

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Biologische Chemie

**Design von Anticalinen gegen CD98hc
als molekulare Werkzeuge für die Theranostik**

Friedrich-Christian Deuschle, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät TUM School of Life Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Angelika Schnieke, Ph. D.
3. Prof. Dr. Harald Kolmar

Die Dissertation wurde am 26.06.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät TUM School of Life Sciences am 19.10.2020 angenommen.

Meiner Verlobten
und meinen Eltern

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie anfertigen zu können und die sehr spannende Themenstellung bedanken. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und exzellente Betreuung hatten einen maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Volker Morath und Herrn Dr. habil. André Schiefner für ihre stete Unterstützung und das Interesse am Fortschritt der gemeinsamen Projekte. Ich habe die sehr unkomplizierte und freundschaftliche Zusammenarbeit stets sehr genossen. Eure Beiträge hatten entscheidenden Einfluss auf das Gelingen dieser Arbeit!

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Biologische Chemie für ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Besonders meinen langjährigen Mitstreitern Julia Martin, Fabian Rodewald, Volker Morath, Elena Ilyukhina, Benjamin Escher, Emanuel Peplau, Laura Job, Jonas Schilz und Carina Sommer möchte ich für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors herzlich danken. Ich kann nur hoffen, dass wir auch weiterhin gemeinsam die Pisten unsicher machen! Besonders danken möchte ich ebenso Herrn Klaus Wachinger und Herrn Stefan Achatz für die stete Unterstützung bei technischen Fragestellungen. Bei Herrn Dr. Martin Schlapschy möchte ich mich für zahlreiche und stets hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Bedanken möchte ich mich zudem bei „meinen“ Studenten Arabella Essert, Brigitte Walla, Marie Motyka und Corinna Brandt für die tatkräftige und motivierte Unterstützung der gemeinsamen Projekte.

Dem gesamten Team der XL-protein GmbH – vor allem Uli Binder – danke ich ganz herzlich für die Zusammenarbeit bezüglich der PASylation®-Technologie und die zahlreichen „Tipps und Tricks“ in diesem Kontext.

Bei Herrn Prof. Dr. Küster, Prof. Dr. Wolfgang Weber, Prof. Dr. Martin Klingenspor und Prof. Dr. Manuel Palacín möchte ich mich für die Überlassung unterschiedlicher Zelllinien bedanken.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern Friederike & Martin, meiner Schwester Susanne sowie meiner Verlobten Nina, ohne deren immerwährende Unterstützung und stetes Verständnis nichts von alledem möglich gewesen wäre.

Teile dieser Arbeit (sowie damit zusammenhängender Teilprojekte) wurden bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

Wissenschaftliche Artikel:

- 1) Deuschle F.-C.¹, Schiefner A.¹ and Skerra A. (2019) Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins* 87, 693-698.
- 2) Deuschle F.-C., Morath V., Schiefner A., Brandt C., Ballke S., Reder S., Steiger K., Schwaiger M., Weber W. and Skerra A. (2020) Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications. *Theranostics* 10, 2172-2187.
- 3) Deuschle F.-C., Schiefner A., Brandt C. and Skerra A. (2020) Development of a surrogate Anticalin directed towards CD98hc for preclinical studies in mice. *Protein Sci* 8, 1774-1783.
- 4) Deuschle F.-C., Morath V. and Skerra A. Selection of a novel α transferrin receptor 1 binding protein for brain drug delivery. (in Vorbereitung)

Patentanmeldung:

- 1) Deuschle F.-C., Morath V., Schiefner A. and Skerra A. High affinity Anticalins directed against human CD98hc. WO 2020/193316

Übersichtsartikel:

- 1) Ilyukhina E.¹, Deuschle F.-C.¹ and Skerra A. (2020) Anticalin[®]-Proteine als neue Wirkstoffklasse für therapeutische Anwendungen. *Pharm. Ind.* 82, 283-289
- 2) Deuschle F.-C.¹, Ilyukhina E.¹ and Skerra A. Anticalin[®] proteins: from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther*, DOI:10.1080/14712598.2021.1839046

Konferenzbeiträge:

- 1) Deuschle F.-C. and Skerra A. (2018) Development of a blood-brain barrier-penetrating Anticalin for non-invasive brain-drug delivery. 10th Annual Protein & Antibody Engineering Summit, in Portugal (12. – 16. November 2018).
- 2) Deuschle F.-C., Morath V., Schiefner A., Weber W. and Skerra A. (2019) Development of a PASylated high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for ⁸⁹Zr PET diagnostic imaging. Antibody Engineering and Therapeutics Conference, San Diego, CA (09. – 13. Dezember 2019).

¹Diese Autoren haben im gleichen Maße zu dieser Arbeit beigetragen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Personalisierte Medizin und das Konzept der Theranostik in der Onkologie.....	1
1.2	CD98hc: eine molekulare Zielstruktur mit breiter medizinischer Relevanz.....	4
1.3	Anticaline: maßgeschneiderte Bindeproteine für biomedizinische Anwendungen.....	9
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2.	Methodenüberblick.....	16
2.1	Bakterienstämme, Bakteriophagen, humane Zelllinien und Versuchstiere	16
2.2	Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Varianten der CD98hc Ektodomäne	18
2.3	Selektion durch Phage Display und Screening auf Anticaline mit Bindungsaktivität mittels ELISA	22
2.4	Herstellung einer Anticalin-Zufallsbibliothek und Selektion mittels Bacterial Surface Display	24
2.5	Gentechnische Herstellung von Anticalinen in <i>E. coli</i> , chromatographische Reinigung und chemische Konjugation.....	26
2.6	Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie.....	28
2.7	Electrospray Ionization Massenspektrometrie	29
2.8	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie und thermische Denaturierung.....	29
2.9	Immuncytofluorimetrie und Immunfluoreszenzfärbung von Krebszelllinien	30
2.10	Positronenemissionstomographie (PET) / Computertomographie (CT) und Biodistributionsanalyse.....	31
2.11	Proteinkristallographische Methoden	34
2.12	Computerprogramme und Datenbanken.....	35

3.	Veröffentlichungen	37
3.1	Veröffentlichung in Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, April 2019 – Überblick und eigener Beitrag.....	37
3.2	Veröffentlichung in Theranostics, Januar 2020 – Überblick und eigener Beitrag.....	40
3.3	Veröffentlichung in Protein Science, Mai 2020 – Überblick und eigener Beitrag.....	43
4.	Diskussion	46
4.1	Spezies-spezifische Eigenschaften von CD98hc der Maus und des Menschen sowie deren Bedeutung für die Entwicklung pharmakologisch nutzbarer Bindeproteine	46
4.2	Entwicklung von Anticalinen zum Targeting des humanen CD98hc-Proteins	49
4.2.1	Selektionsverfahren und strukturelle Untersuchung von α hCD98hc Anticalinen.....	49
4.2.2	Bakterielles Surface Display als Grundlage für die Selektion von Bindeproteinen mit verbesserten Eigenschaften	53
4.2.3	Zielgerichtete Adressierung von hCD98hc durch Anticaline mit bildgebenden Verfahren	56
4.3	Entwicklung eines Surrogat-Anticalins für präklinische Studien in der Maus.....	61
5.	Zusammenfassung	65
6.	Abkürzungen	67
7.	Literatur	69
8.	Anhang I – Nachdruck der eingebundenen Veröffentlichungen	80

1. Einleitung

1.1 Personalisierte Medizin und das Konzept der Theranostik in der Onkologie

Mit weltweit 18,1 Millionen Neuerkrankungen und 9,6 Millionen Todesfällen im Jahr 2018 (Bray *et al.*, 2018) stellen Krebserkrankungen nach wie vor eine der größten gesundheitlichen und ökonomischen Herausforderungen für unsere Gesellschaft dar. Trotz Erfolgen klassischer Behandlungsstrategien auf dem Gebiet der Onkologie, durch Kombination zumeist recht unspezifisch wirkender Chemotherapie mit der operativen Beseitigung größerer Tumormassen und ggf. radioaktiver Bestrahlung, überwiegen oftmals die Nebenwirkungen dieser Therapien, abgesehen von mangelndem Heilungserfolg. So besitzen die für schnell proliferierende Zellen toxisch wirkenden Chemotherapeutika meist sehr niedrige therapeutische Indizes; es kommt zur Entwicklung multipler Arzneimittelresistenzen oder zur Beeinträchtigung gesunder Organe oder Gewebe (Dy & Adjei, 2008; Schirmacher, 2019). Hinzu kommt, dass nur etwa 25% der Patienten auf diese Art der Arzneimitteltherapie nachhaltig anspricht (Spear *et al.*, 2001) und somit ein großer Anteil der Erkrankten vor allem mit den unerwünschten Arzneimittelwirkungen konfrontiert ist. Die Ursache des unbefriedigenden Therapieerfolgs liegt in der komplexen Natur onkologischer Erkrankungen, da jeder Krebs einer sich ständig weiterentwickelnden Entartung körpereigener Zellen entspricht, so dass Primärtumore sowie Metastasen auf molekularer Ebene große Heterogenität aufweisen (Alizadeh *et al.*, 2015). Die hohe Heterogenität der Tumore ist nicht nur zwischen Patienten, trotz pathologisch oftmals ähnlicher Befundung, sondern auch innerhalb desselben Patienten sowie ein und desselben Geschwürs evident (Prasetyanti & Medema, 2017).

Vor diesem Hintergrund fand in den letzten Jahren ein Paradigmenwechsel in der Tumordiagnose und -therapie, von einer „One-Fits-It-All“ Medizin hin zur Biomarker-basierten Patientenstratifizierung im Verbund mit individualisierten Behandlungsstrategien, statt (Abbildung 1) (Verma, 2012). Das Grundprinzip ist hierbei, unter Anwendung analytischer Tests – insbesondere aus dem Bereich der „Omik“-Techniken, u.a. der Genomik und Proteomik (Chen & Snyder, 2013) – ein molekulares Profil der Krebserkrankung zu erstellen, um eine möglichst präzise Diagnose und Prognose sowie maßgeschneiderte Therapiestrategie mit größtmöglicher Erfolgswahrscheinlichkeit für eine Patientensubkohorte abzuleiten. Das Ansprechen dieser Patienten auf eine Therapie wird individuell analysiert und die gewonnenen klinischen Daten verwendet, um die Diagnose und Patientenstratifizierung weiter zu optimieren. Gerade die Onkologie ist aufgrund einer Vielzahl erfolgreicher Beispiele für zielgerichtete Wirkstoffe und Immuntherapien ein Vorreiter im Bereich der Präzisionsmedizin. Speziell die Weiterentwick-

lung der Techniken im Bereich der Genom-/Proteomanalyse und Bioinformatik sowie die Anwendung hochspezifischer Bindeproteine, wie bspw. der monoklonalen Antikörper Trastuzumab (α HER-2), Cetuximab (α EGFR) oder Pembrolizumab (α PD-1), ermöglichte in den letzten Jahren eine enorme Verbesserung des Behandlungsspektrums bei Tumorerkrankungen (Dugger *et al.*, 2018).

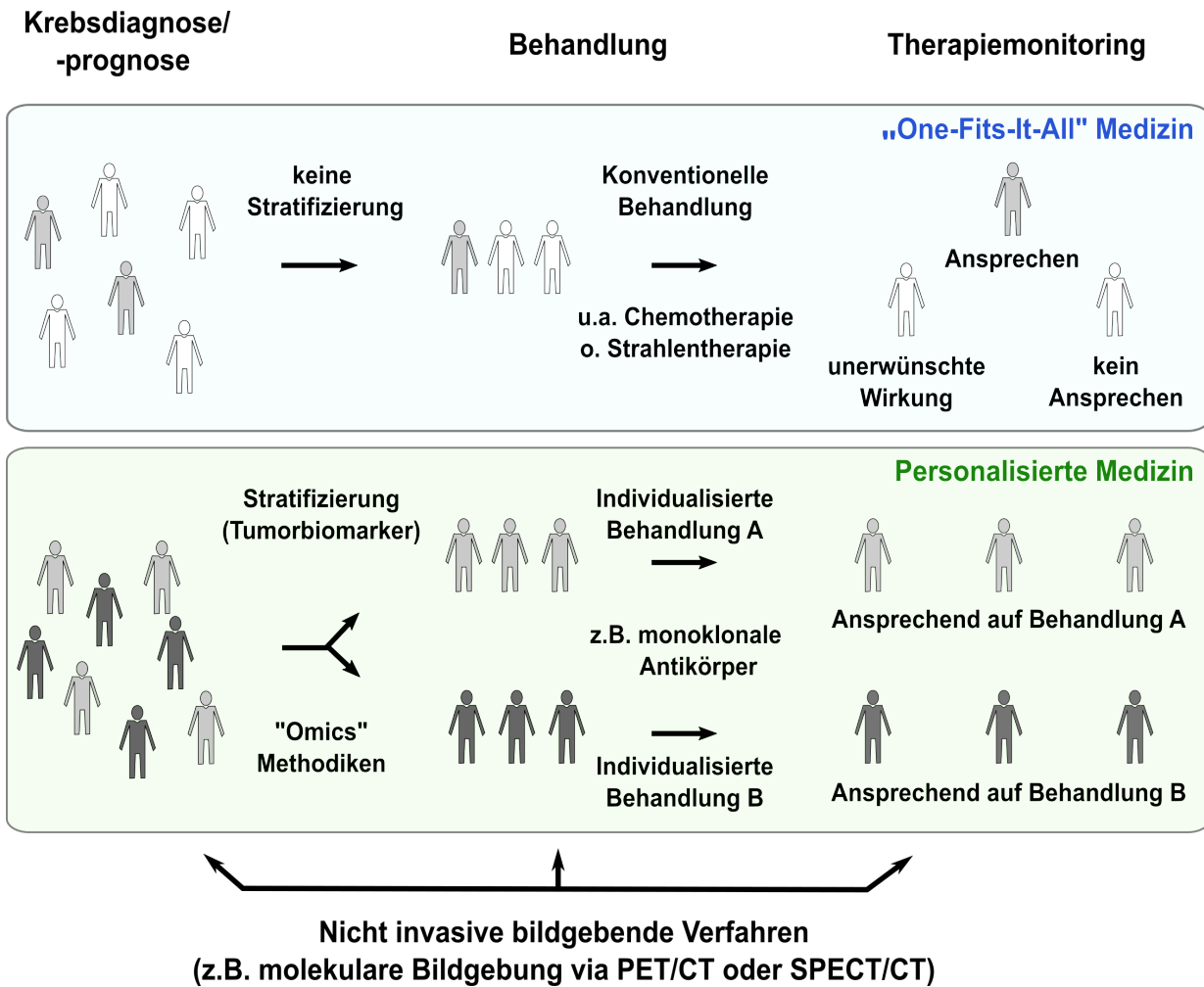


Abbildung 1: Prinzip der personalisierten Medizin im Vergleich zu konventionellen Behandlungsstrategien. Unterschiedliche Patienten reagieren auf eine Standardtherapie („One-Fits-It-All“ Medizin) unterschiedlich. Während manche Individuen gutes Ansprechen zeigen, profitieren andere nicht von dieser Behandlung oder zeigen gar ausschließlich unerwünschte Arzneimittelwirkungen (oben). Im Bereich der personalisierten Medizin kann unter Berücksichtigung des molekularen Profils eines Tumors eine Stratifizierung der Patienten in unterschiedliche Behandlungsgruppen erfolgen, so dass im Idealfall alle Personen von einer maßgeschneiderten Therapieform profitieren (unten). Die Diagnose-/Prognosestellung, die Patientenstratifizierung und das Therapiemonitoring werden durch die Anwendung von nuklearmedizinischen Bildgebungsverfahren unterstützt.

Die zunehmend engere Verzahnung von Diagnose, Behandlung und Überwachung therapeutischer Intervention in der individualisierten Biomedizin wird unter der Bezeichnung Theranostik, einer Wortkreuzung aus Therapie und Diagnostik, zusammengefasst (Langbein *et al.*, 2019). Für die verstärkte Verknüpfung dieser drei Teilaspekte während einer Krebsbehandlung spielt die Radio-Immundiagnostik (RID) eine zentrale Rolle (Histed *et al.*, 2012). Hierbei wird mit Hilfe hochauflösender molekularer Bildgebungsverfahren das Vorhandensein charakteristischer Oberflächenmarker auf Krebszellen identifiziert (= *in vivo* Histologie), so dass diese anschließend mit cytotoxischen Wirkstoffen zielgerichtet adressiert werden können. Um die molekulare Charakterisierung des Krankheitsphänotyps mit Hilfe der RID *in vivo* zu ermöglichen, müssen für einen geeigneten Biomarker spezifische Radiopharmazeutika auf der Basis von niedermolekularen Substanzen, Peptiden oder Proteinen verfügbar sein.

Abhängig von dem verwendeten Radionuklid können verschiedene Verfahren für die Bildgebung angewendet werden. Breiten Einsatz innerhalb der Nuklearmedizin finden die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie die Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), welche meist mit hochauflösender Computertomographie (Röntgenstrahlung) kombiniert werden. Somit kann die durch PET oder SPECT erhaltene funktionelle Bildgebung (bspw. metabolischer Vorgänge) mit der anatomischen Bildgebung eines CT-Scans verknüpft werden (Wahl *et al.*, 2011). Für die begleitend zur Behandlung sowie im Anschluss daran stattfindende Therapieüberwachung kommen wiederum die beschriebenen medizinischen Bildgebungsverfahren in Kombination mit geeigneten (radioaktiv-markierten) Substanzen zur Anwendung. Um Verfahren der Theranostik möglichst effizient zu gestalten, wird neuerdings zudem versucht, integrierte diagnostische und therapeutische Wirkstoffsysteme, so genannte Theranostika, für geeignete Zielstrukturen zu entwickeln (Langbein *et al.*, 2019; Turner, 2018). Ziel ist es hierbei Wirkstoffe mit grundlegend gleichem Aufbau zu entwickeln, welche die Möglichkeit bieten flexibel sowohl für diagnostische als auch therapeutische Anwendungen zum Einsatz zu kommen.

Grundvoraussetzung, um den Kurs in Richtung individualisierter Medizin weiter voranzutreiben sowie die Auswahl an Theranostik-Verfahren zu erweitern, ist die Identifizierung von weiteren krankheitsspezifischen Biomarkern, welche für definierte Patientensubgruppen charakteristisch sind. Insbesondere Zielstrukturen wie Rezeptoren oder Transporter, die beispielweise an der gesteigerten Versorgung von Krebszellen mit Kohlenhydraten und Aminosäuren zur Energiegewinnung, Biosynthese oder der Vermittlung von intra- und interzellulären Wachstumssignalen der schnell proliferierenden Krebszellen beteiligt sind, haben sich als vielverspre-

chend herauskristallisiert. Ferner steht die Entwicklung geeigneter molekularer Agenzien, die diese Strukturen zielgerichtet adressieren und idealerweise diagnostische sowie therapeutische Aspekte in einem Wirkstoff vereinen können, im Mittelpunkt der aktuellen biomedizinischen Forschung. Vor allem hochaffine Bindeproteine, die hinsichtlich ihrer Spezifität und flexiblen Funktionalisierung kleinen Molekülen oder Peptiden oftmals überlegen sind, bilden eine attraktive Wirkstoffklasse, die zunehmend in den Fokus der Entwicklung theranostischer Behandlungsstrategien rücken.

1.2 CD98hc: eine molekulare Zielstruktur mit breiter medizinischer Relevanz

Aminosäuren und ihre Derivate erfüllen im menschlichen Körper vielfältige Funktionen, wobei sie beispielsweise als Bausteine für Biosynthesen, Energieträger oder intra- sowie extrazelluläre Botenstoffe von zentraler Bedeutung sind. Für den Transport der Aminosäuren über zelluläre Membranen hinweg stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Transportsysteme mit variierender Substratspezifität zur Verfügung. Cluster of Differentiation 98 (CD98) bezeichnet eine Proteinfamilie heterodimerer Aminosäuretransporter, die aus einer schweren Polypeptidkette (engl.: heavy chain; CD98hc) und einer von insgesamt sechs leichten Polypeptidketten (engl.: light chain; CD98lc) bestehen (Abbildung 2) (Fotiadis *et al.*, 2013).

Bei CD98hc (auch 4F2hc, FRP-1 oder SLC3A2 genannt) handelt es sich um ein glycosyliertes Typ-2 Transmembranprotein, welches im Menschen durch das SLC3A2 Gen auf Chromosom 11 kodiert ist (Francke *et al.*, 1983; Teixeira *et al.*, 1987). Das humane CD98hc-Protein (UniProt: P08195, Isoform 2) umfasst 529 Aminosäuren mit einer Molmasse von ~58 kDa (ohne Glycosylierung) und zeigt vier beschriebene Isoformen, die jedoch keine Aminosäuresequenzunterschiede in der extrazellulären Domäne aufweisen (Teixeira *et al.*, 1987). Das Glycoprotein bildet über einen extrazellulär lokalisierten konservierten Cysteinrest an Position 109 mit einem Cysteinrest innerhalb der Aminosäuresequenz der CD98lc-Proteine (zwischen Transmembranregion drei und vier) eine Disulfidbrücke aus (Fort *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2019). Somit ist CD98hc im funktionellen Heterodimer kovalent mit einem der sechs derzeit bekannten Permease-Typ CD98lc-Proteine, namens Lat-1 (Kanai *et al.*, 1998), Lat-2 (Pineda *et al.*, 1999), y+Lat-1 (Torrents *et al.*, 1998), y+Lat-2 (Broer *et al.*, 2000), asc-1 (Fukasawa *et al.*, 2000) und xCT (Sato *et al.*, 1999), verknüpft. Diese Aminosäuretransporter besitzen jeweils unterschiedliche Spezifitäten für den Transport von kationischen, neutralen, kleinen neutralen oder negativ geladenen Aminosäuren sowie u.a. für Schilddrüsenhormone (T3 und T4) oder die Neurotransmitter-Vorstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (Fotiadis *et al.*, 2013).

Aus biochemischer Sicht hat CD98hc zwei zentrale Aufgaben, für deren Funktion unterschiedliche Domänen innerhalb des Transmembranproteins verantwortlich sind (Fenczik *et al.*, 2001):

(i) Die membranproximalen Anteile der extrazellulären Domäne und Abschnitte der Transmembranhelix des CD98hc-Proteins fungieren als molekulares Chaperon, das für die korrekte Membrantranslokation, Stabilisierung und somit auch Funktion der CD98lc-Transporterproteine essentiell ist. (Nakamura *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2019). Neben der Bereitstellung von Aminosäuren als Bausteine für Biosynthesen, sind diese bzw. deren Derivate (beispielsweise L-Cystin) auch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt, wie der intrazellulären Signaltransduktion durch Aktivierung des multifunktionellen Proteins mTOR1 (Nicklin *et al.*, 2009) oder der zellulären Redoxhomöostase (Koppula *et al.*, 2018).

(ii) Ferner interagieren die cytoplasmatische Domäne und die Transmembranhelix von CD98hc mit den β -Untereinheiten $\beta 1$ oder $\beta 3$ heterodimerer Integrin-Adhäsionsmoleküle (Prager *et al.*, 2007), was eine Aktivierung bzw. Verstärkung der intra- und interzellulären Integrinfunktionen zur Folge hat (Bajaj *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2005; Feral *et al.*, 2007). Die durch Integrine vermittelten Signale steuern komplexe physiologische Prozesse wie Überleben, Migration und Wachstum von Zellen.

