in einigen der selektierten Lcn2'-basierten Anticaline wurden alle Varianten zur initialen Charakterisierung zunächst in dem *Amber*-Suppressorstamm TG1-F⁻ exprimiert. Wildtyp-Lcn2' wurde dagegen in *E. coli* BL21 exprimiert, da dieser Stamm geringere Mengen des natürlichen Liganden Enterobactin produziert (Goetz *et al.*, 2002).

Die Überlagerung der Elutionsprofile der affinitätsgereinigten Varianten (Abbildung 49A) zeigt, dass die Hauptfraktionen von Lcn2_US7 und Lcn2_Co45 und ca. 20% von Lcn2_UB4 als Monomer eluieren. Lediglich die Variante Lcn2_Ac47 eluierte ausschließlich als Aggregat. Aufgrund von zu niedrigen Ausbeuten wurden die anderen Varianten aus Selektion A (Lcn2_Ac28, Lcn2_Ac30) nicht durch Größenausschlusschromatographie analysiert.

Im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie wurden die Monomerfraktionen in einem „direkten“ ELISA mit immobilisierten Trx-A β 28, bzw. Trx und Ova als Kontrollproteine, bezüglich ihrer Bindungsaktivität für A β getestet. Lcn2_UB4 und Lcn2_US7 interagierten mit Trx-A β 28, nicht aber mit den Kontrollproteinen, wohingegen keinerlei Bindungsaktivität für Lcn2_Co45 und Wildtyp-Lcn2' detektiert wurde. Die Affinitäten der beiden A β -spezifischen Anticaline waren sehr unterschiedlich, mit einer apparenten Dissoziationskonstante von $\sim 1,7 \mu\text{M}$ für Lcn2_UB4 (Abbildung 49B) und einer mehr als 100fach besseren Dissoziationskonstante von $\sim 9,6 \text{ nM}$ für Lcn2_US7 (Abbildung 49C). Aufgrund der deutlich höheren Affinität und der anderen vorteilhaften Eigenschaften, wie der höheren Expression in *E. coli*, dem besseren Elutionsverhalten in der Größenausschluss-

chromatographie und günstigeren Sequenzeigenschaften (kein zusätzliches Cystein, keine Mutationen außerhalb der randomisierten Bereiche), wurde im Folgenden die Variante Lcn2_US7 näher analysiert.

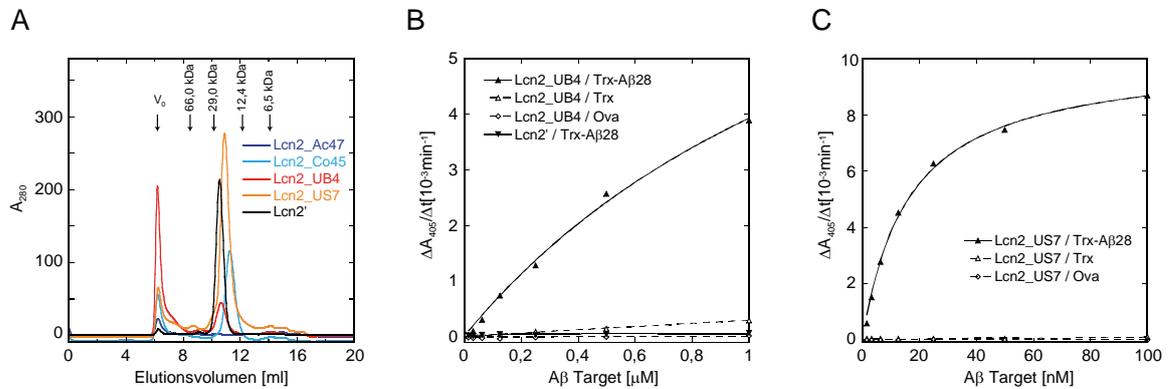


Abbildung 49: Größenausschlusschromatographie zur Analyse des Oligomerisierungsverhaltens und initiale Bindungsanalyse der Varianten Lcn2_UB4 und Lcn2_US7 im „direkten“ ELISA. (A) Die überlagerten Elutionsprofile im analytischen Maßstab (Superdex 75 HR 10/30, 24 ml Bettvolumen) zeigen, dass mit Ausnahme von Lcn2_Ac47 alle Varianten eine ausgeprägte Monomerfraktion bei ca. 21 kDa zeigen. Wildtyp-Lcn2' wies dabei eine zudem deutlich höhere Ausbeute auf. Die Pfeile deuten das Ausschlussvolumen (V_0) und die Elutionsmaxima der Eichproteine BSA (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom C (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) an. Im „direkten“ ELISA zur Analyse der Bindungsaktivität der Lcn2'-Varianten wurde spezifische Interaktion von Lcn2_UB4 (B) und Lcn2_US7 (C) mit immobilisierten Trx-A β 28 beobachtet.

Wie schon für Lcn1_3.3-23 wurden auch für die Variante Lcn2_US7 unterschiedliche Expressionsbedingungen verglichen: die Standardmethode (Induktion bei $OD_{550} = 0,5$, 22 °C, 3 h), die Expression bei erhöhter Zelldichte (Induktion bei $OD_{550} \approx 3$, 20 °C, üN) in *E. coli* JM83 sowie die Expression im 8 l-Fermenter in *E. coli* W3110. Hierbei kam es mit Ausbeuten von 1 mg/l bei der Standardexpression, 3 mg/l bei der Übernacht-Expression und 25 mg/l bei der Fermentation zu deutlichen Unterschieden in der Menge an rekombinantem Protein (Abbildung 50), was sich auch in unterschiedlichen Effizienzen bei der Proteinreinigung niederschlug.

Zur zufriedenstellenden Reinigung (>90 %) von Lcn2_US7 aus Fermenterproben waren zwei konsekutive Streptavidin-Affinitätschromatographien erforderlich (Abbildung 50B). Zwei schwache, niedermolekulare Banden konnten allerdings auch hierbei sowie durch darauffolgende Größenausschlusschromatographie nicht abgetrennt werden. Interessanterweise waren diese beiden Banden in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht nachweisbar, was darauf schließen ließ, dass sie einer proteolytisch gespaltenen Form von Lcn2_US7 entsprachen. Diese war vermutlich über die native Disulfidbrücke kovalent

verknüpft und überlagerte daher in der Größenausschlusschromatographie und im SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen mit dem intakten Anticalin.

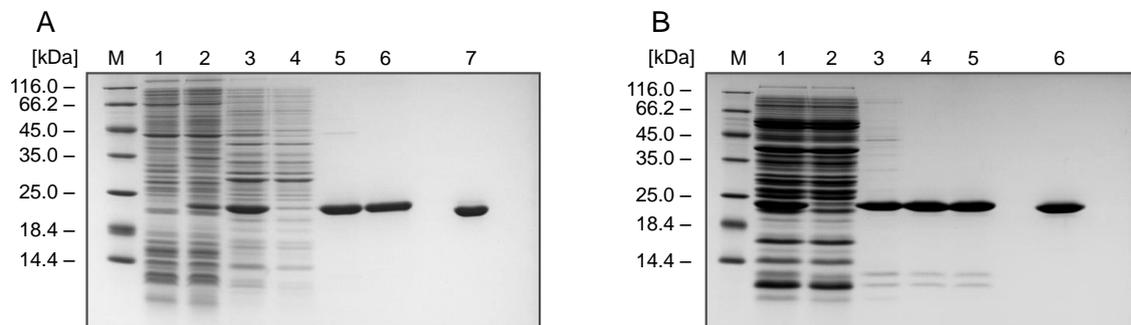


Abbildung 50: SDS-PAGE-Analyse der Expression und Reinigung von Lcn2_US7 unter Verwendung unterschiedlicher Expressionsmethoden. (A) Reinigung nach Expression unter Standardbedingungen: 1) *E. coli* Gesamtzellextrakt vor Induktion der Genexpression; 2) Gesamtzellextrakt bei Ernte; 3) Periplasmaextrakt; 4) Durchlauf der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 5) Elution der Streptavidin-Affinitätschromatographie; 6) Monomer-Peak der Größenausschlusschromatographie, 7) wie 6 unter nicht reduzierenden Bedingungen. (B) Reinigung nach der Proteinproduktion im Fermenter. Zur effektiven Reinigung mussten hier zwei konsekutive Streptavidin-Affinitätschromatographien durchgeführt werden; 1) Periplasmaextrakt; 2) Durchlauf der ersten Streptavidin-Affinitätschromatographie; 3) Elution der ersten Streptavidin-Affinitätschromatographie; 4) Elution der zweiten Streptavidin-Affinitätschromatographie; 5) Monomer-Peak der Größenausschlusschromatographie, 6) wie 5 unter nicht reduzierenden Bedingungen.

Ein ähnliches Bandenmuster mit einer Hauptbande und zwei proteolytischen Fragmenten im SDS-PAGE wurde bereits für das BBP detektiert (Beste, 1998). Durch N-terminale Sequenzierung wurde in diesem Fall die Aminosäuresequenz der Fragmente ermittelt und die Proteaseschnittstelle zwischen den beiden basischen Resten His86 und Lys87 lokalisiert, was die Protease OmpT mit ihrer bevorzugten Spaltung zwischen zwei aufeinanderfolgenden basischen Resten als Verursacher wahrscheinlich machte. Trotz der zahlreichen basischen Aminosäuren in Lcn2_US7 konnte kein vergleichbares Sequenzmotiv an passender Stelle identifiziert werden, weswegen höchstwahrscheinlich eine andere, möglicherweise konformationsspezifische Protease für die Spaltung dieses Anticalins verantwortlich ist.

Durch Konzentrierung der Proteinproben aus den Expressionsversuchen im 2 l-Schüttelkolben, welche zunächst rein erschienen, wurde das proteolytische Bandenmuster ebenfalls, jedoch in abgeschwächter Form, sichtbar (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Strategien zur Vermeidung der Proteolyse bzw. Entfernung dieser Fragmente verfolgt. Durch Zugabe des Proteaseinhibitors Benzamidin in den finalen Periplasmaextrakt konnte das Auftreten der proteolytischen Fragmente nicht verhindert werden, was andeutete, dass die proteolytische Prozessierung bereits während der Expression bzw. im Verlauf der

Präparation des Periplasmaextrakts erfolgte. Der Versuch, das Anticalin in dem Protease-defizienten *E. coli*-Stamm HM125 (Meerman & Georgiou, 1994) zu produzieren, scheiterte an der starken Lysetendenz der transformierten Zellen und einer unzureichenden Proteinausbeute. In einem letzten Ansatz wurde versucht, die beiden proteolytischen Fragmente durch Größenausschlusschromatographie unter Zugabe von DTT oder durch Ionenaustauschchromatographie abzutrennen, was ebenfalls erfolglos blieb.

Aufgrund des reduzierten Anteils der proteolytischen Fragmente nach Expression im 2 l-Schüttelkolben, wurden hauptsächlich diese Proteinpreparationen für die nachfolgenden Experimente verwendet.

3.5.4 Funktionelle Charakterisierung der A β -spezifischen Variante Lcn2_US7

3.5.4.1 Analyse der Bindung von A β -Targets mittels Größenausschlusschromatographie

Zur Analyse der Bindungsaktivität von Lcn2_US7 für die in dieser Arbeit verwendeten A β -Peptide bzw. A β -Fusionsproteine wurden verschiedene Experimente durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde die Interaktion zwischen Lcn2_US7 und Trx-A β 28, MBP-A β 40 bzw. A β 40 mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Hierfür wurden die durch präparative Größenausschlusschromatographie individuell gereinigten Proteine in äquimolaren Verhältnissen gemischt, für 1 h bei RT inkubiert und dann auf einer analytischen S75-Chromatographiesäule analysiert.

In früheren Reinigungsexperimenten mit Lcn2_US7 auf dieser Säule wurde beobachtet, dass das Protein in PBS bei einer Salzkonzentration von 115 mM NaCl eine Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial zeigte, was zu einer leicht verzögerten Elution und auch zu verringerten Ausbeuten an so gereinigtem rekombinanten Protein führte (nicht gezeigt). Um diese Interaktion mit dem Säulenmaterial zu verhindern, wurden die hier beschriebenen Experimente zur Analyse der Komplexbildung unter erhöhter Salzkonzentration in PBS mit 500 mM NaCl durchgeführt.

Abbildung 51 dokumentiert die Koelution von Lcn2_US7 mit den A β -Versionen Trx-A β 28 (A), MBP-A β 40 (C) und A β 40 (E) in der Größenausschlusschromatographie. Die Komplexe mit dem Anticalin eluierten jeweils als Hauptfraktion bei deutlich kleineren Volumina als die Einzelproteine. Im Gegensatz dazu eluierten die äquimolaren Mischungen aus dem Anticalin und den Kontrollproteinen Trx (B) und MBP (D) in zwei separaten Fraktionen mit Volumina entsprechend der Einzelproteine. Die neben der Hauptfraktion detektierte zweite Elutionsfraktion in der Probe des US7•Trx-A β 28-Komplexes (Abbildung 51A, durchgezogene Linie) mit einem Elutionsvolumen gemäß Trx-A β 28, entsprach höchstwahrscheinlich überschüssigem Bindungspartner. Die beiden zusätzlichen Elutionsfraktionen in Abbildung 51C (durchgezogene Linie) bei Volumina entsprechend MBP-A β 40 und Lcn2_US7 wiesen

dagegen darauf hin, dass die Komplexbildung in diesem Fall nicht vollständig abgelaufen war. Die geringfügig niedrigere Affinität von Lcn2_US7 für MBP-A β 40 im Vergleich zu den anderen A β -Versionen (s. Abschnitt 3.5.4.2) könnte eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sein.

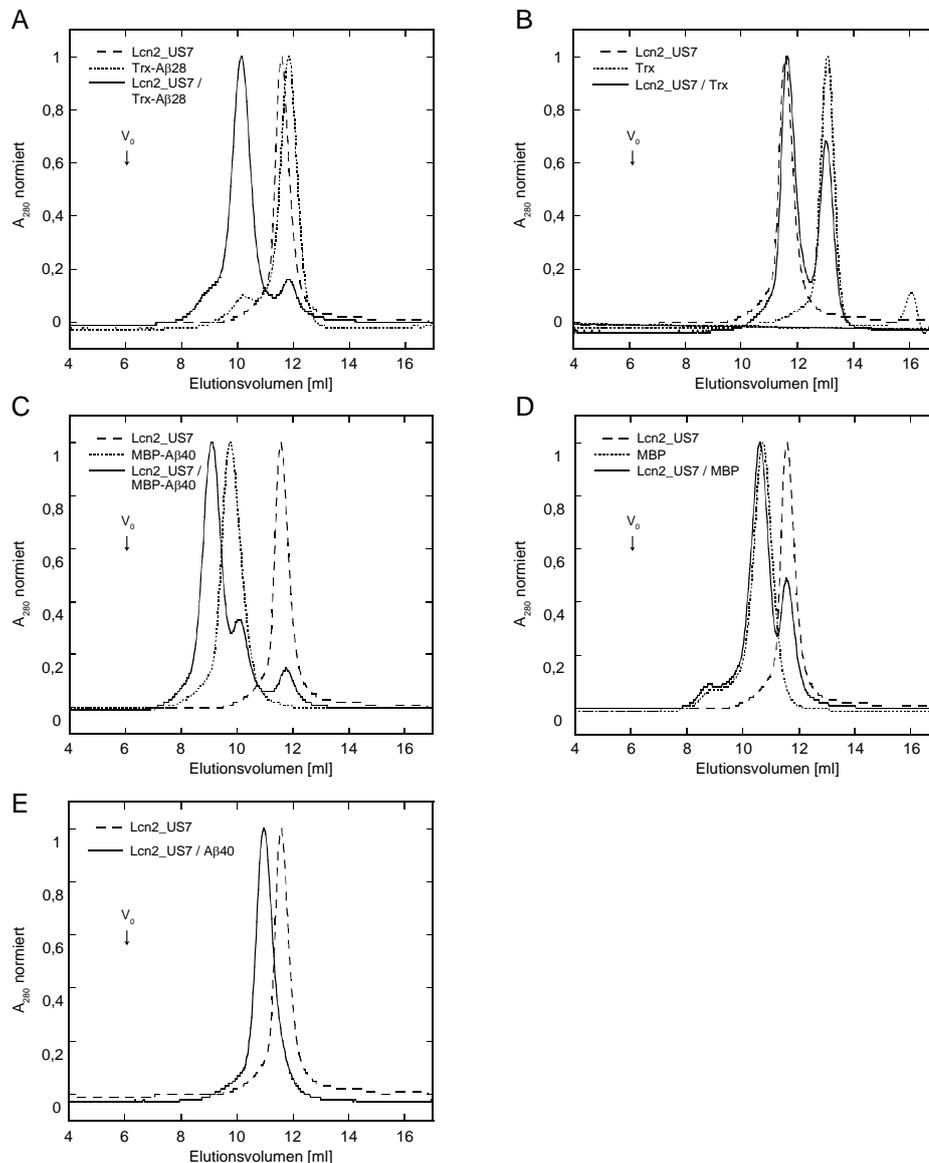


Abbildung 51: Größenausschlusschromatographie zur Analyse der Komplexbildung von Lcn2_US7 und verschiedenen Versionen von A β bzw. Kontrollproteinen. Lcn2_US7 und die zu analysierenden Proteine wurden in äquimolaren Verhältnissen inkubiert und anschließend auf eine S75 HR 10/30 Säule (24 ml Bettvolumen) in Gegenwart von PBS mit 500 mM NaCl analysiert. Als Referenz wurden parallel alle Proteine auch einzeln analysiert. Lcn2_US7 eluierte als Komplex mit A β ; (A) Trx-A β 28, (C) MBP-A β 40 und (E) A β 40. Im Gegensatz dazu wurden die Kontrollproteine (B) Trx und (D) MBP nicht gebunden, was zur Elution als Doppel-Peak bei Volumina entsprechend den Größen der Einzelproteine führte. Der Pfeil deutet das Ausschlussvolumen (V_0) an.

3.5.4.2 Bestimmung der Affinität von Lcn2_US7 mittels ELISA

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen Lcn2_US7 und den verwendeten A β -Versionen wurden ELISA-Experimente in unterschiedlichen Formaten durchgeführt. In einem ersten Ansatz wurden Trx-A β 28, Trx, MBP-A β 40 und MBP direkt in der ELISA-Platte immobilisiert, wobei die spezifische Bindung von Lcn2_US7 an die A β -Fusionsproteine, nicht aber an die Kontrollproteine beobachtet wurde (Abbildung 52). Mit Dissoziationskonstanten von ca. 10 nM bzw. 50 nM (Tabelle 9) unterschieden sich die Affinitäten für Trx-A β 28 und MBP-A β 40 um einen Faktor 5. Zusätzlich führte die Wechselwirkung zwischen Lcn2_US7 und MBP-A β 40 im Vergleich zu Trx-A β 28 zu einem deutlich niedrigeren Bindungssignal, was durch schlechtere Zugänglichkeit des A β -Epitops als Folge der ungerichteten Immobilisierung des Fusionsproteins in der ELISA-Platte in Kombination mit der gesteigerten Molekülgröße von MBP erklärt werden kann

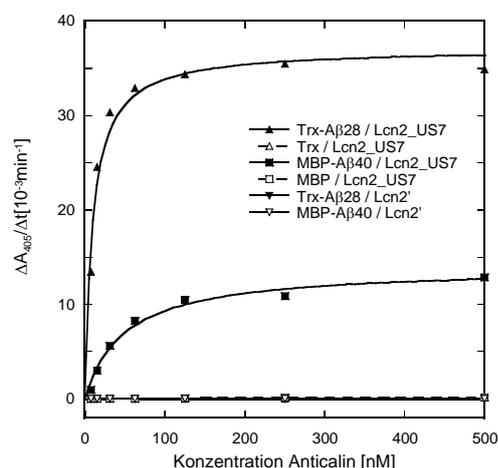


Abbildung 52: ELISA zur Analyse der Bindung von Lcn2_US7 an Trx-A β 28 und MBP-A β 40. Die A β -Fusionsproteine und die Kontrollproteine Trx und MBP wurden in Konzentrationen von 2 μ M direkt in der ELISA-Platte immobilisiert. Nach Blockierung mit 3 % (w/v) BSA wurde die ELISA-Platte mit Verdünnungsreihen von Lcn2_US7 und Wildtyp-Lcn2' als Negativkontrolle inkubiert und gebundene Anticaline über das System *Streptag II*/Streptavidin-AP nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration an Anticalin aufgetragen und die Messdaten mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph nach Gleichung (7) angepasst.

In „Capture“-ELISA-Experimenten, bei denen *StrepMAB*-Immo als Fangantikörper diente (Abbildung 53), wurden neben der Bindung an die biotinylierten Fusionsproteine MBP-A β 40-Bio (B) und Trx-A β 28-Bio (C) auch die Interaktion mit den Peptiden A β 40-Bio (A), A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio (D) analysiert. Mit Ausnahme von biotinyliertem A β (1-11) zeigte Lcn2_US7 Bindung an alle getesteten A β -Versionen mit Dissoziationskonstanten im einstellig bis niedrig zweistellig nanomolaren Bereich (Tabelle 9). Die biotinylierten

Kontrollproteine MBP, Ova und Trx wurden dagegen nicht gebunden. Wiederholt war die für MBP-A β 40 bestimmte Affinität am niedrigsten, allerdings waren die Dissoziationskonstanten für die Bindung von MBP-A β 40 und Trx-A β 28 im Vergleich zum „direkten“ ELISA insgesamt verbessert. Durch gerichtete Immobilisierung des Anticalins mittels *StrepMAB*-Immo lagen in diesem ELISA-Format beide Bindungspartner in nativer Konformation vor, was höchstwahrscheinlich zu den verbesserten Bindungssignalen führte.

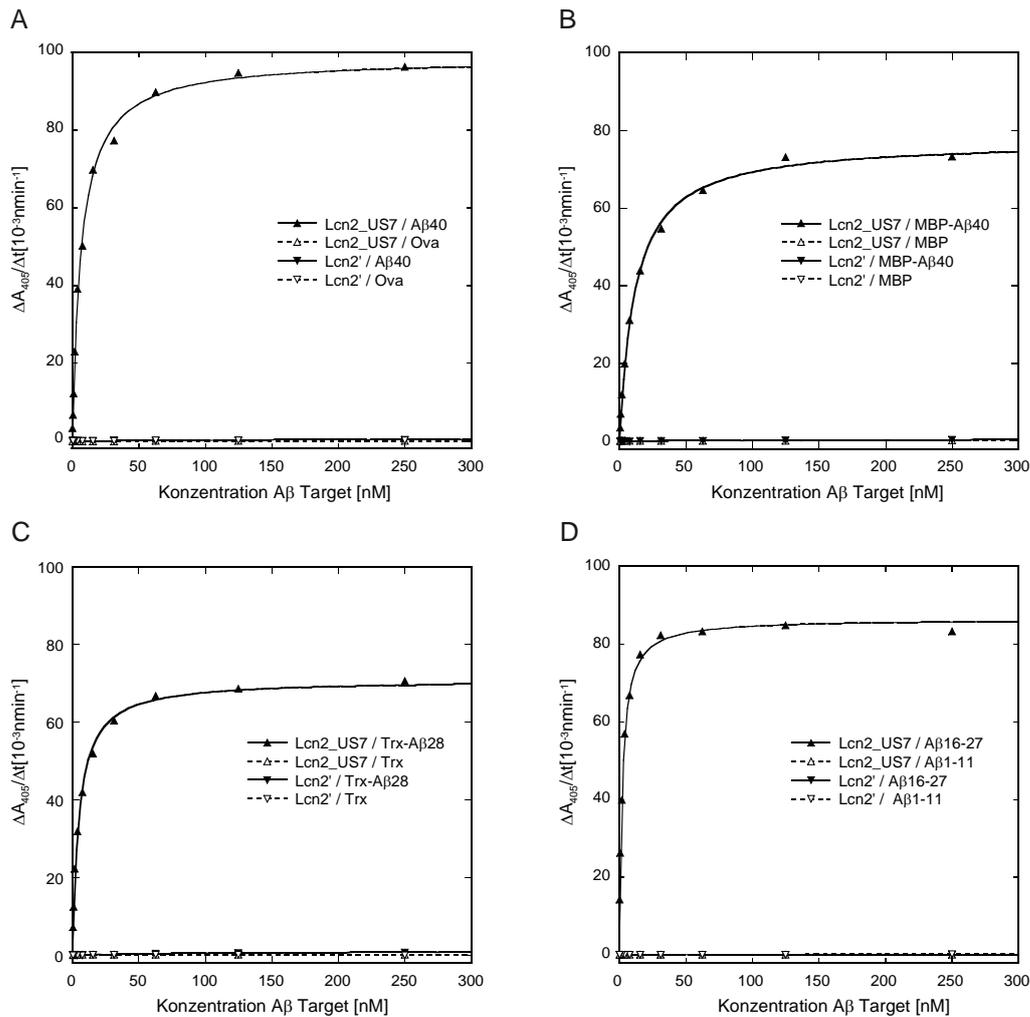


Abbildung 53: „Capture“-ELISA zur Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Interaktion von Lcn2_US7 mit A β 40-Bio (A), MBP-A β 40-Bio (B), Trx-A β 28-Bio (C) und A β (16-27)-Bio (D). Mittels *StrepMAB*-Immo immobilisierte Lcn2'-Varianten wurden bezüglich ihrer Bindung an die biotinylierten A β -Moleküle und Kontrollproteine getestet. Die Detektion der gebundenen biotinylierten Peptide/Proteine erfolgte durch ein ExtrAvidin-AP-Konjugat gefolgt von einer chromogenen Reaktion mit pNPP. Bei ausbleibenden Bindungssignalen gegenüber den biotinylierten Kontrollen und A β (1-11)-Bio konnte Wechselwirkung von Lcn2_US7 mit allen weiteren A β -Moleküle mit ein- bis zweistellig nanomolaren Affinitäten gezeigt werden (K_D -Werte siehe Tabelle 9). Wildtyp-Lcn2' zeigte keine Bindung an die getesteten Proteine.

Trotz Verwendung des Fusionsproteins Trx-A β 28 in der *Phage Display*-Selektion wurde das Peptid A β 40 mit einer vergleichbar guten Dissoziationskonstante gebunden. Da A β 40 sowie dessen längere Version A β 42 die relevanten Zielmoleküle für die in dieser Arbeit generierten Anticline darstellen, war dieses positive ELISA-Ergebnis mit A β 40 für die weiteren Experimente mit Lcn2_US7 entscheidend. Mit Hilfe der kurzen Peptide A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio konnte darüber hinaus das von Lcn2_US7 erkannte Epitop auf den zentralen Bereich des A β -Peptids eingegrenzt werden. Die exakte Bestimmung der für die Bindung relevanten A β 40-Positionen erfolgte im weiteren Verlauf durch Epitop-Mapping mit der SPOT-Methode (s. Abschnitt 3.5.4.4).

In einem dritten Ansatz wurden biotinyliertes sowie unmarkiertes Trx-A β 28 in einem kompetitiven ELISA im „Capture“-Format eingesetzt (Abbildung 54). Hierbei wurde Trx-A β 28-Bio bei einer konstanten Konzentration von 40 nM entsprechend dem halbmaximalen Signal im beschriebenen „Capture“-ELISA eingesetzt. Eine Verdünnungsreihe an nicht markiertem Trx-A β 28 wurde bei einer 100fach höheren Konzentration begonnen. Durch Auftragen der Signalintensität gegen die Konzentration an Trx-A β 28 (halblogarithmisch) wurde eine typische sigmoidale Kurve erhalten. Die Anpassung dieser Kurve nach Gleichung (8) lieferte eine EC_{50} von $69,7 \pm 3,4$ nM. Durch Anwendung der Gleichung von Cheng & Prusoff (1973) (9) unter Verwendung der Dissoziationskonstante aus dem „Capture“-ELISA ($K_D^* = 4,95 \pm 0,26$ nM) wurde die Affinitätskonstante K_D zu $7,68 \pm 0,52$ nM bestimmt.

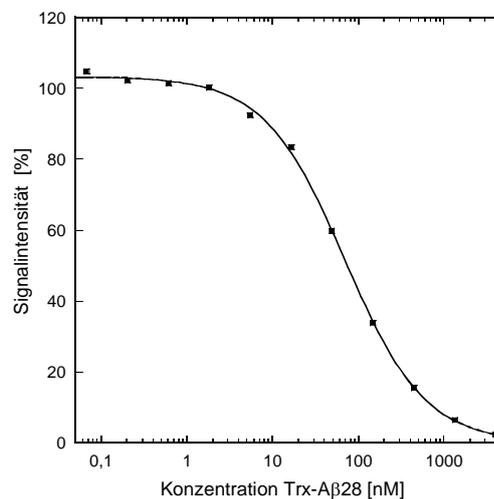


Abbildung 54: Kompetitiver ELISA zur Untersuchung der Bindung von Lcn2_US7 an Trx-A β 28. Wie im „Capture“-ELISA wurde Lcn2_US7 in einer Konzentration von 1 μ M mittels *StrepMAB*-Immo immobilisiert. Im Anschluss an den Blockierungsschritt wurden die Vertiefungen mit einer Mischung aus 40 nM Trx-A β 28-Bio und einer Verdünnungsreihe an nicht markiertem Trx-A β 28 inkubiert. Gebundenes Trx-A β 28-Bio wurde durch ExtrAvidin-AP anhand der chromogenen Reaktion mit pNPP nachgewiesen. Das prozentuale Signal wurde gegen die Konzentration an Trx-A β 28 halblogarithmisch aufgetragen und die Messdaten mit Hilfe des Computerprogramms KaleidaGraph nach der sigmoidalen Gleichung (8) angepasst.

Die in den beschriebenen ELISA-Experimenten bestimmten Dissoziationskonstanten für die Interaktion zwischen Lcn_US7 und den unterschiedlichen A β -Versionen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

ELISA	direkt		"Capture"				kompetitiv
	MBP-A β 40	Trx-A β 28	A β 40	MBP-A β 40	Trx-A β 28	A β 16-27	Trx-A β 28
K_D [nM]	49,7 \pm 8,1	9,6 \pm 1,7	6,77 \pm 0,37	11,76 \pm 0,55	4,95 \pm 0,26	2,20 \pm 0,10	7,68 \pm 0,52

Tabelle 9: Übersicht der Dissoziationskonstanten für die Interaktion von Lcn2_US7 mit den verwendeten A β -Versionen in unterschiedlichen ELISA-Formaten.

3.5.4.3 Bestimmung der Bindungskinetik von Lcn2_US7 mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Zur Bestimmung der Kinetik der Interaktion zwischen Lcn2_US7 und MBP-A β 40 bzw. A β 40 wurde Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie durchgeführt. Hierbei wurde jeweils das A β -Molekül durch Amin-Kopplung mittels NHS/EDC-Chemie kovalent auf dem Sensorchip immobilisiert bevor Lcn2_US7 bzw. Wildtyp-Lcn2' (als Negativkontrolle) über die Chip-Oberfläche geleitet wurden. Dabei wurden Verdünnungsreihen von Lcn2_US7 injiziert und die Assoziation für jeweils 300 s und die Dissoziation für 600 s oder 900 s verfolgt (Abbildung 55).