Erhöhter Aminosäuretransport sowie die Dysregulation von Zelladhäsion, Zellmigration und adhäsiven Signalen sind entscheidende Faktoren für die maligne Entartung von Körperzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung (Hanahan & Weinberg, 2011). Im Einklang mit den beiden oben beschriebenen Hauptfunktionen wird in der klinischen Praxis eine verstärkte Expression des CD98hc-Proteins bei unterschiedlichen Krebserkrankungen beobachtet, unter anderem Darmkrebs (Ye *et al.*, 2017), nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Kaira *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2015), dreifach negatives Mammakarzinom (El Ansari *et al.*, 2018; Furuya *et al.*, 2012), metastasierendes Prostatakarzinom (Wang *et al.*, 2013) sowie Lymphome (Salter *et al.*, 1989) und Leukämien (Bajaj *et al.*, 2016; Hayes *et al.*, 2015). Zudem ist die Überexpression dieses Tumormarkers bei einigen Krebsarten mit einer schlechten klinischen Prognose (Kaira *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2017), dem Ansprechen auf die Behandlung (Digomann *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2007) und der Überlebensrate (Furuya *et al.*, 2012; Kaira *et al.*, 2011; Rietbergen *et al.*, 2014) assoziiert. Somit stellt das Membranprotein eine attraktive molekulare Zielstruktur für diagnostische und therapeutische Zwecke bei der Krebsbehandlung dar.

Trotz dieser klinischen Relevanz in der Onkologie und dem Potenzial einer zielgerichteten Adressierung des CD98hc-Proteins sind aktuell nur wenige spezifische Bindereagenzien für diesen Bestandteil der heterodimeren Aminosäuretransporter beschrieben.

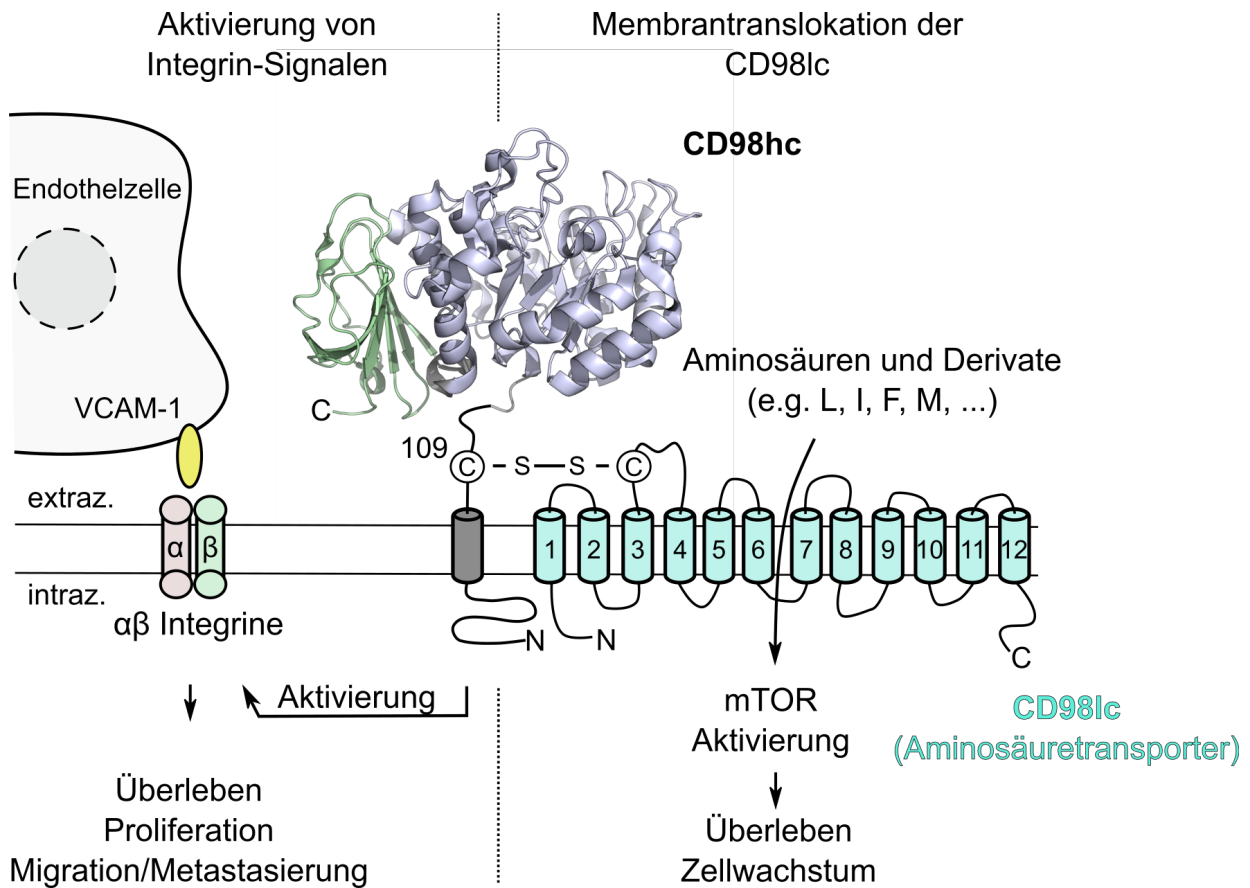


Abbildung 2: Schematische Darstellung und biochemische Funktion des Membranproteins CD98hc. Darstellung des CD98hc/CD98lc Heterodimers zur Illustration der zwei zentralen biochemischen Funktionen von CD98hc: (i) Aktivierung von intra- und interzellulären Integrin-Funktionen sowie (ii) zusammen mit den CD98lc-Proteinen der Transport unterschiedlicher Aminosäuren. Das CD98hc-Protein besitzt eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären N-terminalen Bereich. Die Kristallstruktur der Ektodomäne des humanen Proteins (PDB-ID: 2DH2) wurde mit einer Auflösung von 2,1 Å bestimmt (Fort et al., 2007) und ist hier im Bändermodell dargestellt. Die Ektodomäne von CD98hc besteht aus zwei Proteindomänen, einem $(\beta/\alpha)_8$ Triosephosphat-Isomerase-Barrel (blau) und einem β_8 -Sandwich (grün). (Abgewandelt nach Deuschle *et al.*, 2020a)

Der humanisierte monoklonale Antikörper (mAk) IGN523 ist der am weitesten fortgeschrittene Entwicklungskandidat für therapeutische Zwecke mit picomolarer Dissoziationskonstante gegenüber menschlichem CD98hc (Hayes *et al.*, 2015). Der mAk IGN523 zeigte überzeugende pharmakodynamische Effekte in präklinischen Xenotransplantat-Mausmodellen an humanen Tumoren sowie gute Verträglichkeit in einer klinischen Studie der Phase 1 (Hayes *et al.*, 2015;

Bixby *et al.*, 2015). Insbesondere sind bislang jedoch keine CD98hc-spezifischen Reagenzien für die *in vivo* Bildgebung verfügbar, welche bei einer Vielzahl unterschiedlicher Krebsarten als molekulare Diagnosewerkzeuge Anwendung finden könnten.

Neben der Therapie und Diagnose von Krebserkrankungen wurde CD98hc erst kürzlich als verheißungsvoller Transzytoserezeptor mit hoher Abundanz am Hirnendothel beschrieben, der sich für den Transport von Neuropharmazeutika nach intravenöser Injektion über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das Hirnparenchym eignen sollte (Zuchero *et al.*, 2016). Gemäß der Strategie des „Trojanischen Pferdes“ wird ein Bindeprotein oder -peptid, das für den jeweiligen Transzytoserezeptor der BHS spezifisch ist, an ein zu transportierendes therapeutisches Frachtmolekül gekoppelt, um so einen nicht-invasiven Übergang des Therapeutikums in das erkrankte Hirngewebe zu vermitteln (Pardridge, 2002). In diesem Zusammenhang konnte im Rahmen präklinischer Untersuchungen an einem Alzheimer-Mausmodell gezeigt werden, dass die spezifische Erkennung des murinen CD98hc-Proteins unter Anwendung eines bispezifischen α CD98hc/ α BACE1 mAk zum verstärkten Transport des Antikörpers in das Gehirn sowie zu verstärkten pharmakodynamischen Effekten im Vergleich zu einem Kontroll-Antikörper führte (Zuchero *et al.*, 2016). Gerade die hohe Präsenz dieses Zielrezeptors an den neuronal-mikrovaskulären Endothelzellen sowie die vergleichsweise gute Transporteffizienz von CD98hc gegenüber anderen Transzytoserezeptoren machen diese Strategie für die gezielte Arzneimittelabgabe in das Gehirn äußerst vielversprechend (Bixby *et al.*, 2015; Zuchero *et al.*, 2016).

Für die Konstruktion solch zielgerichteter Wirkstoffe ist die Verfügbarkeit struktureller Information über den Zielrezeptor von entscheidender Bedeutung. Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne (Gly¹⁰⁹ – Ala⁵²⁹) des humanen CD98hc-Proteins konnte nach Expression in *E. coli* in monomerer Form mit einer Auflösung von 2,1 Å (PDB-ID: 2DH2) bestimmt werden (Fort *et al.*, 2007). Die Faltung der Ektodomäne lässt sich in zwei Proteindomänen einteilen: (i) ein bei Trp¹¹⁷ beginnendes und bei Lys⁴³¹ endendes N-terminales (β/α)₈ Triosephosphat-Isomerase (TIM)-Barrel und (ii) ein C-terminales β ₈-Sandwich von Asp⁴³⁹ bis Ala⁵²⁹. Diese beiden Domänen sind über eine sieben Aminosäuren umfassende α -Helix (Glu⁴³² – Gly⁴³⁸) miteinander verbunden. Damit stellt die Ektodomäne der schweren Polypeptidkette humaner CD98-Transporter eine sehr kompakte sowie stabile Zielstruktur dar (Turnay *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu der beschriebenen Kristallstruktur der menschlichen CD98hc-Ektodomäne wurde kürzlich die Struktur des humanen CD98hc/Lat-1-Komplexes mittels Kryo-Elektronen-

mikroskopie (Kryo-EM) mit einer Auflösung von 3,3 Å aufgeklärt (Yan *et al.*, 2019) (Abbildung 3). Neben dem besseren Verständnis der mechanistischen Grundlage des Aminosäuretransports durch Lat-1 sowie der Wechselwirkung zwischen CD98hc und Lat-1 liefert diese Struktur wichtige Erkenntnisse für das Design neuer Biopharmazeutika gegen die heterodimere Zielstruktur. Nahezu die gesamte extrazellulär zugängliche Fläche des Aminosäuretransporters

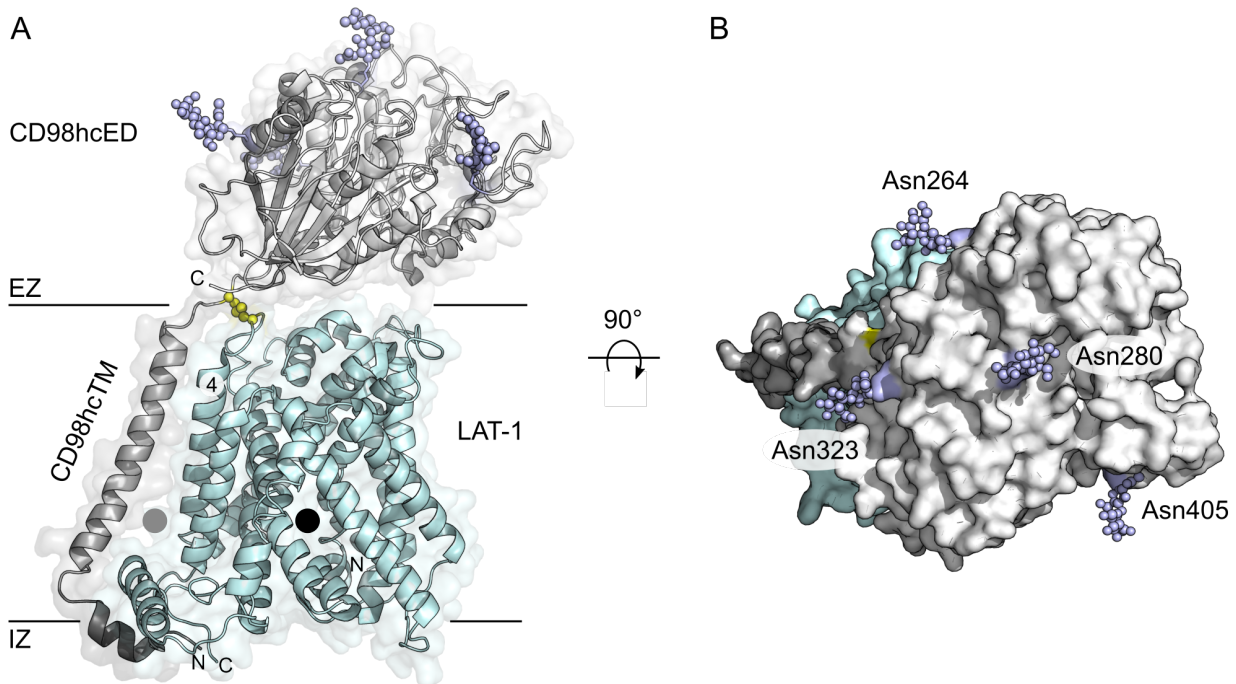


Abbildung 3: Strukturelle Übersicht des heterodimeren Aminosäuretransporters CD98hc/Lat-1. (A) Kryo-EM-Struktur des Komplexes aus CD98hc (grau) und Lat-1 (cyan) (PDB-ID: 6IRT) im Bändermodell mit transparenter Oberfläche in der Seitenansicht (Yan *et al.*, 2019). Die vier experimentell bestätigten N-Glycosylierungsstellen sind in Form von zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten (blau) angedeutet. Die für die kovalente Verknüpfung der zwei Proteineinheiten des Heterodimers nötige extrazellulär lokalisierte Disulfidbrücke ist hervorgehoben (gelb). Diese wird zwischen Cys¹⁰⁹ auf der Seite von CD98hc mit einem im Verbindungssegment zwischen den Transmembranregionen drei und vier lokalisierten Cysteinrest der CD98lc ausgebildet. Die Aminosäure-Bindungsstelle von Lat-1 ist als schwarzer gefüllter Kreis und die Bindungsstelle für Cholesterin an der Grenzfläche zwischen CD98hc und Lat-1 entsprechend grau gekennzeichnet. (B) Darstellung der dem Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche im CD98hc/Lat-1 Heterodimer mit Blick in Richtung Zellmembran.

wird durch die große Ektodomäne des CD98hc-Proteins abgedeckt. Diese begrenzte Zugänglichkeit der CD98lc-Proteine im funktionellen CD98hc/CD98lc-Heterodimer erschwert die Entwicklung von hochspezifischen Bindemolekülen mit hoher Affinität zusätzlich, während die große und weit in den extrazellulären Raum ragende Domäne des CD98hc-Proteins als Zielstruktur sehr gut geeignet scheint. Dennoch ist zu beachten, dass der extrazelluläre Anteil des

humanen CD98hc-Proteins vier experimentell bestätigte N-Glycosylierungsstellen an den Aminosäurepositionen Asn²⁶⁴, Asn²⁸⁰, Asn³²³ und Asn⁴⁰⁵ trägt (Wollscheid *et al.*, 2009), welche alle in dem N-terminalen (β/α)₈-TIM-Barrel lokalisiert sind (Abbildung 3B). Aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften komplexer N-Glycane (bspw. terminale, negativ geladene Sialinsäuren) und der dadurch gehinderten Zugänglichkeit der Proteinoberfläche, ist die Entwicklung entsprechender Bindereagenzien ebenfalls erschwert. Daher scheint für diese Zielstruktur die Entwicklung eines im Vergleich zu konventionellen Antikörpern kleineren und kompakteren Bindeproteins vorteilhaft zu sein.

1.3 Anticaline: maßgeschneiderte Bindeproteine für biomedizinische Anwendungen

Biopharmazeutika sind unter Anwendung biotechnologischer Verfahren hergestellte Arzneistoffe und machen einen stetig wachsenden Anteil des globalen Pharmamarktes aus (Moorkens *et al.*, 2017). Dabei bilden therapeutische Antikörper in den Indikationsgebieten Onkologie, Autoimmun- sowie chronischen Entzündungserkrankungen die funktionell und ökonomisch aktuell erfolgreichste Wirkstoffklasse. Dies spiegelt sich eindrucksvoll in der großen Anzahl an Antikörpern, die im Zeitraum der Jahre 2015 – 2018 für diagnostische und therapeutische Anwendungen klinisch zugelassen wurden (53% aller biopharmazeutischen Produkte), sowie dem in den letzten Jahren relativ zur Gesamtheit aller Biopharmazeutika stetig steigenden Jahresumsatz der Antikörper (Walsh, 2018).

Speziell die Entwicklung der Hybridom-Technologie (Köhler & Milstein, 1975) und späteren Verfahren des Protein-Engineerings (Chiu & Gilliland, 2016), allen voran die Methode des Phage Display (Ledsgaard *et al.*, 2018; Smith, 1985) in Verbindung mit dem Einsatz kombinatorischer Antikörper-Bibliotheken, beschleunigten den Aufstieg dieser Proteinklasse und ermöglichen heutzutage die Generierung quasi humaner Immunglobuline *in vitro*. Durch akkurates Protein-Design ist es zudem inzwischen möglich, nahezu beliebige Antikörperformate mit maßgeschneiderten Bindungseigenschaften hinsichtlich Affinität, Valenz, Geometrie oder Spezifität gegenüber einem Antigen für unterschiedlichste Zielstrukturen zu generieren (Brinkmann & Kontermann, 2017; Holliger & Hudson, 2005; Weiner, 2015).

Dennoch sind Antikörper nicht in jeglicher Hinsicht die ideale Lösung für biomedizinische Anwendungen, da sie teilweise ungünstige molekulare Eigenschaften sowie technische Herausforderungen mit sich bringen (Chames *et al.*, 2009; Hansel *et al.*, 2010). Die bei therapeutischen Anwendungen am häufigsten verwendeten Immunglobuline der Klasse G (IgG; vor allem IgG₁) bestehen aus je zwei identischen schweren und leichten Polypeptidketten, die über

interchenare Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und deren insgesamt 12 Ig-Domänen zusätzlich zahlreiche stabilisierende intrachenare Disulfidbrücken aufweisen (Abbildung 4A) (Irani *et al.*, 2015). Gleichzeitig besitzt jede der schweren Polypeptidketten als posttranslationale Modifikation eine Glycosylierung innerhalb der konstanten schweren Proteindomäne CH2 (Higel *et al.*, 2016). Aufgrund dieser komplexen molekularen Architektur ist die funktionelle Produktion dieser Proteine fast ausschließlich unter Anwendung von teuren und zeitaufwendigen eukaryotischen Expressionssystemen realisierbar.

Zusätzlich wurde in den letzten Jahren zwar die Entwicklung und Herstellung innovativer Antikörper-Formate – wie multispezifische Antikörper oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugate – möglich, allerdings sind in der praktischen Anwendung meist stark verminderte Proteinausbeuten zu beobachten, aufwendige Reinigungsverfahren notwendig und nicht selten nur ungenügend abtrennbare produktspezifische Verunreinigungen nachweisbar. Die erhebliche Größe der Antikörper von ca. 150 kDa führt ferner oftmals zu schlechterer Gewebepenetration sowie, zusammen mit der FcRn-vermittelten Aufnahme in Endothelzellen, zu einer sehr langen Plasma-Halbwertszeit (Liu, 2018). Diese lange systemische Zirkulationsdauer von mehreren Tagen ist für diagnostische Verfahren wie die radiomedizinische Bildgebung oder für Behandlungsstrategien, die die schnelle Ausscheidung gebundener Substanzen aus dem Kreislaufsystem oder variable Anpassung der Wirkstoffkonzentration im Blut erfordern, unvorteilhaft. Hinzu kommt, dass die durch den Fc-Teil der Antikörper vermittelten immunologischen Effektorfunktionen (Vidarsson *et al.*, 2014), wenngleich diese für eine Vielzahl an Anwendungen von Vorteil sind, bei bestimmten Therapieformen überflüssig oder gar nachteilig sind, beispielsweise bei der rein antagonistischen Blockierung von Rezeptoren.

Ausgehend von diesen Beschränkungen der Antikörper gab es bereits seit den 1990er Jahren Bestrebungen, neuartige und flexiblere Bindeproteine auf der Grundlage alternativer Proteingerüststrukturen zu generieren, welche nicht die typische Immunglobulin-Faltung aufweisen (Skerra, 2000a). Hierbei haben sich die natürlich vorkommenden Lipocaline und die auf der Basis dieses Protein-Scaffolds (engl.: scaffold = Gerüst) entwickelten Anticaline, auch klinisch neben DARPins, Affibodies oder Adnectinen, als alternative Bindereagenzien durchsetzen können (Gebauer & Skerra, 2019; Richter *et al.*, 2014; Rothe & Skerra, 2018). Die Entwicklung von Anticalinen mit hoher Spezifität und Affinität gegenüber einer biomedizinisch relevanten Zielstruktur sowie deren Anwendung ist von zentralem Interesse in dieser Arbeit, so dass die Anticalin-Technologie im Folgenden genauer beleuchtet wird.

Lipocaline (gr. lipos = Fett und calyx = Kelch) bilden eine diverse Familie kleiner Bindeproteine (150 – 180 Aminosäure-Reste), welche in nahezu allen Lebewesen – von Pflanzen und Bakterien bis hin zu Vertebraten – zu finden sind und bilden die Grundlage der Anticalin®-Technologie (Abbildung 4B). Im menschlichen Körper sind etwa zwölf unterschiedliche Lipocalin-Vertreter als sekretorische Proteine bekannt (Schiefner & Skerra, 2015). Ihre vielfältigen Funktionen liegen meist in der Bindung und dem Transport von hydrophoben, chemisch sensitiven oder pathophysiologisch relevanten Substanzen, wodurch sie an einer ganzen Reihe wichtiger biologischer Prozesse, wie der Regulation des Zellwachstums und -stoffwechsels oder der Immunantwort, beteiligt sind (Schiefner & Skerra, 2015; Skerra, 2000b).

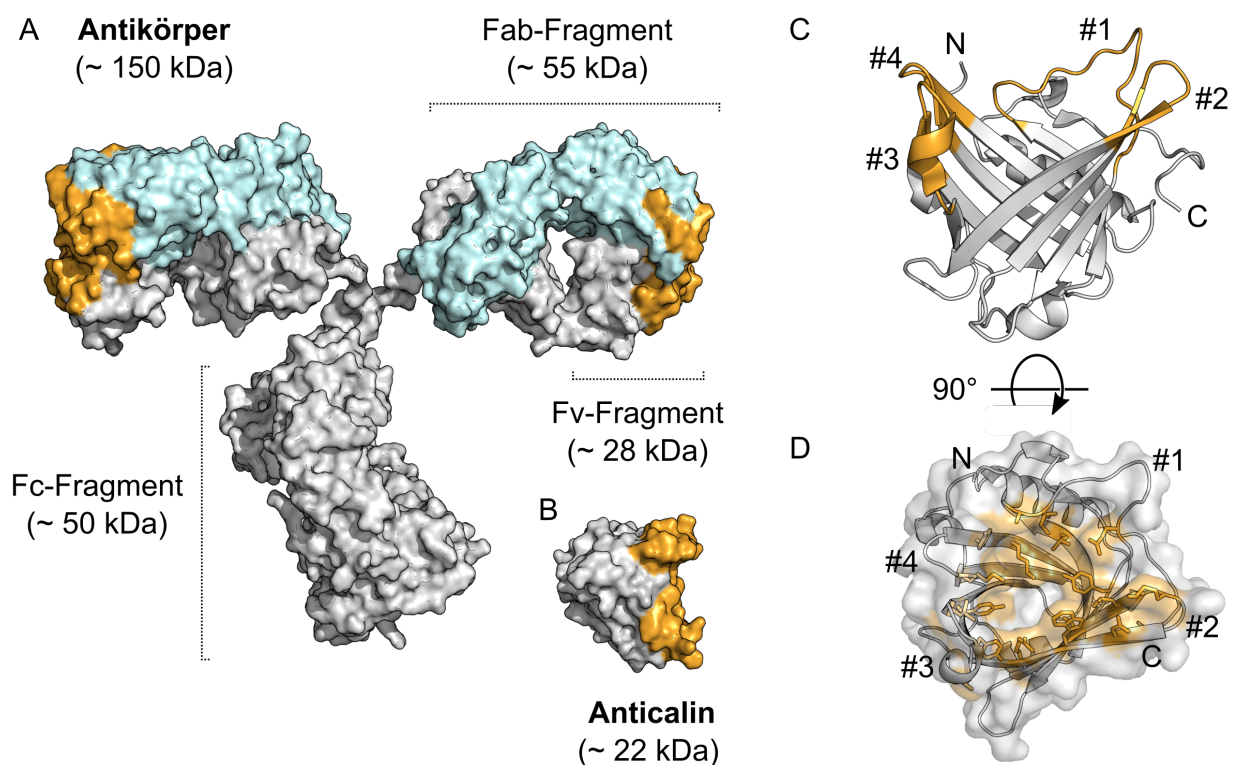


Abbildung 4: Strukturvergleich und Prinzip der molekularen Erkennung von Lipocalinen bzw. Anticalinen und konventionellen Antikörpern. (A und B) Typische Struktur eines Antikörpers (A; PDB-ID: 1IGT) und eines Lipocalins/Anticalins (B; PDB-ID: 1X8U) unter maßstabgetreuer Wiedergabe. Die strukturell variablen Regionen beider Molekülformate, welche die Bindung unterschiedlicher Liganden ermöglichen, sind farblich hervorgehoben (Liganden-Bindungstasche beider Proteinklassen in gold; schwere und leichte Immunglobulin-Kette des Antikörpers in grau bzw. cyan). (C) Anticaline werden ausgehend von humanen Lipocalinen (z.B. Lcn2), welche eine kelchförmige Faltung mit einem konservierten Gerüst aus acht antiparallelen β -Strängen besitzen, generiert. (D) Die ortsgerichtete Randomisierung von Aminosäurepositionen im Bereich der vier strukturell variablen Schleifenregionen am oberen Teil der β -Fasstruktur ermöglicht die Ausbildung passender Ligandenbindungstaschen für unterschiedliche Zielstrukturen. (Abgewandelt nach Deuschle *et al.*, 2020c)

Die Mitglieder der Lipocalinfamilie besitzen trotz einer typischerweise sehr geringen Sequenzhomologie von nur 10–20%, ein strukturell erstaunlich hochkonserviertes kelchförmiges β -Barrel (engl.: Barrel = Fass) als zentrales Faltungsmotiv (Abbildung 4C) (Schiefner & Skerra, 2015). Dieses kompakte β -Barrel ist aus acht antiparallelen β -Strängen aufgebaut, die sich rechtshändig um eine zentrale Achse winden, so dass der erste und der achte Strang über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Auf diese Weise entstehen ein offenes und ein geschlossenes Ende. Am offenen Ende werden die β -Stränge durch vier strukturell variable Peptidschleifen (#1–#4) paarweise miteinander verbunden und bilden so eine Kavität, welche als Bindungstasche für natürliche Liganden fungiert (Skerra, 2000b). Am anderen Ende des Kelches bilden die Peptidschleifen eine dichte Packung vornehmlich hydrophober Aminosäureseitenketten und verschließen das Fass. Als weitere Strukturmerkmale der Lipocaline findet man am C-terminus eine an das β -Barrel angelehnte α -Helix und ein Schleifensegment mit mehreren Aminosäuren, das durch eine intramolekulare Disulfidbrücke mit dem β -Barrel stabilisiert ist.

Aufgrund der vier strukturell variablen Peptidschleifen am Eingang der Bindungstasche, welche im Prinzip eine Adaption dieses Proteingerüsts an unterschiedliche Liganden ermöglichen, besitzt diese Proteinklasse große konzeptionelle Ähnlichkeiten zu Antikörpern (Skerra, 2003). Diese weisen dagegen insgesamt sechs hypervariable Schleifen – auch Complementarity-Determining Region (CDR) genannt – mit wiederum konservierten Gerüstregionen bestehend aus einem antiparallelen Sandwich zweier β -Faltblätter auf. Die bemerkenswerte Analogie zwischen Lipocalinen und Antikörpern, welche anhand früher struktureller Studien erkannt wurde (Huber *et al.*, 1987), lieferte die Grundidee für die Entwicklung der Anticalin-Technologie (Skerra, 2000b). Hierbei wird die Plastizität der vier Peptidschleifen sowie die strukturelle Toleranz des Lipocalin-Scaffolds bezüglich Aminosäureaustauschen genutzt, um unter Anwendung von Methoden des kombinatorischen Protein-Designs Bindeproteine mit Spezifität für völlig neue Zielstrukturen zu erschaffen (Richter *et al.*, 2014).

Da im Vergleich zur natürlichen Rekombination von Immunglobulinen hochspezialisierte genetische Diversifizierungsmechanismen für Lipocalinproteine im Organismus fehlen, werden für die Selektion von Anticalinen künstliche Genbibliotheken mit leistungsstarken Selektionsmethoden (wie dem Phage Display oder Bacterial Surface Display) kombiniert und anschließend angereicherte Sub-Bibliotheken nach Varianten mit neuen und gegebenenfalls therapeutisch relevanten Bindungseigenschaften durchmustert (Gebauer & Skerra, 2012). Für Anwendungen in der Humanmedizin werden Anticaline dabei vornehmlich auf Basis von zwei im

Menschen vorkommenden Lipocalinen – dem Tränenlipocalin (Tlc bzw. Lcn1) und dem Neutrophilen-Gelatinase-assoziierten Lipocalin (NGAL bzw. Lcn2) – selektiert, um die Wahrscheinlichkeit immunogener Reaktionen bei therapeutischer Anwendung zu minimieren. Diese Überlegung scheint sich durch die gute Verträglichkeit von bislang fünf Anticalin-Leitkandidaten in klinischen Studien zu bestätigen (Rothe & Skerra, 2018). Auf der Basis dieser zwei Lipocalin-Gerüste hat sich die Randomisierung von 15-20 Resten innerhalb der strukturell variablen Schleifen sowie angrenzenden Bereichen des β -Barrels für die Erstellung von nativen Bibliotheken zur effizienten Selektion von Anticalinen als vorteilhaft erwiesen (Abbildung 4D).

Auf diese Weise konnten bereits eine Reihe vielversprechender Anticaline für hochrelevante biomedizinische Anwendungen entwickelt werden. Hierbei wurde deutlich, dass die flexibel anpassbare Bindungstasche für die stabile Komplexbildung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Zielstrukturen, wie niedermolekulare Haptene, kleine Peptide wie auch makromolekulare Proteine, mit bis zu picomolaren Dissoziationskonstanten außergewöhnlich gut geeignet ist (Abbildung 5). Demzufolge können Anticaline mit diversen Wirkmechanismen für die Humantherapie entwickelt werden.

Als Antidot zur Neutralisierung toxikologisch relevanter Substanzen und deren raschen Eliminierung aus dem Blutkreislauf konnten etwa die beiden hochaffinen Anticaline DigiCal (zur Komplexbildung des Herzglycosids Digoxin) (Eyer *et al.*, 2012) und Colchicalin (zur Bindung des Pflanzenalkaloids Colchicin) (Barkovskiy *et al.*, 2018) in präklinischen Untersuchungen ihr Potential zur Anwendung bei akuten Intoxikationen unter Beweis stellen. Das als Antagonist wirkende Anticalin PRS-010 (Schönfeld *et al.*, 2009) bindet mit sub-nanomolarer Affinität das cytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen 4 (CTLA-4, CD152), unterdrückt so die Funktion dieses Oberflächenrezeptors als Immuncheckpoint-Protein und führt letztlich zu einer für die Tumorthherapie nützlichen Verstärkung der Immunantwort. Ferner können Anticaline als Vehikel für die zielgerichtete Gewebeadressierung von toxischen Substanzen oder Kontrastmitteln für die medizinische Bildgebung (wie Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffe oder Radionuklide) sowie Enzymen verwendet werden. Vielversprechende Entwicklungskandidaten für diese Anwendung sind die zur Adressierung der Tumor-Neoangiogenese entwickelten Anticaline N7E und N7A (Gebauer *et al.*, 2013; Schiefner *et al.*, 2018), welche hochspezifisch die Extra-Domäne B (ED-B) des humanen onkofetalen Fibronektins erkennen, oder das gegen die membranassoziierte Variante des Tumormarkers Hsp70.1 gerichtete Anticalin BBG10C/I (Friedrich *et al.*, 2018). Mit Hilfe der ausgeprägten konkaven Bindungstasche der Anticaline können zu-

dem pathophysiologisch relevante Peptidfragmente bzw. Peptidhormone fest gebunden und somit der systemischen Zirkulation entzogen werden, wie anhand des für die Therapie der Alzheimer-Erkrankung entwickelten α A β Anticalins H1GA (Rauth *et al.*, 2016) und des zur Behandlung der Eisenmangelanämie einsetzbaren α Hepcidin Anticalins PRS-080 (Hohlbaum *et al.*, 2018) eindrucksvoll gezeigt werden konnte.

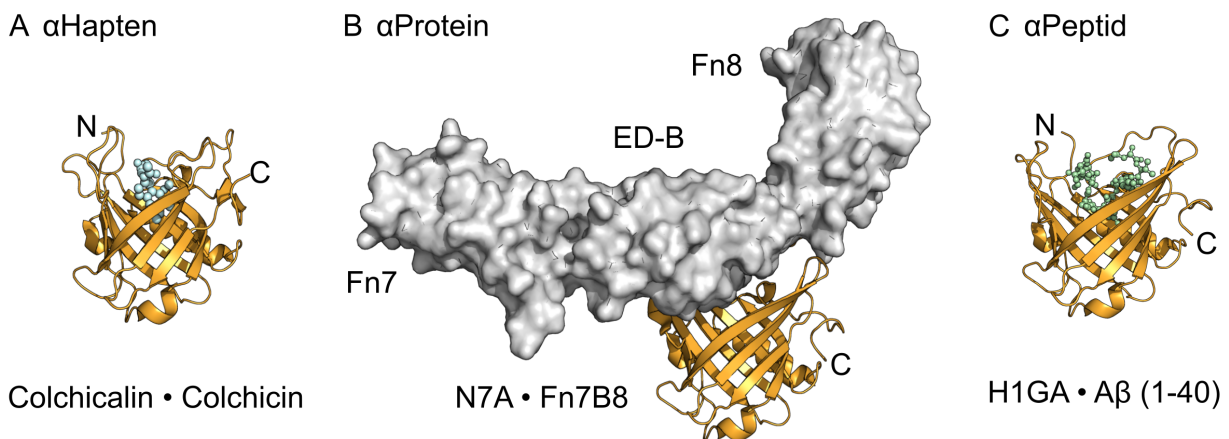


Abbildung 5: Strukturen von Anticalinen auf Basis des Proteingerüsts von Lcn2 im Komplex mit dem jeweiligen Zielmolekül. Kristallstruktur von Anticalinen mit Spezifität für (A) den Hapten-Liganden Colchicin (Colchicalin • Colchicin, PDB-ID: 5NKN), (B) den Protein-Liganden ED-B (N7A • Fn7B8, PDB-ID: 4GH7) und (C) den Peptid-Liganden A β (H1GA • A β 1-40, PDB-ID: 4MVL). (Abgewandelt nach Deuschle *et al.*, 2020c)

Aufgrund ihrer deutlich einfacheren Architektur mit nur einer Polypeptidkette und nicht notwendiger Glycosylierung bietet sich bei Anticalinen die Möglichkeit der Herstellung in kostengünstigen bakteriellen Expressionssystemen. Zusätzlich zeigen diese kleinen Bindeproteine eine exzellente Gewebepenetration bei gleichzeitig kurzer Zirkulationsdauer im Blut. Eine maßgeschneiderte Anpassung der Plasma-Halbwertszeit kann jederzeit durch die chemische Kopplung mit Polyethylenglycol (PEG) (Chapman, 2002; Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 2014) oder die innovative PASylierungs-Technologie (Friedrich *et al.*, 2018; Schlapschy *et al.*, 2013), welche auf der genetischen Fusion mit einem unstrukturierten Polypeptid aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS) beruht, erreicht werden. Ferner bieten die sterisch frei zugänglichen C- und N-Termini der Anticaline sowie die Möglichkeit der zufälligen wie auch ortsspezifischen Kopplung chemischer Wirkstoffe hohe Flexibilität bei der Entwicklung innovativer multifunktionaler Biologika. Anticaline stellen somit aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften eine flexiblere, aber ebenso leistungsstarke Alternative mit teilweise überlegenen

Eigenschaften gegenüber Antikörpern dar und besitzen das Potenzial, die Ära von Biopharmazeutika der nächsten Generation mitzuprägen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten geeignete Anticaline gegen die extrazelluläre Domäne von CD98hc und neuartige Anticalin-Formate für die molekulare *in vivo* Bildgebung sowie ggf. die gezielte Therapie im Sinne eines theranostischen Ansatzes entwickelt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden primär die folgenden drei Themenbereiche bearbeitet:

- (i) Aufgrund der Relevanz für die Entwicklung spezifischer und hochaffiner Bindeagenzien gegen CD98hc sollten die biophysikalischen und strukturellen Unterschiede zwischen der extrazellulären Domäne des CD98hc-Proteins der Maus und des Menschen detailliert untersucht werden. **(Veröffentlichung 1)**
- (ii) Die in einer Selektionskampagne gegen das humane CD98hc-Protein identifizierten Anticaline sollten im Hinblick auf ihre Bindungseigenschaft und ihre biomolekulare Erkennung des Zielmoleküls untersucht werden. Ferner sollte der CD98hc-bindende Leitkandidat hinsichtlich Proteinstabilität und Affinität mittels evolutivem Protein-Engineering für die Anwendung *in vivo* optimiert werden. Um die Eignung des resultierenden Anticalins für die Radiodiagnostik/-therapie zu untersuchen, sollte dessen Funktionalität in seiner PASylierten Form in relevanten humanen Tumorexograft-Modellen in der Maus präklinisch evaluiert werden. **(Veröffentlichung 2)**
- (iii) Für eine translational aussagekräftige präklinische Beurteilung der zielgerichteten Adressierung des CD98hc-Membranproteins in Mausmodellen sollte ein für die extrazelluläre Domäne des murinen CD98hc-Proteins spezifisches Anticalin mit vergleichbaren Bindungseigenschaften zum human-spezifischen Anticalin-Leitkandidaten selektiert, charakterisiert und bezüglich der biomolekularen Erkennung des Zielmoleküls strukturell untersucht werden. **(Veröffentlichung 3)**

2. Methodenüberblick

Diese publikationsbasierte Doktorarbeit beruht auf drei wissenschaftlichen Studien, in denen vielfältige gentechnische, molekularbiologische, proteinbiochemische und strukturelle Methoden angewandt sowie zellbiologische und tierexperimentelle Arbeiten durchgeführt wurden. Diese sind in den Methodenabschnitten der hier eingebundenen Veröffentlichungen (Deuschle *et al.*, 2020a; Deuschle *et al.*, 2020b; Deuschle *et al.*, 2019) sowie in den jeweiligen ergänzenden Informationen (engl.: Supporting Information) unter Angabe der Hersteller für genutzte Chemikalien, Materialien und Geräte im Detail erläutert, weshalb an dieser Stelle nur eine Übersicht der wichtigsten verwendeten Methoden dargestellt wird. Beschreibungen von gentechnischen, molekularbiologischen und proteinchemischen Standardverfahren, welche nicht in den angegebenen Veröffentlichungen bzw. dieser Dissertation beschrieben sind, jedoch im Labor von Prof. Dr. A. Skerra bereits gut etabliert waren (insbesondere die Kultivierung und Transformation von *E. coli*-Stämmen, die Klonierung von Vektoren, Modifikation doppelsträngiger DNA, Polymerase-Kettenreaktionen, ortsgerichtete Mutagenese oder SDS-PAGE Analysen), können vorangegangenen Dissertationen, die am Lehrstuhl für Biologische Chemie (TU München) angefertigt wurden, entnommen werden (beispielsweise die von Dr. M. Schlapschy, Dr. M. Gebauer, Dr. L. Friedrich oder Dr. E. Eggenstein).

2.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen, humane Zelllinien und Versuchstiere

Alle *E. coli* Stämme, Bakteriophagen oder eukaryotische Zelllinien stammten (falls nicht anderweitig angegeben) aus der Sammlung von Prof Dr. A. Skerra (TU München).

Escherichia coli K12-Stämme

JK321 $\Delta ompT proC leu-6 trpE38 entA zih12::Tn10 dsbA::kan$ (Jose *et al.*, 1996)

JM83 $ara \Delta(lac-proAB) rpsL (= strA) \phi80 lacZ\Delta M15$ (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

KS272 $F^- \Delta lacX74 gale galK thi rpsL \Delta phoA (PvuII)$ (Strauch & Beckwith, 1988)

TG1-F⁻ $F^- supE thi-1 \Delta(lac-proAB) \Delta(mcrB-hsdSM)5 (r_K-m_K^-)$ (Gibson, 1984)

XL1-Blue $recA1 endA1 gyrA9 (NaI^R) thi-1 hsdR17 glnV44 relA1 lac F^+[proAB^+ lacI^q lacZ\Delta M15 Tn10(Tet^R)]$ (Bullock *et al.*, 1987)

Escherichia coli B-Stämme

BL21 F⁻ *fhuA2 [lon] [dcm] ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal [malB⁺]_{K-12} (λ^S) (Studier & Moffatt, 1986)*

Bakteriophage

VCS-M13 Helferphage (Kan^R); Stratagene, Heidelberg

Humane Zelllinien

- Caco-2 Isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom; epithelial, adhärent (Fogh *et al.*, 1977); erhalten von Prof. Daniel, TU München
- DU-145 Isoliert aus einer Hirnmetastase eines primären Prostatakarzinoms; epithelial, adhärent (Stone *et al.*, 1978); erhalten von Prof. Weber, TU München
- HEK293T Humane embryonale 293-Nierenzelllinie, ursprünglich als 293/tsA1609neo bezeichnet, welche das Large SV40 T-Antigen exprimiert (DuBridge *et al.*, 1987); erhalten von Prof. Palacín, IRB Barcelona
- HEK293T ΔCD98hc Derivat der HEK293T Zelllinie mit einem CRISPR/Cas9-vermittelten Knockout des für humanes CD98hc kodierenden SLC3A2 Gens (Klon 20) (Fuchs *et al.*, 2018); erhalten von Prof. Palacín, IRB Barcelona
- MEXi-293E Humane embryonale 293-Nierenzelllinie; exprimiert das Protein EBNA-1 für die episomale Replikation von OriP tragenden Plasmiden; lymphoblastisch, Suspension; IBA Lifesciences, Göttingen
- PC-3 Isoliert aus einer Knochenmetastase eines primären Prostatakarzinoms; epithelial, adhärent (Kaighn *et al.*, 1979); erhalten von Prof. Weber, TU München
- Ramos B-Lymphozyt isoliert aus einem Burkitt-Lymphom; lymphoblastisch, Suspension (Klein *et al.*, 1975); Lehrstuhl für Biologische Chemie
- Raji B-Lymphozyt isoliert aus einem Burkitt-Lymphom; lymphoblastisch, Suspension (Epstein & Barr, 1965); erhalten von Prof. Küster, TU München
- SU-DHL-4 B-Lymphozyt isoliert aus einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom; lymphoblastisch, Suspension (Epstein *et al.*, 1976); erhalten von Prof. Küster, TU München

Versuchstiere

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden in den Räumlichkeiten der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar (Prof. Wolfgang Weber, TU München) durchgeführt. Die Durchführung der Tierversuche unterlag dem Tierversuchantrag mit der Nummer 55.2-1-54-2532-216-15 bei der Regierung von Oberbayern.

Immundefiziente CB17-SCID Maus	Artenbezeichnung: CB-17/lcr-Prkdc ^{scid} /Rj Immunsystem: Fehlen von reifen T- und B-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen sowie Kom- plementfaktoren
-----------------------------------	---

2.2 Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Varianten der CD98hc Ektodomäne

Für die Anticalin-Selektionskampagnen, ELISA-Screens, biophysikalische Charakterisierung von Anticalinen sowie proteinkristallographische Untersuchungen wurden unterschiedliche Varianten der extrazellulären Domäne des murinen und humanen CD98hc-Proteins (m/hCD98hc) (UniProt ID P08195-2, Reste Glu¹¹¹–Ala⁵²⁹ bzw. UniProt ID P10852-1, Reste Glu¹⁰⁵–Ala⁵²⁶) in *E. coli* bzw. MEXi-293E (Säugetier-Zellkultur) exprimiert (Tabelle 1).

Herstellung der extrazellulären m/hCD98hc-Domänen in *E. coli*

Die Produktion der für die Proteinkristallisation verwendeten m/hCD98hc-Ektodomäne mit N-terminalem *Strep*-tag II wurde in *E. coli* BL21 (New England Biolabs, Frankfurt am Main) mit den Expressionsplasmiden pASK-IBA5(+)-*Strep*-mCD98hcED bzw. pASK-IBA5(+)-*Strep*-hCD98hcED durchgeführt. Für die heterologe Produktion der für die Anticalin-Selektionskampagnen, ELISA-Screens oder biophysikalische Charakterisierung von Anticalinen verwendeten monobiotinylierten m/hCD98hc-Ektodomänen bzw. der Mutante mCD98hcED(N³⁸⁵D/T⁴⁰¹A) mit N-terminalem Biotin-Akzeptorpeptid (BAP) wurde *E. coli* BL21 mit einem der Expressionsplasmide pASK-IBA5(+)-BAP-mCD98hcED, pASK-IBA5(+)-BAP-hCD98hcED oder pASK-IBA5(+)-BAP-mCD98hcED(N³⁸⁵D/T⁴⁰¹A) und dem für die Biotinligase Bir A kodierenden pBirAcm (Avidity, Aurora, CO) kotransformiert. Der Expressionsvektor pASK-IBA5(+) trägt das chemisch induzierbare tet-Promotor/Operator-System und basiert auf dem Plasmid pASK75 (Skerra, 1994).

Tabelle 1: Übersicht von in *E. coli* oder MEXi-293E-Zellen hergestellten Varianten der m/hCD98hc-Ektodomäne

Protein	N-terminale Peptidanhängsel	Molekülmasse [Da] ^a / Aminosäureanzahl	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^b
<u><i>E. coli</i>:</u>			
hCD98hcED	BAP	48208,4 / 438	68410
	<i>Strep</i> -tag II	47437,5 / 431	68410
mCD98hcED	BAP	49086,6 / 441	69900
	<i>Strep</i> -tag II	48315,8 / 434	69900
mCD98hcED (N ³⁸⁵ D/T ⁴⁰¹ A)	BAP	49057,6 / 441	69900
<u>MEXi-293E:</u>			
hCD98hcED	His ₆ / BAP	49045,3 / 444	68410
mCD98hcED	His ₆ / BAP	49923,5 / 447	69900
mCD98hcED (N ³⁸⁵ D/T ⁴⁰¹ A)	His ₆ / BAP	49894,5 / 447	69900

^a Anhand der Primärsequenz kalkuliertes Molekulargewicht (mit ProtParam, ExPASy-Server). Das Molekulargewicht eines Biotins (244,3 Da) an der Lys-Seitenkette des BAP wurde nicht addiert.