Aus den Messungen am BIACORE X-Instrument (Abbildung 55A, B) wurden recht ähnliche Dissoziationskonstanten von 1,86 nM und 1,16 nM für die Interaktion mit MBP-A β 40 und A β 40 bestimmt. Die Messung am BIACORE T100-Instrument lieferte dagegen eine um den Faktor 5 verbesserte Dissoziationskonstante für die Interaktion mit A β 40 ($K_D = 0,223$ nM), was auf eine erhöhte Assoziationsgeschwindigkeit von Lcn2_US7 in dieser Messung zurückzuführen war. Die verschiedenen Assoziations- und Dissoziationsraten und die daraus berechneten Werte für die Dissoziationskonstante K_D und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ sind in Tabelle 10 angegeben. Wildtyp-Lcn2' zeigte keine Interaktion mit den beiden beladenen Chip-Oberflächen. Wie auch in den ELISAs wurde keine Wechselwirkung zwischen Lcn2_US7 und auf dem Chip immobilisiertem MBP detektiert (nicht gezeigt).

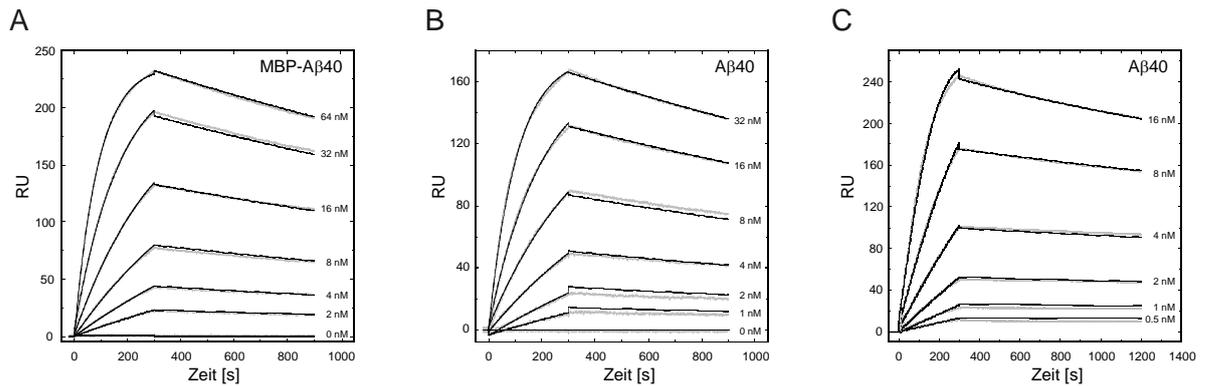


Abbildung 55: Bestimmung der Bindungskinetik zwischen Lcn2_US7 und MBP-Aβ40 bzw. Aβ40 mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. (A) Das rekombinante Fusionsprotein MBP-Aβ40 wurde durch Amin-Kopplung kovalent auf der Carboxymethyl-Dextran-Oberfläche des Sensor-Chips immobilisiert (~1100 RU) und das Anticalin in Konzentrationen von 2 bis 64 nM mit einer Flussrate von 20 μl/min appliziert (Biacore X). Die Interaktion mit dem synthetischen Aβ40-Peptid wurde am Biacore X- (B) und am Biacore T100-Instrument (C) analysiert. Für die Messung am Biacore X-Instrument wurde Aβ40 mit 388 RU kovalent auf dem Chip immobilisiert und das Anticalin in Konzentrationen von 1 bis 32 nM mit einer Flussrate von 20 μl/min injiziert. Für die Messung am Biacore T100-Instrument wurde Aβ40 mit 325 RU kovalent auf dem Chip immobilisiert und das Anticalin in Konzentrationen von 0,5 bis 16 nM mit einer Flussrate von 30 μl/min appliziert. Die Bindungsdaten wurden doppelt korrigiert (s. Abschnitt 2.7.4) und entsprechend einem 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir global angepasst. Graue Linien entsprechen den gemessenen (korrigierten) Bindungssignalen, schwarze Linien den jeweils angepassten Kurven. Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

	k_{on} [$10^5 M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [$10^{-4} s^{-1}$]	K_D [nM]	$t_{1/2}$ [min]
MBP-Aβ40 (Biacore X)	$1,71 \pm 0,001$	$3,18 \pm 0,02$	1,86	36
Aβ40 (Biacore X)	$2,86 \pm 0,005$	$3,32 \pm 0,01$	1,16	35
Aβ40 (Biacore T100)	$10,80 \pm 0,03$	$2,41 \pm 0,05$	0,223	48

Tabelle 10: Kinetische Parameter der Interaktion von Lcn2_US7 mit MBP-Aβ40 und Aβ40 gemäß Abbildung 55.

3.5.4.4 Bestimmung des Epitops von Lcn2_US7 im SPOT Assay

Zur Identifizierung der für die Bindung von Lcn2_US7 relevanten Aminosäuren im Aβ-Peptid wurde ein Epitop-Mapping mit der SPOT-Methode durchgeführt (Frank, 2002). Hierfür wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben die gesamte Aβ40-Sequenz in um jeweils eine Aminosäure versetzten Hexamer-, Dekamer- und Pentadekamer-Peptiden auf der Membran synthetisiert. Als Positivkontrolle diente das *Strep*-tag II, dessen Sequenz an 3 unterschiedlichen Positionen synthetisiert wurde. Nach Blockierung mit BSA wurde die Membran mit Lcn2_US7 bzw. Wildtyp-Lcn2' oder lediglich Streptavidin-AP (als Negativ-

kontrollen) inkubiert. Gebundene Anticaline wurden anhand des *Strep*-tag II detektiert. Durch Vergleich der Signale auf den drei in Abbildung 56 dargestellten Membranen konnten Positionen identifiziert werden, welche ausschließlich auf der mit Lcn2_US7 inkubierten Membran (A) nicht jedoch auf den Kontrollmembranen (B, C) intensive Farbsignale aufwiesen.

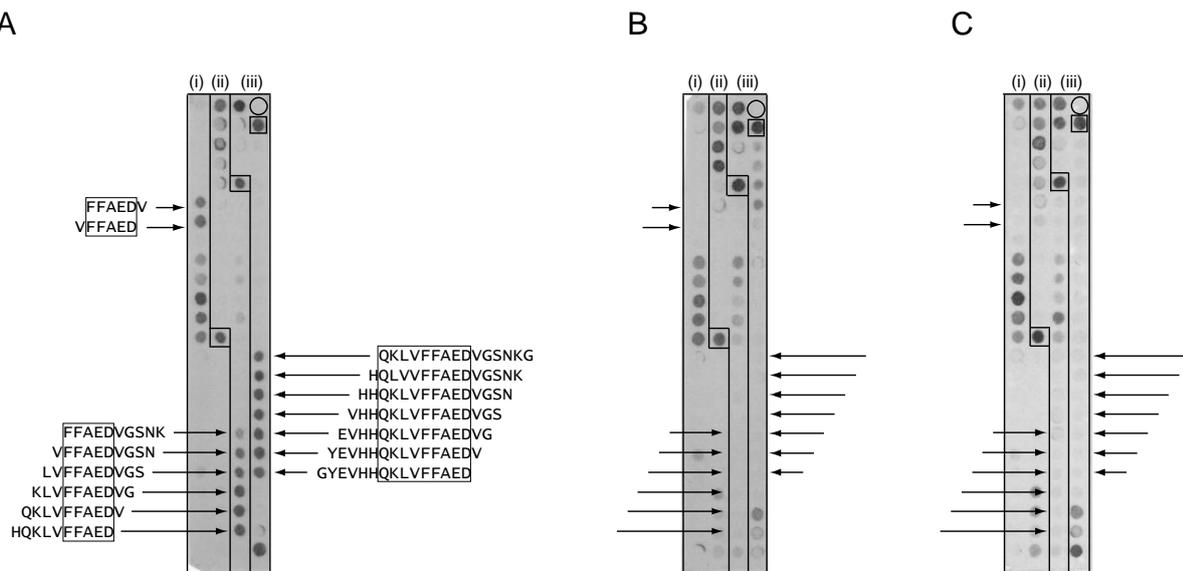


Abbildung 56: Epitope-Mapping zur Bestimmung des Epitops von Lcn2_US7. Die, die A β 40-Sequenz umfassenden, auf der Membran synthetisierten und um jeweils eine Aminosäure versetzten Hexamer-, Dekamer- und Pentadekamer-Peptide sind mit (i), (ii) bzw. (iii) bezeichnet. Die Sequenz des *Strep*-tag II wurde als Positivkontrolle immobilisiert (Kästen), als Negativkontrolle wurde eine Position leer gelassen (Kreis). Im Anschluss an den Blockierungsschritt wurden die Membranen mit 100 nM Lcn2_US7 (A), 100 nM Wildtyp-Lcn2' (B) bzw. Streptavidin-AP ohne vorhergehende Inkubation mit einem Anticalin (C) inkubiert. Gebundene Anticaline wurden anhand des *Strep*-tag II mit Streptavidin-AP sowie chromogener Reaktion mit BCIP und NBT detektiert. Der Vergleich der Membran für Lcn2_US7 (A) mit den Kontrollmembranen (B, C) zeigte deutliche Signale, die ausschließlich nach Inkubation der Membran mit der A β -spezifischen Lcn2'-Variante auftraten. Das Alignment dieser Signale lieferte das von Lcn2_US7 erkannte minimale Epitop.

Ein Alignment der Sequenzen der entsprechenden Hexamer- und Dekamerpeptide deutete auf die zentrale A β 40-Sequenz FFAED (P19-P23) als das minimale Epitop, das von Lcn2_US7 erkannt wird. Die analoge Analyse der Pentadekamerpeptide lieferte dagegen mit QKLVFFAED (P15-P23) ein deutlich längeres Peptid. Eingeschränkte Zugänglichkeit der FFAED-Sequenz in den 15mer Peptiden durch Bildung von Sekundärstrukturen könnte ein möglicher Grund für dieses abweichende Ergebnis sein. Dabei kann beispielsweise Glutamin an Position 15 für die Bindung keine allzu wichtige Rolle spielen, da diese Aminosäure in dem im „Capture“-ELISA erfolgreich eingesetzten Peptid A β (16-28)-Bio nicht enthalten ist.

Wie erwartet, wurde das *Strep*-tag II als Positivkontrolle für den Nachweis mit Streptavidin-AP auf allen Membranen identifiziert. Zusätzlich zu diesen Signalen wurden allerdings weitere Spots auf allen Membranen, d.h. auch auf den Kontrollmembranen, detektiert. Die Analyse der entsprechenden Peptide lieferte überwiegend Sequenzen mit dem Motiv HHQ, welches aufgrund der Ähnlichkeit zur zentralen HPQ-Sequenz des *Strep*-tag II (WSHPQFEK) möglicherweise für eine Bindung von Streptavidin ausreichend ist.

Mit Hilfe der beschriebenen SPOT-Membranen wurde somit nach Subtraktion der Signale der Kontrollmembranen die zentrale A β -Sequenz FFAED als Minimalepitop von Lcn2_US7 eingengt. Auf die wichtige Rolle dieses Sequenzabschnitts im Zusammenhang mit der Aggregation von A β -Peptiden sowie familiären Formen der Alzheimer-Krankheit soll in der Diskussion genauer eingegangen werden (s. Abschnitt 4.3).

3.5.4.5 Analyse der Inhibierung der A β 40-Aggregation im Thioflavin T Assay

Neben spezifischer Erkennung und hoher Affinität für das Zielmolekül ist die funktionelle Aktivität für eine spätere therapeutische Anwendung von größter Bedeutung. Die Funktion von Lcn2_US7 wurde daher in einem Aggregationsassay, in dem die A β 40-Aggregation mit dem kationischen Benzothiazolfarbstoff Thioflavin T (ThT) verfolgt wird, untersucht. ThT interkaliert in die von A β 40 gebildeten Fibrillen und ändert dabei seine Fluoreszenzeigenschaften (LeVine, 1993). Durch Auftragen der ThT-Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Alter einer frisch angesetzten Lösung des A β 40-Peptids wurde ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt von Lcn2_US7 auf die A β -Aggregation beobachtet (Abbildung 57).

Während stöchiometrische Mengen an Lcn2_US7 (100:100) die Aggregation von A β 40 komplett inhibierten, wurde nach Zugabe von subäquimolaren Mengen bis zu einem Verhältnis von 20:100 noch eine signifikante Verzögerung der Aggregation detektiert. Im Gegensatz dazu hatten äquimolare Mengen der Kontrollproteine Wildtyp-Lcn2' und BSA keinerlei inhibitorischen Effekt auf die A β -Aggregation (Abbildung 57B). Im Gegenteil, Zugabe von BSA führte sogar zu einem etwas steileren Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit zu einer leicht erhöhten Aggregationsgeschwindigkeit. Das im Vergleich zu A β 40 erhöhte Endsignal der Mischung aus Lcn2_US7 und A β 40 in einem Verhältnis von 20:100 wies auf eine erhöhte Konzentration an Fibrillen hin. Eine durch Temperatur und Scherkräfte induzierte partielle Denaturierung von Lcn2_US7 in Kombination mit der daraus resultierenden Freilegung von hydrophoben Bereichen könnte dabei zum Einbau der Anticalin-Moleküle in die A β -Fibrillen geführt haben.

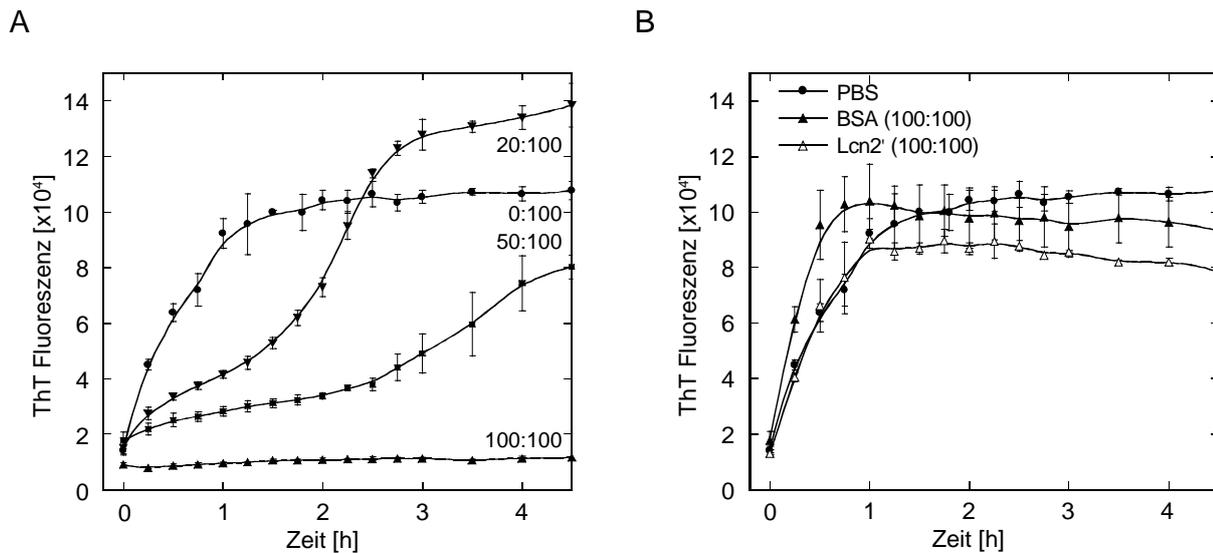


Abbildung 57: ThT-Assay zur Analyse der Inhibierung der A β 40-Aggregation durch Lcn2_US7. „Monomeres“ A β 40 (s. Abschnitt 2.5.6) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml mit verschiedenen molaren Verhältnissen mit Lcn2_US7 (A), mit äquimolaren Konzentrationen der Kontrollproteine Wildtyp-Lcn2' bzw. BSA (B) oder ohne Proteinzugabe (A, B) bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Zur Analyse der Fluoreszenz wurden in periodischen Abständen Proben von 20 μ l entnommen, mit 180 μ l ThT-Stammlösung zu einer ThT-Endkonzentration von 50 μ M gemischt und bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 482 nm vermessen. Die Kurven entsprechen den Mittelwerten von drei unabhängigen Aggregationsexperimenten, dargestellt mit der jeweiligen Standardabweichung. (Daten mit freundlicher Genehmigung von Dominik Hinz)

3.5.5 Stabilitätsanalyse von Lcn2_US7 durch CD-Spektroskopie

Zur Stabilitätsanalyse von Lcn2_US7 und Wildtyp-Lcn2' wurden wie bereits für Lcn1_3.3-23 beschrieben (s. Abschnitt 3.3.6.2) die Schmelztemperaturen durch CD-Spektroskopie bestimmt. Aufgrund der irreversiblen Denaturierung der Lcn2'-Varianten waren die Analyse der Renaturierung und die thermodynamische Evaluierung dabei allerdings nicht möglich.

Durch Auftragen des CD-Signals gegen die Temperatur wurden typische Entfaltungskurven mit einem einstufigen Übergang und einer hohen Kooperativität im Denaturierungsbereich erhalten (Abbildung 58). Wildtyp-Lcn2' wies mit einer Schmelztemperatur von $78,2 \pm 0,2$ °C eine ausgeprägte thermische Stabilität auf. Der Austausch von 17 Aminosäuren in der A β -spezifischen Variante Lcn2_US7 führte jedoch zu einer Destabilisierung um ca. 19 °C ($59,6 \pm 0,1$ °C), wobei die hohe Kooperativität der Entfaltung erhalten blieb.

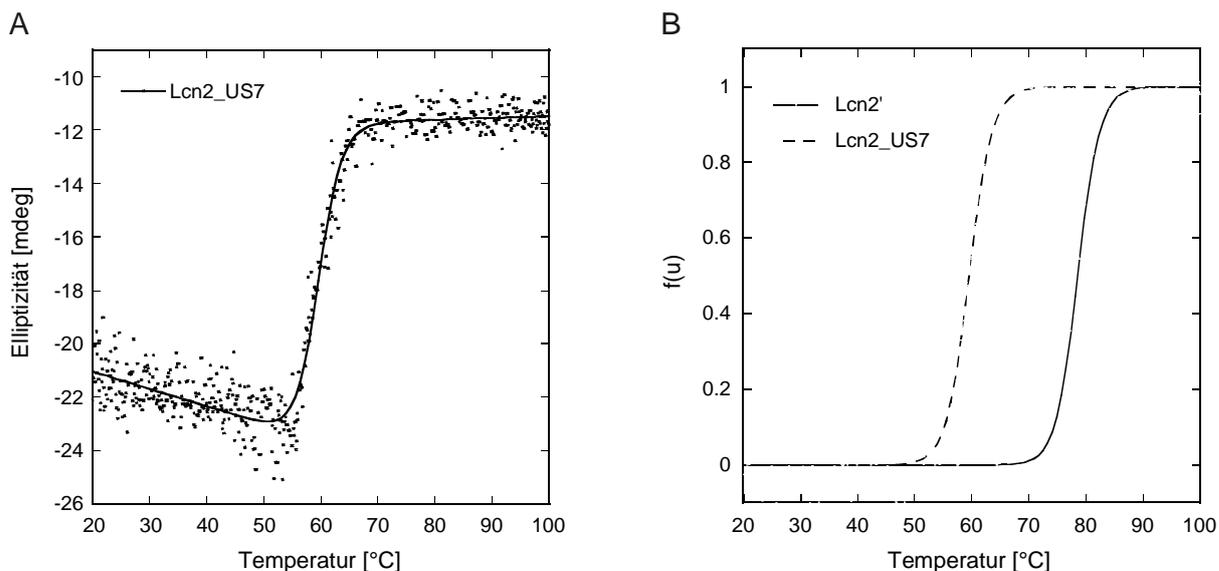


Abbildung 58: Analyse der thermischen Stabilität von Lcn2_US7 und Wildtyp-Lcn2' mittels CD-Spektroskopie. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m wurde die Elliptizität der Anticaline (25 μM in CD-Puffer) bei einer Wellenlänge von 210 nm in einem Temperaturbereich von 20 bis 98 $^{\circ}\text{C}$ aufgezeichnet. (A) Entfaltungskurve von Lcn2_US7. Die gemessenen Elliptizitätswerte wurden gegen die Temperatur aufgetragen und die Denaturierungskurve entsprechend einem Zwei-Zustandsmodell gemäß Gleichung (19) angepasst. (B) Zum besseren Vergleich der Denaturierungsübergänge wurden die Entfaltungskurven von Lcn2_US7 und Wildtyp-Lcn2' nach Gleichung (14) auf den Anteil des ungefalteten Proteins $f(u)$ skaliert und die so erhaltenen normierten Kurven nach Gleichung (20) angepasst.

3.6 Röntgenstrukturanalyse von Lcn2_US7 im Komplex mit A β 40

3.6.1 Kristallisation von Lcn2_US7 im Komplex mit A β 40

Zur strukturellen Analyse des Bindungsmechanismus von Lcn2_US7 wurde das Anticalin mit dem A β 40-Peptid kokristallisiert. Hierfür wurde durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigtes Lcn2_US7 in 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 115 mM NaCl mit einer 1,2-molaren Menge des synthetischen Peptids gemischt, die Mischung zur Komplexbildung für 1 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ rotiert und dann auf 11 mg/ml konzentriert. Der konzentrierte Komplex wurde daraufhin für die Kristallisation im sitzenden Tropfen mit 5 x 96 unterschiedlichen Bedingungen (Vector Screen 1 bis 5) verwendet. Die Ansätze wurden mit Hilfe eines Kristallisationsroboters pipettiert (250 nl Komplex und 250 nl Reservoir) und bei 20 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach mehreren Wochen wurden Kristalle in den folgenden Bedingungen gefunden:

1. 5 % (v/v) Isopropanol, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (viele, winzige Kristalle)
2. 36 % (w/v) PEG4000, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2-3 Kristalle)
3. 30 % (w/v) PEG4000, 100 mM NaCH_3COO , pH 4,5 (2-3 Kristalle)

Zur Optimierung der Kristalle hinsichtlich Größe und Beugungsfähigkeit wurden Fine Screens in 24-Well Platten als hängende Tropfen bei 20 °C angesetzt. Durch Variation der 2. und 3. Bedingung konnten reproduzierbar Kristalle gezüchtet werden. Die besten Ergebnisse lieferte die Optimierung der dritten Bedingung; durch Variation der PEG4000-Konzentration und des pH-Werts wurden hierbei große, quaderförmige Kristalle im Zeitraum von wenigen Tagen bis zu 2 Wochen erhalten (Abbildung 59).

Einer der Kristalle, gezüchtet mit 30 % (w/v) PEG4000, 100 mM NaCH₃COO, pH 5,25, wurde von Dr. Andreas Eichinger unter Zugabe von 20 % (v/v) PEG 200 eingefroren und an der Synchrotronstrahlenquelle 14.2 des BESSY in Berlin vermessen. Abbildung 59C zeigt das Beugungsbild dieses Kristalls in der Raumgruppe P2₁2₁2₁, mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit und einer Auflösung von 1,7 Å. Die gesamte Prozessierung der Daten sowie die Strukturlösung durch Molekularen Ersatz unter Verwendung von Wildtyp-Lcn2 (PDB 1L6M; Goetz *et al.*, 2002) als Suchmodell wurden von Dr. Andreas Eichinger durchgeführt (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Elektronendichte war für 172 der 178 Positionen definiert, entsprechend den Positionen Asp^{A6} bis Asp^{A177} des Anticalins. Lediglich die N-terminalen fünf Aminosäuren und der C-terminale *Strep*-tag II waren in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar. Allerdings zeigten die Bereiche Ser^{A41}-Asp^{A47} und Ile^{A97}-Arg^{A103} in den flexiblen Schleifensegmente #1 und #3 nur schwer interpretierbare Elektronendichte. Das gebundene Aβ-Peptid zeigte Elektronendichte für die zentralen 13 Aminosäurepositionen von Lys^{P16} bis Lys^{P28}.

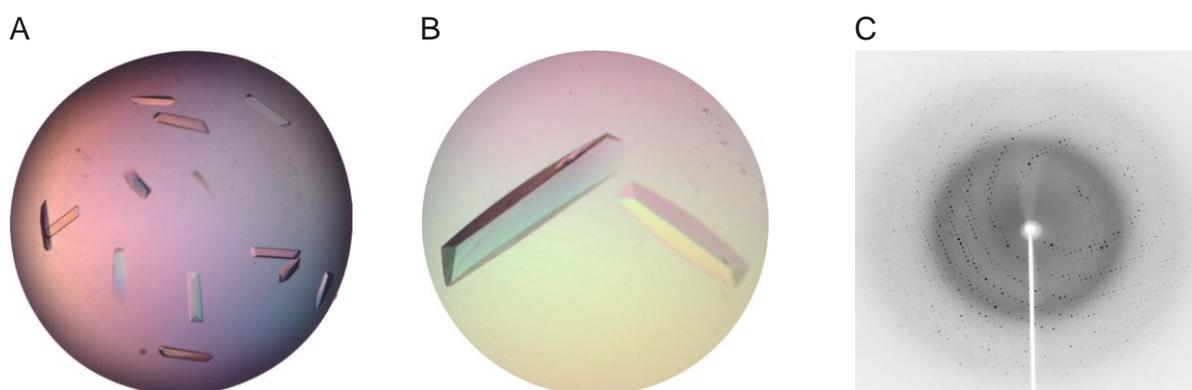


Abbildung 59: Kristalle und Beugungsmuster des Komplexes Lcn2_US7•Aβ40. Die Kristalle wurden durch Mischen von 1 µl Proteinlösung und 1 µl Mutterlauge im hängenden Tropfen bei 20 °C gezüchtet. (A) Gesamter Tropfen mit optimierten Kristallen in 30 % (w/v) PEG4000, 100 mM NaCH₃COO, pH 5,25. (B) Vergrößerte Ansicht zweier Kristalle in 29 % (w/v) PEG4000, 100 mM NaCH₃COO, pH 5,5. (C) Beugungsmuster eines der Kristalle aus (A) unter Synchrotronstrahlung mit einer Auflösung von 1,7 Å in der Raumgruppe P2₁2₁2₁.

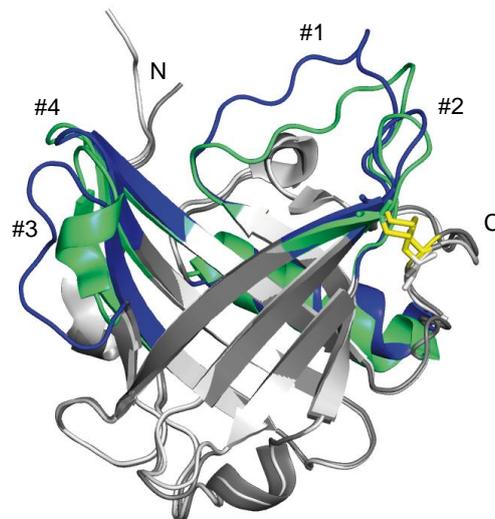
3.6.2 Vergleich der Tertiärstruktur von Lcn2_US7 mit dem natürlichen Lipocalin

Die in Abbildung 60 dargestellte Struktur von Lcn2_US7 zeigt das für Lipocaline typische Faltungsmotiv eines β -Fasses bestehend aus 8 antiparallelen β -Strängen mit einer angelagerten α -Helix. Die Überlagerung mit dem Wildtyp-Lipocalin (Lcn2; PDB: 1L6M; Goetz *et al.*, 2002), welches als Suchmodell zur Strukturlösung durch Molekularen Ersatz eingesetzt worden war, ergab trotz der unterschiedlichen Raumgruppen (Wildtyp-Lcn2: P4₁2₁2; Lcn2_US7: P2₁2₁2₁) und somit unterschiedlicher Kristallpackung eine hohe Deckungsgleichheit zwischen den beiden Strukturen. Dies wird besonders bei der Überlagerung von 58 strukturell konservierten C α -Positionen des β -Fasses deutlich (Positionen 28-37, 52-58, 63-69, 77-84, 91-94, 106-113, 118-124, 133-139; Skerra, 2000), welche nur geringe Abweichungen zwischen Lcn2_US7 und dem Gerüstprotein zeigt, bei einem RMSD-Wert von 0,44 Å (Abbildung 60A).

Ähnlich der β -Fass-Struktur ist auch die C-terminale α -Helix strukturell gut konserviert, weicht allerdings in ihrer Orientierung zum β -Fass von der Position im Gerüstprotein ab, was in einem RMSD-Wert von 1,078 Å zum Ausdruck kommt. Diese Abweichung ist im N-terminalen Bereich der Helix besonders ausgeprägt. Zudem weisen vier kurze Segmente (Cys^{A76}-Tyr^{A78}, Thr^{A104}-Leu^{A107}, Val^{A125}-Gln^{A127} und Arg^{A130}-Phe^{A133}) in den oberen Bereichen der β -Stränge D, F, G und H in enger Nachbarschaft zur Öffnung der Lipocalin-Bindungstasche, unterhalb den strukturell variablen Schleifenbereichen, größere Abweichungen auf. Dieser Bereich des β -Fasses ist im Vergleich zum Gerüstprotein nach innen geneigt, wobei die C α -Positionen der entsprechenden Aminosäuren Abweichungen von bis zu 5 Å aufweisen und so die Kavität des A β -spezifischen Anticalins Lcn2_US7 gegenüber Wildtyp-Lcn2 verkleinern.

Die auffälligsten strukturellen Unterschiede finden sich in den randomisierten Peptidschleifen am offenen Ende der Bindungstasche. Während die Schleifen #2 und #4 in der Elektronendichte von Lcn2_US7 klar definiert sind und Konformationen aufweisen, die den entsprechenden Peptidschleifen des Wildtyp-Lipocalins ähneln, kommt es in den beiden Schleifenregionen #1 und #3 zu deutlichen strukturellen Unterschieden. Allerdings zeigten hier die Bereiche Ser^{A41}-Asp^{A47} in Loop #1 und Ile^{A97}-Arg^{A103} in Loop #3 nur schlecht definierte Elektronendichte. Durch mehrfache Modellbau- und Verfeinerungszyklen war es letztendlich aber möglich, den Kettenverlauf dieser Schleifensegmente plausibel nachzuvollziehen, wobei die größten Unterschiede zum Wildtyp-Lipocalin in Loop #3 ersichtlich wurden, welcher im Anticalin deutlich von der Kavität weg geneigt ist und zudem keine α -Helix ausbildet.