^b Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Summe der Absorptionsbeiträge aller in der Polypeptidkette enthaltenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cystinseitenketten berechnet (Gill & von Hippel, 1989)

Unabhängig von dem fusionierten Peptidanhängsel wurde ausgehend von einer transformierten Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms BL21 das jeweilige m/hCD98hcED-Protein im 2-L Schüttelkolben-Maßstab in TB-Medium hergestellt. Hierzu wurde eine Vorkultur mit der Kolonie in 50 ml LB/Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die 2 L-Hauptkultur wurde im Verhältnis 1:50 mit der Vorkultur beimpft und bei 26 °C mit 180 rpm geschüttelt. Bei OD₅₅₀ ≈ 2,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 200 µg/l aTc (Acros Organics, Geel, Belgien) für 12 h bei 26 °C induziert. Bei vorangegangener Kotransformation mit dem Plasmid pBirAcm wurde für die zusätzliche Induktion der Expression von BirA, welches die Biotinylierung am BAP katalysiert, der Bakterienkultur gleichzeitig mit aTc 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (AppliChem, Darmstadt) zugesetzt. Im Anschluss an die Genexpressionsphase wurden

die Bakterien durch Zentrifugation geerntet, in 30 ml des entsprechenden Puffers der nachfolgenden Chromatographie (siehe unten) resuspendiert und mit einem PandaPLUS 2000-Homogenisator (GEA Niro Soavi, Parma, Italien) aufgeschlossen. Nach gründlicher Zentrifugation wurde der geklärte Zellextrakt erhalten.

Im Fall des N-terminalen *Strep*-tag II wurde die rekombinante Ektodomäne aus dem bakteriellen Zellextrakt durch *Strep*Tactin-Affinitätschromatographie (SAC) gereinigt (Schmidt & Skerra, 2007). Der in Streptavidin-Chromatographiepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) präparierte Gesamtzellextrakt wurde zunächst mit 1 nmol Streptavidin (aus Eigenproduktion) pro Liter Kulturvolumen versetzt, um freies Biotin oder biotinylierte Proteine zu komplexieren. Für die Chromatographie wurde eine mit *Strep*Tactin-Sepharose gepackte Säule mit einem Bettvolumen von 25 ml verwendet. Alle SACs wurden grundsätzlich bei 4 °C durchgeführt. Geeignete Fraktionen nach Elution mit 5 mM D-Desthiobiotin wurden vereinigt und gegen Anionenaustauschchromatographie (AEX)-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) dialysiert. Für die Reinigung mittels AEX wurde eine mit diesem Puffer äquilibrierte Resource Q-Säule (GE Healthcare, München) mit einem Bettvolumen von 6 ml angewendet. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines linearen Konzentrationsgradienten von 0–300 mM NaCl im AEX-Laufpuffer. Mit den vereinigten Fraktionen wurde vor der Proteinkristallisation (siehe Abschnitt 2.11) eine präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) mit einer in 10 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,02% NaN₃ äquilibrierten 24 ml Superdex 75 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden durch Ultrafiltration in einer Amicon Zentrifugationseinheit (MWCO: 10 kDa; Merck Millipore, Billerica, MA) auf die gewünschte Konzentration für die Proteinkristallographie (siehe Abschnitt 2.11) eingestellt.

Im Fall eines N-terminalen BAP wurde die rekombinante m/hCD98hc-Ektodomäne direkt aus dem Zellextrakt durch AEX unter Verwendung einer MacroCapQ-Säule mit 60 ml Bettvolumen (GE Healthcare) isoliert. Die Elution erfolgte im Verlauf eines stufenweisen NaCl-Konzentrationsgradienten (Stufe 1: 50 mM; Stufe 2: 190 mM; Stufe 3: 500 mM NaCl) im AEX-Laufpuffer. Die entsprechenden Fraktionen aus Stufe 2 wurden vereinigt und für einen weiteren Reinigungsschritt mit Hilfe der Streptavidin-Mutante 1.6 gegen Streptavidin-Chromatographiepuffer (Zusammensetzung siehe oben) dialysiert. Die Streptavidin-Mutante 1.6 ermöglicht die Bindung von biotinylierten Proteinen und die anschließende kompetitive Elution mit Hilfe von freiem Biotin (unveröffentlicht) und

somit die spezifische Isolierung des am BAP biotinylierten m/hCD98hcED-Proteins. Die Elution von der mit der Streptavidin-Mutante 1.6 funktionalisierten Säule mit einem Bettvolumen von 5 ml erfolgte unter Verwendung einer Lösung mit 5 mM Biotin in SAC-Puffer. Für den Erhalt einer monodispersen Proteinpreparation wurde abschließend eine SEC mit einer in PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl) äquilibrierten 24 ml S200 10/300 GL Säule (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt.

Bei allen Chromatographie-Schritten wurden relevante Fraktionen gesammelt, mittels SDS-PAGE (Fling & Gregerson, 1986) unter reduzierenden (mit β -Mercaptoethanol) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen analysiert und entsprechend der gewünschten Reinheit vereint. Analytische SEC wurde mit einer S75 10/300 GL oder S200 10/300 GL Säule, jeweils mit 24 ml Bettvolumen, in PBS und einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wurde die Säule mit den folgenden Standardproteinen (alle Sigma-Aldrich) kalibriert: Thyreoglobulin (669 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Cytochrom c (12,4 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa). Das Totvolumen der Säulen wurde unter Verwendung von Blue Dextran (2000 kDa) (Sigma-Aldrich) bestimmt. Basierend auf den Elutionsvolumina wurden die Verteilungskoeffizienten K_{av} berechnet und nach linearer Regression die apparente Molekülgröße des analysierten Proteins interpoliert.

Herstellung der extrazellulären m/hCD98hc-Domänen in Zellkultur

Die Produktion der glycosylierten m/hCD98hc-Ektodomänen (m/hCD98hcEDg) sowie der partiell glycosylierten Mutante mCD98hcEDg(N³⁸⁵D/T⁴⁰¹A) in MEXi-293E-Zellen wurde im wesentlichen nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in MEXi-Kulturmedium, welchem 50 mg/l G-418 (IBA) und 8 mM L-Alanyl-L-Glutamin (beide PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zugesetzt waren, bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre bis zum Erhalt ausreichender Zellmenge für den gewünschten Transfektionsmaßstab kultiviert. Für die transiente Transfektion der MEXi-293E-Zellen mit den Expressionsplasmiden pDSG-BM-His₆-BAP-mCD98hcEDg-Ig κ -BirA-StrepDEL, pDSG-BM-His₆-BAP-hCD98hcEDg-Ig κ -BirA-StrepDEL bzw. pDSG-BM-His₆-BAP-mCD98hcEDg(N³⁸⁵D/T⁴⁰¹A)-Ig κ -BirA-StrepDEL (StrepDEL entspricht einer Fusion zwischen der *Strep*-tag II-Aminosäuresequenz WSHPQFEK und der Re-

tentionssignalsequenz KDEL für das endoplasmatische Retikulum) wurde 250 ml MEXi-Transfektionsmedium bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml mit 25 μ g Plasmid-DNA/ml versetzt. Die Plasmid-DNA wurde davor zur Ausbildung von Polyplexen in einem Massenverhältnis von 1:3 mit linearem Polyethylenimin 25 kDa (PEI; Polysciences Europe, Eppelheim) in MEXi-Transfektionsmedium für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Transfektion für 4 h bei 37 °C wurde 500 ml MEXi-Kultivierungsmedium zugegeben und die sekretorische Expression für vier Tage durchgeführt.

Die Produktion der rekombinanten Proteine als Fusion mit einem C-terminalen Hexahistidinhängsel (His₆-tag) ermöglichte deren Isolierung mit Hilfe der Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) (Skerra *et al.*, 1991). Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen dazu mittels Zentrifugation (5.000 rpm) sedimentiert und der geklärte Überstand gegen IMAC-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl) dialysiert. Zur Isolierung der CD98hc-Ektodomänen wurde der jeweilige Überstand auf eine mit Ni²⁺-beladene und in IMAC-Laufpuffer äquilibrierte HisTrap HP Säule (GE Healthcare) mit einem Bettvolumen von 5 ml aufgetragen. Die Elution erfolgte im Verlauf eines linearen Konzentrationsgradienten von 0–300 mM Imidazol/HCl in IMAC-Puffer. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und mit EDTA zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt, um Schwermetall-vermittelte Proteinpräzipitation zu vermeiden. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Fling & Gregerson, 1986) unter reduzierenden (mit β -Mercaptoethanol) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen analysiert und entsprechend der gewünschten Reinheit vereint. Die vereinte Proteinlösung wurde anschließend, wie bereits für die in *E. coli* hergestellten m/hCD98hcED-Proteine beschrieben, mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (Streptavidin-Mutante 1.6) und präparativer Größenausschlusschromatographie an einer 24 ml Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) in PBS gereinigt.

2.3 Selektion durch Phage Display und Screening auf Anticaline mit Bindungsaktivität mittels ELISA

Für eine schrittweise Beschreibung des Phage Display-Verfahrens und des Hochdurchsatz-ELISA Screens können die Dissertationsschrift von Frau Dr. Michaela Gebauer (Gebauer, 2013) und einschlägige Veröffentlichungen (Gebauer *et al.*, 2013; Gebauer & Skerra, 2012) konsultiert werden.

Die Selektion von Lipocalin-Varianten mit Affinität gegenüber murinem oder humanem CD98hc wurde mittels filamentösem Phagemid-Display aus einer kombinatorischen Bibliothek auf der Basis des humanen Lipocalin 2 durchgeführt. Die hierfür verwendete Bibliothek hatte eine Komplexität von $\sim 1 \times 10^{10}$ Lipocalin-Varianten, wobei das Lipocalin-Gerüst an 20 Positionen innerhalb der strukturell variablen Schleifen randomisiert war (Gebauer *et al.*, 2013). Für den Anreicherungsprozess mittels Phage Display wurde die in *E. coli* hergestellte monobiotinylierte m/hCD98hc-Ektodomäne (100–300 nM) auf zuvor mit PBS-T_{0,1}/2% BSA (4 mM KH₂PO₄, 160 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl pH 7,4 mit 0,1% Tween20 und 2% BSA) blockierten Streptavidin- oder NeutrAvidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln (Sigma-Aldrich, München bzw. Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) immobilisiert. Die mit jedem Zyklus alternierende Anwendung Streptavidin- bzw. NeutrAvidin-beschichteter Partikel erfolgte, um die spezifische Anreicherung von Lipocalin-Varianten mit Affinität zu diesen Hilfsreagenzien zu minimieren. Das auf den paramagnetischen Partikeln immobilisierte Zielprotein wurde anschließend mit der ebenfalls unter Anwendung von PBS-T_{0,1}/2% BSA blockierten Phagemid-Bibliothek (Starttiter 1×10^{12} pfu) für 1 h inkubiert. Nach zehn Waschzyklen mit PBS-T_{0,1}/2% BSA wurden affinitätsangereicherte Phagemide unter denaturierenden Bedingungen mit 4 M Harnstoff eluiert, die Phagenpartikel unter Verwendung von Helferphagen in *E. coli* amplifiziert und die Expression der Anticalin-pIII-Fusionsproteine mittels 25 µg/l Anhydrotetracyclin (für 7 h bei 26 °C und 140 rpm) induziert.

Die gewünschte Phasmid-DNA des angereicherten Phagemid-Pools wurde nach fünf bis sechs aufeinanderfolgenden Selektionszyklen präpariert, die mutierten Lcn2-Genkassetten daraus als Mischung isoliert und, zur löslichen Expression der einzelnen Lcn2-Varianten, in den Vektor pNGAL98 inseriert. Zum Test auf Bindungsaktivität gegenüber dem jeweiligen Zielmolekül mittels Hochdurchsatz-ELISA wurden die Lipocalin-Varianten mit einem C-terminalen *Strep*-tag II im Periplasma von *E. coli* TG1/F⁻ in 2-ml Mikrokulturen löslich exprimiert, der periplasmatische Extrakt präpariert und 200 µL auf eine MaxiSorp-Platte mit 96 Vertiefungen (Thermo Fisher Scientific), die zuvor mit 50 µL 10 µg/ml *Strep*MAB-Immo (IBA, Göttingen) beschichtet worden waren, übertragen. Nach Inkubation für 1 h und fünf Waschschritten mit PBS-T_{0,1} wurden gebundene Lipocalin-Varianten mit 300 nM der monobiotinylierten m/hCD98hc-Ektodomäne inkubiert und erneut mit PBS-T_{0,1} gewaschen. Für den Nachweis gebundener m/hCD98hc-Ektodomäne wurde eine Lösung mit ExtrAvidin/Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat

(1:2000 in PBS) (Sigma-Aldrich) verwendet. Der ELISA wurde mit 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer (0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,8) entwickelt und die Extinktion bei 405 nm mit einem Synergy 2-Photometer (BioTek Instruments, Winooski, VT) gemessen.

2.4 Herstellung einer Anticalin-Zufallsbibliothek und Selektion mittels Bacterial Surface Display

Die Stabilitäts- und Affinitätsmaturierung der gegen hCD98hcED gerichteten Lipocalin-Variante P3D11 wurde durch evolutives Protein-Engineering in Kombination mit der Bacterial Surface Display (BSD)-Methodik (Binder *et al.*, 2010) durchgeführt. Für eine detaillierte schrittweise Beschreibung des Anreicherungsverfahrens mittels BSD und der anschließenden cytofluorimetrischen Einzelklonanalyse können die Dissertationsschrift von Herrn Dr. Lars Friedrich (Friedrich, 2018) und einschlägige Veröffentlichungen (Binder *et al.*, 2010) konsultiert werden.

Zur Herstellung einer an zufälligen Positionen mutierten Anticalin-Genbibliothek wurde eine PCR mit einem Gemisch aus zwei rekombinanten fehleranfälligen DNA-Polymerasen (Error Prone-PCR) unter Verwendung des GeneMorph II-Mutagenesekits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) durchgeführt. Um eine moderate Mutationsrate von 1-3 Aminosäureaustauschen pro Gen zu erhalten, wurde 10 pg des für die Lipocalin-Variante P3D11 kodierenden DNA-Fragments (zuvor mittels Primer F83 und PR1 von pNGAL98-P3D11-Strep amplifiziert) als Matrize für die Error Prone-PCR (mittels Primer *BstXI-fw* und *BstXI-rv*) verwendet. Nach dem Verdau des PCR-Produkts aus der Zufallsmutagenese mit dem Restriktionsenzym *BstXI* wurde das randomisierte DNA-Fragment mit dem Vektorrückgrat von pNGAL146 ligiert (Gebauer & Skerra, 2012). pNGAL146 ermöglicht die Membrantranslokation und Verankerung der Anticalin-Varianten auf der bakteriellen Zelloberfläche durch Expression als genetische Fusion mit dem Periplasma-Sekretionssignal des Outer Membrane Protein A (OmpA) für das Sec-Translokon und einer modifizierten Translokator-Domäne des Autotransporter-Proteins EspP (Binder *et al.*, 2010).

Für die Selektionsexperimente wurde der *E. coli*-Stamm JK321 mit der hergestellten Anticalin-Genbibliothek durch Elektroporation transformiert, wobei 5×10^9 Transformanten erhalten wurden. Diese wurden anschließend auf quadratischen Petrischalen mit Ampicil-

lin-haltigem LB-Agar ausplattiert. Der nach 12 h bei 37 °C entstandene Bakterienrasen wurde in 50 ml LB-Flüssigmedium aufgenommen und die Bakteriensuspension verwendet, um 50 ml vorgewärmtes LB/Amp-Medium mit einer anfänglichen $OD_{550} \approx 0,15$ zu inokulieren. Dieses wurde bei 37 °C bis zum Erreichen von $OD_{550} \approx 0,5$ inkubiert und anschließend die Genexpression bei 37 °C mittels Zugabe von 10 ng/ml aTc für 2,5 Stunden induziert.

Ungefähr 2×10^8 *E. coli* Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 9300 g, 4 °C) sedimentiert, mit PBS in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an biotinyliertem hCD98hcED (Zyklen 1 und 2: 100 nM; Zyklen 3 und 4: 10 nM; Zyklen 5 und 6: 1 nM) resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und einem Waschschrift mit PBS wurden die Bakterien für 30 min mit 25 µg/ml eines Streptavidin/Phycoerythrin(PE)-Konjugats (Biolegend, San Diego, CA) und 3 µM eines A3C5-DY634-Fab-Konjugats (Binder *et al.*, 2010) in PBS inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift in PBS wurden die Bakterien mit einem FACSAria IIu-System (BD Bioscience, Heidelberg) in Abhängigkeit des detektierten PE- bzw. DY634-Fluoreszenzsignals in Proberöhrchen (bei 4 °C gekühlt) sortiert und durch saches Schütteln in Suspension gehalten. Zur Anregung bzw. Detektion der PE- bzw. DY634-Fluoreszenz wurde eine 488-nm-Laserdiode in Kombination mit einem 585/42-Emissionsfilter und ein 633-nm-HeNe-Laser mit einem 660/20-Emissionsfilter verwendet. Die sortierten Bakterien wurden auf quadratischen Petrischalen mit Ampicillin-haltigem LB-Agar ausplattiert, für 12 h bei 37 °C inkubiert und dann einem neuen Sortierzyklus unterzogen.

Nach Zyklus 6 wurde für die Durchmusterung der mittels FACS isolierten Einzelklone eine cytofluorimetrische Analyse durchgeführt, um die individuelle Bindungsaktivität gegenüber hCD98hcED bei einer Konzentration von 1 nM zu untersuchen. Hierbei wurde bzgl. Induktion, Expression, Ernte und Zellfärbung im Prinzip wie bei der zuvor beschriebenen BSD-basierten Affinitätsanreicherung vorgegangen. Zur Untersuchung von Einzelklonen wurde das gesamte Verfahren entsprechend im 96-Well-Plattenformat durchgeführt (vgl. Friedrich, 2018). Zur Auswertung der Cytofluorometrie-Daten wurde die FlowJo v10 Software verwendet.

2.5 Gentechnische Herstellung von Anticalinen in *E. coli*, chromatographische Reinigung und chemische Konjugation

Gentechnische Herstellung in *E. coli* und Reinigung

Für die gentechnische Herstellung von Anticalinen bzw. dem Wildtyp-Lipocalin Lcn2 – sowie entsprechend PASylierter Varianten – wurden Expressionsvektoren mit dem chemisch induzierbaren tet-Promotor/Operator-System basierend auf dem Plasmid pASK75 verwendet (Skerra, 1994). Da die produzierten Lipocalinvarianten für ihre Faltung auf die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke angewiesen sind, wurde die Sec-abhängige Sekretion des Proteins in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums von *E. coli* durch N-terminale Fusion mit der OmpA-Signalsequenz bewerkstelligt (Skerra & Plückthun, 1988).

Ausgehend von einer mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformierten Einzelkolonie des *E. coli*-Stamms JM83 wurde Lcn2 bzw. die gewünschte Anticalin-Varianten im 2-L Schüttelkolben-Maßstab in TB-Medium hergestellt (Tabelle 2). Hierzu wurde eine Vorkultur einer Einzelkolonie in 50 ml LB/Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die 2 L-Hauptkultur wurde im Verhältnis 1:50 mit der Vorkultur beimpft und bei 22 °C mit 180 rpm geschüttelt. Bei $OD_{550} \approx 1,5-2,5$ wurde die Genexpression durch Zugabe von aTc (Endkonzentration 200 µg/l) induziert. Nach 2,5 h wurde der Kulturkolben für 15 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 5.000 rpm für 15 min und 4 °C sedimentiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Zellsediment in 25 ml Periplasma-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und in einem 50 ml-PP-Röhrchen für 30 min bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (5.000 bzw. 20.000 rpm) bei 4 °C abgetrennt und so der Periplasmaextrakt erhalten.

Der periplasmatische Extrakt wurde für die IMAC-Reinigung des rekombinanten Proteins über Nacht gegen den IMAC-Puffer dialysiert. Der gesamte Periplasmaextrakt wurde auf eine mit Ni^{2+} beladene und in IMAC-Puffer äquilibrierte HisTrap HP Säule (GE Healthcare) mit einem Bettvolumen von 5 ml aufgetragen und die Chromatographie entsprechend der Verfahrensweise für die glycosylierten CD98hc-Ektodomänen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2).

Tabelle 2: Übersicht von in *E. coli* hergestellten Anticalinen und Lipocalinen

Protein ^a	Aminosäuren	Molekülmasse [Da] ^b	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^c
P1E4	186	21656,6	31065
P3A12	186	21340,2	32555
P3D11	186	21100,8	27055
D11vs	186	21082,8	27055
D11vs-PAS200	390	37933,5	27055
D11vs-PAS200-Cys	391	38036,7	27055
wtLcn2-PAS200	390	38370,2	26025
wtLcn2-PAS200-Cys	391	38473,3	26025

^a Alle Proteine wurden mit einem C-terminalen His₆-Peptidanhängsel fusioniert.

^b Anhand der Primärsequenz kalkuliertes Molekulargewicht unter Annahme einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen Cys⁷⁶ und Cys¹⁷⁵.

^c Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Summe der Absorptionsbeiträge aller in der Polypeptidkette enthaltenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cystinseitenketten berechnet (Gill & von Hippel, 1989)

Abschließend wurde eine SEC mit einer in PBS äquilibrierten 24 ml S75 10/300 GL (für nicht PASylierte Proteine) – bzw. S200 10/300 GL Säule für PASylierte Proteine – bei einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Fraktionen wurden gesammelt, mittels SDS-PAGE bezüglich Reinheit analysiert und entsprechend vereinigt.

Chemische Modifizierung von Cystein-Seitenketten mit Maleimid-Verbindungen

Für die ortsspezifische Markierung PASylierter Anticaline an der künstlich eingeführten C-terminalen Cys-Seitenkette wurde ein Maleimid-funktionalisiertes Derivat von Deferoxamin (Dfo) (Macrocylics, Plano, TX) oder Sulfo-Cyanin 5.5 (Sulfo-Cy5.5) (Lumiprobe, Hannover) verwendet. Um das Vorliegen der freien Thiolgruppe nach periplasmatischer Produktion in *E. coli* sicherzustellen, wurde das gereinigte Protein mit einer 20-fachen molaren Konzentration von Dithiothreitol zunächst für 1 h bei 20 °C in PBS pH 7,4 inkubiert. Anschließend wurde der Puffer durch Gelfiltration an einer PD-10-Säule (GE Healthcare) gegen 50 mM NaP_i pH 5,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ausgetauscht. Nach Einstellen des pH-Werts mit Hilfe von pH-Fix Indikatorstäbchen (Macherey-Nagel, Düren) unter Verwendung eines geeigneten Volumens einer 1 M Na₃PO₄ Lösung auf pH 7,4

wurde eine 5-fache molare Konzentration des jeweiligen Kopplungsreagenz in ein frisches Reaktionsgefäß vorgelegt und anschließend die entsprechende Proteinlösung mit einer Proteinkonzentration von ~2 mg/ml zugegeben. Nach Inkubation für 12 h bei 4 °C wurde überschüssiges Kopplungsreagenz mit einer in PBS (pH 7,4) äquilibrierten Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) entfernt. Die erfolgreiche 1:1-Kopplung mit Dfo oder Sulfo-Cy5.5 wurde mittels Electrospray Ionization Time of Flight-Massenspektrometrie (ESI-TOF-MS, siehe Abschnitt 2.7) verifiziert und der Erhalt der Affinität entsprechender Konjugate gegenüber hCD98hcED mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) verifiziert (siehe Abschnitt 2.6).