A



B

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90						
NGAL	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQ	QNFQDNQ	FQGK	WYVVL	GLAGNAIL	REDKDP	QKMYATI	YELKED	KSYNV	TSVLF	FRKKKCDY	WIRTFV	PGCQ	PG		
Lib	h.....	x.....	xx.....	x.....	x.....	xx.....	xx.....	x.....	x.....	x.....	s.....		
US7	h.....	V.....	KS.....	W.....	G.GT.....	H.K.....	s.....		
					==A==	==#1==	==B==	==C==	==#2==	==D==						
	100	110	120	130	140	150	160	170								
Lcn2	EFTLGNIKSY	PGLTSYL	VRVVST	NYNQH	AMVFF	KKVSON	REYFKI	TLYGR	TKE	TSEL	KENFIR	FSKSL	GLPEN	HIVFP	VIDQ	CIDG
Lib	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....	x.....
US7	R.....	R.....	R.....	A.....	V.....	Q.....	S.....	N.....
	==E==	==#3==	==F==	==G==	==H==	==I==	==J==	==K==	==L==	==M==	==N==	==O==	==P==	==Q==	==R==	==S==

Abbildung 60: Vergleich des nativen humanen Lcn2 mit der A β -spezifischen Variante US7. (A) Überlagerung der Tertiärstrukturen der beiden Proteine unter Verwendung von 58 strukturell konservierten C α -Positionen des β -Fasses. Die vier Peptidschleifen am offenen Ende der β -Fass-Struktur sowie Bereiche, die strukturelle Abweichungen aufweisen, sind grün (Wildtyp-Lcn2; PDB 1L6M) bzw. blau (Lcn2_US7 in seiner ligandengebundenen Form; PDB 4MVI) markiert. Die übrigen Bereiche sind in Grautönen dargestellt. Die N- und C-Termini und die vier Peptidschleifen sind beschriftet. Die Disulfidbrücke (gelbe Stäbchen) ist in beiden Strukturen geschlossen. (B) Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen der beiden Proteine. In der Anticalin-Bibliothek (Lib) randomisierte Reste sind mit x bezeichnet, konservierte Aminosäureaustausche zur Einführung der N-terminalen *Bst*XI-Schnittstelle bzw. zum Entfernen des ungepaarten Cysteinrests im Wildtyp-Lcn2 sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Punkte repräsentieren Positionen, die mit dem Gerüstprotein identisch sind. Die acht strukturell konservierten β -Stränge A-H und die vier Peptidschleifen am offenen Ende der Kavität sind bezeichnet.

Insgesamt spiegelt die beschriebene hohe Ähnlichkeit zwischen der A β -spezifischen Variante Lcn2_US7 und dem Wildtyp-Protein die Sequenztoleranz des Lipocalin-Gerüsts wider, welches den Austausch von insgesamt 18 Aminosäuren (Abbildung 60B) gut toleriert.

3.6.3 Struktur des Komplexes aus Lcn2_US7 mit dem A β 40-Peptid

Die Gesamtstruktur des Komplexes aus Lcn2_US7 und A β 40 zeigt, dass das A β -Peptid tief in der Bindungstasche des Anticalins gebunden wird (Abbildung 61 und Abbildung 62A). Wie aus den Ergebnissen der ELISA-Experimente (s. Abschnitt 3.5.4.2) und des Epitop-Mappings (s. Abschnitt 3.5.4.4) schon zu erwarten war, wird der zentrale Bereich des Peptids von Aminosäure Lys^{P16} bis Lys^{P28} (K^{P16}LVFFAEDVGSNK^{P28}) von Lcn2_US7 erkannt, ist damit wenig flexibel und in der Elektronendichte klar definiert. Dieser Bereich des Peptids bildet eine kompakte Struktur mit einer über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Peptidschleife. Die N- und C-terminalen Bereiche des Peptids weisen dagegen eine hohe Flexibilität auf und sind in der Elektronendichte nicht definiert. 9 der 13 strukturell definierten A β -Reste befinden sich tief im Inneren der Kavität. Ein herausstechendes Merkmal dieses A β -Abschnitts ist das Auftreten von fünf hydrophoben Seitenketten, wobei vier dieser Reste in einem hydrophoben Cluster konzentriert sind (L^{P17}VFF^{P20}, V^{P24}).

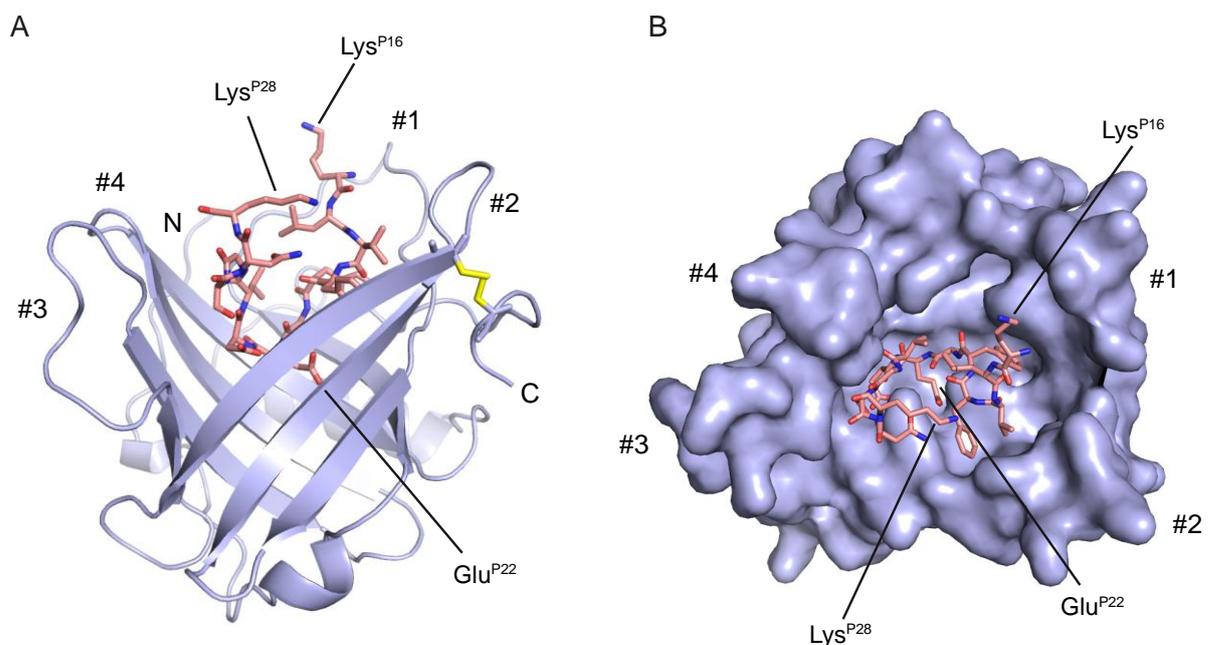


Abbildung 61: Kristallstruktur von Lcn2_US7 im Komplex mit A β 40. (A) Gesamtstruktur in Seitenansicht: die 13 Positionen des A β -Peptids mit definierter Elektronendichte (K^{P16}LVFFAEDVGSNK^{P28}) sind als rosa Stäbchen dargestellt und schließen das in Abschnitt 3.5.4.4 bestimmte Epitop FFAED ein. Die N- und C-terminalen Reste des Peptidabschnitts sowie der am tiefsten in der Tasche begrabene Rest Glu^{P22} sind beschriftet. Die vier die Bindungstasche des Anticalins bildenden Peptidschleifen sind nummeriert. Die native Disulfidbrücke ist als gelbes Stäbchenmodell dargestellt. (B) Blick auf die Oberfläche von US7 mit dem Peptid in der Bindungstasche.

Durch PISA-Analyse (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*; Krissinel & Henrick, 2007) des Komplexes wurde die Kontaktfläche zwischen Lcn2_US7 und A β 40 bestimmt. Das

Peptid begräbt hierbei eine Fläche von $886,9 \text{ \AA}^2$, entsprechend 59,5 % der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche, und zeigt ein ausgeprägtes Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und van-der-Waals-Kontakten mit dem Anticalin. Bei der genaueren Interaktionsanalyse mit dem Programm „Contact“ aus dem CCP4 Programmpaket (Collaborative Computational Project, 1994) wurde gefunden, dass 11 der 13 in der Struktur definierten Reste des Peptids im Abstand von bis zu $4,5 \text{ \AA}$ mit 29 Resten des Anticalins interagieren. Dabei wechselwirken 23 Reste des Anticalins über ihre Seitenketten mit dem Peptid. 13 dieser 23 Anticalin-Reste gehören tatsächlich zu den 20 in der Bibliothek randomisierten Positionen (Tabelle 11). Interessanterweise wurden an drei dieser Positionen, bei Tyr^{A52}, Ser^{A68} und Arg^{A81}, die ursprünglichen Aminosäuren des Wildtyp-Lipocalins selektiert. Weiterhin wurden an den beiden randomisierten Positionen Leu^{A70} und Arg^{A72} Glycinreste eingebaut, welche mehr Raum in der Kavität und somit Platz für das Peptid schaffen, gleichzeitig aber über ihre Rückgrat-Atome auch mit dem Peptid wechselwirken. Die Tatsache, dass 75 % der Bibliothekspositionen (15 von 20) an der Interaktion mit dem Peptid beteiligt sind, verdeutlicht erneut die sorgfältige Auswahl und das hervorragende Design dieser Anticalin-Bibliothek.

Die genauere strukturelle Analyse des Komplexes zeigt, dass der Hauptteil der intermolekularen Kontakte tatsächlich zwischen Lcn2_US7 und den Aminosäuren Phe^{P19}, Phe^{P20}, Ala^{P21}, Glu^{P22} und Asp^{P23} des in Abschnitt 3.5.4.4 experimentell bestimmten Epitops des A β -Peptids ausgebildet wird (Abbildung 62, Tabelle 11). Der Phenylring von Phe^{P20} ist hierbei zwischen den beiden aromatischen Aminosäuren Trp^{A49} und Tyr^{A52} des Anticalins lokalisiert und interagiert dabei durch *Face-to-Face-Stacking* mit der Indolseitenkette von Trp^{A49} sowie durch *Edge-to-Face-Stacking* mit dem Phenylring von Tyr^{A52} (Abbildung 62B). Glu^{P22} des A β 40-Peptids ragt am tiefsten in die Bindungstasche von Lcn2_US7 und nimmt an dem ausgeprägtesten Netzwerk an intermolekularen Wechselwirkungen mit zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen und einer Salzbrücke teil. Das Stickstoffatom der Glu^{P22}-Peptidbindung bildet beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffatomen der Seitenketten von Thr^{A136} und Asn^{A134} des Anticalins. Auch die beiden Sauerstoffatome der Glu^{P22}-Seitenkette gehen zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Anticalin ein: mit den Hydroxygruppen von Tyr^{A52}, Thr^{A54} und Tyr^{A138} sowie mit der Aminogruppe von Arg^{A81}. Zusätzlich kommt es zu einer ionischen Wechselwirkung zwischen der Carboxylatgruppe von Glu^{P22} und der positiv geladenen Guanidiniumgruppe von Arg^{A81} (Abbildung 62C).

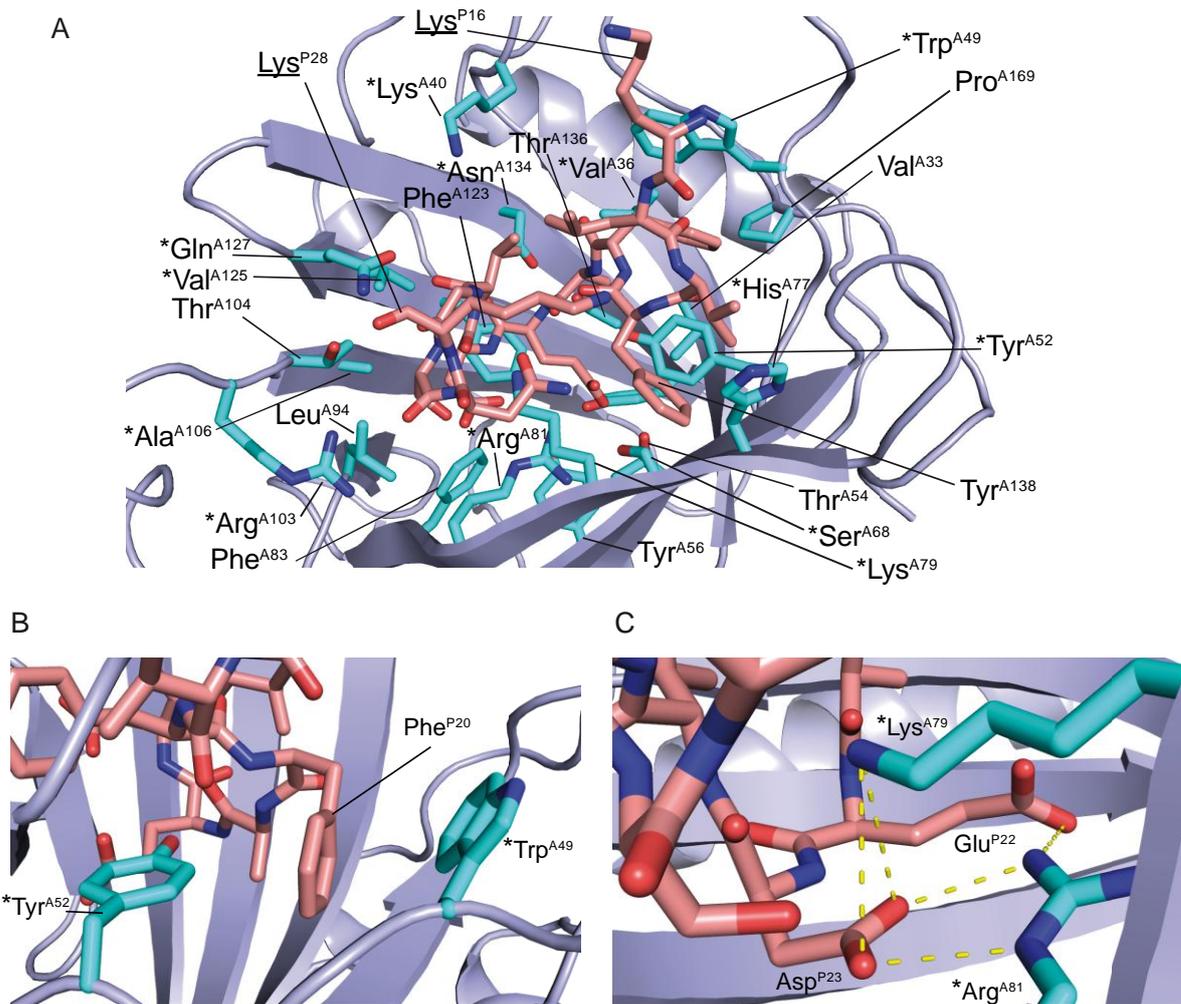


Abbildung 62: Spezifische Erkennung des Aβ40-Peptids durch Lcn2_US7. (A) Gesamtdarstellung des Lcn2_US7•Aβ40-Komplexes. Das Aβ-Peptid (rosa) sowie die Seitenketten der mit dem Peptid interagierenden Reste des Anticalins (cyan) sind als Stäbchen dargestellt. Die einzelnen Atom-Positionen sind entsprechend den Elementen gefärbt mit Kohlenstoff in rosa (Aβ40) bzw. in cyan (US7), Sauerstoff in rot und Stickstoff in blau. Die in der Anticalin-Bibliothek randomisierten Positionen sind mit einem Stern markiert. Die N- und C-terminalen Positionen des sichtbaren Peptidabschnitts (Lys^{P16}, Lys^{P28}) sind beschriftet. (B) Sandwich von Phe^{P20} (Aβ40, rosa) zwischen den aromatischen Aminosäuren Trp^{A49} und Tyr^{A52} von Lcn2_US7 (cyan). (C) Ionische Interaktion zwischen der Carboxylatgruppe von Glu^{P22} (Aβ40, rosa) und der Seitenkette von Arg^{A81} (US7, cyan) sowie Salzbrücken zwischen den Seitenketten-Sauerstoffatomen von Asp^{P23} (Aβ40, rosa) und den basischen Resten Lys^{A79} und Arg^{A81} in Lcn2_US7 (cyan).

Die folgende Aβ40-Position Asp^{P23} ist ebenfalls tief in der Bindungstasche verankert und zeigt ein vergleichbar komplexes Netzwerk an intermolekularen Wechselwirkungen. Der Carbonyl-Sauerstoff von Asp^{P23} interagiert hierbei über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lys^{A79} des Anticalins. Zusätzlich wechselwirkt die Carboxylatgruppe von Asp^{P23} über

Salzbrücken (und Wasserstoffbrückenbindungen) mit den Seitenketten der basischen Aminosäuren Lys^{A79} und Arg^{A81} des Anticalins (Abbildung 62C).

Die auf Asp^{P23} folgende hydrophobe Aminosäure Val^{P24} liegt in enger räumlicher Nachbarschaft zur N-terminalen Position Leu^{P17} des in der Elektronendichte sichtbaren Peptidabschnitts. Zusätzlich interagiert diese Aminosäure mit den Resten Lys^{A40}, Lys^{A79}, Val^{A125}, Gln^{A127} und Asn^{A134} des Anticalins. Die darauffolgenden strukturell definierten Aβ40-Positionen Gly^{P25}, Ser^{P26}, Asn^{P27} und Lys^{P28} befinden sich im Eingangsbereich der Bindungstasche, wo sie Kontakte mit verschiedenen Resten des Anticalins eingehen.

Aβ40	Mit der Seitenkette interagierende Reste von US7 (Abstand zu Aβ40 ≤ 4,5 Å)	Begrabene Oberfläche [Å ²] in Aβ40
Lys16		
Leu17		
Val18	Tyr52, His77	81,84
Phe19	Tyr52, Ser68, His77, Lys79	124,41
Phe20	Val33, Val36, Trp49, Tyr52 (H), Pro169	140,38
Ala21	Val33, Val36, Tyr52 (H), Asn134 , Thr136	52,21
Glu22	Val33, Tyr52 (H), Thr54 (H), Tyr56, Ser68 (H), Arg81 (H, S), Phe123, Val125, Asn134 (H), Thr136 (H), Tyr138 (H)	154,06
Asp23	Lys79 (H, S), Arg81 (H, S), Phe83, Leu94, Ala106 , Phe123, Val125	101,81
Val24	Lys40, Lys79, Val125, Gln127, Asn134	59,91
Gly25	Lys79 , Thr104, Gln127 (H)	23,40
Ser26	Lys79, Arg81 , Leu94, Arg103 (H), Thr104, Gln127	80,82
Asn27	Lys79	28,70
Lys28	Gln127	22,56

Tabelle 11: Wechselwirkungen des Anticalins Lcn2_US7 mit dem Aβ-Peptid. Alle in der Kristallstruktur durch Elektronendichte definierten Reste des Aβ40-Peptids sind aufgeführt und entsprechende Aminosäurepositionen in Lcn2_US7 benannt, die im Abstand von bis zu 4,5 Å über ihre Seitenketten mit dem Peptid interagieren. Die in der verwendeten Anticalin-Bibliothek randomisierten Reste sind fett hervorgehoben. Reste des Anticalins, die Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken mit dem Peptid eingehen, sind mit H bzw. S bezeichnet. Die interagierenden Reste wurden mit dem Programm „Contact“ bestimmt, die begrabene Oberfläche der Peptidreste über den PISA-Server.

Die Konformation des Aβ-Peptids zeigt eine gestauchte Peptidschleife, die durch zahlreiche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird: Asp^{P23} N zu Asp^{P23} OD1, Ser^{P26} N zu Asp^{P23} O, Ser^{P26} OG zu Asp^{P23} OD2 und Lys^{P28} N zu Gly^{P25} O. Zusätzlich stabilisieren fünf in der Kristallstruktur definierte Wassermoleküle die Struktur des Peptids über Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 63A). Besonders auffällig ist hierbei die Konformation der Positionen Asp^{P23} bis Lys^{P28} des Aβ-Fragments, welche die Struktur von zwei direkt aufeinanderfolgenden β-Turns annehmen und das für β-Turns charakteristische

i+3-Motiv (Hutchinson & Thornton, 1994) von stabilisierenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen (Abbildung 63B). Der erste β -Turn von Position Asp^{P23} bis Ser^{P26} gehört zum Typ II, der ein Glycin an Position 3 erfordert, der zweite Turn von Gly^{P25} bis Lys^{P28} gehört zum Typ I.

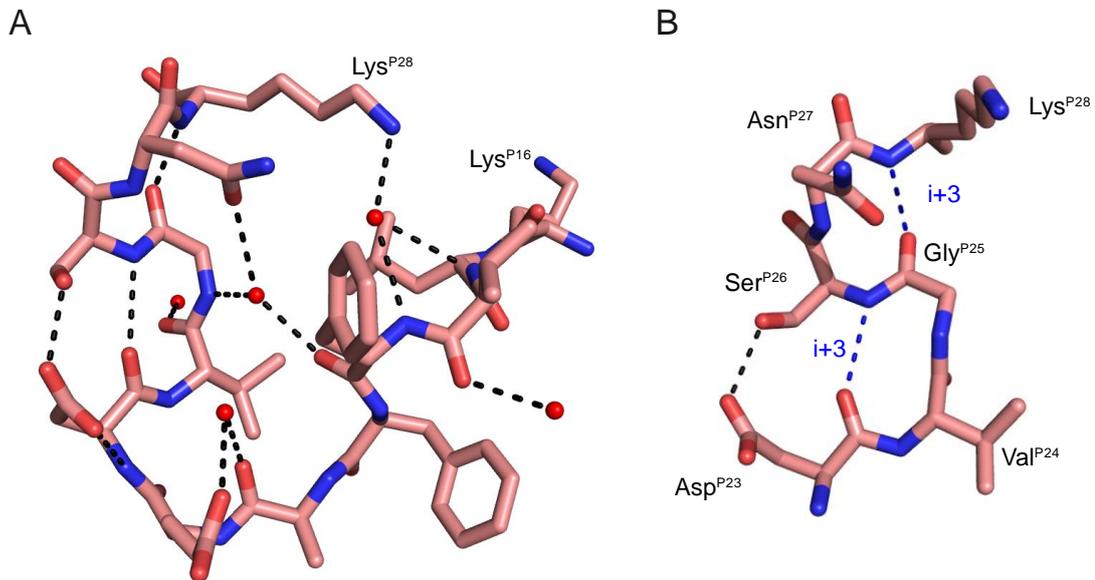


Abbildung 63: Konformation des gebundenen A β -Peptids. (A) Konformation des durch Elektronendichte definierten Bereichs des A β 40-Peptids (K^{P16}LVFFAEDVGSNK^{P28}). Interagierende Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt, intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und Interaktionen mit Wassermolekülen als schwarze Strichlinien. (B) Doppelter β -Turn-Motiv des A β -Fragments von Asp^{P23} bis Lys^{P28}. Stabilisierende intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen mit dem beschriebenen i+3-Motiv sind blau hervorgehoben, zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen sind wie in (A) als schwarze Strichlinien dargestellt.

Insgesamt zeigt die Strukturanalyse des Komplexes, dass die Wechselwirkung zwischen dem zentralen Bereich des A β -Peptids und dem Anticalin nicht nur durch ein komplexes Netzwerk aus hydrophoben Kontakten bestimmt wird, sondern auch durch starke elektrostatische Interaktionen, die von dem zentralen Glu-Asp-Cluster des Peptids ausgehen. Das Peptid selbst bildet zusätzlich intramolekulare Wechselwirkungen aus, die eine kompakte S-förmige Konformation induzieren. Diese ist gut an die Kavität des Anticalins angepasst und ermöglicht das tiefe Eindringen des Peptids. Da dieser Bereich des A β -Peptids eine wichtige Rolle im Verlauf der pathologischen Amyloid-Aggregation spielt (Wood *et al.*, 1995), sollte es möglich sein, durch Bindung durch das Anticalin diesen Prozess zu unterbinden, was im Rahmen dieser Arbeit im Thioflavin T Assay anschaulich gezeigt wurde (s. Abschnitt 3.5.4.5).

4 Diskussion

4.1 Selektion von A β -spezifischen Anticalinen durch *Phage Display*

Zur Selektion von A β -spezifischen Anticalinen wurden *Phage Display*-Experimente mit unterschiedlichen Anticalin-Bibliotheken durchgeführt. *Phage Display* (Huse *et al.*, 1989; Marks *et al.*, 1991) ist eine weit verbreitete Technologie, die die Selektion von hochaffinen Bindungsproteinen aus großen Proteinbibliotheken ermöglicht. Trotz ihres großen Anwendungsbereichs ist diese Methode allerdings keineswegs trivial, sondern ihre erfolgreiche Anwendung hängt von zahlreichen Parametern ab, die den Ausgang der Selektion beeinflussen.

4.1.1 *Phage Display*-Selektion – Design und Durchführung

Jeder einzelne Schritt des *Phage Display*-Verfahrens, von der Qualität und Diversität der verwendeten Genbibliothek über die Eigenschaften und Reinheit des eingesetzten Targets bis hin zu den verwendeten Blockierungsreagenzien, Inkubationsbedingungen, Waschschritten und der Elutionsmethode, spielt eine wichtige Rolle für den Erfolg des Selektions-experiments. Insbesondere drei Faktoren beeinflussen die Affinität der selektierten Binder und deren Spezifität: (1) die Art der Präsentation des Molekül-Targets, (2) die Strategie der Expression der Bindungsproteine auf der Phagen-Oberfläche und (3) die Komplexität der eingesetzten Bibliothek.

Protein-Targets können direkt auf der festen Phase, z.B. Immuno Sticks (Beste *et al.*, 1999), Immuno Tubes (Marks *et al.*, 1991) oder Mikrotiterplatten (Barbas *et al.*, 1992), immobilisiert werden. Allerdings kommt es durch die Adsorption an der hydrophoben Plastikoberfläche zu einer partiellen Denaturierung der Proteine, was zur Freilegung von hydrophoben Bereichen und zur Anreicherung von unspezifischen Bindeproteinen oder solchen mit Spezifität für nicht native Epitope führen kann. Weiterhin werden Proteine unter Umständen in einer bevorzugten Orientierung immobilisiert, wodurch die Zugänglichkeit bestimmter Epitope eingeschränkt wird. Durch Adsorption der Targets in einer hohen Dichte kann zudem die Anreicherung unerwünschter dimerer bzw. oligomerer Bindeproteine durch Aviditätseffekte begünstigt werden. Trotz der beschriebenen Nachteile stellt die direkte Immobilisierung des Targets aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit, ihres geringen Zeitaufwands sowie der Möglichkeit zum hohen Durchsatz die am häufigsten angewandte Variante des *Phage Display* dar.

Als Alternative zur direkten Adsorption können Proteine und insbesondere Peptide und kleine Haptene, welche ohnehin schlechte Immobilisierungseffizienz aufweisen, mit Molekülen wie Biotin oder Digoxigenin markiert und für die Komplexbildung mit den Phagemiden in Lösung verwendet werden. Diese Komplexe aus dem das Bindungsprotein präsentierenden

Phagemid und dem markierten Target-Molekül lassen sich im Anschluss selektiv über die Biotin- bzw. Digoxigenin-Gruppe auf paramagnetischen Partikeln immobilisieren (Hawkins *et al.*, 1992). Diese Variante des *Phage Display* „in Lösung“ weist im Vergleich zu der direkten Selektion an der festen Phase zahlreiche Vorteile auf: Neben der in der Regel nativen Konformation der Targets sowie der Zugänglichkeit einer maximalen Anzahl an Epitopen kann die Konzentration des Targets exakt eingestellt und die Selektion durch schrittweise Reduktion dieser Konzentration in Richtung hochaffiner Binder gelenkt werden (Barbas *et al.*, 2004).

Da eine exzessive Markierung allerdings relevante Epitope maskieren oder auch die Entfaltung von Proteinen induzieren kann, muss die chemische Markierung für jedes Zielmolekül optimiert und eine gründliche Qualitätskontrolle vor der eigentlichen Selektion durchgeführt werden. Dabei kann meist nicht gesteuert werden, wo exakt im Protein die Markierung erfolgt, da Faktoren wie Aminosäuresequenz und Zugänglichkeit der jeweiligen Seitenketten die chemische Markierung stark beeinflussen. Einen Ausweg hierbei kann die Verwendung eines Fusionsproteins oder Affinitätsanhängsels bringen.

Das erste hier durchgeführte *Phage Display*-Experiment mit einer auf dem humanen Lcn1-basierenden Bibliothek verwendete als Targets die beiden kurzen biotinylierten Peptide A β (1-11)-Bio und A β (16-27)-Bio. Diese Peptide wurden bei der Synthese mit einer C-terminalen Biotin-Gruppe markiert. Da bei der Selektion aus einer naiven Zufallsbibliothek die erzielbaren Affinitäten für kurze Peptide bzw. Haptene im Vergleich zu Proteinen häufig niedriger sind, wurde dieses Selektionsexperiment nicht in Lösung durchgeführt, sondern die Peptide wurden durch Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin in gerichteter Weise auf paramagnetischen Partikeln immobilisiert, bevor die Lcn1'-präsentierenden Phagemide zugegeben wurden. Dieses sogenannte *Precharging* führt zu einer lokalen Erhöhung der Peptidkonzentration und ermöglicht so die Identifizierung von Varianten mit niedrigen Affinitäten, teilweise vermutlich gefördert durch Aviditätseffekte desjenigen Anteils der Phagemidpopulation, der mehr als eine Kopie des Bindeproteins präsentiert, was in dieser Arbeit durch Selektion des moderaten, dimeren A β -Binders Lcn1_3.3-23 bestätigt wurde.

Aufgrund der niedrigen Affinität und des ausgeprägten Dimerisierungsverhaltens (vgl. Kapitel 4.1.3) von Lcn1_3.3-23 wurden nachfolgende Selektionsexperimente zur Generierung höher affiner, monomerer Anticaline „in Lösung“ durchgeführt. Diese Änderung im Selektionsverfahren führte mit der Lcn2'-basierten Bibliothek und dem Target Trx-A β 28-DIG letztlich tatsächlich zur Selektion eines hochaffinen Anticalins mit bis zu subnanomolarer Affinität.

Neben der Art der Präsentation des Target-Moleküls sowie seiner effektiven Konzentration kann auch die Art der Präsentation der Bibliotheken auf den Phagemiden das Oligomerisierungsverhalten der einzelnen Varianten beeinflussen. Beim monovalenten *Phage*

Display vom Typ 3+3 (Bass *et al.*, 1990; Lowman *et al.*, 1991) kodiert jedes einzelne Phasmid für ein Bindeprotein als Fusion mit dem Phagenhüllprotein pIII (bzw. mit dessen C-terminalen Fragmenten Δ pIII oder $\Delta\Delta$ pIII; s. Abschnitt 2.4.2). Alle nativen Phagenproteine einschließlich des intakten pIII-Hüllproteins selbst werden von einem Helferphagen kodiert, dessen DNA ein ineffizientes Phagenverpackungssignal trägt, so dass bevorzugt rekombinante Phasmidgenome in die reifen Phagemidpartikel verpackt werden.

Während die Mehrzahl der Phagemide bloß das native pIII-Hüllprotein auf ihrer Oberfläche exprimiert, kann durch geeignete Genregulation in etwa 10 % der Phagemide eine der fünf pIII-Kopien durch ein Fusionsprotein ersetzt werden (Bass *et al.*, 1990). Allerdings kommt es aufgrund kombinatorischer Effekte in ca. 1 % der Phagen zur Präsentation von zwei oder mehreren Kopien des Fusionsproteins, was zu einem Selektionsvorteil aufgrund von Aviditätseffekten und darüberhinaus zu Dimerisierung auf der Phagenoberfläche führen kann. Weiterhin kann die Ausbildung von dimeren Varianten beim *Phage Display* durch Assoziation des auf dem Phagen verankerten Fusionsproteins mit freien Anticalinen während der Biosynthese im Periplasma von *E. coli* erfolgen (Schier *et al.*, 1996). Freie Anticaline entstehen hierbei vor allem durch unvollständige Suppression des *Amber*-Stopcodons, welches zwischen dem Anticalin und dem Phagenhüllprotein kodiert ist und in *Amber*-Suppressorstämmen zu bloß ca. 10 % v.a. als Glutamin translatiert wird (Miller, 1992). In der Tat kam es im Verlauf des „monovalenten“ *Phage Display* mit den Lcn1'- und ApoD-basierenden Bibliotheken zur vermehrten Anreicherung von dimeren bzw. oligomeren Anticalinen.

Ein dritter wichtiger Faktor, der die Affinität der selektierten Varianten beeinflusst, ist die Komplexität der eingesetzten Bibliothek. Hierbei gilt im allgemeinen: je größer die verwendete Bibliothek, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass unterschiedliche Bindeproteine gegen ein bestimmtes Zielmolekül identifiziert werden und desto höher sind die erzielbaren Affinitäten (Perelson & Oster, 1979). Die eingesetzten Anticalin-Bibliotheken weisen mit bis zu 10^{10} unabhängigen Varianten hohe Komplexitäten auf, die hauptsächlich durch die Transformationseffizienz der verwendeten *E. coli*-Zellen limitiert und im Gebiet des Antikörper-Engineerings verwendeten Bibliotheken vergleichbar sind. Allerdings repräsentieren diese Komplexitäten nur einen kleinen Teil der kalkulatorischen Diversität von $2,6 \times 10^{23}$ bzw. $1,0 \times 10^{26}$ unterschiedlichen Varianten nach vollständiger Randomisierung von 18 bzw. 20 Aminosäuren, was die Erfolgsquote der Selektion beschränkt.

Ähnlich wichtig wie die genetische Komplexität ist allerdings die funktionelle Größe einer Bibliothek, d.h. die Anzahl an korrekt gefalteten Varianten, die in proteinbiochemisch aktiver Form auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Diese funktionelle Diversität wird durch zahlreiche Faktoren eingeschränkt und ist in der Regel deutlich niedriger als die – durch Auszählen der transformierten Kolonien bestimmbare – theoretische Komplexität. In dieser

Arbeit wurden durch Sequenzierung von zufällig ausgewählten Varianten der ApoD-basierten Bibliothek in ca. 40 % der Anticaline Deletionen detektiert, welche zum Verlust der jeweiligen Varianten führten und so die funktionelle Größe der Bibliothek annähernd halbierten. Deletionen werden im Verlauf der Gensynthese meist durch verkürzte Nebenprodukte der Oligodesoxynukleotidsynthese hervorgerufen, auch wenn diese durch Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt werden, wie in dieser Arbeit durchgeführt.

Der Einbau von mehrfachen *Amber*-Stopcodons, welcher zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führt, sowie der Einbau von Aminosäuren, die die proteinbiochemischen Eigenschaften der Varianten negativ beeinflussen – u.a. die korrekte Faltung der Proteine verhindern, die effiziente Translation inhibieren, die Tendenz zur Aggregation verstärken oder die Toxizität der Varianten auf die bakteriellen Zellen erhöhen – sind weitere bekannte Limitierungen der funktionellen Größe einer Bibliothek (Clackson & Wells, 1994).

Die Herstellung hochkomplexer Bibliotheken mit Hilfe von DNA-Triplets als Bausteinen bietet in diesem Zusammenhang eine elegante, jedoch kostenintensive Lösung zu einigen dieser Probleme (Van den Brulle *et al.*, 2008). Mittels der Slonomics-Technologie können zumindest Stopcodons und unerwünschte Aminosäuren, wie z.B. Cystein, komplett ausgeschlossen werden, Punktdeletionen allerdings in der Praxis nicht komplett. Zudem besteht im Prinzip die Möglichkeit, die Verteilung der unterschiedlichen Aminosäuren an jeder einzelnen randomisierten Positionen individuell zu bestimmen. Weiterhin wird durch diese Methode im Vergleich zu degenerierten NNK/NNS-Codons die Zahl der möglichen Kombinationen an jeder vollständig randomisierten Position von 32 auf 19 eingegrenzt, was die theoretische Größe der Bibliothek deutlich reduziert und eine bessere experimentelle Abdeckung des Sequenzraums ermöglicht. Eine alternative Methode zur Herstellung von Bibliotheken ohne Stopcodons und ebenfalls mit Kontrolle über die Zusammensetzung der kodierten Aminosäuren ist die Verwendung von Oligodesoxynukleotiden, die mit definierten Mischungen an Trinukleotid-Phosphoramiditen (TRIM) anstelle von bloß einzelnen Nukleotidbausteinen hergestellt werden (Virnekas *et al.*, 1994).

4.1.2 Vor- und Nachteile der verwendeten Lipocalin-Gerüste

Zur Generierung von A β -spezifischen Anticalinen wurden Bibliotheken basierend auf den drei humanen Lipocalinen Lcn1, ApoD und Lcn2 eingesetzt. Neben einer voluminösen Bindungstasche mit langen Peptidschleifen im Eingangsbereich (Breustedt *et al.*, 2009; 2005), bietet das humane Lcn1 günstige biochemische und biophysikalische Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung als Protein-spezifisches Anticalin. Das rekombinante Lcn1 läßt sich beispielsweise in hohen Ausbeuten im Periplasma von *E. coli* exprimieren und liefert nach Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie eine äußerst stabile, homogene

Präparation an monomerem Protein. Als Folge der hohen Ausbeute sollte eine kostengünstige großtechnische Produktion therapeutisch relevanter Lcn1-Varianten möglich sein. Darüberhinaus ist Lcn1 ein verbreitetes Protein im menschlichen Organismus, das neben der Tränenflüssigkeit in diversen anderen Geweben produziert (Redl, 2000) und daher vom Immunsystem toleriert wird.

Angesichts dieser Vorteile wurden Lcn1-basierte Bibliotheken zur Generierung von hochaffinen Anticalinen mit bis zu pikomolaren Affinitäten für Protein-Targets wie VEGF (Giese *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) und den IL4-Rezeptor (Hohlbaum *et al.*, 2011) eingesetzt. Die erste klinische Studie des VEGF-spezifischen Anticalinst PRS-050 in Patienten mit soliden Tumoren zeigte zudem ausgezeichnete Verträglichkeit und das Ausbleiben einer Immunantwort (Mross *et al.*, 2013).

Basierend auf diesen Erfolgen wurde Lcn1 als erste Lipocalin-Gerüststruktur zur Selektion von A β -spezifischen Anticalinen eingesetzt. In mehreren Selektionsversuchen mit verschiedenen Lcn1-basierten Bibliotheken und unterschiedlichen A β -Targets (A β (1-11), A β (16-27), MBP-A β 40, Trx-A β 28), durchgeführt im Rahmen dieser Arbeit wie auch in Studien von Dr. Michael Schneider in unserem Labor, wurde lediglich die hier beschriebene Variante Lcn1_3.3-23 identifiziert. Im Gegensatz zu den Protein-spezifischen Lcn1-Varianten PRS-050 und PRS-060 zeigt Lcn1_3.3-23 bloß moderate Affinität für das kurze Peptid A β (16-27). Zudem besitzt es eine starke Tendenz zur Dimerisierung (s. Abschnitt 4.1.3), was das Potential dieses Anticalins als anti-A β -Therapeutikum deutlich einschränkt.

Mögliche Ursachen für die nur mäßige Affinität sind einerseits die Architektur des Lcn1-Gerüsts mit der Form seiner Bindungstasche sowie die Auswahl der randomisierten Positionen. Letztere befinden sich ausschließlich in den Schleifenbereichen und nicht in der Lipocalin-Kavität und schränken somit die Fähigkeit zur Komplexierung von kleinen Liganden deutlich ein. Dieser Umstand in Verbindung mit der oben besprochenen Präimmobilisierung der A β -Peptide bei der *Phage Display*-Selektion können die niedrige Affinität von Lcn1_3.3-23 für A β (16-27) zumindest teilweise erklären.

In einem zweiten Ansatz wurde das humane ApoD als Lipocalin-Gerüst verwendet und eine entsprechende Bibliothek konstruiert. ApoD besitzt im Vergleich zu anderen Lipocalinen eine kleine, schlitzartige Bindungstasche (Eichinger *et al.*, 2007) und erscheint daher besonders gut geeignet zur Bindung von dem A β -Peptid. Erste Versuche zur Selektion von ApoD-basierten Anticalinen (Vogt & Skerra, 2004) scheiterten allerdings an den ungünstigen proteinchemischen Eigenschaften wie der ausgeprägten Aggregationstendenz, so dass Versuche zur Erhöhung der Löslichkeit dieses Lipocalins durch Protein-Engineering vorgenommen wurden (Nasreen *et al.*, 2006; Irmgard Neumaier unveröffentlichte Ergebnisse).

Aufgrund dieser Resultate sowie der inzwischen gelösten Kristallstruktur des ApoD (Eichinger *et al.*, 2007) wurde die vorhandene ApoD-Bibliothek (Vogt & Skerra, 2004) optimiert. Während in der alten Bibliothek, welche auf einer Modellstruktur beruhte (Peitsch & Boguski, 1990), 24 Reste randomisiert worden waren, wurde in der neuen Bibliothek die Anzahl auf 18 Positionen reduziert. Hierbei waren 14 Positionen identisch mit randomisierten Resten der Vorläufer-Bibliothek, 4 Positionen in den oberen Bereichen der β -Stränge wurden erstmalig randomisiert und 10 der alten Positionen wurden wegen der zur Erhöhung der Löslichkeit eingeführten Aminosäureaustausche oder aufgrund eines zu großen Abstands zur zentralen Kavität nicht berücksichtigt.

Trotz der Verwendung der aus den Studien zum Löslichkeits-Engineering resultierenden optimierten Variante ApoD_IN90 gelang es nicht, stabile, monomere ApoD-Varianten mit hoher Affinität für das A β -Peptid aus der neuen Bibliothek zu isolieren. Im Gegenteil, die Analyse des Oligomerisierungsverhaltens der selektierten Varianten zeigte eine starke Tendenz zur Aggregation. Zusätzlich bewirkten diese Varianten wie auch die stabilisierte Ausgangsvariante ApoD_IN90 nach Induktion der Proteinexpression eine, im Vergleich zu anderen rekombinanten Lipocalinen, deutlich verstärkte Lyse der bakteriellen Zellen, was die Koexpression von Faltungshelferproteinen mittels pTUM4 notwendig machte (Schlapschy *et al.*, 2006). Die mit ApoD_IN90 erreichte Stabilisierung des Lipocalin-Gerüsts scheint demnach noch nicht ausreichend, um hochfunktionelle Bibliotheken zu generieren und stabile Varianten daraus zu selektieren.

In einem dritten Ansatz wurde eine Bibliothek basierend auf dem humanen Lcn2 verwendet. Hierbei wurden auf Basis der Kristallstrukturen der zuvor selektierten Protein- sowie Haptenspezifischen Lcn2-Varianten gegen CTLA-4 (Schönfeld *et al.*, 2009) und gegen Me-DTPA (Kim *et al.*, 2009a) die vorhandenen spezialisierten Bibliotheken für einen erweiterten Anwendungsbereich optimiert. Dies ermöglichte die Selektion von hochaffinen Anticalinen mit Spezifität für Peptide (z.B. Hcpicidin; Giese *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) wie auch Proteine (z.B. die Extra-Domäne B des humanen Fibronectins; Gebauer *et al.*, 2013).

Im Einklang mit diesen neueren Ergebnissen wurde mit der optimierten Lcn2'-Bibliothek unter Verwendung von Trx-A β 28-DIG als Target das vielversprechendste A β -spezifische Anticalin in dieser Arbeit, Lcn2_US7, selektiert. Parallel wurden von Dominik Hinz in unserem Labor Selektionsexperimente mit der gleichen Bibliothek mit A β 40-Bio als Target durchgeführt, welche zur Identifizierung von weiteren sehr aussichtsreichen A β -spezifischen Lcn2'-Varianten führten (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Lcn2_US7 zeichnet sich durch eine hervorragende Affinität im Bereich um 1 nM aus und bindet neben dem zur Selektion verwendeten Trx-A β 28 auch andere relevante A β -Konstrukte (A β 40, MBP-A β 40) mit vergleichbaren Affinitäten. Die Identifizierung eines Anticalins mit einer so hohen Affinität durch initiale Selektion ohne die Notwendigkeit einer Affinitäts-

maturierung bestätigt die ausgezeichnete Wahl der randomisierten Positionen in der verwendeten Lcn2'-Bibliothek. Durch Randomisierung von Resten nicht nur in den Schleifenbereichen, sondern auch im oberen Bereich der Kavität, ähnlich der Haptenspezifischen Lcn2-Bibliothek (Kim *et al.*, 2009a), ist die hochaffine Komplexierung von kleineren Liganden, die tiefer in die Lipocalin-Tasche eindringen, ermöglicht worden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie Daten von Kollegen am Lehrstuhl für Biologische Chemie und bei der Pieris AG zeigen eindrucksvoll, dass die beschriebene optimierte Lcn2'-Bibliothek bislang die erfolgreichste Bibliothek zur Generierung von Anticalinen mit Spezifität für eine große Vielfalt an unterschiedlichen Targets, also Proteine, Peptide und Haptene, darstellt. Varianten aus der verwendeten Lcn1'-Bibliothek eignen sich dagegen hauptsächlich zur Komplexierung von Protein-Targets. Weiterhin neigen zahlreiche Lcn1'-basierte Anticaline zur Dimerisierung, was im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert wird.

Im Gegensatz zu Lcn1 und Lcn2, welche als natürliche Lipocaline hervorragende Stabilitäten und Ausbeuten als rekombinante Proteine aufweisen, sind ApoD und dessen optimierte Variante ApoD_IN90 noch nicht ausreichend robust für die Herstellung von komplexen Bibliotheken. Aufgrund der Geometrie der Bindungstasche scheint ApoD allerdings für Anwendungen mit kleinen Molekülen besonders gut geeignet, was das weitere Engineering der optimierten Variante ApoD_IN90 und das Design von neuen ApoD-basierten Bibliotheken erstrebenswert macht.

Die Identifizierung von hochaffinen, monomeren, A β -spezifischen Lcn2'-Varianten zeigt, dass die Ergebnisse mit den Lcn1'- und ApoD-Bibliotheken, welche nur zur Selektion von schwach bindenden, oligomeren oder aggregierten Varianten führten, nicht allein auf das difficile Target sondern auch auf die eingesetzten Anticalin-Bibliotheken zurückzuführen sind. Obwohl das A β -Peptid mit seiner hohen Hydrophobie und der Neigung zur Aggregation sicherlich die Selektion von hydrophoben, aggregierenden Varianten begünstigt, ist es dennoch möglich, durch sorgsame Präparation der A β -Peptide bzw. durch Einsatz von A β -Fusionsproteinen in den *Phage Display*-Experimenten monomere, hochaffine Binder gegen dieses Peptid zu generieren.

4.1.3 Dimerisierung von Lcn1-basierten Anticalinen – Einfluss der konservierten Disulfidbrücke

Neben der deutlich höheren Affinität für die hier verwendeten A β -Derivate besitzt Lcn2_US7 im Vergleich zu Lcn1_3.3-23 weitere wichtige Vorteile. Während beide Anticaline eine relativ hohe thermische Stabilität mit Schmelztemperaturen um 60 °C aufweisen, liefert Lcn2_US7 deutlich höhere Ausbeuten bei der periplasmatischen Expression in *E. coli* und eluiert als stabiles Monomer in der Größenausschlusschromatographie. Lcn1_3.3-23 besitzt dagegen eine starke Tendenz zur nicht-kovalenten Dimerisierung. Dies ist eine nachteilige

Eigenschaft, da für therapeutische Anwendungen von Anticalinen homogene Proben von stabilen, monomeren Proteinen erstrebenswert sind, so dass *Batch-to-Batch* Variabilitäten minimal sind.

Eine Tendenz zur Dimerisierung wurde in zwei anderen Studien ebenfalls für das native Wildtyp-Lcn1 gezeigt (Glasgow *et al.*, 1999; Redl *et al.*, 1992), welches nach Isolierung aus der Tränenflüssigkeit in der Größenausschlusschromatographie als Dimer eluierte. Im Gegensatz dazu zeigten Gasymov *et al.* (2007) allerdings, dass sowohl natives als auch in *E. coli* exprimiertes Wildtyp-Lcn1 hauptsächlich monomeres Protein darstellt und dass bloß die delipidierte *apo*-Form eine Tendenz zur Oligomerisierung aufweist. Tatsächlich lagen in *E. coli* produzierte Lcn1-Varianten, in welchen das freie Cystein an Position 101 zu Alanin bzw. Serin mutiert worden war (Breustedt *et al.*, 2005; Tsukamoto *et al.*, 2009) wie auch die Ausgangsvariante Lcn1' der hier eingesetzten Bibliothek ausschließlich als Monomer vor.

Im Gegensatz zu Lcn1, bei welchem das Dimerisierungsverhalten noch umstritten ist, wurde die Ausbildung von stabilen nicht-kovalenten Homodimeren bei anderen Vertretern der Lipocalin-Familie zweifellos beobachtet. Beispiele hierfür sind das BBP aus *Pieris brassicae* (Huber *et al.*, 1987), das bovine Odorant-Binding Protein (OBP) (Tegoni *et al.*, 1996), das bovine und porcine β -Lactoglobulin (BLG) (Brownlow *et al.*, 1997; Hoedemaeker *et al.*, 2002), das *Major Horse Allergen* Equ c1 (Lascombe *et al.*, 2000) und die Violaxanthin Deepoxidase (VDE) aus *Arabidopsis thaliana* in ihrer aktiven Konformation (Arnoux *et al.*, 2009).

Interessanterweise kommt es dabei allerdings trotz der konservierten Struktur des Lipocalin-Gerüsts zu keinem einheitlichen Dimerisierungsmechanismus; vielmehr bestehen deutliche Unterschiede in der räumlichen Anordnung der einzelnen Monomere, in den an der Dimerisierung beteiligten Aminosäurepositionen sowie in der pH-Abhängigkeit der Dimerisierung. Während beispielsweise in BBP I, der häufigsten Isoform des Bilin-Bindungsproteins, die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 4 eine entscheidende Rolle für die Dimerisierung spielen und im Dimer-Interface begraben liegen, kommt es beim bovinen OBP zur Dimerisierung aufgrund eines *Domain Swapping*-Mechanismus im C-terminalen Bereich des Lipocalins. Hierbei entsteht ein verschränktes Dimer, in welchem über eine verlängerte Hinge-Region das β -Fass von Monomer A mit der C-terminalen α -Helix und dem gestreckten Segment von Monomer B interagiert. Der Vergleich des monomeren OBP aus dem Schwein mit dem dimeren OBP des Rindes und die Analyse von Punktmutationen zeigten deutlich, dass vor allem die Abwesenheit von Gly121 in der Hinge-Region – aber auch das Fehlen der konservierten Disulfidbrücke – an der Dimerisierung des bovinen Proteins beteiligt sind (Ramoni *et al.*, 2008; Ramoni *et al.*, 2002).

Vergleichbar mit den Beobachtungen im bovinen OBP spielt die native Disulfidbrücke auch für das Lcn1-Gerüst eine wichtige Rolle, was u.a. am dimeren Lcn1_3.3-23 gezeigt wurde.

Hierbei wurde durch Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke eine deutlich stabilere, monomere Lcn1_3.3-23-Variante generiert (s. Abschnitt 3.3.5.1). Die in fast allen Lipocalinen konservierte Disulfidbrücke verbindet den C-terminalen Bereich des Lipocalins mit dem β -Fass und erhöht somit die Starrheit des Proteingerüsts. In Lcn1' und den von dieser Variante abgeleiteten Anticalinen fehlt diese Quervernetzung, was den C-Terminus deutlich flexibler macht und die Dimerisierung in einigen Varianten begünstigt. Das Fehlen der Disulfidbrücke ist allerdings nicht der alleinige Grund für die Dimerisierung – die Ausgangsvariante Lcn1' eluiert beispielsweise als stabiles Monomer – sondern sie scheint lediglich zu einer Destabilisierung des Proteingerüsts zu führen, welche die Dimerisierung von Lcn1_3.3-23 und anderen Lcn1'-basierten Varianten fördert (Holla, 2012).

In Übereinstimmung mit dem destabilisierenden Effekt, den die Entfernung der nativen Disulfidbrücke auf das Lcn1-Gerüst ausübt, konnte durch Rückeinführung dieser Bindung die thermische Stabilität von Lcn1_3.3-23 tatsächlich verbessert werden. Allerdings wurde durch die Monomerisierung auch die Bindungsaktivität für das A β -Peptid aufgehoben, was Anlass zur Vermutung gibt, dass das Peptid-Target am Dimer-Interface zwischen zwei Lcn1_3.3-23-Monomeren gebunden wird. Aufgrund der positiven Effekte der nativen Disulfidbrücke auf die Stabilität, auf das Oligomerisierungsverhalten und auf die Expressionsausbeute sollte diese in zukünftigen Lcn1-basierten Bibliotheken, ähnlich wie bei der verwendeten Lcn2'-Bibliothek, erhalten bleiben.

4.2 Engineering zur Verbesserung der Stabilität des Lcn1-Gerüsts

Neben den weiter oben beschriebenen Vorteilen ist die überaus hohe thermische Stabilität des Lcn1 ein weiteres Argument für die Verwendung dieses Lipocalins als Proteingerüst für die Anticalin-Technologie. Mit einer Schmelztemperatur über 90 °C ist Lcn1 deutlich stabiler als zahlreiche andere Lipocaline, wie u.a. das Bilin-Bindungsprotein aus *Pieris brassicae*, das α 1-Acid Glycoprotein des Menschen oder das OBP des Schweins mit Schmelztemperaturen von 61 °C, 63 °C bzw. 74 °C (Parisi *et al.*, 2005; Schlehuber & Skerra, 2002; Scire *et al.*, 2011).

Allerdings zeigen durch *Phage Display* selektierte Lcn1-Varianten häufig deutlich reduzierte Schmelztemperaturen, was u.a. auf die Mutagenese der Schleifenbereiche und ggf. die Entfernung der nativen Disulfidbrücke zurückzuführen ist. Aus diesem Grund sollten Positionen im Lcn1-Gerüst identifiziert werden, deren Austausch einen stabilisierenden Effekt hat. Die in diesem Zusammenhang hergestellten Varianten beruhen auf den drei im Folgenden beschriebenen Hypothesen sowie auf experimentellen Beobachtungen mit unterschiedlichen Lcn1-basierten Anticalinen.

4.2.1 Theoretische Grundlagen zur Verbesserung der Thermostabilität des Lcn1

4.2.1.1 Knowledge-based Potentials

In einem ersten Ansatz wurden in Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Dr. Manfred Sippl am Centre of Applied Molecular Engineering an der Universität Salzburg „*Knowledge-based Potentials*“ verwendet (Sippl, 1995; Wiederstein & Sippl, 2005), um stabilisierende Aminosäureaustausche im Lcn1-Gerüst vorherzusagen. *Knowledge-based Potentials* nutzen experimentell bestimmte Proteinstrukturen, um Informationen über Wechselwirkungen in der nativen Proteinkonformation für Vorhersagen bezüglich der Stabilität zu verwenden. Hierbei beschreiben die verwendeten Potentiale die durchschnittliche Verteilung aller paarweisen Abstände und Interaktionen zwischen allen C α - bzw. C β -Atomen des Proteins. Durch Aufsummierung dieser paarweisen Interaktionen wird für jede Variante ein spezifischer Energiewert berechnet (*Knowledge-based Energy*). Die normalisierte Form dieses Energiewerts, der sogenannte *z-score*, dient dem Vergleich von unterschiedlichen Sequenzvarianten in einer bestimmten, in der Regel nativen Faltung:

$$z(s,c) = \frac{E(s,c) - \bar{E}(s)}{\sigma(s)}$$

Hierbei entspricht $E(s,c)$ der *Knowledge-based Energy* von Sequenz s in Konformation c , $\bar{E}(s)$ der durchschnittlichen Energie von Sequenz s in allen repräsentierten Konformationen der Datenbank und $\sigma(s)$ der Standardabweichung der entsprechenden Verteilung. Im Fall der Wildtyp-Sequenz kann mit Hilfe des *z-scores* abgeschätzt werden, wie gut eine vorgegebene Faltung mit der tatsächlichen, nativen Konformation des Proteins übereinstimmt.

Aufgrund der Unterschiede in der Aminosäuresequenz kann theoretisch für jede Variante des Proteins ein neuer *z-score* (z_{mut}) berechnet werden. Ein im Vergleich zum Wildtyp erhöhter *z-score* ($z_{mut} > z_{wt}$) zeigt an, dass die Sequenzvariante weniger gut mit der vorgegebenen Konformation übereinstimmt und dass der entsprechende Aminosäureaustausch einen destabilisierenden Effekt hat. Umgekehrt entspricht eine Variante mit einem niedrigeren *z-score* ($z_{mut} < z_{wt}$) einer stabilisierten Form des ursprünglichen Proteins.

Für die Identifizierung von stabilisierten Lcn1-Varianten mit Hilfe der *Knowledge-based Potentials* wurde die Struktur 1XKI als Grundlage verwendet (Breustedt *et al.*, 2005). Aufgrund der fehlenden Elektronendichte in den Schleifenbereichen #1, #2 und #4 wurden diese von Prof. Skerra modelliert. Auf Basis dieser Modellstruktur mit einem *z-score* von -11,4 wurden 3 464 992 Einzel- bzw. Doppelmutanten *in silico* generiert und anhand ihrer C β -Atome analysiert. Dabei hatten ungefähr 30 % der Varianten einen erniedrigten *z-score*. Mit 4 der 20 besten Einzelmutanten und 14 der 20 besten Doppelmutanten wurden Aminosäureaustausche gegen Cystein häufig als stabilisierend vorhergesagt. Zudem erschienen

Substitutionen der beiden Positionen Lys114 und Lys20 am vielversprechendsten und zeigten mit K114C (-12,95) und K20C/K114C (-13,98) als beste Einzel- und Doppelmутanten sowie mit K114V (-12,85) und K20I/K114V (-13,72) als beste Cystein-freie Mutanten die insgesamt stabilsten Varianten. Neben Aminosäureaustauschen an diesen Positionen (K20I, K20M, K114V, K114W und K114H in Experimenten von Markus Moosmeier) wurden zusätzlich die Varianten E50V und E34F (Markus Moosmeier) analysiert. Da freie Cysteinreste durch Bildung von Disulfidisomeren häufig die Dimerisierung, Oligomerisierung bzw. Aggregation von Varianten verursachen, erscheint der Einbau dieser Aminosäure ungünstig. Aus diesem Grund wurden die theoretisch stabilsten Varianten K114C und K20C/K114C nicht analysiert.

4.2.1.2 Stabilisierung durch Austausch von flexiblen Resten

In Studien von Argos und Kollegen (Argos *et al.*, 1979; Menendez-Arias & Argos, 1989) wurde durch Sequenzvergleich von mesophilen und thermophilen Proteinen gezeigt, dass Alanin eine bevorzugte Aminosäure in thermophilen Organismen darstellt und dass die Substitutionen Gly→Ala und Ser→Ala zu den fünf häufigsten Aminosäureaustauschen auf dem Weg zur verbesserten Thermostabilität zählen. Der stabilisierende Einfluss von Gly→Ala kann einerseits durch einen entropischen Effekt erklärt werden; hierbei wird aufgrund der zusätzlichen Methyl-Seitenkette des Alanins die Entropie der ungefalteten Polypeptidkette deutlich verringert und somit das Gleichgewicht in Richtung auf das gefaltete Protein verschoben. Zudem erhöht der Austausch durch Alanin die Hydrophobie und führt zum besseren Ausfüllen von Kavitäten und somit zur Stabilisierung durch dichtere Packung im Protein. Zusätzlich besitzt Alanin einen α -Helix-stabilisierenden Effekt (Chakrabarty *et al.*, 1991).

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte der stabilisierende Effekt des Gly→Ala Austausches in mehreren Studien demonstriert werden. Basierend auf dem Konzept der entropischen Stabilisierung führten beispielsweise die beiden Substitutionen G77A und A82P im T4-Lysozym zur Stabilisierung des Proteins (Matthews *et al.*, 1987). Der positive Effekt von Alanin auf die Stabilität von α -Helices wurde u.a. am Beispiel des λ -Repressors sowie der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* dokumentiert (Hecht *et al.*, 1986; Imanaka *et al.*, 1986). Die erhöhte Stabilität der Glycerinaldehyd-3-phosphatase als Folge der Substitution G316A wurde dagegen hauptsächlich auf die Verbesserung der internen Proteinpackung zurückgeführt (Ganter & Plückthun, 1990).

In anderen Studien zum Vergleich von Enzymen aus mesophilen und thermophilen Organismen wurde gezeigt, dass thermophile Enzyme in der Regel rigider sind als ihre mesophilen Analoga (Vieille & Zeikus, 2001). Durch Erhöhung der strukturellen Rigidität von mesophilen Proteinen sollte es daher möglich sein, deren thermische Stabilität zu verbessern. Dies wurde u.a. am Beispiel der Lipase A aus *Bacillus subtilis* gezeigt, welche

durch iterative Sättigungsmutagenese an ausgewählten Positionen signifikant stabilisiert wurde (Reetz *et al.*, 2006).

In dieser Studie wurden anhand der Kristallstruktur die zehn Positionen mit den höchsten B-Faktoren identifiziert und der Mutagenese unterworfen. Der B-Faktor (kristallographischer Temperaturfaktor), welcher zur Identifizierung der zu randomisierenden Positionen in der Lipase A herangezogen wurde, ist v.a. ein Maß für die Flexibilität der jeweiligen Aminosäureposition in der Kristallstruktur. Hierbei wurden zunächst 8 Teilbibliotheken hergestellt, die Varianten bezüglich ihrer thermischen Stabilität analysiert und die jeweils beste Variante ausgewählt und als Basis für die nächste Mutageneserunde eingesetzt. In dieser Weise wurde in fünf Zyklen iterativer Mutagenese die thermische Stabilität der Lipase A um +45 °C drastisch verbessert.

Als Kombination dieser Studien wurden zur Stabilisierung des Lcn1-Gerüsts Glycinreste mit relativ hohen B-Faktoren identifiziert, zu Alanin ausgetauscht und die Stabilität der Varianten analysiert. Von den so hergestellten Varianten (Lcn1*[G59A], Lcn1*[G81A], Lcn1*[G82A], Lcn1*[G47A] und Lcn1*[G103A]) waren die Positionen Gly81 und Gly82 im Lcn1-Gerüst von besonderem Interesse, da diese in der kurzen 3_{10} -Helix (Asp80 - Gly82) vorkommen.