2.6 Biomolekulare Interaktionsanalyse mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die markierungsfreie kinetische Echtzeit-Bindungsanalyse zwischen Anticalinen und der entsprechenden CD98hc-Ektodomäne wurde an einem BIAcore 2000 System (BIAcore, Uppsala, Schweden) bei 25 °C in HBS-T (20 mM Hepes/NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,005% v/v Tween20) als Laufpuffer durchgeführt. Die in MEXi-293E-Zellen oder *E. coli* hergestellten und gereinigten monobiotinylierten m/hCD98hcED-Proteine (20 µL einer 2–5 µg/ml Proteinlösung in HBS-T) wurden mittels Streptavidin unter Verwendung des Biotin CAPture-Kits (GE Healthcare) immobilisiert ($\Delta\text{RU} \approx 225$).

Für kinetische Einzelzyklus-Experimente (engl.: single cycle kinetics) wurden fünf aufeinanderfolgende Injektionen einer aufsteigenden Konzentrationsreihe der gereinigten Lcn2-Variante bei einer Flussrate von 25 µl/min mit einer Kontaktzeit von jeweils 288 s und einer langen Dissoziationszeit von 3500 s nach der fünften Injektion durchgeführt. Für kinetische Experimente in wiederholten Zyklen (engl.: multiple cycle kinetics) wurden Assoziation und Dissoziation für acht Proben einer aufsteigenden Konzentrationsreihe der gereinigten Lcn2-Variante aufgezeichnet. Hierbei wurde typischerweise zwischen 80 und 120 µl der jeweiligen Probenlösung injiziert und die Dissoziation des Komplexes anschließend bei konstantem Pufferfluss bis zum Erreichen der Basislinie verfolgt, bevor der nächste Zyklus gestartet wurde.

Für die Berechnung der Dissoziationskonstante (K_D -Wert) wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) durch Anpassung der referenzkorrigierten Sensorgramme an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der

BIAevaluation Software bestimmt. Der K_D -Wert ergab sich aus dem Quotienten $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Die Halbwertszeit des ausgebildeten Komplexes zwischen Anticalin und Zielmolekül wurde als $\tau_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$ berechnet.

2.7 Electrospray Ionization Massenspektrometrie

Für die exakte Bestimmung der molekularen Masse rekombinanter Proteine wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die gereinigten Proteine üblicherweise mit einer Konzentration von 5–20 μM zweimal gegen das 10.000-fache Volumen an 10 mM Ammoniumacetat pH 6,6 (Sigma-Aldrich) dialysiert und anschließend mit einer Vivaspin® Ultrazentrifugationseinheit (Sartorius, Göttingen) filtriert (0,45 μm). Zur Masseanalyse der Proteine im positiven Ionisierungsmodus und unter denaturierenden Bedingungen wurde die Probe jeweils auf 50% (v/v) Methanol und 1% (v/v) Essigsäure eingestellt. Die Applikation der Probe in das mit einer Electrospray Ionization (ESI)-Quelle ausgestattete maXis Time of Flight (TOF)-Massenspektrometer (MS) (Bruker Daltonics, Bremen) erfolgte über eine mit 180 $\mu\text{L}/\text{h}$ betriebene Spritzenpumpe. Der Ionentransfer fand unter den folgenden Bedingungen statt: Kapillarspannung: 4,5 kV; Spannungsdifferenz zur Endplatte: 500 V; Verdampfungsdruck: 0,3 bar; Flussgeschwindigkeit des Trockengases: 4 L/min; Temperatur des Trockengases: 200 °C; Kollisionsenergie: 3 eV bei Proteinen ohne PASylierung bzw. 10 eV bei PASylierten Proteinen. Die Aufnahme und Dekonvolierung der m/z -Histogramme erfolgte mit Hilfe der Compass Data Analysis Software v4.0 unter Anwendung des MaxEnd und MaxEndX Algorithmus (Ferrige *et al.*, 1991).

2.8 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie und thermische Denaturierung

Die CD-Spektren und die thermische Entfaltung gereinigter Lcn2-Varianten wurden unter Verwendung eines J-810-Spektropolarimeters (Jasco, Pfungstadt), welches mit einem PT-423S Peltier-Element ausgestattet war, gemessen. Die Proteine wurden gegen 20 mM KPi pH 7,5 und 50 mM K_2SO_4 dialysiert und mit einer Konzentration von 1 μM für die jeweilige Messung eingesetzt. Um die Wellenlänge mit maximaler Änderung der Elliptizität für thermische Denaturierungsstudien zu identifizieren, wurden zunächst Spektren von 190 bis 250 nm sowohl bei 20 °C als auch bei 90 °C mit einer 1 mm Quarzküvette (Hellma, Müllheim) aufgenommen. Die thermische Entfaltung der Lcn2-Varianten wurde

daraufhin mit einer frischen Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 214 nm (Bandbreite 1 nm, Pfadlänge 0,2 mm, Response 4 s) durch Erhitzen von 20 °C auf 90 °C bei einem Temperaturgradienten von 60 K/h gemessen. Die gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Ausgehend von einem Zwei-Zustands-Modell lässt sich aus der so erhaltenen sigmoidalen Denaturierungskurve anhand der Änderung der freien Enthalpie ΔH_m beim Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand die thermodynamische Stabilität ΔG des gefalteten Zustandes sowie die Schmelztemperatur T_m des Anticalins berechnen (Schlehuber, 2001). Lineare Signaländerungen im prä- und post-transitionellen Bereich wurden dabei korrigiert.

2.9 Immuncytofluorimetrie und Immunfluoreszenzfärbung von Krebszelllinien

Die humanen Krebszelllinien Ramos, Raji, SU-DHL-4, PC-3, DU-145 und Caco-2 wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Biochrom, Berlin) üblicherweise mit Zusatz von 10% v/v fötalem Rinderserum (PAA Laboratories) und 1 U/ml Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) unter aseptischen Bedingungen bei 37 °C, 5% CO₂-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die HEK293T Zelllinie sowie der „Klon 20“, welcher einen mittels CRISPR/Cas9 induzierten homozygoten Knockout des SLC3A2 Gens besitzt (Fuchs *et al.*, 2018), wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom) mit Zusatz von 20 mM Hepes/NaOH, 100 µM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 100 µM nicht-essentielle Aminosäuren (Thermo Fisher Scientific) und 10% v/v fötalem Rinderserum kultiviert (de la Ballina *et al.*, 2016).

Für die cytofluorimetrischen Experimente wurden die adhärenen Zelllinien (PC-3, DU-145, Caco-2 und HEK293T) mit PBS_x (Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) (Biochrom) gewaschen und mit Hilfe von PBS_x/EDTA (PBS_x ergänzt mit 0,5 mM EDTA) für 10 min bei 37 °C abgelöst. In Suspension wachsende Zellen (Ramos, Raji und SU-DHL-4) wurden hingegen direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit PBS_x gewaschen (Zentrifugation 3 min, 200 g, 4 °C). Für jede Messung wurden 250.000 lebende Zellen (bestimmt mittels Trypanblau Färbung) mit 1 µM des mit SulfoCy5.5 konjugierten rekombinanten D11vs-PAS200 in 250 µl FACS-Puffer (PBS_x + 10% v/v fötalem Rinderserum) resuspendiert und für 1 h bei 4 °C inkubiert. In Konkurrenzexperimenten zum Nachweis der Bindungsspezifität des PASylierten Anticalins wurde zusätzlich zu 1 µM D11vs-PAS200-SulfoCy5.5 eine 10-fache molare Konzentration von entweder unmar-

kiertem D11vs-PAS200 oder dem löslichen glycosylierten hCD98hcED-Protein in den Reaktionsansatz zugegeben. Als Kontrollansatz wurde im Fall der HEK293T Zelllinien das mit SulfoCy5.5 konjugierte rekombinante wtLcn2-PAS200 verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen dreimal in FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation jeweils 3 min, 200 g, 4 °C) und schließlich in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert. Durchflusszytometrische Experimente wurden an einem FACSAria IIu-Instrument (BD Bioscience) mit einer Anregungswellenlänge von 650 nm und einem 780/60 nm Emissionsbandpass-Filter durchgeführt.

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die adhärennten Zelllinien PC-3 und Caco-2 nach dem Ablösen von der Kulturflasche mittels PBS_x/EDTA auf Poly-D-Lysin (PDL)-beschichteten Lab-Tek II-Kammerobjektträger (Thermo Fisher Scientific) in RPMI 1640 Medium mit 10% v/v fötalem Rinderserum bis zum Erreichen einer Konfluenz von 60–70% kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C durch Inkubation mit 1 µM D11vs-PAS200-SulfoCy5.5 gefärbt, gefolgt von drei weiteren Waschschritten mit PBS. Die in Suspension wachsende Zelllinie Ramos wurde auf die gleiche Weise angefärbt, allerdings unter Verwendung eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes, gefolgt von der Übertragung auf einen PDL-beschichteten Lab-Tek II-Kammerobjektträger. Für Kontrollexperimente wurde entweder ein Gemisch aus 1 µM D11vs-PAS200-SulfoCy5.5-Konjugat mit einer 10-fachen molaren Konzentration von unmarkiertem D11vs-PAS200 oder das äquivalente Konjugat von rekombinantem Lcn2 (Lcn2-PAS200-SulfoCy5.5) verwendet. Die Zellen wurden durch 5-minütige Inkubation mit eiskaltem Methanol fixiert, dem zuvor zusätzlich 1 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma-Aldrich) zugefügt wurde. Digitale Fluoreszenzbilder wurden mit einem Axiovert 40 CFL-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena), das mit einer AxioCam MRm-Kamera ausgestattet war, unter Verwendung von 365/12 nm (DAPI) und 716/40 nm (Cy5.5) Bandpassfiltern aufgenommen.

2.10 Positronenemissionstomographie (PET) / Computertomographie (CT) und Biodistributionsanalyse

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Antrags-Nr.: 55.2-1-54-2532-216-15), in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Klinikums rechts der Isar sowie freundlicher Unterstützung von Volker Morath und Prof. Wolfgang Weber

(Nuklearmedizinische Klinik am Klinikum rechts der Isar, TU München) durchgeführt. Männliche und weibliche CB17-SCID Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen von den Charles River Laboratories (Wilmington, MA) bezogen und unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (engl.: Specific-Pathogen-Free; SPF) gehalten. Für die Implantation der Xenograft-Tumore wurden den Mäusen subkutan 6×10^6 PC-3 oder Ramos Zellen (suspendiert in 100 μ l RPMI 1640 Medium, ohne Medienzusätze) über der rechten Schulter injiziert. Am Tag 12 nach der Injektion hatten die Tumore einen Durchmesser von $\sim 0,5$ cm erreicht.

Radioaktive Markierung

Zur ^{89}Zr -Markierung (Vosjan *et al.*, 2010) von Deferoxamin (Dfo)-konjugiertem PASylierten Anticalin wurde 250 μ g der gegen 250 mM Na-Acetat pH 5,5 (Carl Roth, Karlsruhe) dialysierten Proteinlösung mit 200 μ l 0,5 M HEPES/NaOH pH 7,0, 50 μ l 0,5 M Genti-sinsäure und 111 MBq $^{89}\text{Zr(IV)}$ (in 1 M Oxalsäure, neutralisiert mit 3 M Na_2CO_3 ; Perkin Elmer, Waltham, MA) inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die radioaktive Markierung des Anticalins mittels Dünnschichtchromatographie (Radio-TLC) auf Glas-mikrofaser-Chromatographiepapier (TLC-SG; Agilent Technologies) mit 100 mM Na-Citrat pH 5,0 als mobile Phase bestätigt. Das radioaktiv markierte Protein wurde durch Gelfiltration an einer PD-10 Säule (GE Healthcare) in 0,9% (w/v) NaCl-Injektionslösung (B. Braun, Melsungen) umgepuffert. Die radiochemische Reinheit des Proteins wurde kurz vor der Injektion in Mäuse durch eine weitere Radio-TLC verifiziert.

PET/CT Bildgebung

Den tumortragenden weiblichen CB17-SCID Mäusen – PC-3 (n=5) oder Ramos (n=5) – wurde in einer ersten Studie das radioaktiv markierte Protein in einer Dosis von ~ 3 MBq in die Schwanzvene injiziert. Für Blockierungsexperimente in Mäusen mit PC-3 Tumoren (n=2) wurde 2 h vor der Injektion des ^{89}Zr -markierten Anticalins eine 100-fache molare Konzentration von nicht-markiertem D11vs-PAS200 injiziert. 24, 48 und 72 h nach der Injektion wurden von den mit Isofluran narkotisierten Mäusen statische PET/CT-Bilder in einem Inveon PET/CT-Kleintierscanner (Siemens Medical Solutions, Erlangen) mit 20-minütiger PET- und 5-minütiger CT-Signalerfassung durchgeführt. Die mit 3D-OSEM rekonstruierten Bilder wurden mit Hilfe der Inveon Research Workplace-Software analysiert und als Maximum Intensity Projection (MIP) dargestellt, wobei die Skalierung (be-

zogen auf % injizierte Dosis/g) für die Blockierungsgruppe bzw. nur mit dem ^{89}Zr -markierten Anticalin behandelten Mäuse identisch gewählt wurde. Zur Quantifizierung der Aktivität in einzelnen Organen wurden Bereiche um die in der 3D-Darstellung abgrenzbaren Organe selektiert (Region of Interest, ROI). Zur Verminderung des Einflusses der nicht absolut exakten Übereinstimmung ausgewählter Bereiche mit den Organabmessungen wurden von jeder ROI nur die Teile in die Berechnung einbezogen, welche mindestens 50% der maximal in der ROI gemessenen Strahlungsintensität aufwiesen (Foster *et al.*, 2014).

Ex vivo Autoradiographie

Für die autoradiographische Untersuchung der Organe wurden die behandelten Mäuse nach Abschluss der PET-Experimente (72 h nach Injektion) in einer CO_2 -Atmosphäre eingeschläfert. Die Tumore wurden direkt im Anschluss entnommen und nach Einbettung und Einfrieren in Tissue Tek-Medium (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) wurden mit dem Kryostat-Mikrotom HM500 (Leica Biosystems, Nußloch) 10 μm dicke Gewebeschnitte vom mittleren Teil der Tumore angefertigt und auf Glasobjektträger (Thermo Fisher Scientific) transferiert. Eine hochauflösende Strahlungs-Bildplatte (BAS-IP) (GE Healthcare) wurde für eine Dauer von einer Woche mit den Objektträgern inkubiert, mit dem Scanner CR 35 BIO (Dürr Medical, Bietigheim-Bissingen) ausgelesen und mit Hilfe der AIDA-Image Analyzer-Software ausgewertet. Die zur Publikation ausgewählten Bilder zeigen die Abschnitte mit dem jeweils höchsten Radioaktivitäts-Signal, um einen Vergleich zwischen Tumorschnitten aus der blockierten bzw. nicht blockierten Tiergruppe zu ermöglichen.

Szintillationsradiometrische Biodistributionsanalyse

Um quantitative Daten aus *ex vivo* Biodistributionsexperimenten zum optimalen Bildgebungszeitpunkt 24 h nach Injektion des ^{89}Zr -markierten Anticalins zu erhalten, wurde eine zweite Studie unter Verwendung von männlichen CB17-SCID Mäusen mit PC-3 Xenograft-Tumoren durchgeführt. Zwei Kohorten (jeweils $n=5$) wurde in die Schwanzvene, entweder mit ($t = -2$ h) oder ohne vorangegangener Injektion einer 250-fachen molaren Konzentration des nicht radioaktiven PASylierten Anticalins, $3,96 \pm 0,12$ MBq ^{89}Zr markiertes D11vs-PAS200 injiziert. Nach 24 h wurden die Tiere in einer CO_2 -Atmosphäre eingeschläfert. Blut, Organe und Tumore wurden nach der Entnahme gewo-

gen und mit einem γ -Szintillationszähler analysiert (γ -Counter 2480 Wallac Wizard) (Perkin Elmer). Zur Berechnung der injizierten Aktivität wurden die Spritzen vor und nach der Injektion mit einem Capintec CRC-15R-Dosiskalibrator analysiert. Bei der Berechnung der je Maus injizierten Dosis wurde außerdem die im Schwanz verbliebene Radioaktivität berücksichtigt und abgezogen. Zur radionuklidspezifischen Kalibrierung des γ -Counters wurde eine der Größenordnung nach vergleichbare Aktivität in 100 ml Wasser überführt und hiervon fünfmal 1 ml (1%) entnommen und direkt vor der Analyse der Organe gemessen.

Biostatistik

Für den Vergleich der arithmetischen Mittelwerte zwischen zwei Tiergruppen wurde der t-Test für ungepaarte Daten verwendet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant beurteilt (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,005$). Die experimentellen Daten wurden unter Verwendung von GraphPad Prism 6 analysiert und die Standardabweichungen (S.D.) angegeben.

2.11 Proteinkristallographische Methoden

Für die strukturelle Untersuchung der CD98hc-Ektodomäne aus der Maus sowie zur strukturellen Analyse des Bindungsmechanismus der Anticaline P3D11 und C1B12 gegenüber dem CD98hc-Zielmolekül des Menschen bzw. der Maus wurden die relevanten Proteine oder Komplexe kristallisiert. Für die Identifizierung geeigneter initialer Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *Sparse-Matrix Screen* angewandt (Jancarik & Kim, 1991). Dazu wurde der aus 480 Kristallisationsbedingungen bestehende *Vector Screen* verwendet, der am Lehrstuhl für Biologische Chemie zusammengestellt wurde. Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in 96-Well CrystalQuick-Platten (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden mit Hilfe des Kristallisationsroboters FreedomEvo (Tecan, Männedorf, Schweiz) 200 nL einer konzentrierten Proteinlösung mit 200 nL des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 100 μ L Reservoirlösung äquilibriert. Die Platten wurden mit transparenter Klebefolie luftdicht verschlossen und der Kristallisationsverlauf mit Hilfe des RockImager Systems (Formulatrix, Bedford, MA) bei 20 °C verfolgt.

Vielversprechende Bedingungen aus dem *Vector Screen* wurden mit Hilfe von *Fine Screens* hinsichtlich Größe und Streufähigkeit der entstandenen Kristalle optimiert. Dies

wurde durch iterative Variation unterschiedlicher Parameter wie Konzentration des Proteins bzw. Fällungsmittels, pH-Wert sowie Wahl und Konzentration von Pufferkomponenten erreicht. Die *Fine Screens* wurden in 24-Well Platten (Crystalgen, Commack, NY) durch Mischen von 0,5–1,0 μL Proteinlösung und 0,5–1,0 μL des Kristallisationspuffers unter Äquilibrierung gegen 1 ml der entsprechenden Reservoirlösung als hängende Tropfen nach der Dampfdiffusionsmethode angesetzt. Dabei wurden die Tropfen auf silanierten Deckgläschen gemischt, diese umgedreht auf dem Reservoir platziert und mit einer Öl/Vaseline-Mischung abgedichtet. Die Platten wurden bei 20 °C gelagert und regelmäßig bezüglich Kristallbildung analysiert.

Nach erfolgreicher Kristallisation der Proteine bzw. Proteinkomplexe wurde die Datensammlung am Synchrotron und die Strukturbestimmung mittels molekularem Ersatz von Herrn Dr. habil. A. Schiefner (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München) fortgesetzt. Das weitestgehend standardisierte Vorgehen bei der Strukturbestimmung wurde ausführlich in den hier eingebundenen Veröffentlichungen beschrieben. Die Atomkoordinaten und Strukturaktoren der im Umfang dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen sind in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die gelösten Proteinstrukturen und entsprechende PDB Kodes.

Struktur	PDB-ID	Referenz
mCD98hcED	6I9Q	(Deuschle <i>et al.</i> , 2019)
P3D11•hCD98hcED	6S8V	(Deuschle <i>et al.</i> , 2020a)
C1B12•mCD98hcED	6SUA	(Deuschle <i>et al.</i> , 2020b)

2.12 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme

AxioVision	Fotodokumentation in der Zellkultur (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen)
Biocapt MW	Fotodokumentation von Gelen (Vilber Lourmat, Eberhardzell)

ChemBioDraw 14.0	Zeichnen chemischer Strukturen und Darstellung von Reaktionsgleichungen (PerkinElmer, Waltham, MA)
Compass Data Analysis Software	Analyse und Dekonvolierung von Massenspektren (Bruker Daltonik, Bremen)
Coot 0.8.9	3D-Modellierung und Analyse von Proteinstrukturen (Emsley & Cowtan, 2004)
EndNote X8	Literaturverwaltung (Thomson Reuters, New York, NY)
Geneious 9.1.3	Planung, Visualisierung und Annotation von DNA Sequenzen (Biomatters, Auckland, NZ)
GraphPad Prism 6	Statistische Analysen und Schaubilder (GraphPad Software, La Jolla, CA)
Inkscape 0.91	Erstellung von Vektorgrafiken (Inkscape Community)
Inveon Research Workplace	Analyse und Darstellung von PET/CT Daten (Siemens Healthcare, Erlangen)
Office Professional 2016	Textverarbeitung und Tabellenkalkulation (Microsoft Corp, Redmond, WA)
PyMOL 1.3	3D-Darstellung und Analyse von Proteinstrukturen (DeLano, 2002)
UNICORN, 5.20 und 7.04	Steuerung der ÄKTA-Anlagen und Analyse von Chromatogrammen (GE Healthcare, München)
<u>Datenbanken/Server</u>	
ExpASy	Proteindatenbank und Analyseprogramme; www.expasy.org (Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
NCBI	Literaturdatenbank; www.ncbi.nlm.nih.gov
PISA	Programm zur Untersuchung makromolekularer Grenzflächen (Krissinel & Henrick, 2007)
Protein Data Bank	3D-Strukturdatenbank; www.rcsb.org/pdb (Berman <i>et al.</i> , 2000)
UniProt	Datenbank für Proteine; www.uniprot.org (Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

3. Veröffentlichungen

Alle in dieser publikationsbasierten Dissertation eingebrachten Veröffentlichungen wurden durch Gutachter auf dem entsprechenden Fachgebiet im Auftrag der jeweiligen Fachzeitschrift geprüft (engl.: *Peer Review*).

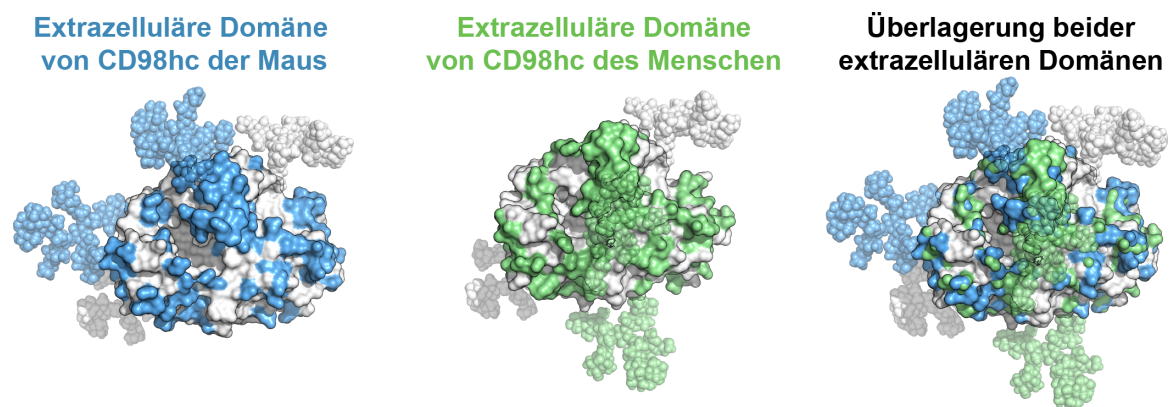
3.1 Veröffentlichung in *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, April 2019 – Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel “Structural differences between the human and the murine CD98hc ectodomains“ wurde am 08. April 2019 (online Version) in der Fachzeitschrift “*Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*“ publiziert.

Zitat:

Deuschle, F. C., Schiefner, A. & Skerra, A. 2019. Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins* 87, 693-698.

Grafische Zusammenfassung



Zusammenfassung der Veröffentlichung

Das Typ-2-Transmembranprotein CD98hc ist sowohl ein vielversprechender Zelloberflächen-Rezeptor für die Diagnose und Behandlung von unterschiedlichen Krebserkrankungen als auch ein Transzytoserezeptor, der für die Anreicherung von Therapeutika im Gehirn erfolgversprechend erscheint. Präklinische pharmakokinetische Studien und Sicherheitsbewertungen von Antikörpern oder alternativen Bindeproteinen (wie beispielsweise Anticalinen), werden jedoch häufig durch Unterschiede des jeweiligen Zielproteins hin-

sichtlich Aminosäuresequenz und Glycosylierungsmuster zwischen einer präklinischen Modellspezies und dem letztlich zu behandelnden Menschen eingeschränkt.

Die extrazellulären Domänen des murinen und humanen CD98hc-Proteins (mCD98hcED bzw. hCD98hcED) besitzen nur relativ geringe Aminosäure-Sequenzidentität von 71%, bei zusätzlich inkonsistentem Glycosylierungsmuster. Während die Kristallstruktur der extrazellulären Domänen des hCD98hcED-Proteins kürzlich beschrieben wurde, sind Strukturinformationen für das Orthologe der Maus für das Design biologischer Wirkstoffe und deren präklinische Beurteilung von großem Interesse.

Diese Publikation beschreibt die Kristallstruktur der extrazellulären CD98hc-Domäne der Maus sowie einen umfassenden Strukturvergleich mit dem humanen Pendant. Hierzu wurde das mCD98hcED-Protein in *E. coli* BL21 produziert und in löslicher monomerer Form mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie isoliert. Das mCD98hcED-Protein kristallisierte mit plättchenförmiger Morphologie in der Raumgruppe I422 und einem Molekül pro asymmetrischer Einheit. Die Struktur wurde mit einer Auflösung von 2,1 Å unter Verwendung von Synchrotronstrahlung bestimmt. Wie das zuvor beschriebene orthologe hCD98hcED-Protein ähnelt die Faltung des mCD98hcED-Proteins der α -Amylase/Glycosidase-Familie, die eine zentrale TIM-Barrel-Domäne (Reste 108-432) und eine C-terminale β -Sandwich-Domäne (Reste 433-526) umfasst.

Der Anteil identischer Aminosäurereste an der vom Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche zwischen den m/hCD98hcED-Proteinen beträgt nur 50%. Infolgedessen konnte nur ein einziger konservierter Oberflächenbereich mit einer für Bindeproteine typischen zugänglichen Epitopoberfläche ($\sim 900 \text{ \AA}^2$), die identische Aminosäurereste zwischen den Orthologen aufweist und gleichzeitig weder durch Glycosylierung noch durch die Zellmembran verdeckt ist, identifiziert werden. Somit zeigt unsere Strukturstudie, dass die spezifische Bindung von mCD98hcED und hCD98hcED durch dasselbe Bindeprotein mit therapeutisch relevanten Affinitäten eine große Herausforderung darstellt. Anstelle dessen verspricht eine Surrogat-Strategie mehr Aussicht auf Erfolg für die präklinische Entwicklung von gegen CD98hc-gerichteten Bindeproteinen.

Beitrag des Autors dieser Dissertation:

Der Autor dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Studie beteiligt. Der Autor führte den Großteil der Experimente selbst

durch (beispielsweise Klonierung von Plasmiden, Expression, Reinigung und Charakterisierung der Proteine sowie Kristallisation des mCD98hcED-Proteins), er analysierte Daten und war federführend am Verfassen des Manuskripts sowie der Überarbeitung beteiligt. Der Beitrag der weiteren Autoren wurde in der Veröffentlichung beschrieben. Der Autor dieser Dissertation und André Schiefner haben im gleichen Maße zu dieser Arbeit beigetragen.

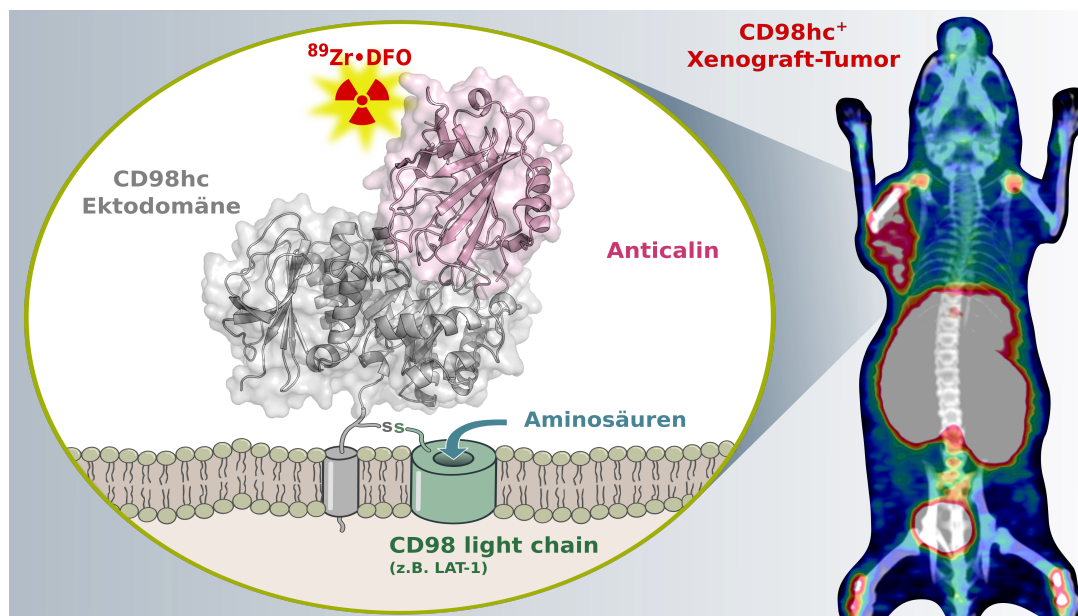
3.2 Veröffentlichung in Theranostics, Januar 2020 – Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel “Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications“ wurde am 12. Januar 2020 in der Fachzeitschrift “Theranostics“ publiziert.

Zitat:

Deuschle, F. C., Morath, V., Schiefner, A., Brandt, C., Ballke, S., Reder, S., Steiger, K., Schwaiger, M., Weber, W. & Skerra, A. 2020. Development of a high affinity Anticalin directed against human CD98hc for theranostic applications. *Theranostics* 10, 2172-2187.

Grafische Zusammenfassung



Zusammenfassung der Veröffentlichung

Ein gesteigerter Aminosäurezustrom sowie die Störung zellulärer Integrinsignale stellen zwei Hauptmerkmale von Krebserkrankungen dar und sind entscheidende Faktoren für die metastatische Transformation von Zellen. Entsprechend seiner Beteiligung an beiden biologischen Prozessen wird eine Überexpression von CD98hc bei verschiedenen Krebsarten klinisch beobachtet, weshalb dieses Membranprotein eine vielversprechende Zielstruktur auf Tumorzellen darstellt. Dennoch sind momentan nur wenige diagnostisch oder therapeutisch einsetzbare Moleküle zur spezifischen Erkennung des CD98hc-Proteins beschrieben.

Diese Studie umfasst das molekulare Design und die funktionelle Charakterisierung eines Anticalin-Proteins (P3D11) auf Grundlage der humanen Lipocalin 2-Gerüststruktur mit picomolarer Affinität ($K_D = 150 \text{ pM}$) gegenüber dem menschlichen CD98hc-Protein (hCD98hc). Die kristallographische Analyse des biomolekularen Komplexes, bestehend aus dem Anticalin P3D11 und der extrazellulären hCD98hc-Domäne, zeigt die Erkennung einer hervorstehenden Peptid-Schleifenstruktur des CD98hc-Proteins (Reste Asp³⁷⁴–Ala⁴⁰⁴), die von zwei N-Glycosylierungsstellen in dem Lösungsmittel exponierten membrandistalen Teil des Zielproteins umgeben ist. Durch evolutives Protein-Engineering in Kombination mit der Selektionsmethodik des Bacterial Surface Display wurde eine bezüglich ihrer Affinität gegenüber dem Zielprotein ($K_D = 60 \text{ pM}$) wie auch ihrer thermischen Stabilität ($T_m = 63,5 \text{ °C}$) optimierte Anticalinvariante (D11vs) unter Substitution von nur zwei Aminosäure-Resten (Phe71Ser und Gly81Val) identifiziert.

In vitro Studien mit einer unter Anwendung der PASylation[®]-Technologie in ihrer Plasma-Halbwertszeit optimierten Variante des Anticalins D11vs belegten die spezifische Bindungsaktivität gegenüber CD98hc-exprimierenden menschlichen Krebszelllinien unterschiedlicher Ursprungsorgane, was die breitere biomedizinische Verwendbarkeit des Bindeproteins in der Krebsforschung ermöglicht. Die Anwendbarkeit des PASylierten und über den Chelatbildner Deferoxamin mit ⁸⁹Zr-markierten Anticalins für die spezifische Adressierung von hCD98hc *in vivo* wurde durch eine Bildgebungsstudie unter Kombination von Positronenemissionstomographie (PET) und Computertomographie (CT) in zwei Xenotransplantat-Mausmodellen an humanen Tumoren untersucht. Dabei konnten auf Ramos- und PC-3-Zelllinien basierende Xenograft-Tumore in PET/CT-Aufnahmen deutlich visualisiert werden, wobei in beiden Fällen der höchste Bildgebungscontrast 24 h nach der Injektion des Radiotracers erreicht wurde. Quantitative Biodistributionsanalysen ergaben eine hohe Aufnahme des Radiopharmazeutikums von $8,6 \pm 1,1\%$ der injizierten Dosis pro Gramm der PC-3 Tumore und ein sehr günstiges Tumor-zu-Blut-Signalverhältnis von 11,8:1.

Diese Ergebnisse liefern die erste konzeptionelle Bestätigung zur Nutzung von CD98hc auf Tumorzellen als Zielstruktur für die nicht-invasive biomedizinische PET/CT-Bildgebung. Das in dieser Studie entwickelte Anticalin D11vs stellt somit ein vielversprechendes Werkzeug für präklinische und potenziell auch klinische Anwendungen im Bereich der Krebsdiagnostik und -therapie, möglicherweise in einem theranostischen Ansatz, dar.

Beitrag des Autors dieser Dissertation:

Der Autor dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption der wissenschaftlichen Studie, der Analyse der entstandenen Daten sowie deren Interpretation beteiligt. Er führte den Großteil der Experimente selbst durch. Hierbei plante und klonierte der Autor alle verwendeten Plasmide, selektierte, optimierte, produzierte und charakterisierte die Lipocalin-Varianten, produzierte und reinigte die Proteine für die Selektionskampagnen, die PET/CT-Bildgebungsstudie und die Proteinkristallographie, kristallisierte den Proteinkomplex hCD98hcED•P3D11, führte die Zellkulturexperimente sowie gemeinsam mit Volker Morath die Bildgebungsstudie und *ex vivo* Gewebeanalysen (abgesehen von der Immunhistochemie) durch. Der Beitrag der weiteren Autoren wurde in der Veröffentlichung beschrieben.

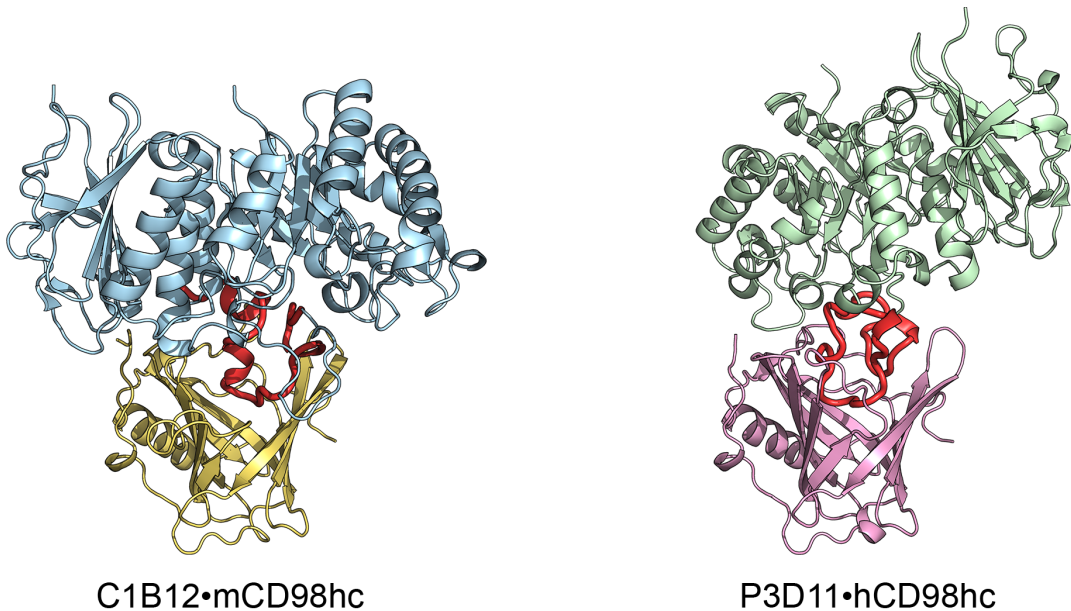
3.3 Veröffentlichung in Protein Science, Mai 2020 – Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel “Development of a surrogate Anticalin[®] protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice“ wurde am 28. Mai 2020 (online Version) in der Fachzeitschrift “Protein Science“ publiziert.

Zitat:

Deuschle, F. C., Schiefner, A., Brandt, C. & Skerra, A. 2020. Development of a surrogate Anticalin[®] protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice. *Protein Science* 8, 1774-1783.

Grafische Zusammenfassung



Zusammenfassung der Veröffentlichung

In Veröffentlichung Nr. 2 dieser Dissertation wurde die Entwicklung eines hochaffinen Anticalins (P3D11) gegen humanes CD98hc (hCD98hc) beschrieben, das eine exponierte Schleifenstruktur, lokalisiert im membrandistalen Anteil der extrazellulären Domäne des Typ-2 Membranproteins, spezifisch erkennt. Dieses Anticalin bindet jedoch nur hCD98hc und nicht das entsprechende Orthologe der Maus, was sowohl durch die niedrige Aminosäuresequenzkonservierung an der Proteinoberfläche (~ 50%) als auch durch das differenzielle Glycosylierungsmuster beider Spezies begründet ist, wie in Veröffentlichung Nr. 1 dargelegt. Um aussagekräftige präklinische Studien zu ermöglichen, sind experimentelle

Untersuchungen unter Anwendung von Nagetier-Modellsystemen jedoch von großer Bedeutung. Angesichts der besonderen Schwierigkeit, für diese vielversprechende biomedizinische Zielstruktur spezifische Bindeproteine mit Kreuzreaktivität zwischen CD98hc aus dem Menschen und dem aus Nagetieren zu generieren, wurde die Entwicklung eines mausspezifischen Surrogat-Bindeproteins zusätzlich dem humanspezifischen Leitkandidaten für die Durchführung von pharmakologischen Studien und Sicherheitsbewertungen, in Angriff genommen.

In dieser Studie beschreiben wir die Selektion mittels Phage Display sowie die ausführliche biochemische und biophysikalische Charakterisierung eines Anticalins (C1B12), wiederum auf der Basis des humanen Lipocalin 2-Proteingerüsts, mit picomolarer Affinität ($K_D = 630 \text{ pM}$) gegenüber dem murinen CD98hc-Protein (mCD98hc). Die kristallographische Analyse des biomolekularen Komplexes aus dem Anticalin und der extrazellulären mCD98hc-Domäne zeigt im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen humanspezifischen Anticalin P3D11 die Erkennung der analogen Schleifenstruktur innerhalb der extrazellulären Domäne des Zielproteins der Maus sowie einen sehr ähnlichen Bindungsmechanismus. Beide Anticaline, C1B12 und P3D11, binden CD98hc jeweils mit einer großen begrabenen Oberfläche ($\sim 1400 \text{ \AA}^2$) und weisen die gleiche Anzahl an Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken mit der extrazellulären Domäne des Membranproteins auf. Die Überlagerung der Proteinkomplexe C1B12•mCD98hc und P3D11•hCD98hc – anhand der m/hCD98hc-Strukturen – und die Analyse des Bindungsmodus von C1B12 im Vergleich zu P3D11 ergab eine Rotation von 153° um die β -Barrel-Achse des Anticalins und eine Verschiebung von 14 \AA in Richtung des C-Terminus von CD98hc. Beide Anticaline adressieren somit zwar im Prinzip das gleiche Epitop, erkennen dieses allerdings in unterschiedlichen Orientierungen.

Die zwei bekannten Glycosylierungen innerhalb der gebundenen Peptidschleife des mCD98hc-Proteins (Asn³⁸⁵ und Asn³⁹⁹) verhindern allerdings die Anwendung dieses Anticalins zur Bindung des nativen Proteins *in vivo*. Jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass zwei konservative Mutationen (N³⁸⁵D / T⁴⁰¹A) mit nur geringfügiger Beeinträchtigung der Affinität in das mCD98hcED-Protein eingeführt werden können, um diese zwei Glycosylierungen zu unterbinden, so dass das Anticalin C1B12 in einem entsprechenden transgenen Mausmodell grundsätzlich eingesetzt werden kann.

Angesichts bislang fehlender kreuzreaktiver Bindeproteine für diese biomedizinische Zielstruktur kann dieses Anticalin-Paar, aufgrund annähernd gleicher Bindungseigen-

schaften bezüglich des gebundenen Epitops wie auch der Affinität zu CD98hc der jeweiligen Spezies für pharmakokinetische und -dynamische Studien in einem geeigneten transgenen Mausmodell genutzt werden, um Einblicke in die zielgerichtete Adressierung von CD98hc für theranostische Zwecke zu gewinnen.

Beitrag des Autors:

Der Autor dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption der wissenschaftlichen Studie beteiligt. Er führte den Großteil der Experimente, wie beispielsweise die Planung und Klonierung von Plasmiden, die Selektion, Produktion und Charakterisierung der Lipocalin-Varianten, Produktion und Reinigung der Proteine für die Anticalin-Selektionskampagne und Proteinkristallographie sowie die Kristallisation des mCD98hcED•C1B12 Proteinkomplexes selbst durch. Der Autor analysierte einen Großteil der Daten und war für das Verfassen des Manuskripts sowie dessen Überarbeitung verantwortlich.

4. Diskussion

4.1 Spezies-spezifische Eigenschaften von CD98hc der Maus und des Menschen sowie deren Bedeutung für die Entwicklung pharmakologisch nutzbarer Bindeproteine

Homologe Proteine aus unterschiedlichen Organismen/Spezies weisen trotz verwandter Funktionen oftmals beträchtliche Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz und/oder in der Art, Lokalisation sowie Anzahl co- bzw. posttranslationaler Modifikationen auf. Insbesondere extrazelluläre Bereiche von Membranproteinen sind evolutiven Veränderungen stärker unterworfen, da sie für die Anpassung von Organismen an neue Umgebungen oder spezialisierte Funktionen im Zuge von Entwicklungsprozessen von zentraler Bedeutung sind (Sojo *et al.*, 2016).

Trotz enger evolutionärer Verwandtschaft zwischen Mensch und Maus können sich die Eigenschaften orthologer Proteine bedeutend unterscheiden, was für die zielgerichtete Erkennung relevanter Biomarker in biomedizinischen Anwendungen eine erhebliche Hürde darstellt. Denn spezies-spezifische Unterschiede zwischen Mensch und gebräuchlichen präklinischen Modelltieren (wie bspw. Nagetieren, aber auch Affen) haben unmittelbaren Einfluss auf die Entwicklung neuer Pharmazeutika oder Proteintherapeutika. Vor allem die Durchführung prädiktiver präklinischer Studien für die klinische Entwicklung von Humantherapeutika beruht auf einer relevanten Kreuzreaktivität der Wirkstoffe zwischen der menschlichen Zielstruktur und der des jeweils verwendeten Modellorganismus. Andernfalls ist, gerade für biomedizinische Targets mit geringer Aminosäure-Sequenzidentität und differenziellem Glycosylierungsmuster, die Generierung eines Surrogatmoleküls für präklinische Studien oftmals erforderlich. Ein solches molekulares Ersatzpaar muss dabei möglichst vergleichbare biophysikalische Eigenschaften aufweisen sowie ein analoges Epitop auf der Zielstruktur erkennen. Derlei Surrogat-Strategie wurde bereits bei der Zulassung und funktionellen Charakterisierung mehrerer Antikörper für die Humantherapie (z.B. Bevacizumab, Certolizumab Pegol, Efalizumab, Eculizumab oder Infliximab) angewandt (Clarke *et al.*, 2004; EMA, 2007; Treacy, 2000; Wakefield *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2008). Für den gegen Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) gerichteten monoklonalen Antikörper Infliximab (Remicade[®]), welcher neben dem humanen Zielmolekül nur das Pendant im Schimpansen erkennt jedoch keine messbare Kreuzreaktivität mit TNF- α der Maus oder Ratte zeigt, wurde beispielsweise ein entsprechender Surrogat-Antikörper

für Studien zur Einschätzung toxikologischer Parameter (u.a. bei chronischen Behandlungen oder bzgl. der Reproduktionstoxizität) in Mäusen entwickelt und angewandt (Treacy, 2000).

Im Fall der heterodimeren CD98-Aminosäuretransporter weisen sowohl das CD98hc-Protein als auch die verschiedenen CD98lc-Proteine hohe funktionelle Konservierung zwischen unterschiedlichen Spezies auf (Reynolds *et al.*, 2009; Wipf *et al.*, 2002). Wie groß der strukturelle Unterschied speziell zwischen der extrazellulären Domäne des menschlichen und murinen CD98hc ist, wurde bislang jedoch nicht detailliert untersucht. Während die Struktur der extrazellulären Domäne von humanem CD98hc (hCD98hcED) kürzlich beschrieben wurde, wurde in dieser Arbeit die Struktur der Ektodomäne von murinem CD98hc (mCD98hcED) röntgenkristallographisch bei einer Auflösung von 2,1 Å aufgeklärt.

Wie das zuvor beschriebene hCD98hcED lässt sich die Struktur von mCD98hcED der Glycosid-Hydrolase-Familie 13 zuordnen, mit einer zentralen TIM-Barrel-Domäne (Reste 108-432) und einer C-terminalen β -Sandwich-Domäne (Reste 433-526) (MacGregor, 1988). Neben dem humanen Orthologen weist die α -Amylase SusG aus *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB-ID: 3K8K) – einem Gram-negativen Darmsymbionten – unter allen bekannten Strukturen die größte Ähnlichkeit mit mCD98hc auf (RMSD von 2,7 Å über alle C α -Positionen). Ähnlich wie m/hCD98hc ist auch das Enzym SusG über eine N-terminale, hydrophobe α -Helix in der äußeren Bakterienmembran verankert, was darauf hindeutet, dass CD98hc möglicherweise durch horizontalen Gentransfer in Säugetieren/Wirbeltieren erworben und anschließend als Bestandteil heterodimerer Aminosäuretransporter adaptiert wurde. Trotz einer konservierten markanten Furche auf der C-terminalen Seite des TIM-Barrels, in der sich bei SusG das aktive Zentrum befindet, scheint CD98hc allerdings nicht in der Lage zu sein, Zuckerstrukturen umzusetzen (Fort *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind sowohl das Nucleophil als auch der Säure / Base-Katalysator (Reste D388 und E431 von SusG) in mCD98hc und hCD98hc durch Arg bzw. Gly substituiert und somit katalytisch inaktiv.