4.2.1.3 Stabilisierung durch Einführung von Konsensusmotiven

In einem dritten Ansatz wurden in einem strukturellen Alignment von 10 unterschiedlichen Lipocalinen (Adam *et al.*, 2008) zwei Konsensusmotive identifiziert und basierend auf diesen Motiven Varianten des Lcn1 konstruiert. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass sich verwandte Proteine aus einem Vorläuferprotein entwickeln, welches hohe Stabilität aufweist. Im Verlauf der divergenten Evolution kommt es zum Einbau von zufälligen, voneinander unabhängigen Mutationen, wobei die meisten der Aminosäureaustausche zu einer gewissen Destabilisierung führen, solange diese für die biologische Funktion noch tolerable ist. Im Gegensatz dazu ist die zufällige Anreicherung der weniger häufig auftretenden, stabilisierenden Mutationen in Abwesenheit eines ausgeprägten Selektionsdrucks eher unwahrscheinlich (Steipe *et al.*, 1994). Aminosäuren, die sehr häufig an einer bestimmten Position in verwandten Proteinen auftreten und somit mit größerer Wahrscheinlichkeit der Sequenz des Vorläuferproteins entsprechen, können daher einen stabilisierenden Effekt auf das betrachtete Protein ausüben. Aus diesem Grund sollte es möglich sein, Proteine durch Austausch von selten auftretenden Aminosäuren gegen die entsprechenden Konsensusreste zu stabilisieren.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigten in einer Studie zur Stabilisierung einer variablen Immunglobulin-Domäne 6 von 10 Konsensusaustauschen tatsächlich einen positiven Effekt auf die chemische Stabilität des Proteins, während lediglich ein Austausch das Protein erkennbar destabilisierte (Steipe *et al.*, 1994). In einer weiteren Studie wurde auf

Basis von 13 Phytase-Sequenzen eine Konsensusvariante generiert, welche im Vergleich zu den einzelnen Vorläuferenzymen mit einem Anstieg der thermischen Stabilität um 15 - 22 °C deutlich stabilisiert war (Lehmann *et al.*, 2000).

Das als Grundlage zur Wahl der Konsensusvarianten verwendete strukturelle Alignment umfasste 10 Lipocaline, für die Strukturdaten in der Protein Data Bank vorliegen (Adam *et al.*, 2008; 1A3Y, 1AQB, 1DF3, 1EXS, 1I4U, 1LF7, 1NGL, 1QWD, 1XKI und 1PEE) und die gleichzeitig 9 der 13 unterschiedlichen phylogenetischen Stämme der Lipocalin-Familie repräsentierten (Ganforina *et al.*, 2000). Durch Vergleich der Lipocalin-Sequenzen wurde im N-terminalen Bereich des Lcn1 (Positionen 7 - 9 des maturen Proteins) eine deutliche Abweichung vom Konsensus identifiziert. Während 5 der 10 Lipocaline das Motiv NF an den Positionen 7 und 8 aufweisen, trägt Lcn1 das Motiv DE. Insbesondere das Fehlen einer hydrophoben Aminosäure an Position 8, wie es in 8 der 10 Lipocaline der Fall ist, könnte hierbei einen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität haben. Aus diesem Grund wurde die Variante Lcn1*[DE7-8NF] konstruiert.

Eine weitere Abweichung wurde für den Schleifenbereich zwischen β -Strang F und G an der Unterseite der β -Fass-Struktur beobachtet. Dieser Schleifenbereich ist bedeutsam, da er das zweite der drei in Lipocalinen konservierten Struktur motive (SCR2; Flower, 1996) einschließt. Aufgrund der Abweichung des Lcn1 in diesem Bereich wurde es ursprünglich in die Gruppe der *Outlier*-Lipocaline eingeordnet. Zur Stabilisierung des Lcn1 wurde dieser Loop (H⁹²VKD⁹⁵) gegen die entsprechende Sequenz des porcinen β -Lactoglobulins (D⁹⁸YDS¹⁰¹) ersetzt (Lcn1*[HVKD92-95DYDS]). Zusätzlich trägt das porcine β -Lactoglobulin ein konserviertes Threonin (T⁹⁷) am 5'-Ende dieser Loop-Sequenz. Dieses Threonin tritt in insgesamt 6 der 10 Lipocaline auf, wurde in der hier durchgeführten Mutagenese des Lcn1 allerdings nicht berücksichtigt.

4.2.2 Effekt der eingeführten Mutationen und Rolle der nativen Disulfidbrücke auf die Stabilität des Lcn1-Gerüsts

In Einklang mit zwei unabhängigen Veröffentlichungen wurde die hohe thermische Stabilität des Lcn1 mit einer Schmelztemperatur von über 90 °C in dieser Arbeit bestätigt (Creuzenet & Mangroo, 1998; Tsukamoto *et al.*, 2009). Aufgrund der unvollständigen Denaturierung des Lcn1 in einem Temperaturbereich bis zu 90 °C wurde in der Arbeit von Tsukamoto *et al.* (2003) der Vergleich der thermischen Stabilität von apo-, holo- und mit Palmitinsäure gesättigtem Lcn1 bei einem erniedrigten (destabilisierenden) pH-Wert von 5 durchgeführt. Analog wurden in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Lcn1-Varianten sowohl unter physiologischen Bedingungen (pH 7,5) als auch in Gegenwart von 0,75 M Gdn•HCl als Denaturierungsmittel analysiert.

Übereinstimmend wurde unter beiden Bedingungen nur für drei der insgesamt 26 analysierten Lcn1-Varianten eine Stabilisierung im Vergleich zum Wildtyp-Protein detektiert. Alle drei entsprechenden Mutationen, E50V, K114V und K114W, waren auf der Grundlage der *Knowledge-based Potentials* (s. Abschnitt 4.2.1.1) geplant worden.

Mit einer Temperaturdifferenz von +1 °C (bzw. +0,3 °C unter Zugabe von Gdn•HCl) ist Lcn1*[E50V] nur geringfügig stabilisiert. Im Gegensatz dazu hat der Austausch der basischen Aminosäure Lysin an Position 114 mit einer hydrophoben Aminosäure einen deutlichen Effekt mit Temperaturdifferenzen von +10 °C (+18 °C) für Valin bzw. +8 °C (+16 °C) für Tryptophan. Die strukturelle Analyse des Lcn1-Gerüsts zeigt, dass sich Lys114 relativ tief in der Kavität nahe an der hydrophoben Kernregion (Trp17, Met39, Leu41, Leu49, Leu68, Ile88, Tyr97, Phe99, Val116) befindet und mit seiner Seitenkette in das Innere der Bindungstasche ragt. Durch Einbau einer hydrophoben Aminosäure anstelle des basischen Lysins können zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen an dieser Position entstehen, welche die Rigidität des Proteingerüsts erhöhen und somit die jeweiligen Varianten stabilisieren. In Übereinstimmung mit dieser Annahme tragen die gemäß dem Ansatz von Sippl (Sippl, 1995; Wiederstein & Sippl, 2005) vorhergesagten besten Einzelmutanten hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren (Val, Ile, Phe, Leu, Met, Trp) an dieser Position. Ebenfalls im Einklang mit der Annahme wurde durch Einbau der schwach basischen Aminosäure Histidin an dieser Position (K114H in Experimenten von Markus Moosmeier) keine Stabilisierung des Lcn1 erreicht. Der Austausch von Lys20, der zweitbesten vorhergesagten Position, hatte dagegen einen destabilisierenden Effekt bei allen analysierten Varianten.

Keine der auf der Kombination der Theorien von Argos *et al.* (1979) und Reetz *et al.* (2006; s. Abschnitt 4.2.1.2) beruhenden Varianten zeigte einen stabilisierenden Effekt auf das Lcn1-Gerüst. Im Gegenteil, die Varianten waren mit Temperaturdifferenzen von bis zu -9 °C teilweise deutlich destabilisiert, was entgegen den Erwartungen auch für die Austausche an den beiden Positionen Gly81 und Gly82 in der kurzen 3_{10} -Helix zutraf.

Deutliche Abweichungen von den diesen Theorien zu Grunde liegenden experimentellen Studien spielen hierbei höchstwahrscheinlich eine Rolle. Während bei Reetz *et al.* (2006) die zu randomisierenden Positionen streng anhand der Höhe der B-Faktoren und unabhängig von der Art der Original-Aminosäure ausgewählt wurden, wurden in dieser Arbeit aufgrund der Beobachtungen von Argos *et al.* (1979) ausschließlich Glycinreste mit erhöhten B-Faktoren mutiert. Weiterhin wurden die ausgewählten Glycinreste bloß gegen Alanin ausgetauscht und keiner Sättigungsmutagenese unterzogen. Der Einbau von Alanin erscheint in Anlehnung an Argos *et al.* (1979) zwar aus allgemeiner struktureller Sicht optimal, unter bestimmten Umständen könnte aber der Einbau einer größeren Seitenkette für einen stabilisierenden Effekt erforderlich sein. Zusätzlich unterscheiden sich mesophile und thermophile Proteine in der Regel nicht nur in einer sondern in einer Vielzahl von Positionen, wobei einzelne

Aminosäureaustausche häufig bloß marginalen Effekt aufweisen und erst in Kombination eine nennenswerte Stabilisierung bewirken. In Übereinstimmung damit wurde die deutliche Stabilisierung der Lipase A in der Studie von Reetz *et al.* (2006) auch erst nach iterativen Zyklen erreicht. Allerdings hatten alle in dieser Arbeit eingeführten Gly→Ala Substitutionen einen destabilisierenden Effekt auf Lcn1, was die Kombination dieser Mutationen oder die Einführung nachfolgender Mutationen nicht erfolgsversprechend machte.

Auch die beiden Varianten aus der Konsensusstrategie (s. Abschnitt. 4.2.1.3) waren mit Temperaturdifferenzen von -2 °C für Lcn1*[DE7-8NF] und -14 °C für Lcn1*[HVKD92-95DYDS] destabilisiert. Dies könnte auf das spezifische Design dieser Varianten zurückzuführen sein, da in beiden jeweils eine konservierte Position des Konsensusmotivs, Glu9 in Lcn1*[DE7-8NF] und Ser91 in Lcn1*[HVKD92-95DYDS], ausgenommen und nicht zu der entsprechenden Aminosäure der Konsensussequenz mutiert war. Der Einbau von Glutamat anstelle von Aspartat an Position 9 in Lcn1*[DE7-8NF] sollte aufgrund der großen Ähnlichkeit dieser beiden Aminosäuren allerdings keinen starken Einfluss auf die Stabilität dieser Lcn1-Variante haben. Im Gegensatz dazu stellt Serin an Position 91 in Lcn1*[HVKD92-95DYDS] einen deutlichen Unterschied zu Threonin der Konsensussequenz dar. Zwar unterscheiden sich diese beiden Aminosäuren – wie auch Glutamat und Aspartat – nur in einer Methylengruppe, allerdings zählt Threonin zu den beta-verzweigten Aminosäuren, was einen Einfluss auf die Rückgratkonformation der Polypeptidkette hat. Der Austausch des konservierten Threonins zu Serin beeinflusst daher mit großer Wahrscheinlichkeit die native Rückgratkonformation der Polypeptidkette, was möglicherweise auch die Stabilität des Lcn1 beeinträchtigen kann. Zudem kommt es in der Struktur des β -Lactoglobulins zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Resten Thr97 und Asp98, welche Ser91 und der zu Aspartat mutierten Position 92 in Lcn1*[HVKD92-95DYDS] entsprechen. Durch Ausbildung dieser Wasserstoffbrückenbindung wird die Flexibilität des Loops eingeschränkt und die Stabilität des Proteins vermutlich erhöht. Die Nichteinführung dieses ansonsten konservierten Threoninrests, welcher in 6 der 10 analysierten Lipocaline auftritt, bei der Transplantation des Schleifen-segments zwischen β -Strang F und G führt möglicherweise zu einer erhöhten Flexibilität dieser Peptidschleife und somit zu der beobachteten Destabilisierung.

Angesichts der schon hohen Ausgangsstabilität des humanen Lcn1 bestätigt die Identifizierung von zwei signifikant stabilisierten Varianten, dass das Konzept der *Knowledge-based Potentials* zumindest teilweise funktioniert.

Im Gegensatz zu diesem Ansatz, in welchem stabilisierende Interaktionen unabhängig von der Stabilität der Ausgangsvariante identifiziert werden, stützen sich die beiden anderen hier verfolgten Strategien auf Unterschiede zwischen Proteinen mit nur mäßigen Stabilitäten und

solchen, die hohe Stabilitäten besitzen und beispielsweise thermophilen Organismen entstammen. Bei dem bereits „thermophilen“ Lcn1 versagen diese Ansätze allerdings.

Variante Lcn1*[C61S/C153S], in welcher die konservierte Disulfidbrücke entfernt worden war, wies mit einer Temperaturdifferenz von -16°C die stärkste Destabilisierung auf. Dieses Ergebnis und die Beobachtungen an der A β -spezifischen Variante Lcn1_3.3-23, welche durch Rückeinführung der nativen Disulfidbrücke um mehr als 12°C stabilisiert werden konnte, bestätigen die Bedeutung der konservierten Disulfidbrücke für die Faltungstabilität von Lcn1 und ggf. anderen Lipocalinen (Gasymov *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2005). Im Einklang mit den Befunden in der vorliegenden Arbeit zeigten Gasymov *et al.* (2011), dass Lcn1 ohne die native Disulfidbrücke auch im Verlauf der chemischen Denaturierung mit Harnstoff deutlich destabilisiert ist. Die Konzentration des Denaturierungsmittels $[D]_{1/2}$, bei welchem das Protein zu 50 % denaturiert vorlag, war hierbei für das Wildtyp-Protein doppelt so hoch wie für die Variante [C61S/C153S] (6,8 M gegenüber 3,5 M). Ähnliche Ergebnisse wurden für die *Lipocalin-Type* Prostaglandinsynthase der Ratte ($\Delta T = 12^{\circ}\text{C}$, $[D]_{1/2}$: 5,8 M gegenüber 2,6 M; Liu *et al.*, 2008) und für das porcine OBP ($\Delta T = 33^{\circ}\text{C}$, $[D]_{1/2}$: 2,4 M gegenüber 0,7 M; Parisi *et al.*, 2005) erhalten.

Zusätzlich zur thermischen Denaturierung wurden das Wildtyp-Protein, die beiden stabilisierten Varianten Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] sowie Lcn1*[C61S/C153S] – ohne Disulfidbrücke – bezüglich ihrer chemischen Stabilität untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der thermischen Analysen waren Lcn1*[K114V] und Lcn1*[K114W] auch gegenüber Denaturierung mit Gdn•HCl deutlich stabilisiert, und Lcn1*[C61S/C153S] deutlich destabilisiert. In früheren grundlegenden Arbeiten wurde gezeigt, dass die thermodynamischen Parameter der Proteinfaltung weniger vom Denaturierungsreagenz abhängig sind, die strukturellen Eigenschaften des denaturierten Zustands dagegen schon (Makhatadze & Privalov, 1992; Pfeil & Privalov, 1976). Während der Verlust der Sekundärstruktur und die Freisetzung von begraben hydrophoben Seitenketten stark von der Art der Denaturierung abhängen, sind die extrapolierten Werte der Enthalpie und Entropie der Denaturierung intrinsische Eigenschaften des jeweiligen Proteins. Im Einklang damit entsprechen die in dieser Arbeit ermittelten Werte der freien Energie der Entfaltung von Wildtyp-Lcn1 mit Gdn•HCl den von Gasymov *et al.* (2011) zuvor unter Verwendung von Harnstoff ermittelten Werten (21,3 bzw. 20,5 kJ mol^{-1}). Ebenfalls ist die freie Energie der Entfaltung in Abwesenheit der Disulfidbrücke in beiden Studien mehr als halbiert, was die reduzierte Faltungstabilität gegenüber chemischer Denaturierung zum Ausdruck bringt. Dagegen wird bei Vergleich der Werte für $[D]_{1/2}$ die stärkere Denaturierungskraft von Gdn•HCl im Vergleich zu Harnstoff deutlich (0,6 gegenüber 3,5 M).

Allerdings war der durch thermische Denaturierung ermittelte Wert der freien Enthalpie der Entfaltung von Wildtyp-Lcn1 mit 47,2 kJ mol^{-1} deutlich größer als der in den chemischen

Denaturierungsstudien ermittelte Parameter. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Wärmekapazität ΔC_p als konstant angesehen und somit die Temperaturabhängigkeit der Enthalpie bei der thermischen Denaturierung H_m vernachlässigt wurde. Zusätzlich ist der Fit der thermischen Denaturierung mit einem Fehler behaftet, da aufgrund der hohen Schmelztemperatur von Wildtyp-Lcn1 die posttransitionelle lineare Phase nicht erreicht wurde; die Steigung der posttransitionellen Geraden (m_U) wurde daher unter einfachster Annahme auf Null gesetzt und der Wert des entsprechenden y-Achsen-Abschnitts (b_U) als konstanter Wert abgeschätzt und zur Bestimmung der anderen Parameter verwendet.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen mit der A β -spezifischen Variante Lcn1_3.3-23 geschlossen werden, dass zur Generierung von stabilen, gut exprimierenden Lcn1-Varianten der Erhalt der nativen Disulfidbrücke im Lcn1-Gerüst notwendig ist. Zusätzliche Stabilität kann durch den Einbau von Valin bzw. Tryptophan an Position 114 gewonnen werden. In der in dieser Arbeit verwendeten Lcn1'-Bibliothek war zwar die stabilisierende Mutation K114W enthalten, zur Generierung der C-terminalen BstXI-Schnittstelle war allerdings gleichzeitig der Austausch R111P notwendig, welcher den stabilisierenden Effekt von K114W aufhob und die Variante Lcn1*[K114W/R111P] sogar um 2 °C destabilisierte. Dieser destabilisierende Effekt der Doppelmutation K114W/R111P in Kombination mit der Entfernung der Disulfidbrücke führten zu der deutlich reduzierten thermischen Stabilität von Lcn1' im Vergleich zum Wildtyp-Protein ($\Delta T = -20$ °C).

4.3 Die zentrale A β -Peptidregion als bevorzugtes Anticalin-Epitop

Unabhängig von der verwendeten Anticalin-Bibliothek und den eingesetzten Targets wiesen alle gegen A β isolierten Anticaline aus dieser Arbeit und auch parallelen Projekten (s. Dissertation Domink Hinz) Spezifität für ein zentrales Epitop im Bereich von A β (16-27) auf.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Veröffentlichungen, in denen nach Verwendung von A β (1-28), A β (1-40) bzw. A β (1-42) lediglich die *Phage Display*-Selektion von scFv-Fragmenten mit Spezifität für den zentralen oder den C-terminalen Bereich, nicht aber den N-terminalen Bereich des A β -Peptids beschrieben wurden (Liu *et al.*, 2004; Manoutcharian *et al.*, 2004). Ähnlich bindet der ebenfalls mittels *Phage Display* identifizierte A β -spezifische, dimere Affibody Z_{A β 3} bevorzugt die Positionen 30 bis 36 des A β -Peptids (Gronwall *et al.*, 2007). Lediglich der rekombinante humane Antikörper Gantenerumab, welcher in *Phage Display*-Selektionen gegen Amyloid-Fibrillen isoliert worden war (Bohrmann *et al.*, 2011), und das DARPin Molekül D23, welches mit biotinyliertem A β (1-28) in *Ribosomen Display* selektiert worden war (Hanenberg *et al.*, 2014), erkennen konformationelle Epitope, die aus N-terminalen und zentralen Positionen des Peptids gebildet werden. Abgesehen von diesen Ausnahmen scheint das N-terminale Peptid A β (1-11) mit seiner im Vergleich zum zentralen A β -Fragment niedrigen Hydrophobie für die *in vitro* Selektion von Antikörperfragmenten

bzw. alternativen Gerüstproteinen weniger geeignet. Im Gegensatz dazu ist dieses Fragment jedoch aufgrund der Anwesenheit von immundominanten B-Zellepitopen für die *in vivo* Generierung von A β -spezifischen Antikörpern durch aktive Immunisierung entscheidend (Gardberg *et al.*, 2007; Miles *et al.*, 2008). So bindet beispielsweise der in klinischen Studien analysierte und in Kapitel 4.5 ausführlicher beschriebene Antikörper Bapineuzumab die N-terminalen Aminosäuren A β (1-5) (Kerchner & Boxer, 2010).

Bei der detaillierten Analyse der Bindungsspezifität des hier selektierten Anticalins Lcn2_US7 im Epitop-Mapping wurde das zentrale A β -Fragment F^{P19}FAED^{P23} als minimales Epitop identifiziert. Interessanterweise erkennen die beiden in der Doktorarbeit von Dominik Hinz unabhängig selektierten Lcn2-Varianten S1A4 und H1G1 das gleiche Epitop, obwohl sie gegen das A β 40-Peptid anstelle des Fusionsproteins Trx-A β 28 selektiert wurden (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Diese zentrale, hydrophobe A β -Sequenz besitzt mit zwei benachbarten aromatischen und zwei benachbarten sauren Aminosäuren ein herausstechendes Motiv, das für die Selektion von Bindeproteinen äußerst attraktiv erscheint. Zusätzlich spielt dieses A β -Fragment, wie im Folgenden diskutiert, eine wichtige Rolle im Verlauf der Amyloid-Aggregation sowie im Rahmen erblicher Formen der Alzheimer-Krankheit.

NMR-Studien von A β -Fibrillen zeigten beispielsweise, dass die Positionen 18 bis 42 des A β -Peptids ein charakteristisches *β -Strand-Turn- β -Strand-Motiv* annehmen und für die Fibrillenbildung verantwortlich sind (Luhrs *et al.*, 2005). Hierbei kommt es zur Ausbildung von intermolekularen β -Faltblättern zwischen den beiden antiparallelen Strängen β 1 und β 2 eines Hairpins mit den entsprechenden β -Strängen benachbarter A β -Moleküle. Die Stabilisierung dieser Faltblätter erfolgt durch intermolekulare Wechselwirkungen insbesondere zwischen den hydrophoben Aminosäuren Leu^{P17}, Phe^{P19} und Ala^{P21} in Strang β 1 mit hydrophoben Aminosäuren im C-terminalen Bereich von Strang β 2 eines zweiten A β -Peptids. Zusätzlich erfolgt eine Stabilisierung der Faltblätter durch eine intermolekulare Salzbrücke zwischen Asp^{P23} und Lys^{P28} benachbarter Peptide. Der hydrophobe Cluster L^{P17}VFFA^{P21} stellt hierbei die Schlüsselsequenz der Fibrillenbildung dar und nimmt bereits in Form eines 9mer-Peptids (KKLVFFAED) Amyloid-artige Strukturen an (Wood *et al.*, 1995).

Basierend auf diesem Mechanismus der Fibrillenbildung wurden Peptide als Aggregationsinhibitoren entwickelt. Durch Homologie zu der zentralen, hydrophoben A β -Sequenz werden diese Peptide bei der A β -Selbstassoziation angelagert, verhindern durch Einbau von Prolin (*β -Sheet Breaker Peptides*; Soto *et al.*, 1998) bzw. von methylierten Aminosäuren (Gordon *et al.*, 2001) allerdings die Anlagerung von weiteren A β -Molekülen und inhibieren so das Fibrillenwachstum. Lcn2_US7 bindet das gleiche Epitop mit hoher Affinität und kann daher die A β -Aggregation ebenfalls inhibieren, was in der vorliegenden Arbeit im Thioflavin T Aggregation Assay gezeigt wurde.

Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle des von US7 erkannten Epitops ist die Tatsache, dass die Positionen Ala^{P21}, Glu^{P22} und Asp^{P23} einen Hot Spot für Mutationen in autosomal-dominant vererbten Formen der Alzheimer-Krankheit darstellen (Bateman *et al.*, 2011). Vererbte Formen mit Mutationen im Bereich der β - und γ -Sekretaseschnittstellen führen zu erhöhten Konzentrationen an A β 40 und A β 42 oder zur Erhöhung des A β 42/A β 40-Verhältnisses (Bateman *et al.*, 2011) und rufen somit ein frühes Einsetzen des konventionellen Alzheimer-Phänotyps hervor. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Mehrzahl der Mutationen im Bereich der Schnittstelle der α -Sekretase, welche innerhalb der Amyloid-Domäne zwischen Lys16 und Leu17 schneidet und das nicht toxische, verkürzte Peptid p3 generiert, zu einem andersartigen Phänotyp (Nilsberth *et al.*, 2001). Aufgrund der Lokalisierung dieses Hot Spots in enger Nachbarschaft zu der für die Aggregation verantwortlichen KLVFF-Region haben Mutationen in diesem Bereich häufig einen Effekt auf Konformation, Oligomerisierung sowie Fibrillenbildung des A β -Peptids und führen in den meisten Fällen zum Krankheitsbild der zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) mit massiven Amyloid-Ablagerungen in den zerebralen Blutgefäßen und damit einhergehenden Gehirnblutungen (Nilsberth *et al.*, 2001). Die Mutationen E22Q (Dutch; Levy *et al.*, 1990), E22K (Italian; Tagliavini *et al.*, 1999) und D23N (Iowa; Grabowski *et al.*, 2001; Tycko *et al.*, 2009) führen u.a. zu einer beschleunigten Fibrillenbildung, wobei die Fibrillen teilweise auch andere Struktur aufweisen. Die Flämische Mutation (A21G; Hendriks *et al.*, 1992) führt zu erhöhten Mengen an A β 40 und A β 42, insbesondere zu einer Erhöhung des Verhältnisses zwischen A β 40/42 und dem kürzeren p3-Peptid, was eine reduzierte Aktivität der α -Sekretase andeutet. Lediglich die arktische Mutation (E22G; Nilsberth *et al.*, 2001), welche eine drastisch erhöhte Bildung von Protofibrillen induziert, weist einen klassischen jedoch deutlich früher einsetzenden Alzheimer-Phänotyp auf.

Die Koinzidenz dieses Hot Spots mit dem von Lcn2_US7 erkannten Epitop steht im Einklang mit der wichtigen Rolle dieser A β -Region für die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. Da Glu^{P22} und Asp^{P23} des A β -Peptids ein ausgeprägtes Netzwerk an Wechselwirkungen mit Aminosäuren des Anticalins in dem gebildeten Komplex haben (s. Abschnitt 3.6.3), ist allerdings ein therapeutischer Nutzen dieses Anticalins speziell bei familiären Formen der Alzheimer-Krankheit, die mit Mutationen an Glu^{P22} und Asp^{P23} einhergehen, nicht zu erwarten. Tatsächlich sollte die Affinität des Anticalins zu diesen Versionen des A β -Peptids aufgrund dieser Aminosäureaustausche negativ beeinflusst werden. Aufgrund des äußerst seltenen Auftretens dieser vererbten Formen, welche zusammen mit allen bekannten Mutationen in APP sowie den Presenilinen insgesamt nur 1 % aller Alzheimer-Fälle darstellen (Bateman *et al.*, 2011), wäre dies allerdings kein Hindernis für eine therapeutische Anwendung der selektierten A β -spezifischen Lcn2'-Varianten für die überwiegende Mehrzahl aller Alzheimer-Patienten, bei denen das zentrale A β -Epitop die Wildtyp-Sequenz aufweist. Um die Chancen einer erfolgreichen Therapie zu erhöhen, könnte vor Verabreichung der

Anticaline zudem eine Genotypisierung der Patienten in Bezug auf das APP-Gen vorgenommen werden.

Im Gegensatz zu den erwähnten A β -Varianten mit Mutationen im Bereich der α -Sekretaseschnittstelle, können N- bzw. C-terminal modifizierte A β -Peptide mit großer Wahrscheinlichkeit von Lcn2_US7 erkannt, gebunden und blockiert werden. Einige dieser modifizierten A β -Varianten spielen eine wichtige Rolle bei sporadischen Formen der Alzheimer-Krankheit. So wurde beispielsweise gezeigt, dass an Position Ser^{P8} phosphoryliertes A β *in vitro* eine verstärkte Tendenz zur Oligomerisierung aufweist. Zudem kann es in Hirnpräparaten von transgenen Mäusen und Alzheimer-Patienten identifiziert werden und führt in Drosophila-Modellen zu einer erhöhten Toxizität (Kumar *et al.*, 2011). Pyroglutamat-A β , eine an Position 3 bzw. Position 11 verkürzte A β -Version, in welcher der N-terminale Glutamatrest durch das Enzym Glutaminylcyclase cyclisiert wird, weist nicht nur eine erhöhte Tendenz zur Bildung von toxischen Aggregaten auf, sondern ist zusätzlich resistent gegenüber proteolytischem Abbau, und stellt eine in Alzheimer-Patienten verstärkt auftretende A β -Spezies dar (Gunn *et al.*, 2010).

Neben der offenbar relevanten Rolle im Verlauf der Amyloid-Aggregation ist die beschriebene zentrale A β -Sequenz auch entscheidend für den natürlichen Abbau des Peptids durch die Protease Insulysin (Guo *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2006). Insulysin (IDE, *Insulin Degrading Enzyme*; Qiu & Folstein, 2006) ist eine Schwefel-Metalloproteinase, die neben Insulin u.a. auch das monomere A β -Peptid sowie Amylin als Substrate erkennt. Ein reduzierter proteolytischer Abbau von A β -Peptiden durch Insulysin wie auch andere A β -spezifische Proteasen und die dadurch induzierte Ansammlung der A β -Peptide spielt höchstwahrscheinlich eine Rolle im Verlauf der sporadischen Alzheimer-Krankheit (Leissring, 2008). In diesem Zusammenhang wurde in Studien mit transgenen Mausmodellen gezeigt, dass reduzierte Insulysin Aktivität zu erhöhter Menge an A β -Peptiden im Gehirn führt (Miller *et al.*, 2003) bzw. dass Überexpression von Insulysin in Neuronen die Konzentration an A β -Peptiden im Gehirn reduziert und die Plaque-Bildung sowie den frühzeitigen durch das APP-Transgen induzierten Tod der Mäuse verhindert (Leissring *et al.*, 2003).

Im Verlauf der Spaltung des A β -Peptids durch Insulysin werden die drei N-terminalen Aminosäuren des Peptids an der Exosite der Protease gebunden, während das zentrale A β -Epitop KLVFFAED (Positionen 16-23 des Peptids) im aktiven Zentrum der Protease erkannt und u.a. zwischen den Aminosäuren Phe^{P19}, Phe^{P20} und Ala^{P21} gespalten wird. Durch Bindung desselben Epitops in A β könnte das Anticalin den natürlichen Abbau durch Insulysin inhibieren. Andere Bindeproteine bzw. Antikörper mit Spezifität vor allem für N-terminale Epitope sollten die Interaktion mit Insulysin und somit die Proteolyse von A β allerdings in vergleichbarem Maße inhibieren.

Der durch aktive Immunisierung mit dem zentralen A β -Peptid generierte Antikörper m266, welcher sich in der humanisierten Form als Solanezumab in klinischen Studien der Phase III befindet, bindet ein ähnliches, zentrales Epitop des A β -Peptids (Samadi & Sultzer, 2011). Frühe Studien in transgenen Mäusen postulieren, dass dieser Antikörpers gemäß der peripheren „Sink“-Hypothese wirkt (DeMattos *et al.*, 2001; DeMattos *et al.*, 2002), welche besagt, dass die A β -Last im Gehirn durch Bindung von monomeren A β in der Peripherie reduziert werden kann, ein Mechanismus, demzufolge Anticaline eine vergleichbare Wirkung zeigen könnten (s. Abschnitte 1.3.3 und 4.5).