Obwohl mCD98hcED und hCD98hcED eine Aminosäure-Sequenzidentität von 71% aufweisen, ist der Beitrag identischer Reste zur Proteinoberfläche nur 50%. Dies deckt sich mit der generellen Beobachtung höherer Konservierung zentraler Faltungsmotive im Proteininneren, während die Sequenzkonservierung zwischen verschiedenen Spezies bei exponierten Aminosäureresten geringer ist, vermutlich um gleichzeitig größtmögliche

Variabilität und stabile Proteinfaltung zu realisieren (Moutinho *et al.*, 2019). Der größte Konformationsunterschied zwischen beiden Proteinen zeigt sich innerhalb der Peptidschleife, die dem letzten β -Strang der TIM-Barrel-Domäne folgt und letztlich die Größe der Furche an der membran-distalen Oberfläche von CD98hc bestimmt (Reste 367-397 in mCD98hc; lokaler $C\alpha$ -RMSD der Peptidschleife von 5,2 Å). In mCD98hc ist dieses Peptidsegment nicht nur um einen Rest verkürzt, sondern weist auch große Sequenzunterschiede sowie ein zusätzliches N-Glycan an Position Asn³⁸⁵ auf. Wegen der variablen Länge und Aminosäurezusammensetzung dieser Peptidschleife unterscheiden sich Form und Größe der Furche erheblich zwischen beiden Orthologen.

Gerade gegen dieses in hCD98hc gut zugängliche Epitop scheint es somit nur sehr eingeschränkt möglich zu sein, kreuzreaktive Bindereagenzien für mCD98hc zu gewinnen, wie im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls deutlich wurde (siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.3). Zudem liefert die unterschiedliche Verteilung der Glycosylierungsstellen einen Beitrag zu Abweichungen in der Homologie beider CD98hcED-Proteine. Infolge des inhomogenen Glycosylierungsmusters und der beschriebenen starken Sequenzunterschiede sind zwischen m/hCD98hcED nur sehr wenige Bereiche mit ausreichender Größe und Konservierung zugänglich, um kreuzreaktive Reagenzien zu generieren. Gerade aufgrund ihrer Raumerfüllung und konformationellen Flexibilität können N-Glycane ein Aminosäure-Epitop entweder vollkommen abschirmen oder die Assoziationskinetik von Bindungsreagenzien stark beeinträchtigen. Dies lässt den Schluss zu, dass kleinere biomolekulare Formate, wie Antikörperfragmente oder alternative Bindereagenzien (bspw. Anticaline), möglicherweise besser geeignet sind, um das stark glycosylierte CD98hc zu adressieren. Dieser Ansatz hat sich in der Vergangenheit bereits für anderweitige Zielstrukturen, wie dem prostataspezifischen Membranantigen (PSMA) des Menschen mit seinen insgesamt 10 Glycosylierungsstellen in der homodimeren extrazellulären Domäne, als vielversprechend erwiesen (Barinka *et al.*, 2016).

Unsere Strukturstudie zeigt daher, dass die zielgerichtete Bindung von hCD98hcED und mCD98hcED durch kreuzreaktive Bindungsproteine mit therapeutisch relevanten Affinitäten nur sehr eingeschränkt möglich ist und somit ein Ersatzmolekül für die präklinische Entwicklung in Mausmodellen erforderlich ist. Die Generierung eines molekularen Ersatzpaares wurde daher auch für die Entwicklung von Anticalinen gegen CD98hc verfolgt (siehe Abschnitt 4.3).

4.2 Entwicklung von Anticalinen zum Targeting des humanen CD98hc-Proteins

4.2.1 Selektionsverfahren und strukturelle Untersuchung von α hCD98hc Anticalinen

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion neuartiger Bindereagenzien zur zielgenauen Adressierung von CD98hc war die Darstellung der auf der Zelloberfläche zugänglichen Ektodomäne des Membranproteins in einer für den Anticalin-Entwicklungsprozess geeigneten Form. Hierzu wurde die lösliche extrazelluläre Domäne des menschlichen CD98hc (UniProt ID: P08195-2, Reste Glu¹¹¹–Ala⁵²⁹; berechnete Masse 48,4 kDa) sowohl als unglycosyliertes Protein (hCD98hcED) in *E. coli* BL21 als auch in nativer glycosylierter Form (hCD98hcEDg) in menschlichen embryonalen Nierenzellen hergestellt.

Die heterologe Proteinproduktion in *E. coli* ist mit mehreren Vorteilen verbunden. So besitzt das genetisch sehr gut charakterisierte Gram-negative Bakterium kurze Generationszeit, es kann schnell in kostengünstigen Nährmedien zu hohen Zelldichten wachsen und es können im Prinzip hohe Proteinausbeuten erreicht werden (Swartz, 2001). Andererseits ist die gentechnische Herstellung von Glycoproteinen mit diesem Wirtsorganismus nicht möglich, so dass für diese besondere Anforderung auf ein eukaryotisches Expressionssystem humanen Ursprungs zurückgegriffen wurde. Obwohl die Glycosylierung von Membranproteinen oder sekretorischen Proteinen einen Einfluss auf deren Faltungstabilität und Oligomerisierungszustand haben kann (Kayser *et al.*, 2011), erwies sich diese als nicht erforderlich für die korrekte Faltung von CD98hcED. Tatsächlich ließ sich dieses mit hoher Ausbeute in monodisperser und monomerer Form mit beiden Expressionssystemen produzieren.

Analysen mittels Größenaufschlusschromatographie zeigten, dass die vier experimentell verifizierten N-Glycosylierungsstellen des nativen hCD98hc (Asn²⁶⁴, Asn²⁸⁰, Asn³²³ und Asn⁴⁰⁵) mit ca. 32% zu der apparenten Masse des rekombinanten hCD98hcEDg (73,1 kDa) beitragen. Die starke Glycosylierung zeigte sich ebenfalls in Form von verzögerter und inhomogener elektrophoretischer Mobilität von hCD98hcEDg in der SDS-PAGE verglichen mit der unglycosylierten hCD98hcED aus *E. coli*. Zudem konnte die Glycosylierung von hCD98hcEDg in eukaryotischer Suspensionskultur mittels Deglycosylierung durch PNGase F und anschließende SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden. PNGase F hydrolysiert die N-glycosidische Bindung zwischen dem ersten N-Acetylglucosamin (GlcNac)-Kernzucker des Oligosaccharids und dem entsprechenden

Asparaginrest des Glycoproteins, was die Abspaltung des gesamten posttranslational angefügten Glycans unter Bildung eines Asp-Restes bewirkt (Elder & Alexander, 1982).

Die starke Glycosylierung der hCD98hcEDg hätte die *in vitro* Selektion von Anticalinen mittels Phage Display wegen der begrenzten sterischen Zugänglichkeit von Oberflächenepitopen maskieren können, ein Phänomen, das bei der Selektion von Anticalinen gegen das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) beobachtet wurde (Barinka *et al.*, 2016). Um harsche Reaktionsbedingungen zur Entfernung der komplexen Oligosaccharide zu vermeiden, wurde die in *E. coli* produzierte unglycosylierte Ektodomäne als Zielmolekül für die Selektion mittels Phage Display verwendet. Dennoch war die Herstellung der glycosylierten extrazellulären Domäne für spätere Screening-Versuche und Bindungsstudien unabdingbar, auch um die Eignung selektierter Anticaline für den Einsatz *in vivo* zu untersuchen und den Einfluss der N-Glycosylierung auf die Interaktion mit dem Zielmolekül zu ermitteln.

Die N-terminale Fusion des Biotin-Akzeptorpeptids (BAP) (Beckett *et al.*, 1999) mit CD98hcED und die gleichzeitige Expression der Biotin-Proteinligase (BirA) in beiden Expressionssystemen erlaubte die intrazelluläre ortsgerichtete Kopplung des Zielproteins mit einer Biotin-Gruppe. Diese Modifikation ermöglichte die Immobilisierung der Ektodomäne auf (Strept-)Avidin-beschichteten paramagnetischen Partikeln oder anderen Oberflächen in einer natürlichen Orientierung, wobei der distale Teil der Ektodomäne in Richtung Lösungsmittel zeigt und für die Bindung von Lipocalin-Varianten sowohl während Selektion und Screening als auch bei Bindungsstudien zugänglich ist. So wurde bei der Selektion die Identifizierung von Lipocalin-Varianten begünstigt, welche das CD98hc-Membranprotein in seiner natürlichen Form auf der Zelloberfläche binden.

Für die Selektion von Anticalinen gegen die große extrazelluläre Domäne des hCD98hc-Proteins wurde eine bereits für andere Zielstrukturen erfolgreich angewandte Zufallsbibliothek auf der Grundlage des humanen Lipocalins Lcn2 herangezogen (Gebauer *et al.*, 2013). Gerade das Grundgerüst von Lcn2 ist aufgrund seiner im Vergleich zu anderen menschlichen Lipocalin-Vertretern weit geöffneten Bindungstasche besonders gut geeignet, um neben kleinen Molekülen bzw. Molekülkomplexen auch größere, proteinbasierte Zielstrukturen zu binden. Aufgrund der ausgewogenen Verteilung der insgesamt 20 für die ortsgerichtete Randomisierung ausgewählten Aminosäurepositionen innerhalb der strukturell variablen Schleifenregionen am offenen Ende der β -Fasstruktur konnten in der Vergangenheit bereits vielversprechende Bindereagenzien für diverse Protein-

Zielstrukturen (z.B. ED-B, Hsp70, VEGFR-3 oder PSMA), Peptide (z.B. monomeres A β) sowie für biomedizinisch relevante Haptene (z.B. Colchicin, oder Petrobactin) aus der gleichen Anticalin-Zufallsbibliothek selektiert werden (Deuschle *et al.*, 2020c; Ilyukhina *et al.*, 2020; Rothe & Skerra, 2018).

In dieser Arbeit wurden nach sechs Selektionsrunden mittels Phage Display drei unabhängige hCD98hc-spezifische Lipocalin-Varianten – P3D11, P3A12 und P1E4 – durch ELISA-Screening identifiziert und anschließend in *E. coli* als lösliche Proteine exprimiert. Die drei aus der naiven Lcn2-Bibliothek selektierten Anticaline besaßen bereits Dissoziationskonstanten im picomolaren bis einstelligen nanomolaren Bereich bei gleichzeitig stabilem Monomerverhalten, was erneut die Leistungsfähigkeit dieser Bibliothek veranschaulicht. Die nähere Analyse des Bindungsverhaltens der Anticaline durch SPR-Messungen offenbarte zudem, dass alle drei Lipocalin-Varianten das Zielprotein kompetitiv und daher mit sich überlappenden Epitopen binden. Weitere SPR-Studien mit der immobilisierten hCD98hcEDg zeigten, dass die Glycosylierung des Zielproteins keinen Einfluss auf die Dissoziationskonstanten von P3D11 und P3A12 hat, die Bindung von P1E4 jedoch signifikant schwächt (~ 100-fach). Diese Beobachtung kann durch Abweichungen in der relativen Orientierung der verschiedenen Anticaline gegenüber hCD98hcED erklärt werden, was zu unterschiedlicher Beeinflussung der Bindung durch die sterisch anspruchsvollen Kohlenhydratseitenketten in direkter Nachbarschaft des jeweiligen Epitops führt. Eine solche Art der Paratop-Plastizität wurde auch für die verschiedenen Anticaline nachgewiesen, die zur Bindung der Extradomäne B des onkofetalen Fibronectins entwickelt wurden (Schiefner *et al.*, 2018). Die Anticaline P3D11 und P3A12 zeigten einen sehr ähnlichen Satz von Aminosäureaustauschen, wobei 8 der 19 (bei P3D11) bzw. 20 (bei P3A12) diversifizierte Reste identisch waren. Regionen mit hoher Übereinstimmung der Aminosäuresubstitutionen waren die Peptidschleifen #1 und #2 sowie ihre angrenzenden β -Stränge A + B bzw. C + D. Dies legt den Schluss nahe, dass diese beiden Bindeproteine hCD98hcED in sehr ähnlicher Orientierung binden.

Zur genaueren Bestimmung der überlappenden Epitope, in der die drei selektierten Anticalin-Kandidaten das Membranprotein binden, und um die hochaffine molekulare Wechselwirkung von P3D11 mit der Ektodomäne zu verstehen, wurde dieses Anticalin zusammen mit der hCD98hcED kristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht. Der Komplex aus P3D11 und hCD98hcED mit N-terminalem *Strep*-tag II wurde zunächst durch Größenaufschlusschromatographie isoliert, um eine 1:1-Stöchiometrie zu gewähr-

leisten. Der hCD98hcED•P3D11-Komplex kristallisierte in der Raumgruppe C2 mit je zwei Polypeptidketten pro asymmetrischer Einheit und wurde bei einer Auflösung von 1,8 Å verfeinert. Die Kristallstruktur des biomolekularen Komplexes zeigte, dass das selektierte Anticalin über seine vier strukturell variablen Schleifen #1 bis #4 am offenen Ende des β -Barrels an einen membran-distalen Teil von hCD98hcED bindet. Die Achse des β -Barrels von P3D11 ist dabei gegenüber der Achse des TIM-Barrels von hCD98hcED um etwa 45° geneigt. Die Kontaktfläche zwischen beiden Proteinen stellt mit 1473 Å² die größte begrabene Oberfläche (engl.: Buried Surface Area, BSA) dar, die bislang für Anticalin•Protein-Komplexe beobachtet wurde. Sie ist durch vielfältige intermolekulare Wechselwirkungen (u.a. 15 Wasserstoffbrücken und 3 Salzbrücken) gekennzeichnet. Zum Vergleich zeigen die meisten Antikörper wie auch alternative Bindeproteine mit Proteinantigenen eine begrabene Oberfläche um 900 Å² (Gilbreth & Koide, 2012; Janin *et al.*, 2007).

Das Epitop von hCD98hcED umfasst im Wesentlichen zwei Peptidschleifen, L1 (Reste 128 – 137) und L2 (Reste 374 – 404), die auf den ersten und den achten β -Strang des TIM-Barrels von CD98hcED folgen. Dabei dringt die Peptidschleife L2 tief in die kelchförmige Bindungstasche des Anticalins ein, trägt mit ca. 75% zur Kontaktfläche bei und stellt somit das Hauptepitop dar. Das Epitop von P3D11 liegt außerdem in einem Teil der extrazellulären Domäne, der trotz dynamischer Bewegungen des CD98-Heterodimers ständig zugänglich ist (Chiduza *et al.*, 2019) und somit den Aminosäuretransport über die CD98lc-Untereinheit nicht beeinträchtigen sollte. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass der in klinischen Studien untersuchte mAk IGN523, welcher ebenfalls die Peptidschleife L2 (Reste 374–401) von hCD98hcED bindet, keinen negativen Einfluss auf die Funktionalität des Aminosäuretransporters hat (Hayes *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu den hier selektierten Anticalinen wurde IGN523 nicht mittels eines *in vitro* Selektionsverfahrens identifiziert, sondern wurde durch Immunisierung von Mäusen in Verbindung mit der Hybridom-Technik generiert. Die Erkennung der identischen und auf der Proteinoberfläche gut zugänglichen Peptidschleife von hCD98hc durch Anticalin P3D11 und IGN523 unterstütze bereits nach der strukturellen Aufklärung des Komplexes aus hCD98hcED und P3D11 die Hypothese, dass das Anticalin die molekulare Zielstruktur genau wie IGN523 auch in seiner natürlichen Umgebung auf der Zelloberfläche binden könnte. Zudem konnte durch die Modellierung der Glycosylierung der CD98hcED gezeigt werden, dass zwei der vier N-Glycane zwar in direkter Umgebung des Epitops lie-

gen, jedoch nicht mit der Bindung des Anticalins interferieren, in Einklang mit den Ergebnissen der SPR-Messungen mit hCD98hcEDg.

4.2.2 Bakterieller Surface Display als Grundlage für die Selektion von Bindeproteinen mit verbesserten Eigenschaften

Obwohl die Lipocalin-Variante P3D11 mit ihrer picomolaren Dissoziationskonstante gegenüber hCD98hc sowie einer sehr langen Halbwertszeit der Dissoziation ($K_D = 0,15 \text{ nM}$, $k_{\text{on}} = 2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 3,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\tau_{1/2} = 359 \text{ min}$) bereits nahezu optimale Eigenschaften für die zielgerichtete Adressierung von CD98hc *in vivo* besaß, zeigte dieser Anticalin-Leitkandidat eine überraschend geringe thermische Stabilität. Gerade längere Inkubation bei 37 °C, um die Temperatur im menschlichen Blut oder im Tiermodell zu simulieren, offenbarte erhöhte Aggregationstendenz. Da diese ungünstige Eigenschaft von P3D11 eine erhebliche Einschränkung für die weitere präklinische und klinische Entwicklung bedeutet, war ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit, die Faltungstabilität dieses Anticalin-Leitkandidaten durch evolutives Protein-Design zu optimieren.

Da es selbst mit Hilfe bioinformatischer Verfahren schwierig ist, den Einfluss einzelner und vor allem kombinierter Aminosäureaustausche auf Proteineigenschaften vorherzusagen, sind kombinatorische Verfahren unter Anwendung von Hochdurchsatz-Screening dem rationalen Protein-Engineering häufig überlegen. Um die niedrige Temperaturstabilität von P3D11 und gleichzeitig dessen Affinität für hCD98hc weiter zu verbessern, wurde das Anticalin durch gerichtete Evolution unter Einsatz von Bacterial Surface Display (BSD) einer Maturierung hinsichtlich beider Parameter unterzogen. Insbesondere der BSD hat sich als leistungsstarke und robuste Methodik für die Optimierung von Anticalin-Eigenschaften bewährt (Barkovskiy *et al.*, 2018; Binder *et al.*, 2010; Friedrich *et al.*, 2018). Hierbei werden Anticalin-Varianten durch genetische Fusion mit der OmpA-Signalsequenz am N-terminus sowie der modifizierten Translokationsdomäne des Autotransporters EspP am C-terminus, über das Sec-Transportsystem zunächst in das bakterielle Periplasma geschleust und anschließend auf der äußeren Membran der Bakterien präsentiert. Auf diese Weise wird die plasmidkodierte genetische Information für eine jeweilige Anticalin-Variante mit ihrem Phänotyp physikalisch gekoppelt. Die einfache Kultivierbarkeit, schnelle Generationszeit sowie hohe Transformationseffizienz von *E. coli* sind Schlüsselfaktoren dieses Verfahrens, das die phänotypische Charakterisierung

komplexer Proteinbibliotheken von $>10^9$ Varianten unter Hochdurchsatz-Analyse mit fluoreszenzbasierten Zellsortiergeräten in Echtzeit zulässt.

Um Varianten von P3D11 mit verbesserter Temperaturstabilität und erhöhter Affinität gegenüber hCD98hc zu selektieren, wurde eine Zufallsbibliothek mit moderater Aminosäuremutationsrate von durchschnittlich etwa zwei Aminosäureaustauschen pro Anticalin-Variante generiert. Dem lag die Erwartung zugrunde, dass bereits der Austausch weniger Aminosäurepositionen einen nennenswerten Effekt auf die relevanten Parameter haben kann. Ferner waren die Anwendung erhöhter Temperatur während der Proteinexpression sowie die Korrelation zwischen effizienter Proteinfaltung und funktioneller Oberflächenpräsentation (Konning & Kolmar, 2018; Traxlmayr & Shusta, 2017) der Anticalin-Varianten im BSD zielführend. Hierzu wurde die Expression des membranverankerten Proteins in *E. coli* bei 37 °C induziert, verglichen mit 26 °C bei dem ursprünglich genutzten Phage Display, und zudem wurden nur solche Bakterien gesammelt, die sowohl ein starkes Bindungssignal für hCD98hcED als auch ein hohes Signal für die Zelloberflächenpräsentation in den FACS-Experimenten zeigten.

Nach sechs Anreicherungszyklen konnten zahlreiche Mutanten identifiziert werden, die nach Inkubation mit 1 nM hCD98hcED ein signifikant stärkeres Bindungssignal im Vergleich zur Ausgangsvariante P3D11 zeigten. Angesichts der sehr niedrigen picomolaren Dissoziationskonstante, musste das erhöhte Bindungssignal (bei einer eingesetzten Konzentration des Zielmoleküls, die ~ 7 -fach über dem K_D -Wert von P3D11 lag) vor allem auf eine effizientere Oberflächenpräsentation durch verbesserte Proteinfaltung und/oder Stabilität zurückzuführen sein. Die anschließende Sequenzanalyse ergab, dass die beiden Aminosäuresubstitutionen Gly81Val und Phe71Ser – lokalisiert in Loop #2 und β -Strang D von P3D11 – für verstärkte Bindungssignale im BSD von entscheidender Bedeutung sind. Bemerkenswerterweise trugen alle untersuchten Varianten von P3D11 die Mutation Gly81Val, wohingegen die Substitution Phe71Ser in 50% der Fälle auftrat, allerdings begleitet von weiteren Aminosäuresubstitutionen. Folglich wurde die Variante D11vs, in der nur diese beiden Mutationen vereint wurden, als lösliches Protein im präparativen Maßstab hergestellt. Hierbei lieferte die deutlich erhöhte Proteinausbeute der Variante D11vs im Vergleich zu P3D11 (ca. Faktor 5) ein weiteres Indiz für eine Erhöhung der Faltungsstabilität.

Die Analyse der thermischen Entfaltung mittels CD-Spektroskopie (in PBS und bei physiologischem pH-Wert) bestätigte einen signifikanten Anstieg der Schmelztemperatur

(T_m) von D11vs ($T_m = 63,5\text{ °C}$) um $8,3\text{ °C}$ gegenüber P3D11. Auffallend war außerdem die deutlich erhöhte Steigung des Entfaltungsüberganges von D11vs, welche durch erhöhte Kooperativität des Faltungs-/Entfaltungsprozesses zu erklären ist. Dies spiegelt sich in einer höheren Denaturierungsenthalpie (ΔH_m) wieder und resultiert letztlich in einer erhöhten extrapolierten freien Enthalpie der Entfaltung (ΔG_U) unter Standardbedingungen (25 °C). Diese Befunde standen im Einklang mit der beobachteten geringeren Aggregationsstendenz von D11vs im Vergleich zu P3D11 im Verlauf der Inkubation bei 37 °C . Darüber hinaus zeigte die Variante D11vs sogar verbesserte Affinität zu hCD98hcED ($K_D = 0,06\text{ nM}$, $k_{on} = 4,5 \times 10^5\text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, $k_{off} = 2,6 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$, $\tau_{1/2} = 442\text{ min}$), was sowohl leicht schnellerer Assoziationsrate wie auch langsamerer Dissoziationsrate im Vergleich zu P3D11 zu verdanken war.