4.4 Lcn2_US7: hochaffine Bindung des A β -Peptids in der Bindungstasche

Die Kristallstruktur des Komplexes aus Lcn2_US7 und dem A β 40-Peptid zeigt, dass das Peptid tief in der Bindungstasche des Anticalins gebunden wird. Der Großteil der Struktur des Anticalins ist anhand der Elektronendichte definiert und die hohe Auflösung des Datensatzes von 1,7 Å erlaubt die detaillierte Analyse der Interaktion mit dem A β -Peptid. Das Anticalin wechselwirkt durch zahlreiche hydrophobe Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken mit dem zentralen Segment des A β 40-Peptids, was die hohe Affinität um 1 nM erklärt.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Lcn2'-Bibliothek ist eine für einen breiten Einsatzbereich weiter entwickelte Version der beiden zuvor erfolgreich eingesetzten Hapten- und Proteinspezifischen Lcn2-Bibliotheken (Kim *et al.*, 2009a; Schönfeld *et al.*, 2009). Anhand der Kristallstrukturen von daraus resultierenden Anticalin•Target-Komplexen wurden 6 Reste der Hapten-spezifischen Bibliothek (Leu³⁶, Ile⁴¹, Tyr⁵², Ser⁶⁸, Arg⁸¹, Lys¹³⁴), 9 Reste der Proteinspezifischen Bibliothek (Ala⁴⁰, Gln⁴⁹, Arg⁷², Lys⁷³, Asp⁷⁷, Leu¹⁰³, Lys¹²⁵, Ser¹²⁷, Tyr¹³²), 2 Reste aus beiden Bibliotheken (Leu⁷⁰, Trp⁷⁹) und 3 neue Reste (Asn⁹⁶, Tyr¹⁰⁰, Tyr¹⁰⁶) zur Randomisierung ausgewählt. Von diesen insgesamt 20 mutierten Positionen interagieren im Fall von Lcn2_US7 13 über ihre Seitenketten mit dem A β -Peptid. Hierbei waren 5 ebenfalls in der Hapten-spezifischen Bibliothek (Val³⁶, Tyr⁵², Ser⁶⁸, Arg⁸¹, Asn¹³⁴), 6 in der Proteinspezifischen Bibliothek (Lys⁴⁰, Trp⁴⁹, His⁷⁷, Arg¹⁰³, Val¹²⁵, Gln¹²⁷) und einer in beiden früheren Bibliotheken (Lys⁷⁹) randomisiert. Dies bestätigt das erfolgreiche Konzept der neuen Lcn2-basierten Anticalin-Bibliothek (Gebauer *et al.*, 2013) und zeigt zudem, dass mit keiner der älteren Bibliotheken ein Anticalin wie Lcn2_US7 selektierbar gewesen wäre.

Die Strukturanalyse des Komplexes aus der Hapten-spezifischen Variante Lcn2 Tb7.N9 und ihrem Liganden Y³⁺•DTPA (Kim *et al.*, 2009a) ergab, dass 15 Reste des Anticalins im Abstand von 4 Å mit dem Liganden Y³⁺•DTPA interagieren. Durch strukturellen Vergleich mit dem in dieser Arbeit gelösten Anticalin•Peptid-Komplex wird deutlich, dass das A β -Peptid vergleichbar tief in die Anticalin-Bindungstasche eindringt und mit 14 der für die

Bindung von Y^{3+} •DTPA verantwortlichen Positionen interagiert, wobei allerdings in 10 der Fälle andere Seitenketten vorhanden sind. Dagegen sind nur 11 der 20 für die Interaktion mit CTLA-4 verantwortlichen Reste (Schönfeld, 2010) auch an der Bindung des A β -Peptids beteiligt, was allerdings nicht überrascht, da CTLA-4 als voluminöser Proteinligand verstärkt mit den exponierten Schleifensegmenten des Anticalins wechselwirkt.

Die N- und C-terminalen Bereiche des A β -Peptids sind in der Elektronendichte des US7•A β 40-Komplexes nicht aufgelöst, was andeutet, dass diese eine hohe Flexibilität besitzen und ungeordnet in das Lösungsmittel ragen.

Die wichtige Rolle einiger der an der Bindung des A β -Peptids beteiligten Aminosäurepositionen wird im Sequenz-Alignment von Lcn2_US7 mit den in der Doktorarbeit von Dominik Hinz beschriebenen A β -spezifischen Lcn2'-Varianten deutlich (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Obwohl die Anticaline gegen unterschiedliche A β -Targets (Trx-A β 28-DIG bzw. A β 40-Bio) selektiert wurden, binden sie das gleiche zentrale Epitop und weisen Übereinstimmung in 6 der 20 randomisierten Positionen auf (Tyr⁵², Ser⁶⁸, Gly⁷⁰, Lys⁷⁹, Arg⁸¹, Asn¹³⁴). Diese 6 Reste sind im Fall von Lcn2_US7 signifikant an der Bindung des A β 40-Peptids beteiligt, was in der Kristallstruktur des Komplexes deutlich wird und das hohe Maß an Konservierung erklärt. Hierbei erscheinen die beiden basischen Reste Lys⁷⁹ und Arg⁸¹ besonders wichtig, da sie durch Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken mit den zentralen sauren Resten Glu^{P22} und Asp^{P23} des A β -Peptids wechselwirken. Man nimmt an, dass es im Verlauf der Fibrillenbildung zur Ausbildung stabilisierender intermolekularer Salzbrücken zwischen Asp^{P23} und Lys^{P28} in benachbarten A β -Peptiden kommt (Luhrs *et al.*, 2005) – neben zahlreichen hydrophoben Interaktionen. Durch Interaktion mit Asp^{P23} des A β -Peptids übernehmen die beiden basischen Anticalin-Reste daher eine ähnliche elektrostatische Rolle wie Lys^{P28} in einem benachbarten Fibrillen-Peptid und behindern somit die Oligomerisierung.

Wie in Abschnitt 3.6.3 dargestellt, besitzt das in der Bindungstasche des Anticalins gebundene A β -Segment eine charakteristische Konformation mit einem Knick im zentralen Bereich. Zur Analyse der funktionellen Signifikanz dieser Peptidkonformation wurde dieser zentrale Bereich des A β -Peptids mit anderen in der PDB veröffentlichten A β -Strukturen verglichen (Abbildung 64). Neben den NMR-Strukturen eines A β 42-Monomers mit zwei α -Helices (PDB 1Z0Q; Tomaselli *et al.*, 2006) und einer A β 42-Fibrille (PDB 2BEG; Luhrs *et al.*, 2005) wurden zwei A β -Komplexe in die Analyse einbezogen. PDB 2G47 (Shen *et al.*, 2006) repräsentiert die Röntgenkristallstruktur von A β 40 im Komplex mit Insulysin, der oben erwähnten humanen Protease, welche neben Insulin auch das A β -Peptid als Substrat bindet. Hierbei sind die Peptidpositionen A β (1-3) und A β (16-23) in der Kristallstruktur aufgelöst. Die Struktur des A β 40-Monomers (Positionen A β (16-40)) im Komplex mit dem dimeren Affibody Z_{A β 3} wurde durch NMR gelöst und zeigt einen β -Hairpin (PDB 2OTK; Hoyer *et al.*,

2008). Als fünfte Struktur wurde ein Fusionsprotein analysiert, in welchem das p3-Fragment von A β entsprechend den Peptidpositionen A β (18-41) in den CDR3 einer monomeren VNAR-Immunglobulinomäne aus Haifisch inseriert war (3MOQ; Streltsov *et al.*, 2011).

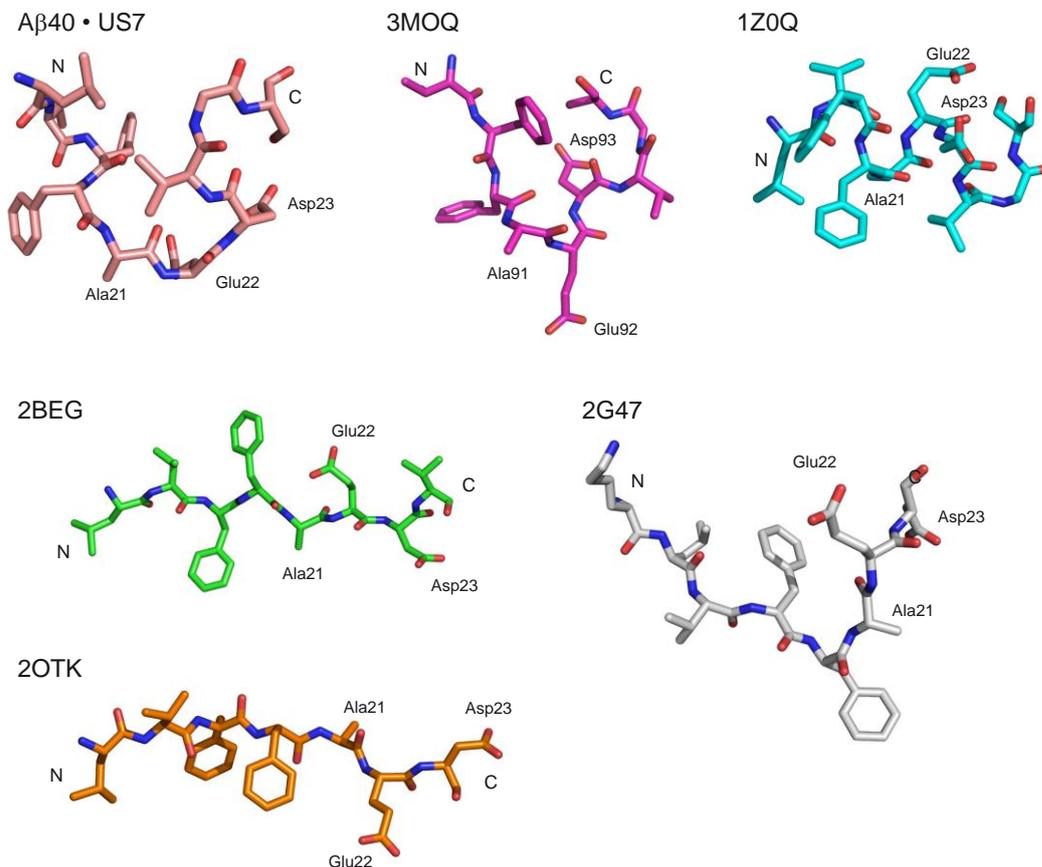


Abbildung 64: Struktureller Vergleich der Konformationen unterschiedlicher A β -Peptide. Die Peptide sind als Stabmodelle dargestellt und entsprechend den Elementen gefärbt (Sauerstoff rot, Stickstoff blau und Kohlenstoff abhängig von der jeweiligen Struktur). Die Aminosäurepositionen mit Mutationen in speziellen familiären Formen der Alzheimer-Krankheit sind bezeichnet. Folgende A β -Strukturen sind dargestellt: A β 40 im Komplex mit US7 (PDB 4MVI; aa17-26, rosa), A β (18-41) inseriert in den CDR3 eines Haifischantikörpers (PDB 3MOQ; aa88-96 entsprechend A β (18-26), magenta), A β 42-Monomer in Lösung (PDB 1Z0Q; aa17-26, cyan), Fibrillenstrukturmodell von A β 42 (PDB 2BEG; aa17-24, grün), A β 40 im Komplex mit Insulysin (PDB 2G47; aa16-23, grau), A β 40 im Komplex mit dem dimeren Affibody Z $_{A\beta 3}$ (PDB 2OTK; aa17-23, orange).

Die C α -Atome der zentralen sechs A β -Positionen (Val^{P18}–Asp^{P23}) der in dieser Arbeit gelösten A β 40-Struktur wurden mit jedem der beschriebenen fünf A β -Modelle überlagert und bezüglich ihrer konformationellen Unterschiede analysiert (Überlagerung nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der doppelt geknickten A β -Konformation im Komplex mit Lcn2_US7 zeigt die

Mehrheit der veröffentlichten A β -Strukturen eine lineare Konformation dieses A β -Segments, was zu großen strukturellen Abweichungen mit hohen RMSD-Werten von $>2,2$ Å führt. Lediglich die Struktur des p3-Fragments im CDR3 des Haifischantikörpers weist eine ähnliche Konformation auf mit einem Turn im Peptidrückgrat (vgl. Abbildung 64).

Das durch den dimeren Affibody gebundene A β 40-Monomer bildet einen β -Hairpin, in dem die hier diskutierten Positionen Leu^{P17}-Asp^{P23} einen der beiden Stränge ausbilden und somit in gestreckter Konformation vorliegen (Hoyer *et al.*, 2008). Dieser β -Hairpin wurde als (erster) Übergangszustand im Verlauf der Amyloid-Aggregationskaskade postuliert, weswegen der dimere Affibody Z_{A β 3} fähig sein soll durch Bindung dieses Hairpins die weitere Aggregation zu verhindern. Im Gegensatz dazu wird durch die geknickte Konformation des an das Anticalin gebundenen A β -Peptids bereits die Ausbildung dieses β -Hairpins verhindert und so die Aggregation potentiell an einem früheren Zeitpunkt blockiert. Zudem werden zahlreiche Reste, die Schlüsselpositionen für die Interaktion von A β -Peptiden darstellen, wie beispielsweise Phe^{P19} (aromatische π - π -Interaktionen) oder Asp^{P23} (intermolekulare Salzbrücke), tief in der Bindungstasche des Anticalins begraben, wodurch die Wechselwirkung zwischen den einzelnen A β -Peptiden sterisch verhindert und so die Aggregation und die wahrscheinlich sogar noch schädlichere Bildung von toxischen Oligomeren bereits im Keim unterdrückt wird.

4.5 Therapeutisches Potential der A β -spezifischen Anticaline

Die passive Immunisierung von transgenen Mäusen mit unterschiedlichen A β -spezifischen Antikörpern führte in zahlreichen Studien zu deutlichen Verbesserungen der Gedächtnisleistung und der Plaque-Pathologie (Lichtlen & Mohajeri, 2008). Aufgrund dieser aussichtsreichen Daten in Tiermodellen wurden zahlreiche präklinisch erfolgreiche Antikörper in klinische Studien aufgenommen, wo sie in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung für die experimentelle Behandlung der Alzheimer-Krankheit gewonnen haben (Delrieu *et al.*, 2012). Neben Fc-abhängigen Wirkmechanismen, wie beispielsweise der Aktivierung von Mikrogliazellen, können auch Fc-unabhängige Mechanismen signifikant zur Reduktion der Amyloid-Last im Gehirn beitragen, was u.a. in Tierexperimenten mit Antikörperfragmenten gezeigt wurde (Bacskai *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2005).

In Studien, in denen A β -spezifische F(ab')₂-Fragmente lokal, d.h. direkt in den Schädel, oder systemisch verabreicht wurden, konnte beispielsweise die Zahl der Amyloid-Plaques ähnlich wie mit dem entsprechenden Volllängen-Antikörper reduziert werden, allerdings bei deutlich verminderter Infiltration von Phagozyten (Bacskai *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2005). In einer anderen Studie führte die periphere Applikation von A β -bindenden Molekülen, wie Gelsolin, einem 82-kDa Protein, das in seiner sekretorischen Form unter physiologischen Bedingungen Komplexe mit A β bildet (Chauhan *et al.*, 1999), sowie dem Gangliosid GM-1, einem

Glycosphingolipid mit mikromolarer Affinität für A β (Choo-Smith *et al.*, 1997), zur Reduktion von aggregiertem A β 40 und A β 42 im Gehirn von jungen PS/APP-transgenen Mäusen (Matsuoka *et al.*, 2003). Die aktive Immunisierung von transgenen APP-Mäusen, in denen der für die Mikrogliazell-vermittelte Phagozytose notwendige Fc γ R-Rezeptor gentechnisch entfernt worden war (Das *et al.*, 2003), wies ebenfalls darauf hin, dass Fc-vermittelte Mechanismen keine bzw. nur eine nebensächliche Rolle für die Reduktion der Amyloid-Last spielen.

In einer neueren Studie wurde zudem gezeigt, dass die passive Immunisierung mit der deglycosylierten Form eines A β -spezifischen Antikörpers, welche reduzierte Effektorfunktionen aufweist, im Mausmodell ebenfalls zur signifikanten Reduktion der A β -Last und zu Verbesserungen von kognitiven Fähigkeiten führt, allerdings unter deutlich verringertem Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen, wie Mikrohäorrhagien (Wilcock *et al.*, 2006). Vergleichbare Ergebnisse wurden in transgenen Mausmodellen für unterschiedliche A β -spezifische scFv-Fragmente gezeigt, die über virale Vektoren appliziert wurden (Levites *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2010). Aufgrund der Bedeutung von Fc-unabhängigen Mechanismen einerseits und andererseits den Risiken, die mit einer Antikörperbehandlung einhergehen, könnte alternativen Bindungsproteinen wie den Anticalinen in Zukunft also eine Rolle bei der Behandlung der Alzheimer-Krankheit zukommen.

Die in klinischen Studien am ausgiebigsten analysierten Antikörper Bapineuzumab und Solanezumab binden N-terminale (Positionen 1-5) bzw. zentrale Segmente (Positionen 16-23) des A β -Peptids. Bapineuzumab, der die Amyloid-Plaques hauptsächlich über Fc-vermittelte Phagozytose reduziert, zeigte in klinischen Studien der Phase II in Abhängigkeit vom ApoE-Trägerstatus der behandelten Patienten deutliche Unterschiede in der Wirkung auf die Amyloid-Last und die kognitiven Fähigkeiten. Während passive Immunisierung in Patienten negativ für den wichtigsten genetischen Risikofaktor der Alzheimer-Krankheit, dem ϵ 4-Genotyp des humanen Apolipoprotein E (Corder *et al.*, 1993), zu Verbesserungen in kognitiven und funktionellen Endpunkten führte, wurden bei Trägern von ApoE ϵ 4 keinerlei positive Veränderungen nachgewiesen (Salloway *et al.*, 2009). Zusätzlich waren 10 der insgesamt 12 Patienten, die ein vasogenes Ödem entwickelten, positiv für ApoE ϵ 4, was die schlechtere Verträglichkeit der Bapineuzumab-Behandlung in dieser Patientengruppe verdeutlicht. Allerdings wurden in darauffolgenden klinischen Studien der Phase III, in denen die behandelten Patienten gemäss ApoE ϵ 4-Genotyp stratifiziert worden waren, in beiden Gruppen die klinischen Endpunkte nicht erreicht (Salloway *et al.*, 2014), woraufhin alle Studien mit intravenösem Bapineuzumab eingestellt wurden.

Solanezumab bindet hauptsächlich lösliche A β -Formen und zeigte in klinischen Studien der Phase II ebenfalls pharmakologische Aktivität, allerdings nur in Bezug auf zerebrospinale und Plasma-Biomarker, nicht jedoch auf kognitive Fähigkeiten (Farlow *et al.*, 2012). Im Vergleich

zu Bapineuzumab wies Solanezumab keinerlei Unterschiede in Abhängigkeit vom ApoE-Status der behandelten Patienten auf und zeigte zudem deutlich bessere Verträglichkeit, ohne Anzeichen an vasogenem Ödem oder Mikrohämmorrhagien. Intravenöse Applikation von Solanezumab in Patienten mit milder bis mittelschwerer Alzheimer-Krankheit führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der A β 40- und A β 42-Plasmakonzentration und zu einer damit korrelierenden Abnahme der Amyloid-Ablagerungen im Gehirn (Farlow *et al.*, 2012). Dies läßt darauf schließen, dass Solanezumab möglicherweise wirklich gemäß der peripheren „Sink“-Hypothese wirkt und A β aus den amyloiden Plaques mobilisiert. Aufgrund der Spezifität für ein zentrales Epitop im Bereich von A β (16-23) ist Solanezumab zudem fähig, vermeintlich stärker aggregierende N-terminal verkürzte und modifizierte Versionen zu binden (DeMattos *et al.*, 2009). Allerdings wurden auch mit Solanezumab die klinischen Endpunkte in einer großen klinischen Studie der Phase III nicht erreicht (Doody *et al.*, 2014). Da Solanezumab aber zu einer signifikanten Verbesserung in Patienten mit milder Alzheimer-Krankheit führte, wurde eine neue Phase III Studie (EXPEDITION 3) in ausschließlich diesen Patienten im Frühstadium der Alzheimer-Krankheit gestartet (Karran & Hardy, 2014). Zusätzlich werden Solanezumab sowie Roche's Gantenerumab und Genentech's Crenezumab derzeit in drei großen Alzheimer Präventionsstudien getestet (Corbyn, 2013; Mullard, 2012). Die Ergebnisse der klinischen Studien mit den monoklonalen Antikörpern Bapineuzumab und Solanezumab sowie mit Gammagard (Loeffler, 2013), Baxter's Mischung humaner Immunglobuline, geben Anlass zu der Annahme, dass eine Anti-Amyloid-Therapie bei klinisch symptomatischen Patienten zu spät kommt und eigentlich viel früher einsetzen müsste (Panza *et al.*, 2014). Dies wird auch von Biomarker-Studien gestützt, die zeigen, dass die Amyloidablagerung zwei bis drei Jahrzehnte vor den eigentlichen klinischen Symptomen beginnt. Aus diesem Grund zielen die drei neuartigen Präventionsstudien darauf ab, Patienten, die ein erhöhtes Krankheitsrisiko besitzen, bereits vor dem Auftreten der ersten Symptome, zu behandeln.

Durch hochaffine Bindung des gleichen zentralen Epitops sind die in dieser und in der Doktorarbeit von Dominik Hinz selektierten Lcn2'-Varianten im Prinzip aussichtsreiche Kandidaten für den Einsatz zur präsymptomatischen Behandlung der Alzheimer-Erkrankung. Um dieses Potential genauer zu analysieren, wurden zunächst die Effekte dieser Anticaline auf die A β -Aggregation sowie auf die A β -vermittelte Neurotoxizität *in vitro* untersucht (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Ähnlich wie die murine Version von Solanezumab (Legleiter *et al.*, 2004) inhibieren die A β -spezifischen Lcn2'-Varianten die A β -Fibrillogenese im Thioflavin T Assay spezifisch und in Abhängigkeit von der eingesetzten Anticalin-Konzentration. Während äquimolare Konzentrationen der Anticaline die A β 40-Aggregation komplett inhibierten, führten substöchiometrische Konzentrationen je nach analysierter Variante immer noch zu signifikanten Verzögerungen bzw. partieller Inhibition der Amyloid-Aggregation. Lcn2_US7

besaß hierbei bis zu einem Verhältnis von 1:5 (Anticalin:A β) einen Aggregationsverzögernden Effekt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Lcn2'-Varianten bevorzugt eine oligomerisierungs-kompetente Form des A β -Peptids binden und auf diese Weise die Aggregation verlangsamen. Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem dimeren Affibody Z_{A β 3} erhalten, der die A β -Aggregation ebenfalls nur in äquimolaren Mengen vollständig inhibiert und die Aggregationskinetik in einem substöchiometrischen Verhältnis von 1:2 (Affibody:A β) ähnlich verlangsamt (Hoyer *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu zeigt der für ein konformationelles A β -Epitop spezifische dimere Nanobody B10AP Inhibition der A β -Aggregation schon in einem subäquimolaren Verhältnis von 1:10 (Habicht *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um eine isolierte Immunoglobulindomäne aus Kamelen, die durch *Phage Display* selektiert wurde und A β -Protofibrillen und -Fibrillen, nicht aber Monomere erkennt. Der Nanobody bindet hierbei höchstwahrscheinlich ein Epitop auf den fibrillären A β -Aggregaten und verhindert so schon in geringen Mengen die Anlagerung weiterer A β -Monomere bzw. A β -Oligomere.

Zusätzlich zum Aggregationsassay wurde in Zellkultur-Experimenten mit PC12-Zellen, einer Ratten-Phäochromozytom-Zelllinie, die mit NGF (*Nerve Growth Factor*) zu einem neuronalen Phänotyp differenziert wurde (Greene & Tischler, 1976), die Fähigkeit der Anticaline zur Reduktion der A β 42-vermittelten Neurotoxizität analysiert (Rauth *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Hierbei konnte ein dosisabhängiger, protektiver Effekt gegenüber präaggregiertem A β 42 nachgewiesen werden, was das Potential dieser Proteine als anti-A β -Therapeutika erneut unterstreicht. Das Ausmaß dieses protektiven Effekts variierte in Abhängigkeit von der analysierten Variante und war für Lcn2_US7 weniger stark ausgeprägt. Dieser verminderte Effekt ist möglicherweise auf eine erhöhte Zytotoxizität der verwendeten Lcn2_US7-Präparation zurückzuführen, welche in Kontrollexperimenten in Abwesenheit von A β 42 zu einer reduzierten Überlebensrate der Zellen führte und möglicherweise durch unzureichende Abtrennung bakterieller Endotoxine zu erklären ist.

Die vielversprechenden Ergebnisse der *in vitro* Experimente mit den A β -spezifischen Lcn2'-Varianten lassen erwarten, dass das Potential dieser Anticaline als anti-A β -Therapeutika durch *in vivo* Experimente in transgenen Mausmodellen bestätigt werden kann. Aufgrund der Bindung eines zentralen Epitops im monomeren A β -Peptid ist ein Effekt der Anticaline entsprechend der peripheren „Sink“-Hypothese zu erwarten. Neben dem reduzierten Risiko für immunologische Nebenwirkungen kann sich die Abwesenheit der Fc-Region und, verglichen mit Antikörpern, die dadurch deutlich reduzierte Plasma-Halbwertszeit der Anticaline speziell in dieser Anwendung positiv auf die Aktivität der Anticaline auswirken und eine rasche Eliminierung der komplexierten A β -Peptide begünstigen. Sollte allerdings eine längere Zirkulationsdauer vorteilhaft sein, können sowohl etablierte als auch innovative Technologien zur Erhöhung der Plasma-Halbwertszeit angewandt werden (Kontermann, 2011). Beispiele hierfür sind die klassische, chemische Konjugation mit Polyethylenglycol

(PEG; Jevsevar *et al.*, 2010), die genetische Fusion mit der Fc-Domäne von Antikörpern (Huang, 2009), mit Albumin (Sleep *et al.*, 2013) bzw. mit Albumin-bindenden Proteinen oder Peptiden sowie die vor kurzem entwickelte PASylierung (Schlappschy *et al.*, 2013).

Gemäß der peripheren „Sink“-Hypothese sollte die Anwesenheit von hochaffinen A β -bindenden Proteinen im Blut ausreichen, um einen Abfluss von A β aus dem ZNS zu induzieren und so die Amyloid-Last im Gehirn zu reduzieren. Aufgrund der geringen Größe, der äußerst kompakten Struktur und der sehr hohen Stabilität der Anticaline könnten diese darüberhinaus möglicherweise sogar mittels rezeptorvermittelter Transzytose über die Blut-Hirn-Schranke hinweg in das Gehirn eingeschleust werden, um dort vor Ort die Oligomerisierung der A β -Peptide und die dadurch vermittelte Toxizität zu blockieren. Dies könnte beispielsweise durch Fusion der Anticaline mit Proteindomänen bzw. Peptiden mit Bindungsspezifität für Rezeptoren, die sich auf der luminalen Seite der Hirn-Endothelzellen befinden und die Transzytose ihrer natürlichen Liganden über die Blut-Hirn-Schranke hinweg vermitteln, erreicht werden, wie z.B. dem Transferrin-, dem Insulin- oder dem *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptor (Niewoehner *et al.*, 2014; Pardridge, 2010). Als vielversprechendes hypothetisches Konstrukt erscheint in diesem Zusammenhang eine Fusion aus einem A β -spezifischen Anticalin mit einem zweiten Anticalin mit Spezifität für einen der genannten Rezeptoren als sogenanntes Duocalin (Schlehuber & Skerra, 2001), was die Vorteile der Anticalin-Technologie mit den Möglichkeiten zum zielgerichteten Transport kombinieren könnte.

Basierend auf den erfolgversprechenden *in vitro* Experimenten steht dieses Projekt nun vor einer äußerst interessanten, aber auch kritischen Phase, in welcher Experimente in transgenen Mausmodellen zeigen werden (Oddo *et al.*, 2003), ob die selektierten Anticaline ihren Erwartungen auch *in vivo* gerecht werden und eine weitere Entwicklung zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit damit rechtfertigen. Hierbei soll zunächst die periphere systemische Applikation der Anticaline untersucht werden, bevor in Folgeexperimenten eventuell der gerichtete Transport über die Blut-Hirn-Schranke studiert werden kann.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das A β -Peptid als relativ kleines, hydrophobes Molekül mit der Anticalin-Architektur hervorragend adressiert werden kann, und dass es möglich ist hochaffine und spezifische Anticaline gegen dieses Peptid-Target zu generieren. Diese Resultate in Kombination mit den bisher beschriebenen Protein- und Hapten-spezifischen Anticalinen (u.a. Beste *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2009a; Schönfeld *et al.*, 2009) bestätigen die Vielseitigkeit und breite Anwendbarkeit dieses Proteingerüsts, welches Moleküle unterschiedlichster Klassen mit hohen Affinitäten binden kann und sich somit deutlich von anderen alternativen Bindungsproteinen abhebt (Richter *et al.*, 2014). Die unterschiedlichen Ergebnisse aus den Selektionsexperimenten mit Anticalin-Bibliotheken basierend auf drei verschiedenen Lipocalin-Gerüsten zeigen zudem, dass die Art

des Lipocalin-Proteingerüsts und die Auswahl der bei der Generierung der Zufallsbibliothek randomisierten Aminosäurepositionen für die Erfolgswahrscheinlichkeit der Selektion wichtig sind und zudem Ansatzpunkte für die weitere Entwicklung der Anticalin-Technologie liefern. Insbesondere die Strukturaufklärung des Komplexes aus Lcn2_US7 und dem A β -Peptid liefert wichtige Erkenntnisse in Bezug auf die Anticalin-Peptid-Interaktion im Allgemeinen und trägt somit zum Verständnis der Bindungsmechanismen der Anticaline bei, was einen weiteren Beitrag liefert, um diese vielversprechende Technologie zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Die Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Krankheit stellt das A β -Peptid an die Spitze einer Kaskade, welche letztendlich zum neuronalen Zelltod und zur fortschreitenden Demenz führt. A β , welches durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins generiert wird und sich mit zunehmendem Alter im Gehirn anhäuft, bildet zunächst lösliche, toxische Oligomere, die im weiteren Verlauf der Krankheit aggregieren und sich in neuritischen Plaques ablagern. Im Hinblick auf spätere diagnostische und therapeutische Anwendungen sollten im Rahmen dieser Arbeit Anticaline entwickelt werden, welche durch Komplexierung des löslichen A β -Monomers dessen Aggregation und toxische Wirkung blockieren.

Anticaline sind künstliche Bindungsproteine, die sich von der Familie der Lipocaline ableiten und auf einer stabilen β -Fass-Struktur mit vier variablen Peptidschleifen, vergleichbar den CDRs von Antikörpern, als zentralem Strukturmotiv beruhen. Gegenüber Antikörpern besitzen Anticaline allerdings biotechnologische Vorteile, wie u.a. ihre geringe Größe, die Möglichkeit zur einfachen genetischen Manipulation aufgrund des Aufbaus aus einer einzelnen kurzen Polypeptidkette sowie die effiziente Produktion in *E. coli*.

Zur Selektion und Charakterisierung von A β -spezifischen Anticalinen wurden unterschiedliche Versionen des A β -Peptids eingesetzt: das synthetische Vollängen-Peptid A β 40 sowie dessen Fragmente A β (1-11) und A β (16-27). Zusätzlich dienten zwei Fusionsproteine als lösliche Ziel-Moleküle zur Präsentation der relevanten A β -Sequenzen: MBP-A β 40, in welchem A β 40 C-terminal mit dem bakteriellen Maltose-Bindungsprotein fusioniert worden war, und Trx-A β 28, in welchem die Reste 1-28 von A β in den Schleifenbereich des aktiven Zentrums von Thioredoxin aus *E. coli* inseriert worden waren. Beide Fusionsproteine wurden in hohen Ausbeuten im Cytoplasma von *E. coli* produziert und gereinigt.

Zur Selektion von A β -spezifischen Anticalinen wurden randomisierte Phagemid-Bibliotheken basierend auf drei humanen Lipocalinen eingesetzt: dem Tränenlipocalin (Tlc, Lcn1), dem Apolipoprotein D (ApoD) und dem Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertem Lipocalin (NGAL, Lcn2). Hierbei wurden jeweils 18 bis 20 ausgewählte Positionen im offenen Bereich der Ligandenbindungstasche sowie den angrenzenden Bereichen der Peptidschleifen einer ortsgerichteten Zufallsmutagenese ausgesetzt und so Bibliotheken mit mindestens 10^9 unabhängigen Varianten generiert. Daraufhin wurden *Phage Display*-Selektionsexperimente mit biotinylierten A β -Peptiden bzw. mit digoxigeninmarkiertem Trx-A β 28 durchgeführt. Durch Kolonie-Filterstapel-Test und/oder Screening-ELISA wurden die angereicherten Anticalin-Populationen schließlich auf A β -spezifische Varianten durchmustert. Aussichtsreiche Anticaline wurden löslich exprimiert und bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften (z.B. Oligomerisierungsverhalten) und ihrer Bindungseigenschaften für A β -Peptide charakterisiert.

Da das humane ApoD im Vergleich zu anderen Lipocalinen ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften zeigt, wurde zur Herstellung der ApoD-Bibliothek eine solubilisierte Variante eingesetzt, in der eine Reihe von oberflächenexponierten, apolaren Resten ersetzt worden waren. Dennoch gelang es nicht, lösliche, monomere ApoD-Varianten mit hoher Affinität für das A β -Peptid zu isolieren, was andeutet, dass eine weitere Optimierung dieses Lipocalin-Gerüsts erforderlich ist.

Im Gegensatz dazu konnte mit der Lcn1-basierten Bibliothek die A β -spezifische Variante Lcn1_3.3-23 isoliert werden. In ELISA und SPR-Experimenten wurde gezeigt, dass Lcn1_3.3-23 das zentrale Peptidepitop A β (16-27) spezifisch mit nanomolarer Affinität bindet. Allerdings zeigte Lcn1_3.3-23 eine starke Tendenz zur Dimerisierung und eluierte als stabiles Dimer in der Größenausschlusschromatographie, weshalb Studien zur Monomerisierung dieses Anticalins durchgeführt wurden. Hierbei wurde die wichtige Rolle der – in dieser Bibliothek eliminierten – nativen Disulfidbrücke für das Oligomerisierungsverhalten und die Stabilität von Lcn1-basierten Anticalinen deutlich. Infolgedessen wurden ausführlichere Studien zur Stabilisierung des Lcn1-Gerüsts durchgeführt und verbessernde Aminosäureaustausche identifiziert; diese Austausche könnten sich für das Design zukünftiger Bibliotheken nützlich erweisen.

Das vielversprechendste A β -spezifische Anticalin, Lcn2_US7, wurde in einer weiteren Selektion mit mit Digoxigenin-markierten Trx-A β 28-DIG als Target und der Lcn2-basierten Anticalin-Bibliothek identifiziert. In ELISA- und SPR-Experimenten wurde gezeigt, dass Lcn2_US7 das synthetische A β 40-Peptid wie auch die rekombinanten A β -Fusionsproteine mit hervorragender Affinität mit Dissoziationskonstanten im Bereich um 1 nM bindet. Durch Epitop-Mapping wurde die Spezifität von Lcn2_US7 auf den zentralen Bereich FFAED der Reste 19-23 des A β -Peptids eingegrenzt. Durch hochaffine Komplexierung dieses Sequenzmotivs, welches bekanntermaßen eine wichtige Rolle für die Amyloid-Aggregation spielt, ist Lcn2_US7 fähig, die Aggregation von A β 40 komplett zu inhibieren, was im Thioflavin T Aggregationsassay gezeigt wurde. Die mittels Proteinkristallographie aufgeklärte Struktur des Komplexes aus Lcn2_US7 und A β 40 zeigt zudem, dass das Peptid tief in der Bindungstasche des Anticalins gebunden wird, und bestätigt, dass die im Epitop-Mapping identifizierten Positionen des Peptids wichtige Wechselwirkungen mit dem Anticalin eingehen.

Durch hochaffine Bindung des A β -Peptids und Inhibierung der Amyloid-Aggregation *in vitro* ist Lcn2_US7 ein aussichtsreicher Kandidat für eine spätere Anwendung als innovatives anti-A β -Therapeutikum gegenüber den derzeit intensiv untersuchten Antikörpern. Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen *in vitro* werden Experimente in transgenen Mausmodellen mit großer Spannung erwartet.

6 Summary

The amyloid hypothesis of Alzheimer disease poses the amyloid- β peptide on top of a cascade which eventually leads to neuronal death and progressive dementia. A β peptides are generated by proteolytic processing of the amyloid precursor protein and accumulate with increasing age in the brain of patients. These peptides initially form soluble toxic oligomers which subsequently accumulate to amyloid aggregates and finally deposit in neuritic plaques. In light of potential therapeutic or diagnostic applications this thesis aimed at the generation of Anticalins that possess the ability to complex soluble A β monomers and, thus, block their aggregation as well as toxic effects.

Anticalins are engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. Similar to antibodies with their six CDRs, Anticalins exhibit four highly variable loops supported by a structurally conserved β -barrel framework. However, compared to immunoglobulins Anticalins possess several biotechnological advantages such as smaller size, ease of genetic manipulation due to their composition of only one polypeptide chain as well as efficient production in *E. coli*.

Several versions of the A β peptide, the synthetic full length peptide A β 40 as well as its fragments A β (1-11) and A β (16-27) were used for the selection and characterisation of A β -specific Anticalins using phage display technology. Furthermore, two fusion proteins served as soluble target molecules for the presentation of the relevant sequences: MBP-A β 40 in which the A β 40 sequence was fused to the C-terminus of the maltose-binding protein and Trx-A β 28 in which residues 1-28 of the A β peptide were inserted into the active site loop of thioredoxin from *E. coli*. Both fusion proteins were expressed in high yields in the cytoplasm of *E. coli* and subsequently purified.

Phagemid libraries comprising randomized versions of the three human lipocalins tear lipocalin (Tlc, Lcn1), apolipoprotein D (ApoD) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, Lcn2) were used for the selection of A β -specific Anticalins. To this end, 18 to 20 selected residues at the open end of the β -barrel and adjoining regions of the loop segments were subjected to targeted random mutagenesis, and libraries with at least 10^9 independent variants were generated. Phagemid panning experiments were performed either with biotinylated A β peptides or with digoxigenin-labeled Trx-A β 28. Subsequently, filter sandwich colony screening assays and/or screening ELISAs were employed to identify individual A β -specific Anticalins from the pools of enriched Anticalin variants. Finally, promising variants were expressed as soluble proteins and biochemically characterised with regard to their biochemical behaviour (e.g. oligomerisation propensity) and, importantly, binding activity towards A β peptides.

In comparison to other lipocalins, ApoD exhibits pronounced hydrophobic characteristics. Hence, a solubilised version in which several surface-exposed apolar residues had been replaced was used for the generation of the ApoD phagemid library. Despite the use of this improved variant, no soluble, monomeric ApoD variants with significant affinity for A β were identified, indicating the need for further optimization of the ApoD scaffold.

In contrast, the A β -specific variant Lcn1_3.3-23 was identified from phage display selection experiments with the Lcn1-based library. In ELISA and SPR studies, Lcn1_3.3-23 was shown to specifically bind the central region of the A β peptide with nanomolar affinity. However, Lcn1_3.3-23 showed a strong tendency for dimerization and eluted mainly as stable dimer in size exclusion chromatography. Therefore, studies aiming at the engineering of a monomeric version of Lcn1_3.3-23 were initiated. In these experiments the importance of the native disulfide bond – which had been eliminated in this random library – for stability and oligomerisation tendency of Lcn1-based Anticalins became evident. Consequently, further studies aiming at improving the stability of the Lcn1 scaffold were performed and stabilising amino acid substitutions were identified; these might be useful for the design of future Lcn1-based libraries.

The most promising A β -specific Anticalin, Lcn2_US7, was selected in another phage display campaign using digoxigenin-labeled Trx-A β 28 as target and the Lcn2-based Anticalin library. ELISA and SPR experiments showed that Lcn2_US7 binds the synthetic A β 40 peptide as well as both recombinant A β fusion proteins with high affinity, revealing dissociation constants around 1 nM. Epitope mapping led to the central five-amino acid sequence stretch FFAED comprising residues 19-23 of the A β peptide to be recognized by Lcn2_US7. This motif is known to play a major role for amyloid aggregation. Indeed, by specifically targeting this epitope Lcn2_US7 is able to completely inhibit fibrillation of the A β 40 peptide, which was demonstrated in a thioflavin T aggregation assay. Finally, the high resolution X-ray structure of the complex between Lcn2_US7 and the A β 40 peptide showed that the peptide is deeply bound within the Anticalin cavity and confirmed that the identified epitope residues form important interactions with the Anticalin.

Taken together, Lcn2_US7 binds the A β peptide with strong affinity and is able to completely inhibit amyloid aggregation *in vitro*, which makes it a promising candidate for therapeutic application as innovative anti-A β molecule, offering an alternative to the intensely examined antibody therapies. Following the promising results *in vitro*, experiments *in vivo* in transgenic mouse models are eagerly awaited.

7 Abkürzungen

A	Fluoreszenzanisotropie
ΔA	Absorptionsänderung
Å	Angström (1×10^{-10} m)
ABD	Albumin-Bindungsdomäne
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure
AP	Alkalische-Phosphatase
ApoD	Apolipoprotein D
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
aTc	Anhydrotetracyclin
BBP	Bilin-Bindungsprotein
Bio	Biotin
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
c	Konzentration
Cam	Chloramphenicol
cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Circulardichroismus
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementary Determining Region
cfu	Colony Forming Unit
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4
(k)Da	(kilo-)Dalton
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol

E	Extinktion
ϵ_x	Molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge x
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ED-B	Extra Domain B des humanen Fibronectin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	“Fragment Antigen Binding” der Immunglobuline
f(u)	Fraction Unfolded
Fc	“Fragment Crystallizable” der Immunglobuline
Fn	Fibronectin
HDL	High Density Lipoprotein
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HSA	Humanes Serumalbumin
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
Kan	Kanamycin
k_{on}	Assoziationsrate
k_{off}	Dissoziationsrate
K_D	Dissoziationskonstante
BLG	β -Lactoglobulin
LDL	Low Density Lipoprotein
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MOI	Multiplicity of Infection
MRW	Mean Residue Weight
MW	Molecular Weight
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NGF	Nerve Growth Factor
OBP	Odorant Bindungsprotein
OD_x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OmpA	Outer Membrane Protein A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol

Pfu	Plaque Forming Unit
pIII	Hüllprotein des filamentösen Bakteriophagen M13
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per Minute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonance Units
SA	Streptavidin
scFv	“Single Chain Variable Fragment” der Immunglobuline
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography
TEV	Tobacco Etch Virus
Tlc	Tränenlipocalin
Trx	Thioredoxin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VDE	Violaxanthin Deepoxidase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V _H	Variable heavy chain der Immunglobuline
V _{HH}	Variable heavy chain of a “heavy chain” antibody
V _L	Variable light chain der Immunglobuline
v/v	Volume per Volume
wt	Wildtyp
w/v	Weight per Volume
ZNS	Zentrales Nervensystem
Θ _{MRW}	Molare Elliptizität pro Aminosäure

8 Literaturverzeichnis

- Adam, B., Charlotheaux, B., Beaufays, J., Vanhamme, L., Godfroid, E., Brasseur, R. & Lins, L. (2008) Distantly related lipocalins share two conserved clusters of hydrophobic residues: use in homology modeling. *BMC Struct Biol* 8, 1.
- Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146-148.
- Ando, Y., Brannstrom, T., Uchida, K., Nyhlin, N., Nasman, B., Suhr, O., Yamashita, T., Olsson, T., El Salhy, M., Uchino, M. & Ando, M. (1998) Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. *J Neurol Sci* 156, 172-176.
- Argos, P., Rossman, M.G., Grau, U.M., Zuber, H., Frank, G. & Tratschin, J.D. (1979) Thermal stability and protein structure. *Biochemistry* 18, 5698-5703.
- Arnoux, P., Morosinotto, T., Saga, G., Bassi, R. & Pignol, D. (2009) A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 2036-2044.
- Bachmann, B.J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* 36, 525-557.
- Bacsikai, B.J., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D. & Hyman, B.T. (2002) Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *J Neurosci* 22, 7873-7878.
- Barbas, C.F., 3rd, Bain, J.D., Hoekstra, D.M. & Lerner, R.A. (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4457-4461.
- Barbas, C.F., 3rd, Burton, D.R., Scott, J.K. & Silverman, G.J. (2004) *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido, T., Hoenow, K., Hu, K., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, C., Lee, M., Motter, R., Nguyen, M., Reed, A., Schenk, D., Tang, P., Vasquez, N., Seubert, P. & Yednock, T. (2003) Epitope and isotype specificities of antibodies to beta-amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2023-2028.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. & Yednock, T. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-919.
- Bass, S., Greene, R. & Wells, J.A. (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* 8, 309-314.
- Bateman, R.J., Aisen, P.S., De Strooper, B., Fox, N.C., Lemere, C.A., Ringman, J.M., Salloway, S., Sperling, R.A., Windisch, M. & Xiong, C. (2011) Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 3, 1.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. & Corvaia, N. (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 10, 345-352.
- 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.
- Benilova, I., Karran, E. & De Strooper, B. (2012) The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349-357.

- Berova, N., Nakanishi, K. & Woody, R. (2000) *Circular dichroism: principles and applications*. Wiley-VCH, New York.
- Beste, G. (1998) Evolutive Design künstlicher Bindungsproteine auf Grundlage der Beta-Barrel-Proteinarchitektur der Lipocaline. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. & Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1898-1903.
- Binz, H.K., Amstutz, P. & Plückthun, A. (2005) Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bishop, R.E. (2000) The bacterial lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1482, 73-83.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136, 175-179.
- Böcskei, Z., Groom, C.R., Flower, D.R., Wright, C.E., Phillips, S.E., Cavaggioni, A., Findlay, J.B. & North, A.C. (1992) Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* 360, 186-188.
- Bohrmann, B., Baumann, K., Benz, J., Gerber, F., Huber, W., Knoflach, F., Messer, J., Oroszlan, K., Rauchenberger, R., Richter, W.F., Rothe, C., Urban, M., Bardroff, M., Winter, M., Nordstedt, C. & Loetscher, H. (2011) Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid-beta binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 28, 49-69.
- Bolignano, D., Donato, V., Lacquaniti, A., Fazio, M.R., Bono, C., Coppolino, G. & Buemi, M. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer Lett* 288, 10-16.
- Borghini, I., Barja, F., Pometta, D. & James, R.W. (1995) Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta* 1255, 192-200.
- Borghouts, C., Kunz, C. & Groner, B. (2005) Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 5, 783-797.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R.A.I., Jansen, E.N.H. & Bohl, J. (1996) Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases *J Neural Transm* 103, 455-490.
- Breustedt, D.A., Chatwell, L. & Skerra, A. (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65, 1118-1125.
- Breustedt, D.A., Korndorfer, I.P., Redl, B. & Skerra, A. (2005) The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem* 280, 484-493.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- Briand, L., Eloit, C., Nespoulous, C., Bezirard, V., Huet, J.C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D. & Pernollet, J.C. (2002) Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* 41, 7241-7252.
- Brody, D.L. & Holtzman, D.M. (2008) Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci* 31, 175-193.

- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C. & Sawyer, L. (1997) Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution--still an enigmatic lipocalin. *Structure* **5**, 481-495.
- Brumano, M.H., Rogana, E. & Swaisgood, H.E. (2000) Thermodynamics of unfolding of beta-trypsin at pH 2.8. *Arch Biochem Biophys* **382**, 57-62.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-378.
- Butterfield, D.A. (2002) Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res* **36**, 1307-1313.
- Caine, J., Volitakis, I., Cherny, R., Varghese, J. & Macreadie, I. (2007) Aβ produced as a fusion to maltose binding protein can be readily purified and stably associates with copper and zinc. *Protein Pept Lett* **14**, 83-86.
- Cantor, C.R., Warshaw, M.M. & Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**, 1059-1077.
- Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., Goate, A.M., Bales, K.R., Paul, S.M., Bateman, R.J. & Holtzman, D.M. (2011) Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* **3**, 89ra57.
- Chakrabarty, A., Schellman, J.A. & Baldwin, R.L. (1991) Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature* **351**, 586-588.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. & Baty, D. (2009) Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol* **157**, 220-233.
- Chauhan, V.P., Ray, I., Chauhan, A. & Wisniewski, H.M. (1999) Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 241-246.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H. (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Cheng, Y. & Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**, 3099-3108.
- Choo-Smith, L.P., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G. & Surewicz, W.K. (1997) Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Aβ-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem* **272**, 22987-22990.
- Citron, M. (2010) Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 387-398.
- Clackson, T. & Wells, J.A. (1994) In vitro selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol* **12**, 173-184.
- Clark, M.R. (1997) IgG effector mechanisms. *Chem Immunol* **65**, 88-110.
- Collaborative Computational Project, N. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 760-763.
- Corbyn, Z. (2013) New set of Alzheimer's trials focus on prevention. *Lancet* **381**, 614-615.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L. & Pericak-Vance, M.A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921-923.

- Cowan, S.W., Newcomer, M.E. & Jones, T.A. (1990) Crystallographic refinement of human serum retinol binding protein at 2A resolution. *Proteins* 8, 44-61.
- Creuzenet, C. & Mangroo, D. (1998) Physico-chemical characterization of human von Ebner gland protein expressed in *Escherichia coli*: implications for its physiological role. *Protein Expr Purif* 14, 254-260.
- Das, P., Howard, V., Loosbrock, N., Dickson, D., Murphy, M.P. & Golde, T.E. (2003) Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in FcRgamma-/- knock-out mice. *J Neurosci* 23, 8532-8538.
- De Strooper, B. (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90, 465-494.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*.
- Delrieu, J., Ousset, P.J., Caillaud, C. & Vellas, B. (2012) 'Clinical trials in Alzheimer's disease': immunotherapy approaches. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 186-193.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Dodart, J.C., Paul, S.M. & Holtzman, D.M. (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855.
- DeMattos, R.B., Bales, K.R., Cummins, D.J., Paul, S.M. & Holtzman, D.M. (2002) Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 295, 2264-2267.
- DeMattos, R.B., Racke, M., Gelfanova, V., Knierman, M., Hale, J., Dean, R., Paul, S. & Siemers, E. (2009) Characterization of amino-terminally truncated Abeta-42 peptides in plasma from Alzheimer's patients receiving solanezumab immunotherapy treatment. *Alzheimer's & Dementia* 6, S542.
- Desai, P.P., Ikonovic, M.D., Abrahamson, E.E., Hamilton, R.L., Isanski, B.A., Hope, C.E., Klunk, W.E., DeKosky, S.T. & Kamboh, M.I. (2005) Apolipoprotein D is a component of compact but not diffuse amyloid-beta plaques in Alzheimer's disease temporal cortex. *Neurobiol Dis* 20, 574-582.
- Devarajan, P. (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 4, 265-280.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X. & Green, M.R. (2005) A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123, 1293-1305.
- Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M. & Paul, S.M. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5, 452-457.
- Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R.G., Aisen, P.S., Siemers, E., Sethuraman, G. & Mohs, R. (2013) A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369, 341-350.
- Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H. & Mohs, R. (2014) Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 311-321.
- Drayna, D., Fielding, C., McLean, J., Baer, B., Castro, G., Chen, E., Comstock, L., Henzel, W., Kohr, W., Rhee, L. & et al. (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J Biol Chem* 261, 16535-16539.

- Eckman, E.A. & Eckman, C.B. (2005) Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* **33**, 1101-1105.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Egen, J.G., Kuhns, M.S. & Allison, J.P. (2002) CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* **3**, 611-618.
- Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H.J. & Skerra, A. (2007) Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem* **282**, 31068-31075.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. & Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-3616.
- Eyer, F., Steimer, W., Nitzsche, T., Jung, N., Neuberger, H., Muller, C., Schlapschy, M., Zilker, T. & Skerra, A. (2012) Intravenous application of an anticalin dramatically lowers plasma digoxin levels and reduces its toxic effects in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **263**, 352-359.
- Farlow, M., Arnold, S.E., van Dyck, C.H., Aisen, P.S., Snider, B.J., Porsteinsson, A.P., Friedrich, S., Dean, R.A., Gonzales, C., Sethuraman, G., DeMattos, R.B., Mohs, R., Paul, S.M. & Siemers, E.R. (2012) Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **8**, 261-271.
- Fattori, B., Castagna, M., Megna, G., Casani, A. & Pelosi, P. (1998) Immunohistochemical localisation of tear lipocalin in human nasal mucosa. *Rhinology* **36**, 101-103.
- Ferrara, N. & Kerbel, R.S. (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-974.
- Fischbach, M.A., Lin, H., Liu, D.R. & Walsh, C.T. (2006) How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nat Chem Biol* **2**, 132-138.
- 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.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S. & Aderem, A. (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917-921.
- Flower, D.R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* **318** (Pt 1), 1-14.
- Flower, D.R., North, A.C. & Sansom, C.E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 9-24.
- Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B.J. & Redl, B. (2004) Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3367-3372.
- Fournier, T., Medjoubi, N.N. & Porquet, D. (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 157-171.
- Frank, R. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* **267**, 13-26.
- Frenkel, D., Solomon, B. & Benhar, I. (2000) Modulation of Alzheimer's beta-amyloid neurotoxicity by site-directed single-chain antibody. *J Neuroimmunol* **106**, 23-31.
- Ganforina, M.D., Do Carmo, S., Lora, J.M., Torres-Schumann, S., Vogel, M., Allhorn, M., Gonzalez, C., Bastiani, M.J., Rassart, E. & Sanchez, D. (2008) Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* **7**, 506-515.

- Ganfornina, M.D., Gutierrez, G., Bastiani, M. & Sanchez, D. (2000) A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol Biol Evol* 17, 114-126.
- Ganter, C. & Plückthun, A. (1990) Glycine to alanine substitutions in helices of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: effects on stability. *Biochemistry* 29, 9395-9402.
- Gardberg, A.S., Dice, L.T., Ou, S., Rich, R.L., Helmbrecht, E., Ko, J., Wetzel, R., Myszka, D.G., Patterson, P.H. & Dealwis, C. (2007) Molecular basis for passive immunotherapy of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15659-15664.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gasymov, O.K., Abduragimov, A.R. & Glasgow, B.J. (2011) The conserved disulfide bond of human tear lipocalin modulates conformation and lipid binding in a ligand selective manner. *Biochim Biophys Acta* 1814, 671-683.
- 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.
- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W.A. & Tremblay, P. (2007) Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 28, 537-547.
- Giese, T. (2015) Strukturbiologische Untersuchungen von Anticalin/Ligand-Komplexen. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Glasgow, B.J., Abduragimov, A.R., Farahbakhsh, Z.T., Faull, K.F. & Hubbell, W.L. (1995) Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr Eye Res* 14, 363-372.
- Glasgow, B.J., Marshall, G., Gasymov, O.K., Abduragimov, A.R., Yusifov, T.N. & Knobler, C.M. (1999) Tear lipocalins: potential lipid scavengers for the corneal surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 3100-3107.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10, 1033-1043.
- Goetz, D.H., Willie, S.T., Armen, R.S., Bratt, T., Borregaard, N. & Strong, R.K. (2000) Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* 39, 1935-1941.
- Golde, T.E., Koo, E.H., Felsenstein, K.M., Osborne, B.A. & Miele, L. (2013) gamma-Secretase inhibitors and modulators. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2898-2907.
- Gordon, D.J., Sciarretta, K.L. & Meredith, S.C. (2001) Inhibition of beta-amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of beta-amyloid(40) fibrils by short beta-amyloid congeners containing N-methyl amino acids at alternate residues. *Biochemistry* 40, 8237-8245.
- Grabowski, T.J., Cho, H.S., Vonsattel, J.P., Rebeck, G.W. & Greenberg, S.M. (2001) Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 49, 697-705.

- Greene, L.A. & Tischler, A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, 2424-2428.
- Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc* 1, 2527-2535.
- Gronwall, C., Jonsson, A., Lindstrom, S., Gunneriusson, E., Stahl, S. & Herne, N. (2007) Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides. *J Biotechnol* 128, 162-183.
- Gunn, A.P., Masters, C.L. & Cherny, R.A. (2010) Pyroglutamate-Abeta: role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1915-1918.
- Guo, Q., Manolopoulou, M., Bian, Y., Schilling, A.B. & Tang, W.J. (2010) Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF-alpha, and amylin by human insulin-degrading enzyme. *J Mol Biol* 395, 430-443.
- Haass, C. (2009) Alzheimer – Mechanismen und therapeutische Ansätze. Warum wir im Alter dement werden. *Biologie in unserer Zeit* 39, 92-100.
- Haass, C. & Selkoe, D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101-112.
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K., Gellermann, G.P., Brodhun, M., Gotz, J., Halbhuber, K.J., Rocken, C., Horn, U. & Fandrich, M. (2007) Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19232-19237.
- Hagel, P., Gerding, J.J., Fieggen, W. & Bloemendal, H. (1971) Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim Biophys Acta* 243, 366-373.
- Hanenberg, M., McAfoose, J., Kulic, L., Welt, T., Wirth, F., Parizek, P., Strobel, L., Catepoel, S., Spani, C., Derungs, R., Maier, M., Pluckthun, A. & Nitsch, R.M. (2014) Amyloid-beta peptide-specific DARPins as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 289, 27080-27089.
- Hardy, J. & Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harmsen, M., van Solt, C., van Zijderveld-van Bommel, A., Niewold, T. & van Zijderveld, F. (2006) Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 544-551.
- Harper, J.D. & Lansbury, P.T., Jr. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66, 385-407.
- Hawkins, R.E., Russell, S.J. & Winter, G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226, 889-896.
- Hecht, M.H., Sturtevant, J.M. & Sauer, R.T. (1986) Stabilization of lambda repressor against thermal denaturation by site-directed Gly---Ala changes in alpha-helix 3. *Proteins* 1, 43-46.
- Hendriks, L., van Duijn, C.M., Cras, P., Cruts, M., Van Hul, W., van Harskamp, F., Warren, A., McInnis, M.G., Antonarakis, S.E., Martin, J.J. & et al. (1992) Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1, 218-221.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C. & Yamamoto, H.Y. (2000) Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim Biophys Acta* 1482, 84-91.

- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**, 293-302.
- Hoedemaeker, F.J., Visschers, R.W., Alting, A.C., de Kruijff, K.G., Kuil, M.E. & Abrahams, J.P. (2002) A novel pH-dependent dimerization motif in beta-lactoglobulin from pig (*Sus scrofa*). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 480-486.
- Hohlbaum, A.M., Jensen, K., Allersdorfer, A., Baehre, A., Bel Aiba, R.S., Christian, J., Gille, H., Huelsmeyer, M., Kirchfeld, K., Kolodziejczyk, M., Matschiner, G., Rattenstetter, B., Trentmann, S. & Audoly, L. (2011) Exploiting Lipocalin Biochemistry For The Treatment Of Allergy And Asthma: Discovery And Characterization Of An Anti-IL-4RA Therapeutic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**.
- Holla, A.D. (2012) Protein-Engineering eines Anticalins mit Bindungsspezifität für DC-SIGN. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C. & Strong, R.K. (2005) Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* **13**, 29-41.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Pat Cerretti, D., Urdal, D.L. & Conlon, P.J. (1988) A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotech* **6**, 1204-1210.
- Hortschansky, P., Schroeckh, V., Christopeit, T., Zandomenighi, G. & Fandrich, M. (2005) The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci* **14**, 1753-1759.
- Hoyer, W., Gronwall, C., Jonsson, A., Stahl, S. & Hard, T. (2008) Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5099-5104.
- Huang, C. (2009) Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 692-699.
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Muller, R., Deutzmann, R., Suter, F., Zuber, H., Falk, H. & Kayser, H. (1987) Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **198**, 499-513.
- Huse, W.D., Sastry, L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton, D.R., Benkovic, S.J. & Lerner, R.A. (1989) Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* **246**, 1275-1281.
- Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1994) A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci* **3**, 2207-2216.
- Imanaka, T., Shibasaki, M. & Takagi, M. (1986) A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature* **324**, 695-697.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* **24**, 409-411.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2004) *Immunobiology*. Garland Science.
- Jevsevar, S., Kunstelj, M. & Porekar, V.G. (2010) PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J* **5**, 113-128.
- Johnson, W.C., Jr. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **17**, 145-166.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-736.

- Kapust, R.B., Tozser, J., Copeland, T.D. & Waugh, D.S. (2002) The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 949-955.
- Karlsson, R., Katsamba, P.S., Nordin, H., Pol, E. & Myszkowski, D.G. (2006) Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem* 349, 136-147.
- 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.
- Karran, E. & Hardy, J. (2014) Anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease--are we on the right road? *N Engl J Med* 370, 377-378.
- Kasturirangan, S., Li, L., Emadi, S., Boddapati, S., Schulz, P. & Sierks, M.R. (2010) Nanobody specific for oligomeric beta-amyloid stabilizes nontoxic form. *Neurobiol Aging*, 1320-1328.
- Kasturirangan, S. & Sierks, M. (2010) Targeted hydrolysis of Beta-amyloid with engineered antibody fragment. *Curr Alzheimer Res* 7, 214-222.
- Kenanova, V. & Wu, A.M. (2006) Tailoring antibodies for radionuclide delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 3, 53-70.
- Kerchner, G.A. & Boxer, A.L. (2010) Bapineuzumab. *Expert Opin Biol Ther* 10, 1121-1130.
- Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009a) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc* 131, 3565-3576.
- Kim, J., Basak, J.M. & Holtzman, D.M. (2009b) The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303.
- Kim, M.W., Chelliah, Y., Kim, S.W., Otwinowski, Z. & Bezprozvanny, I. (2009c) Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure* 17, 1205-1212.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengelov, H. & Borregaard, N. (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268, 10425-10432.
- 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. (2007) Monobodies: antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain. *Methods Mol Biol* 352, 95-109.
- Konig, T. & Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods* 218, 73-83.
- Kontermann, R.E. (2011) Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 22, 868-876.
- Körndorfer, I.P., Beste, G. & Skerra, A. (2003a) Crystallographic analysis of an "anticalin" with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region. *Proteins* 53, 121-129.
- Körndorfer, I.P., Schlehuber, S. & Skerra, A. (2003b) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J Mol Biol* 330, 385-396.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.
- Kumar, S., Rezaei-Ghaleh, N., Terwel, D., Thal, D.R., Richard, M., Hoch, M., Mc Donald, J.M., Wullner, U., Glebov, K., Heneka, M.T., Walsh, D.M., Zweckstetter, M. & Walter, J. (2011) Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes

- formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J* **30**, 2255-2265.
- La Porte, S.L., Bollini, S.S., Lanz, T.A., Abdiche, Y.N., Rusnak, A.S., Ho, W.H., Kobayashi, D., Harrabi, O., Pappas, D., Mina, E.W., Milici, A.J., Kawabe, T.T., Bales, K., Lin, J.C. & Pons, J. (2011) Structural Basis of C-terminal beta-Amyloid Peptide Binding by the Antibody Ponezumab for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Mol Biol.*
- Lacazette, E., Gachon, A.M. & Pitiot, G. (2000) A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet* **9**, 289-301.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- Lannfelt, L., Blennow, K., Zetterberg, H., Batsman, S., Ames, D., Harrison, J., Masters, C.L., Targum, S., Bush, A.I., Murdoch, R., Wilson, J. & Ritchie, C.W. (2008) Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* **7**, 779-786.
- Lascombe, M.B., Gregoire, C., Poncet, P., Tavares, G.A., Rosinski-Chupin, I., Rabillon, J., Goubran-Botros, H., Mazie, J.C., David, B. & Alzari, P.M. (2000) Crystal structure of the allergen Equ c 1. A dimeric lipocalin with restricted IgE-reactive epitopes. *J Biol Chem* **275**, 21572-21577.
- Lechner, M., Wojnar, P. & Redl, B. (2001) Human tear lipocalin acts as an oxidative-stress-induced scavenger of potentially harmful lipid peroxidation products in a cell culture system. *Biochem J* **356**, 129-135.
- Legleiter, J., Czilli, D.L., Gitter, B., DeMattos, R.B., Holtzman, D.M. & Kowalewski, T. (2004) Effect of different anti-Abeta antibodies on Abeta fibrillogenesis as assessed by atomic force microscopy. *J Mol Biol* **335**, 997-1006.
- Lehmann, M., Kostrewa, D., Wyss, M., Brugger, R., D'Arcy, A., Pasamontes, L. & van Loon, A.P. (2000) From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase. *Protein Eng* **13**, 49-57.
- Leissring, M.A. (2008) The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases. *J Biol Chem* **283**, 29645-29649.
- Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P. & Selkoe, D.J. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* **40**, 1087-1093.
- LeVine, H., 3rd (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* **2**, 404-410.
- Levites, Y., Jansen, K., Smithson, L.A., Dakin, R., Holloway, V.M., Das, P. & Golde, T.E. (2006) Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice. *J Neurosci* **26**, 11923-11928.
- Levy, E., Carman, M.D., Fernandez-Madrid, I.J., Power, M.D., Lieberburg, I., van Duinen, S.G., Bots, G.T., Luyendijk, W. & Frangione, B. (1990) Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**, 1124-1126.

- Lichtlen, P. & Mohajeri, M.H. (2008) Antibody-based approaches in Alzheimer's research: safety, pharmacokinetics, metabolism, and analytical tools. *J Neurochem* 104, 859-874.
- Lipovsek, D. (2010) Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Eng Des Sel* 24, 3-9.
- Liu, J., Guo, C., Yao, Y. & Lin, D. (2008) Effects of removing a conserved disulfide bond on the biological characteristics of rat lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimie* 90, 1637-1646.
- Liu, R., Yuan, B., Emadi, S., Zameer, A., Schulz, P., McAllister, C., Lyubchenko, Y., Goud, G. & Sierks, M.R. (2004) Single chain variable fragments against beta-amyloid (Abeta) can inhibit Abeta aggregation and prevent abeta-induced neurotoxicity. *Biochemistry* 43, 6959-6967.
- Loeffler, D.A. (2013) Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now? *J Neuroinflammation* 10, 70.
- Löfblom, J. (2011) Bacterial display in combinatorial protein engineering. *Biotechnol J* 6, 1115-1129.
- Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Stahl, S. & Frejd, F.Y. (2010) Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. *FEBS Lett* 584, 2670-2680.
- Löfblom, J., Frejd, F.Y. & Kontermann, R.E. (2011) Alternative Scaffolds as Bispecific Antibody Mimetics. *Bispecific Antibodies*. Springer Heidelberg.
- Logdberg, L. & Wester, L. (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim Biophys Acta* 1482, 284-297.
- Lord, A., Gumucio, A., Englund, H., Sehlin, D., Sundquist, V.S., Soderberg, L., Moller, C., Gellerfors, P., Lannfelt, L., Pettersson, F.E. & Nilsson, L.N. (2009) An amyloid-beta protofibril-selective antibody prevents amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36, 425-434.
- Lowman, H.B., Bass, S.H., Simpson, N. & Wells, J.A. (1991) Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display. *Biochemistry* 30, 10832-10838.
- Luhrs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D. & Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17342-17347.
- Lumry, R. & Biltonen, R. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- Makhatadze, G.I. & Privalov, P.L. (1992) Protein interactions with urea and guanidinium chloride. A calorimetric study. *J Mol Biol* 226, 491-505.
- Mandrekar-Colucci, S. & Landreth, G.E. (2010) Microglia and inflammation in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 156-167.
- Manoutcharian, K., Acero, G., Munguia, M.E., Becerril, B., Massieu, L., Govezensky, T., Ortiz, E., Marks, J.D., Cao, C., Ugen, K. & Gevorkian, G. (2004) Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol Dis* 17, 114-121.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222, 581-597.
- Martello, J.L., Woytowish, M.R. & Chambers, H. (2012) Ecallantide for treatment of acute attacks of hereditary angioedema. *Am J Health Syst Pharm* 69, 651-657.
- Matsuoka, Y., Saito, M., LaFrancois, J., Gaynor, K., Olm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiratori, C., Lemere, C. & Duff, K. (2003) Novel therapeutic approach for the

- treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J Neurosci* 23, 29-33.
- Matthews, B.W., Nicholson, H. & Beektel, W.J. (1987) Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6663-6667.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E. & Bateman, R.J. (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774.
- McConathy, W.J. & Alaupovic, P. (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett* 37, 178-182.
- McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M.E., Tian, X., Phinney, A.L., Manea, M., French, J.E., Lambermon, M.H., Darabie, A.A., Brown, M.E., Janus, C., Chishti, M.A., Horne, P., Westaway, D., Fraser, P.E., Mount, H.T., Przybylski, M. & St George-Hyslop, P. (2002) Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med* 8, 1263-1269.
- McPherson, A. (2008) Introduction to Macromolecular Crystallography. *Introduction to Macromolecular Crystallography*. John Wiley & Sons, Inc.
- Meerman, H.J. & Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* 12, 1107-1110.
- Meining, W. & Skerra, A. (2012) The crystal structure of human alpha(1)-microglobulin reveals a potential haem-binding site. *Biochem J* 445, 175-182.
- Menendez-Arias, L. & Argos, P. (1989) Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in alpha-helices. *J Mol Biol* 206, 397-406.
- Miles, L.A., Wun, K.S., Crespi, G.A., Fodero-Tavoletti, M.T., Galatis, D., Bagley, C.J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Cappai, R., McKinstry, W.J., Barnham, K.J. & Parker, M.W. (2008) Amyloid-beta-anti-amyloid-beta complex structure reveals an extended conformation in the immunodominant B-cell epitope. *J Mol Biol* 377, 181-192.
- Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B. & Thiele, D.L. (2003) Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6221-6226.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moretto, N., Bolchi, A., Rivetti, C., Imbimbo, B.P., Villetti, G., Pietrini, V., Polonelli, L., Del Signore, S., Smith, K.M., Ferrante, R.J. & Ottonello, S. (2007) Conformation-sensitive antibodies against alzheimer amyloid-beta by immunization with a thioredoxin-constrained B-cell epitope peptide. *J Biol Chem* 282, 11436-11445.
- Morgan, D. (2011) Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med* 269, 54-63.
- Mross, K., Richly, H., Fischer, R., Scharr, D., Buchert, 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.
- Muffat, J., Walker, D.W. & Benzer, S. (2008) Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7088-7093.
- Mullard, A. (2012) Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials. *Nat Rev Drug Discov* 11, 657-660.

- Müller, H.N. (1995) Konstruktion eines Lipocalins mit neuen Eigenschaften. *Dissertation, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.*
- Muller, H.N. & Skerra, A. (1993) Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in *Escherichia coli*. Ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J Mol Biol* 230, 725-732.
- Muyldermans, S., Baral, T.N., Retamozzo, V.C., De Baetselier, P., De Genst, E., Kinne, J., Leonhardt, H., Magez, S., Nguyen, V.K., Revets, H., Rothbauer, U., Stijlemans, B., Tillib, S., Wernery, U., Wyns, L., Hassanzadeh-Ghassabeh, G. & Saerens, D. (2009) Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 178-183.
- Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12, 279-284.
- Myszka, D.G. (2000) Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods Enzymol* 323, 325-340.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 177, 244-249.
- Nasreen, A., Vogt, M., Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2006) Solubility engineering and crystallization of human apolipoprotein D. *Protein Sci* 15, 190-199.
- Navarro, A., Del Valle, E., Astudillo, A., Gonzalez del Rey, C. & Tolivia, J. (2003) Immunohistochemical study of distribution of apolipoproteins E and D in human cerebral beta amyloid deposits. *Exp Neurol* 184, 697-704.
- Newcomer, M.E. & Ong, D.E. (2000) Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 1482, 57-64.
- Niewoehner, J., Bohrmann, B., Collin, L., Ulrich, E., Sade, H., Maier, P., Rueger, P., Stracke, Jan O., Lau, W., Tissot, Alain C., Loetscher, H., Ghosh, A. & Freskgård, P.-O. (2014) Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle. *Neuron* 81, 49-60.
- Nygren, P.A. & Skerra, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 290, 3-28.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y. & LaFerla, F.M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
- Ordóñez, C., Navarro, A., Perez, C., Astudillo, A., Martínez, E. & Tolivia, J. (2006) Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol* 21, 361-366.
- Orgogozo, J.M., Gilman, S., Dartigues, J.F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A. & Hock, C. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* 131, 266-280.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4, 2411-2423.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B.P. & Logroscino, G. (2014) Amyloid-directed monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: the point of no return? *Expert Opin Biol Ther*, 1-12.

- Pardridge, W.M. (2010) Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J Drug Target* **18**, 157-167.
- Parisi, M., Mazzini, A., Tibor Sorbi, R., Ramoni, R., Grolli, S. & Favilla, R. (2005) Role of the disulphide bridge in folding, stability and function of porcine odorant binding protein: spectroscopic equilibrium studies on C63A/C155A double mutant. *Biochim Biophys Acta* **1750**, 30-39.
- Paschke, M. (2006) Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 2-11.
- Peat, T.S., Christopher, J.A. & Newman, J. (2005) Tapping the Protein Data Bank for crystallization information. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1662-1669.
- Peitsch, M.C. & Boguski, M.S. (1990) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol* **2**, 197-206.
- Perdomo, G. & Henry Dong, H. (2009) Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)* **1**, 17-27.
- Perelson, A.S. & Oster, G.F. (1979) Theoretical studies of clonal selection: Minimal antibody repertoire size and reliability of self-non-self discrimination. *Journal of Theoretical Biology* **81**, 645-670.
- Pervaiz, S. & Brew, K. (1987) Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J* **1**, 209-214.
- Pfeil, W. & Privalov, P.L. (1976) Thermodynamic investigations of proteins. II. Calorimetric study of lysozyme denaturation by guanidine hydrochloride. *Biophys Chem* **4**, 33-40.
- Plückthun, A. (2012) Ribosome display: a perspective. *Methods Mol Biol* **805**, 3-28.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Postow, M.A., Callahan, M.K. & Wolchok, J.D. (2012) The Antitumor Immunity of Ipilimumab: (T cell) Memories to Last a Lifetime? *Clin Cancer Res* **18**, 1821-1823.
- Pul, R., Dodel, R. & Stangel, M. (2011) Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 343-357.
- Qiu, W.Q. & Folstein, M.F. (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* **27**, 190-198.
- Ramoni, R., Spinelli, S., Grolli, S., Conti, V., Merli, E., Cambillau, C. & Tegoni, M. (2008) Deswapping bovine odorant binding protein. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 651-657.
- Ramoni, R., Vincent, F., Ashcroft, A.E., Accornero, P., Grolli, S., Valencia, C., Tegoni, M. & Cambillau, C. (2002) Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *Biochem J* **365**, 739-748.
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L. & Milne, R. (2000) Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 185-198.
- Rauth, S., Schlapschy, M. & Skerra, A. (2010) Selection of Antibody Fragments by Means of the Filter-Sandwich Colony Screening Assay. *Antibody Engineering, Vol 1, Second Edition*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Redl, B. (2000) Human tear lipocalin. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 241-248.
- Redl, B., Holzfeind, P. & Lottspeich, F. (1992) cDNA cloning and sequencing reveals human tear prealbumin to be a member of the lipophilic-ligand carrier protein superfamily. *J Biol Chem* **267**, 20282-20287.
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D. & Vogel, A. (2006) Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 7745-7751.

- Reichert, J.M. (2012) Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 4, 413-415.
- Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B. & Dewitz, M.C. (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 23, 1073-1078.
- Richter, A., Eggenstein, E. & Skerra, A. (2014) Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett* 588, 213-218.
- Roopenian, D.C. & Akilesh, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. & Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25, 4500-4504.
- Roychaudhuri, R., Yang, M., Hoshi, M.M. & Teplow, D.B. (2009) Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284, 4749-4753.
- Ryan, D.A., Mastrangelo, M.A., Narrow, W.C., Sullivan, M.A., Federoff, H.J. & Bowers, W.J. (2010) Abeta-directed single-chain antibody delivery via a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice. *Mol Ther* 18, 1471-1481.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I.C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R. & Brashear, H.R. (2014) Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 322-333.
- Salloway, S., Sperling, R., Gilman, S., Fox, N.C., Blennow, K., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Doody, R., van Dyck, C.H., Mulnard, R., Barakos, J., Gregg, K.M., Liu, E., Lieberburg, I., Schenk, D., Black, R. & Grundman, M. (2009) A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73, 2061-2070.
- Samadi, H. & Sultzer, D. (2011) Solanezumab for Alzheimer's disease. *Expert Opin Biol Ther* 11, 787-798.
- Sambrook, J., and Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schaible, U.E. & Kaufmann, S.H. (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2, 946-953.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. & Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L.M. & Marks, J.D. (1996) Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol* 255, 28-43.
- Schiweck, W. & Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* 23, 561-565.

- Schlapschy, M. (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, 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.
- Schlehuber, S. (2001) Evolutes Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2001) Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol Chem* **382**, 1335-1342.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem* **96**, 213-228.
- Schmid, F.X. (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. *Protein structure: A practical approach*. TRL Press, Oxford
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.
- Schönfeld, D. (2010) Strukturbiologische Untersuchungen an humanen Lipocalinen und deren Varianten mit neuartigen Bindspezifitäten. *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hulsmeier, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8198-8203.
- Scire, A., Baldassarre, M., Lupidi, G. & Tanfani, F. (2011) Importance of pH and disulfide bridges on the structural and binding properties of human alpha-acid glycoprotein. *Biochimie* **93**, 1529-1536.
- Scott, C.J. & Taggart, C.C. (2010) Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* **92**, 1681-1688.
- Shen, Y., Joachimiak, A., Rosner, M.R. & Tang, W.J. (2006) Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. *Nature* **443**, 870-874.
- Sippl, M.J. (1995) Knowledge-based potentials for proteins. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 229-235.
- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* **20**, 3551-3554.
- Skerra, A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra, A. (2001) 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J Biotechnol* **74**, 257-275.
- Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 683-693.

- Skerra, A. (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., Dreher, M.L. & Winter, G. (1991a) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal Biochem* 196, 151-155.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991b) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273-278.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Sleep, D., Cameron, J. & Evans, L.R. (2013) Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim Biophys Acta* 1830, 5526-5534.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. & Hanan-Aharon, E. (1997) Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4109-4112.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M. & Frangione, B. (1998) Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4, 822-826.
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A. & Steinbacher, S. (1994) Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J Mol Biol* 240, 188-192.
- Stine, W.B., Jr., Dahlgren, K.N., Krafft, G.A. & LaDu, M.J. (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278, 11612-11622.
- Storz, U. (2010) IP Issues in the Therapeutic Antibody Industry. In Dübel, P.D.R.K.P.D.S. (Ed.) *Antibody Engineering, Vol 1, Second Edition*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Carmichael, J.A., Irving, R.A., Hudson, P.J. & Nuttall, S.D. (2004) Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12444-12449.
- Streltsov, V.A., Varghese, J.N., Masters, C.L. & Nuttall, S.D. (2011) Crystal structure of the amyloid-beta p3 fragment provides a model for oligomer formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31, 1419-1426.
- 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.
- Stumpp, M.T., Binz, H.K. & Amstutz, P. (2008) DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 13, 695-701.
- Sun, P., Tropea, J.E. & Waugh, D.S. (2011) Enhancing the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli* by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner. *Methods Mol Biol* 705, 259-274.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6339-6343.
- Tagliavini, F., Rossi, G., Padovani, A., Magoni, M., Andora, G., Sgarzi, M., Bizzi, A., Savoirdo, M., Carella, F., Morbin, M., Giaccone, G. & Bugiani, O. (1999) A new β PP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzheimer's Reports* 2, S28.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. & Plückthun, A. (2012) Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy. *Methods Enzymol* 503, 101-134.

- Tamura, Y., Hamajima, K., Matsui, K., Yanoma, S., Narita, M., Tajima, N., Xin, K.Q., Klinman, D. & Okuda, K. (2005) The F(ab)'2 fragment of an Aβ-specific monoclonal antibody reduces Aβ deposits in the brain. *Neurobiol Dis* 20, 541-549.
- Tegoni, M., Ramoni, R., Bignetti, E., Spinelli, S. & Cambillau, C. (1996) Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat Struct Biol* 3, 863-867.
- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R. & Rassart, E. (1998) Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* 71, 1643-1650.
- Thomas, E.A., Dean, B., Pavey, G. & Sutcliffe, J.G. (2001) Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4066-4071.
- Thomas, E.A., Laws, S.M., Sutcliffe, J.G., Harper, C., Dean, B., McClean, C., Masters, C., Lautenschlager, N., Gandy, S.E. & Martins, R.N. (2003) Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol Psychiatry* 54, 136-141.
- Tindall, K.R. & Kunkel, T.A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.
- Tomaselli, S., Esposito, V., Vangone, P., van Nuland, N.A., Bonvin, A.M., Guerrini, R., Tancredi, T., Temussi, P.A. & Picone, D. (2006) The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's Aβ-(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBiochem* 7, 257-267.
- Triebel, S., Blaser, J., Reinke, H. & Tschesche, H. (1992) A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314, 386-388.
- Tsukamoto, S., Fujiwara, K. & Ikeguchi, M. (2009) Fatty acids bound to recombinant tear lipocalin and their role in structural stabilization. *J Biochem* 146, 343-350.
- Tycko, R., Sciarretta, K.L., Orgel, J.P. & Meredith, S.C. (2009) Evidence for novel beta-sheet structures in Iowa mutant beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* 48, 6072-6084.
- Urade, Y. & Hayaishi, O. (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim Biophys Acta* 1482, 259-271.
- van't Hof, W., Blankenvoorde, M.F., Veerman, E.C. & Amerongen, A.V. (1997) The salivary lipocalin von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 272, 1837-1841.
- 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 Dijk, W., Do Carmo, S., Rassart, E., Dahlbäck, B. & Sodetz, J.M. (2006) The Plasma Lipocalins α1-Acid Glycoprotein, Apolipoprotein D, Apolipoprotein M and Complement Protein C8γ. *Lipocalins*. Landes Bioscience, Georgetown, TX.
- Vieille, C. & Zeikus, G.J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 1-43.
- Virnekas, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K.C., Wellenhofer, G. & Moroney, S.E. (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607.

- Vogt, M. (2003) Das humane Apolipoprotein D als Gerüststruktur für neuartige Bindungsproteine mit Affinität zu Protein-Antigenen *Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit* 14, 79-86.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem* 5, 191-199.
- Voss, S. & Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* 10, 975-982.
- Walsh, G. (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28, 917-924.
- Wang, Y.J., Zhou, H.D. & Zhou, X.F. (2006) Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug Discov Today* 11, 931-938.
- Wiederstein, M. & Sippl, M.J. (2005) Protein sequence randomization: efficient estimation of protein stability using knowledge-based potentials. *J Mol Biol* 345, 1199-1212.
- Wilcock, D.M., Alamed, J., Gottschall, P.E., Grimm, J., Rosenthal, A., Pons, J., Ronan, V., Symmonds, K., Gordon, M.N. & Morgan, D. (2006) Deglycosylated anti-amyloid-beta antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 26, 5340-5346.
- Wojnar, P., Dirnhofer, S., Ladurner, P., Berger, P. & Redl, B. (2002) Human lipocalin-1, a physiological scavenger of lipophilic compounds, is produced by corticotrophs of the pituitary gland. *J Histochem Cytochem* 50, 433-435.
- Wood, S.J., Wetzel, R., Martin, J.D. & Hurler, M.R. (1995) Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* 34, 724-730.
- Yang, C.Y., Gu, Z.W., Blanco-Vaca, F., Gaskell, S.J., Yang, M., Massey, J.B., Gotto, A.M., Jr. & Pownall, H.J. (1994) Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* 33, 12451-12455.
- Yang, J., Goetz, D., Li, J.Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R. & Barasch, J. (2002) An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10, 1045-1056.
- 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.
- Yusifov, T.N., Abduragimov, A.R., Narsinh, K., Gasymov, O.K. & Glasgow, B.J. (2008) Tear lipocalin is the major endonuclease in tears. *Mol Vis* 14, 180-188.
- Zagorski, M.G., Yang, J., Shao, H., Ma, K., Zeng, H. & Hong, A. (1999) Methodological and chemical factors affecting amyloid beta peptide amyloidogenicity. *Methods Enzymol* 309, 189-204.
- Zameer, A., Schulz, P., Wang, M.S. & Sierks, M.R. (2006) Single chain Fv antibodies against the 25-35 A β fragment inhibit aggregation and toxicity of A β 42. *Biochemistry* 45, 11532-11539.

9 Anhang

Sequenz-Alignment von ApoD-Varianten aus der Selektion gegen Trx-Aβ28-DIG

	GTGAATAAGTATCCcGGGAAGAAGTACGAAATTGAGAAGATCCCAACACCTTTGAGAATGGACGCTGCATCCAGCCCACTACTCACTAATGAAAAACGGAAAGATCAAA
BibliothekNNSNNSNNSNNSNNS.....
ApoD_313-1, 4, 5, 23GGAGTTGGTGAAT.....
ApoD_313-2, 3, 16, 17, 26GlySerCysValAsn.....
ApoD_313-9GTTCCGCTAGGGGT.....
ApoD_313-10ValArgSerArgGly.....
ApoD_313-13TCTGGATGTTTAAT.....
ApoD_313-15SerGlyMetPheAsn.....
ApoD_313-21AAGGGTTTGTGAAG.....
ApoD_313-22LysGlyPheValLys.....
ApoD_313-30CATGCTGCCTGGG.....
ApoD_313-32HisAlaAlaLeuGly.....
ApoD_313-33TGTTGATTGTTAAG.....
TrpLeuIleValLys.....
TTTCGTGTGTAAG.....
PheArgValMetLys.....
AGGCTCTTCAGAG.....
ArgGlyValGlnArg.....
CGGGGTGCTCGTCGG.....
ArgGlyAlaArgArg.....
CGTGTTCGCTATT.....
ArgValLeuArgIle.....
AGTCGGCGGTTTCAT.....
SerArgArgValHis.....

	GTGTTAAACACGAGCCTTGAGAGCTGATGAACTGGAAATCAAATCGAAGGTGAAGCCACCCAGTTAACCTCACAGACCTGCCAAGCTGGAAGTTAAGTTTCCTGGgcTATG
BibliothekValLeuAsnGlnGluLeuArgAlaAspGlyThrValAsnGlnIleGluGlyGluAlaThrProValAsnLeuThrGluProAlaLysLeuGluValLysPheSerTrpAlaMet.....
ApoD_313-1, 4, 5, 23NNS.....NNS.....NNS.....NNS.....A.....NNSNNSNNS.....NNS.....
ApoD_313-2, 3, 16, 17, 26CTG.....AGG.....TGG.....AAA.....GTC.....A.....A.....GTCCTCTGC.....TCG.....
ApoD_313-9Arg.....Trp.....Lys.....Gly.....Lys.....ValArgCys.....
ApoD_313-10AAG.....CAG.....AAG.....CGG.....A.....A.....GTCCTCTGC.....TCG.....
ApoD_313-13Lys.....Gln.....Lys.....Arg.....Lys.....ValLeuCys.....Ser.....
ApoD_313-15AAG.....AAG.....A.....CAC.....AAG.....T.....A.....TCCACAGGG.....CCC.....
ApoD_313-21Lys.....Lys.....MetHis.....Lys.....Val.....SerGlnGly.....Pro.....
ApoD_313-22AAT.....ATC.....AAG.....GGG.....A.....AGGGCGGG.....AGC.....
ApoD_313-30Asn.....Ile.....Lys.....Gly.....ArgGlyArg.....Ser.....
ApoD_313-32AAG.....CCC.....CAC.....AAG.....A.....A.....CTGTCGGCG.....AGG.....
ApoD_313-33Lys.....Pro.....His.....Lys.....Lys.....LeuSerAla.....Arg.....
CGG.....TGG.....AGG.....CTG.....A.....A.....TCTCTGCTC.....CGC.....
Arg.....Trp.....Arg.....Leu.....Lys.....CysSerLeu.....Arg.....
ACTG.....G.....CTG.....CTG.....ATG.....GGG.....A.....GGGAggtgc.....TTC.....
ArgVal.....Leu.....Met.....Gly.....GlyArgCys.....Phe.....
CTG.....AGG.....CGC.....TAC.....AGG.....A.....A.....GCGAAGTGC.....GGG.....
Arg.....Arg.....Tyr.....Arg.....Lys.....AlaLysCys.....Ala.....
CTG.....ACG.....AAC.....AAG.....TCC.....A.....GTGAAGTGC.....TGC.....
Thr.....Asn.....Lys.....Ser.....AAGTCTCGAG.....Cys.....
CTG.....CGC.....AAG.....CGG.....CAG.....G.....A.....AAGTCTCGAG.....GGC.....
Arg.....Lys.....Arg.....Gln.....Gly.....LysSerGln.....Gly.....
AAG.....AAC.....AAG.....AAG.....A.....A.....GCGCCACAG.....TTC.....
Lys.....Asn.....Lys.....Lys.....Lys.....AlaProLys.....Phe.....

	CCATCGGCACCGTACTggATCCTGGCCACCGACTATGAGAAGTATGCCCTCGTGTATTCCTGTACTaGCAcCTCCAACTcaTCACGTGGATTTGCTTGGATCTTGGCCaGA
BibliothekProSerAlaProTyrTrpIleLeuAlaThrAspTyrGluAsnTyrAlaLeuValTyrSerCysThrSerThrSerGlnSerHisHisValAspPheAlaTrpIleLeuAlaArg.....
ApoD_313-1, 4, 5, 23NNS.....NNS.....CGG.....GGG.....GTC.....AGG.....
ApoD_313-2, 3, 16, 17, 26Tyr.....Arg.....Gly.....Val.....Arg.....
ApoD_313-9CTG.....TTC.....GGG.....CGG.....TCG.....
ApoD_313-10Leu.....Phe.....Gly.....Arg.....Ser.....
ApoD_313-13Leu.....Val.....Asp.....Leu.....Arg.....
ApoD_313-15TGG.....CTG.....TTG.....CTG.....CGG.....CGG.....
ApoD_313-21Trp.....Val.....Leu.....Arg.....Arg.....
ApoD_313-22CCG.....T.....CTC.....AAG.....AAG.....AAG.....
ApoD_313-30Pro.....Cys.....Val.....Lys.....Lys.....Lys.....Lys.....
ApoD_313-32TCG.....TCG.....CGC.....CGC.....CGG.....AGG.....AGG.....
ApoD_313-33Ser.....Ser.....Arg.....Arg.....Arg.....Arg.....
GTC.....CGC.....CGC.....CGG.....AGG.....AAG.....
Val.....Arg.....Arg.....Gly.....Lys.....
CGC.....CTC.....AAG.....GGG.....TTC.....
Arg.....Leu.....Lys.....Gly.....Phe.....
AGC.....G.....TTG.....GGC.....GGC.....TGC.....
TTC.....Gly.....CysLeu.....Gly.....Gly.....Cys.....
Phe.....Leu.....Val.....Arg.....Val.....
GCC.....TTG.....CTG.....AGG.....GCG.....
Ala.....Leu.....Val.....Arg.....Ala.....
AAC.....CGG.....TTG.....GGG.....TCG.....
Asn.....Arg.....Leu.....Gly.....Ser.....

Abbildung 65: Sequenzanalyse potentieller Aβ-spezifischer ApoD-Varianten nach Selektion gegen Trx-Aβ28 mit alternativen Elutionsmethoden. Dargestellt sind die DNA- und Aminosäuresequenzen von Wildtyp-ApoD_IN90 und den davon abgeleiteten Varianten. Die in der Bibliothek randomisierten Positionen sind magenta, die in ApoD_IN90 löslichkeitsverbessernden Mutationen cyan und die zur Klonierung der randomisierten Kasette verwendeten *Bst*XI-Schnittstellen gelb markiert. Die basischen Aminosäuren Lys und Arg sind blau, die Aminosäure Cystein orange hervorgehoben.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

- Skerra, A., Gebauer, M., Hinz, D., Rauth, S., & Matschiner, G. Muteins of human lipocalin 2(Lcn2, hNGAL) with affinity for a given target. WO 2011/069992 A2.
- Rauth, S., Hinz, D., Eichinger A., Schneider, M., Uhrig, M., Mayhaus, M., Riemenschneider, M., & Skerra, A. High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer β -amyloid peptide, Manuskript in Vorbereitung
- Rauth, S., Hinz, D., Schneider, M., Matschiner, G., & Skerra, A. Development and characterization of Anticalins[®] specific for the Alzheimer amyloid beta peptide (A β) Poster 20th Annual International Conference on Antibody Engineering in San Diego, CA (6. – 10. Dezember 2009)