Anhand der strukturellen Informationen über den biomolekularen Komplex aus hCD98hcED und P3D11 lässt sich eine plausible Erklärung für die verbesserte Stabilität und Affinität der Anticalin-Variante D11vs ableiten: Gly⁸¹ wurde im Verlauf der ursprünglichen Phage Display Selektionskampagne eingeführt und ersetzte das in wtLcn2 vorhandene Arg⁸¹, offenbar um ausreichend Platz für die Bindung des Zielmoleküls zu schaffen. Aufgrund des Fehlens einer Seitenkette bewirkt Glycin jedoch eine erhöhte konformationelle Flexibilität des Peptidrückgrats, was zu einer Destabilisierung des β -Barrels führt. Die Substitution durch die β -verzweigte Aminosäure Valin reduziert diese ungünstige Flexibilität (Matthews *et al.*, 1987).

Zudem bildet P3D11 in dieser Region eine hydrophobe Kavität, die von den Aminosäureresten Tyr⁶⁸, Gly⁸¹, Phe⁸³ und Leu⁹⁴ ausgekleidet wird, von denen auch Tyr⁶⁸ während der ursprünglichen Selektion des Anticalins eingeführt wurde. Dieser destabilisierende Hohlraum wird durch die hydrophobe Seitenkette von Valin gefüllt. Zusätzlich zu diesem stabilisierenden Effekt auf die Proteinfaltung vergrößert Val⁸¹ die Kontaktfläche mit dem Zielmolekül hCD98hcED und trägt so auch zur Erhöhung der Affinität von D11vs bei.

Ferner ermöglicht der Ersatz von Phe⁷¹ durch Ser die Bildung stabilisierender Wasserstoffbrückenbindungen mit den Resten Asn¹⁷⁴ und Lys⁵⁰. Gleichzeitig führt die kleinere Serin-Seitenkette vermutlich dazu, dass sich die Peptidschleife #2 des Anticalins leicht von der Achse des β -Barrels wegbiegen kann, was mehr Platz für die Bindung des Zielmoleküls schafft.

Zusammenfassend verdeutlicht diese Studie sehr eindrucksvoll die Leistungsfähigkeit der gerichteten Evolution zur Identifizierung relevanter Aminosäuresubstitutionen für die Optimierung von Proteineigenschaften unter Anwendung des BSD-Verfahrens.

4.2.3 Zielgerichtete Adressierung von hCD98hc durch Anticaline mit bildgebenden Verfahren

Die Evaluierung der Fähigkeit des Anticalins zur Bindung des Zielmoleküls in seiner nativen Umgebung auf der Oberfläche von Tumorzellen sowie nach intravenöser Injektion in einem Tiermodell *in vivo* war ein zentraler Gegenstand dieser Arbeit. Für Studien an Mäusen wurde eine modifizierte Version des Anticalin-Leitkandidaten D11vs mit moderat verlängerter Plasma-Halbwertszeit unter Anwendung der PASylation®-Technologie (Schlapschy *et al.*, 2013; Binder & Skerra, 2017) entwickelt. Zu diesem Zweck wurde ein strukturell ungeordnetes Polypeptid mit insgesamt 200 Prolin-, Alanin- und Serinresten (PAS200) genetisch mit dem C-Terminus des Anticalins fusioniert, wodurch dessen hydrodynamisches Molekülvolumen erhöht wurde, was letztlich eine verzögerte Nierenfiltration zur Folge hat. Die moderate Verlängerung der Zirkulationsdauer im Organismus hat im Zusammenhang mit nuklearmedizinischer Bildgebung bereits in früheren Studien – bei der Verwendung von Anticalinen (Friedrich *et al.*, 2018) wie auch Fab-Fragmenten (Mendler *et al.*, 2015a; Mendler *et al.*, 2015b) – gezeigt, dass die Feinabstimmung der Größe des Bindeproteins bzw. seiner Pharmakokinetik einen positiven Effekt auf die Akkumulation im Tumorgewebe sowie den Bildgebungscontrast hat. Im Gegenzug zu konventionellen Verfahren der Plasma-Halbwertszeit-Verlängerung, wie bspw. der PEGylierung, kann bei der PASylierung auf chemische Kopplungsschritte verzichtet werden, was die Herstellung eines monodispersen Proteinpräparats ohne Beeinflussung seiner biologischen Aktivität und Affinität erleichtert (Binder & Skerra, 2017).

Ein weiterer entscheidender Aspekt beim Design proteinbasierter Biologika zur gezielten Adressierung von Oberflächenmarkern im Anwendungsbereich der Theragnostik ist, neben der Verwendung eines hochspezifischen Bindemoduls (hier dem Anticalin) für eine Zielstruktur, größtmögliche Flexibilität bei der Auswahl funktionell passender Effektormoleküle (wie bspw. niedermolekulare Cytostatika, Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffe, Radiochelatoren oder Proteintoxinen) für entsprechende Anwendung. Somit wurde D11vs-PAS200, als eine mögliche Option zur Kopplung mit verschiedensten niedermole-

kularen Effektormolekülen, am C-Terminus des PAS-Anhängsels mit einem freien Cystein-Rest ausgestattet. Dieser gestattet die ortsspezifische Konjugation mit Maleimid-funktionalisierten chemischen Gruppen und ermöglicht so die Verwendung des Anticalins für die *in vitro*- und *in vivo*-Bildgebung wie auch als Drug Carrier (Ravasco *et al.*, 2019). Aufgrund der großen Distanz zwischen der natürlichen Disulfidbrücke innerhalb des Anticalins (Cys⁷⁶ und Cys¹⁷⁵) und dem am Ende des PAS-Anhängsels angefügten freien Cystein-Rest, wird die Ausbildung unerwünschter intramolekularer Disulfidspezies weitgehend unterdrückt. Mit der ortsspezifischen Kopplung an die Thiolgruppe des Cystein-Rests kann auf statistische Markierungsverfahren –wie die Iodierung von Tyrosin-Resten (Fraker & Speck, 1978) oder die Kopplung mit Lysin-Seitenketten unter Einsatz von N-Hydroxysuccinimid-Estern (Kalkhof & Sinz, 2008) bzw. Isothiocyanaten (Nakamura *et al.*, 2009) – verzichtet werden, welche negativen Einfluss auf die Affinität der jeweiligen Anticaline haben könnten. Generell werden bei kleinen Bindeproteinen wie Anticalinen, Fab-Fragmenten oder anderen alternativen Scaffolds, im Vergleich zu Antikörpern statistisch gesehen häufiger auch Aminosäurereste innerhalb der Bindungstasche konjugiert, was die biomolekulare Erkennung des Zielmoleküls beeinträchtigen kann.

Die Fähigkeit von D11vs-PAS200, den Tumormarker hCD98hc in seiner nativen zellulären Umgebung zu binden, wurde durch zytofluorometrische Experimente und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurde der Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoff Sulfo-Cy5.5 mit dem PASylierten Anticalin konjugiert. Starke Bindungssignale in der zytofluorometrischen Analyse bzw. eine starke Färbung des Cytoplasmas und der Membran bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde für alle untersuchten menschlichen Krebszelllinien erhalten. Die hierzu angewandten Zelllinien stammen von unterschiedlichem Ursprungsort ab und zeigen variierendes Expressionslevel des Tumormarkers. Die Spezifität der Bindungssignale wurde in drei unterschiedlichen Kontrollexperimenten überprüft: (i) unter Verwendung des Sulfo-Cy5.5-markierten PASylierten wtLcn2, welches keine Affinität gegenüber hCD98hc besitzt, (ii) durch Blockadeexperimente mit unmarkiertem PASylierten D11vs und/oder der löslichen hCD98hcEDg sowie (iii) durch Analyse einer HEK293T Zelllinie, in der das SLC3A2 Gen kodierend für hCD98hc homozygot mittels CRISPR/Cas9 inaktiviert war (Fuchs *et al.*, 2018). Mit diesen Reagenzien bzw. Experimenten konnte die hohe Spezifität des Anticalins D11vs für hCD98hc und somit dessen grundsätzliche Eignung zur zielgenauen Detektion des Tumormarkers auf Krebszellen bestätigt werden.

Die Anwendbarkeit des PASylierten Anticalins zur zielgerichteten Adressierung von hCD98hc *in vivo* wurde mit Hilfe von PET/CT-Bildgebungsstudien sowie in einer Biodistributionsstudie an Xenotransplantat-Mausmodellen mit humanen Tumoren untersucht. Hierzu wurde das PASylierte D11vs über den freien Cystein-Rest mit einem Maleimid funktionalisierten Deferoxamin konjugierte und für anschließende nuklearmedizinische Bildgebungsstudien mit ^{89}Zr -markiert. Die Tumore wurden ausgehend von den humanen Krebszelllinien Ramos und PC-3 generiert, nachdem CD98hc als vielversprechender Tumormarker für Lymphome (Salter *et al.*, 1989) und andere hämatologische Krebsarten (Bajaj *et al.*, 2016) beschrieben wurde und ebenfalls im metastasierenden Prostatakarzinom überexprimiert wird (Wang *et al.*, 2013; Papetti & Herman, 2001). Die Ramos-Tumor-Xenotransplantate zeigten allerdings sehr schnelles, heterogenes und infiltrierendes Wachstumverhalten, was diese schwierig in der Handhabung machte und die Abgrenzung auf den PET-Bildern erschwerte. Folglich wurden nur die PC-3-Xenotransplantate für weitere Experimente verwendet.

In den PET/CT-Bildgebungsstudien konnten die PC-3 Tumor-Xenotransplantate sehr gut visualisiert und klar vom umgebenden Gewebe abgegrenzt werden, wobei der beste Bildgebungskontrast 24 h *post injectionem* (p.i.) erreicht wurde. Dies stand im Einklang mit vorangegangenen Bildgebungsstudien unter Anwendung anderer PASylierter Bindeproteine mit gleicher Länge des PAS-Anhängsels (Friedrich *et al.*, 2018; Mendler *et al.*, 2015a). Zudem zeigte das PASylierte Anticalin sehr homogene Verteilung innerhalb der Tumore, wie anhand von Gewebeschnitten 72 h nach der Tracer-Injektion durch Autoradiographie dokumentiert wurde. Eine Biodistributionsanalyse 24 h p.i. belegte zudem eine hohe Aufnahme des Radiopharmazeutikums von $8,6 \pm 1,1\%$ der injizierten Dosis pro Gramm Tumormasse. Außerdem wurde ein hoher Tumor-zu-Blut-Kontrast von 11,8:1 24 h nach Injektion erreicht. Diese Ergebnisse liefern gute Indizien dafür, dass mit dem molekularen Design des Protein-Tracers bereits ein guter Kompromiss bezüglich Zirkulationsdauer und Tumoraufnahme bzw. Gewebepenetration erreicht wurde. Gleichzeitig durchgeführte Blockadeexperimente mit unmarkiertem PASyliertem Anticalin bestätigten zudem die ausgeprägte Spezifität von D11vs. Nach Blockierung des hCD98hc-Epitopes waren die Tumore auf den PET/CT-Bildern kaum noch vom umliegenden Gewebe abgrenzbar. *Ex vivo* Biodistributionsanalysen ergaben ebenfalls eine signifikant verringerte Aufnahme des Radiopharmazeutikums um $\sim 40\%$ verglichen mit den Tieren ohne vorausgegangene Injektion des unmarkierten PASylierten Anticalins.

Neben der starken Akkumulation von Strahlung in den Tumoren war auch eine Aufnahme in Leber und Nieren bzw. Blase, also Organen, die an der Ausscheidung des proteinbasierten Radiopharmazeutikums beteiligt sind, sowie Gelenken und Milz detektierbar. Bei der Aufnahme von Radioaktivität in Niere Leber, Gelenke und Milz handelt es sich um ein für Protein-Metallchelatkomplexe bekanntes Phänomen, welches sich vornehmlich durch die begrenzte Komplex-Stabilität erklären lässt, die u.a. auch für den linearen Chelator Deferoxamin in Kombination mit dem Radiometall $^{89}\text{Zr}(\text{IV})$ bekannt ist (Mendler *et al.*, 2015b; Abou *et al.*, 2011). Da sich die Signale in Gelenken und Nieren der Mäuse mit oder ohne blockiertes CD98hc-Epitop nicht signifikant unterschieden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine unspezifische Aufnahme von Radioaktivität handelt. Außerdem wurde in einer Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebungsstudie unter Anwendung des Sulfo-Cy5.5-markierten PASylierten D11vs beobachtet, dass 24 h p.i. ausschließlich Signale in Tumor und Niere auftraten (Daten nicht gezeigt). Durch Verwendung eines ^{89}Zr -Chelatbildners mit höherer *in vivo* Stabilität im Vergleich zu Deferoxamin, wie beispielsweise Fusarinin C – einem von *Aspergillus fumigatus* produzierter cyclischer Chelator (Summer *et al.*, 2018a; Summer *et al.*, 2018b) – könnte zumindest ein Teil dieser Nebenaktivitäten vermieden werden.

Während die vorliegenden Bildgebungsstudien den konzeptionellen Beweis zur Nutzung der spezifischen Erkennung von CD98hc durch das PASylierte Anticalin D11vs auf Tumorzellen für die nicht-invasive biomedizinische PET/CT-Bildgebung liefern, können nun verschiedene Anwendungen in Betracht gezogen werden. Ein mögliches Einsatzgebiet des in dieser Arbeit entwickelten αCD98hc Anticalins in der Onkologie ist im Bereich der Behandlung und Diagnose von Gehirntumoren zu sehen. Im Falle von Gliomen und Gehirnmetastasen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass CD98hc zusammen mit dem Transporter Lat-1 überexprimiert ist, beide andererseits aber mit geringerer Abundanz im angrenzenden normalen Gehirngewebe vorliegen (Haining *et al.*, 2012; Papin-Michault *et al.*, 2016). Aufgrund der selektiven Natur der BHS ist die Zugänglichkeit von Wirkstoffen für die Therapie oder Diagnose von krankhaften Veränderungen im Gehirn nach intravenöser Applikation allerdings erheblich beeinträchtigt (Zhan & Lu, 2012).

Eine leistungsfähige Methodik zur Diagnose von Hirntumoren bei betroffenen Patienten ist die Verwendung von Radiotraceren auf der Basis von Aminosäureanaloge, wie O-(2-[^{18}F]-Fluoroethyl)-L-Tyrosin (FET), welche zu > 80% von Lat-1 transportiert werden (Sun *et al.*, 2018; Heiss *et al.*, 1999). Solche substratbasierten bildgebenden Diagnosever-

fahren zeigen jedoch häufig nur geringe Spezifität und niedrige Sensitivität für einen bestimmten Aminosäuretransporter, was unter anderem auf die bidirektionale Natur des Lat-1 Transporters und anderer System-L Transporter zurückzuführen ist (Hutterer *et al.*, 2013). Um diese Hürde zu überwinden, wurde ein α Lat-1 mAk beschrieben, der den hochspezifischen extrakraniellen Nachweis von Lat-1 in soliden humanen Xenotransplantat-Tumoren in Mausmodellen ermöglicht (Ikotun *et al.*, 2013). Trotz effizienter Bindung der Zielstruktur und guter Visualisierung von Tumoren *in vivo*, werden mAk im allgemeinen jedoch nicht effektiv in das Gehirn transportiert (St-Amour *et al.*, 2013). Wie bereits beschrieben, wurde CD98hc erst kürzlich als neuer Transzytoserezeptor von Endothelzellen der BHS charakterisiert, der für den nicht-invasiven Transport von Arzneimitteln in das Gehirn mittels spezifischer Bindeproteine ausgenutzt werden kann (Zuchero *et al.*, 2016). Daher bieten die in dieser Arbeit entwickelten CD98hc-spezifischen Anticaline eine hervorragende Möglichkeit, die gezielte Abgabe therapeutischer oder diagnostischer Substanzen an das Gehirn mit der hochspezifischen Bindung eines Biomarkers zur Bekämpfung von Gehirntumoren zu kombinieren. Die Fähigkeit von D11vs und anderen α CD98hc-Anticalinen, die BHS zu überwinden und gezielt Tumorzellen im Gehirn zu adressieren, ist eine vielversprechende Anwendung, die in zukünftigen Studien evaluiert werden muss.

Darüber hinaus kann durch Protein-Design das Format der α CD98hc-Anticaline für unterschiedliche Einsatzgebiete weiter optimiert werden. So stehen vielfältige Optionen, gerade auch im Verbund mit der PASylation[®]-Technologie, zur maßgeschneiderten Anpassung der Wirkstoffeigenschaften, bspw. im Hinblick auf die Bindungswalenz oder -spezifität sowie Zirkulationsdauer, zur Verfügung. Die sterisch gut zugänglichen N- und C-Termini der Anticaline, welche nicht direkt an der Bindung der Zielstruktur beteiligt sind, erlauben hohe Flexibilität bei der Formatierung, von multifunktionellen Fusionsproteinen, bspw. in Kombination mit weiteren Anticalinen, Enzymen oder Toxinen, dem Fc-Teil von Immunglobulinen oder gar intakten Antikörpern (Rothe & Skerra, 2018). Zudem eröffnet die ortsspezifische chemische Konjugation der α CD98hc-Anticaline, bspw. mit Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffen, Toxinen oder alternativen Radiometallchelatoren, weitere Anwendungen in der Theranostik.

4.3 Entwicklung eines Surrogat-Anticalins für präklinische Studien in der Maus

Die niedrige Aminosäuresequenzkonservierung an der Proteinoberfläche (~ 50%) sowie das unterschiedliche Glycosylierungsmuster zwischen dem menschlichen und murinen CD98hc erschwert die Entwicklung von Bindeproteinen mit ausreichender Kreuzreaktivität für diese beiden Orthologe erheblich. Dies ist auch die Ursache dafür, dass die α hCD98hcED Anticaline ausschließlich das humane Membranprotein binden, wie durchgeführte SPR-Experimente belegen. Die Peptidschleife L2, welche das Hauptepitop der human-spezifischen Anticaline darstellt, ist bei mCD98hcED um einen Rest kürzer, trägt ein zusätzliches N-Glycan – neben Asn³⁹⁹ auch an Asn³⁸⁵ – und zeigt größere Sequenzunterschiede auf. Dies verhindert eine Kreuzreaktivität der biomolekularen Erkennung in diesem Bereich. Auch der mAk IGN523, der ebenfalls die Schleife L2 (Reste 374–401) von hCD98hcED mit picomolarer Affinität erkennt, besitzt keine nachweisbare Affinität zu CD98hc der Maus (Lippincott *et al.*, 2013).

Für präklinische Studien zur Bewertung der pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter neuer Biologika (bspw. Beurteilung der Immun- und Reproduktionstoxizität oder Bestimmung von Zielmolekül-vermittelter Clearance) sind experimentelle Studien an Nagetieren von großer Bedeutung. Insbesondere für die Entwicklung von proteinbasierten Wirkstoffen welche die BHS überwinden sollen, ist die Untersuchung des gerichteten Hirntransports wie auch in der Folge pharmakologischer Effekte in Nagetiermodellen entscheidend. Gerade im Hinblick auf die Expression in unterschiedlichen Geweben und Blutzellen (siehe The Humane Protein Atlas; Gen-Name: SLC3A2) (Uhlén *et al.*, 2015) können in geeigneten Tiermodellen die Effekte und das Sicherheitsprofil der zielgerichteten Bindung des CD98hc-Proteins abgeschätzt werden. Die Bedeutung solcher Untersuchungen zeigt sich besonders am Beispiel des für den Eisenstoffwechsel essentiellen Transferrin Rezeptor 1, dem aktuellen Goldstandard für die nicht-invasive und zielgerichtete Arzneimittelabgabe in das Gehirn (Paterson & Webster, 2016). Aufgrund der ebenfalls abundanten Expression in unterschiedlichen Geweben, deren Adressierung unerwünscht ist, führt die Bindung dieses Rezeptors am Hirnendothel – durch einen Antikörper oder dessen Fragmente – zwar zur erhöhten Aufnahme eines gekoppelten Therapeutikums in das Gehirn, jedoch können teils starke Nebenwirkungen in peripheren Organen die Folge sein (Couch *et al.*, 2013). Diese unerwünschten Effekte können – falls im Umfang entsprechender präklinischer Studien erkannt – oftmals durch akkurates Design des Therapeutikums bereits in frühen Phasen der Wirkstoffentwicklung zielgerichtet reduziert

oder gar unterbunden werden (Weber *et al.*, 2018). Leider fehlen zuverlässige *in vitro* Modellsysteme der humanen BHS oder humanisierte transgene Mausstämme, mit denen das Wirkungs- und Sicherheitsprofil eines Therapeutikums mit hinreichender Aussagekraft studiert werden könnte. Im Falle von CD98hc würde die einfache Substitution der extrazellulären Domäne durch das menschliche Gegenstück in einer transgenen Maus aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der orthologen Proteine höchstwahrscheinlich eine Dysfunktion des multifunktionellen Proteins hervorrufen, was die Situation zusätzlich erschwert (Sato *et al.*, 2011).

Vor diesem Hintergrund sowie aufgrund eines gescheiterten Versuchs zur Selektion von kreuzreaktiven Anticalinen zwischen den murinen und humanen CD98hc-Proteinen unter Einsatz der beschriebenen Lcn2-Zufallsbibliothek mittels Phage Display (Daten nicht gezeigt), wurde die Selektion eines Surrogatproteins für den humanspezifischen Anticalin-Leitkandidaten P3D11 bzw. D11vs angestrebt. Die Selektionskampagne für das mauspezifische Anticalin erfolgte methodisch analog zu der für die Anticaline gegen hCD98hcED (d.h. hinsichtlich der verwendeten Lipocalin-Bibliothek, der Durchführung der Phage Display-Methode sowie des anschließenden ELISA-Screening). Da die humanen und murinen CD98hc-Proteine unterschiedliches Glycosylierungsmuster aufweisen, wurde bei der Selektion erneut das unglycosylierte Zielprotein verwendet.

Auf diese Weise wurde der Anticalin-Kandidat C1B12 mit picomolarer Affinität gegenüber der extrazellulären Domäne von mCD98hc selektiert. Wie erwartet, waren auch bei diesem Anticalin die meisten der 20 randomisierten Positionen innerhalb des Lcn2-Gerüsts mutiert. SPR-Experimente mit hCD98hcED und der glykosylierten mCD98hcED zeigten, dass C1B12 ein Epitop erkennt, das beim menschlichen CD98hc für eine Kreuzreaktivität nicht ausreichend hoch konserviert ist, sowie durch N-Glycosylierung aus sterischen Gründen beim murinen CD98hc unzugänglich ist. Diese Befunde legten nahe, dass die Lipocalin-Variante C1B12 die zwischen beiden Spezies höchst variable Peptidschleife L2 auf der membran-distalen Seite der extrazellulären Domäne erkennt. Diese Vermutung wurde durch Lösung der Struktur des biomolekularen Komplexes zwischen dem Anticalin C1B12 und mCD98hcED mittels Röntgen-Kristallographie bestätigt.

Trotz der erheblichen Unterschiede der Aminosäureaustausche zwischen C1B12 und P3D11/D11vs sind erstaunlich hohe Ähnlichkeiten beider Proteine bzgl. der Bindung des Zielmoleküls zu beobachten. Beide Anticaline erkennen das jeweilige CD98hc-Antigen mit picomolarer Affinität und ähnlicher Bindungskinetik, besitzen vergleichbare begrabe-

ne Oberfläche (C1B12 mit 1363 Å² und P3D11 mit 1473 Å²) sowie die gleiche Anzahl an Wasserstoffbrücken und Salzbrücken (15 bzw. 3) in der dreidimensionalen Struktur ihrer Komplexe. Obwohl die beiden Bindeproteine das strukturell äquivalente Epitop in unterschiedlichen Orientierungen erkennen, stellt die hervorstehende Peptidschleife L2 in beiden Fällen mit ~ 75% aller Kontakte das dominante Strukturelement dar und ragt sehr tief in die Bindungstasche der Anticaline.

Die Lipocalin-Variante C1B12 erkennt L2 vorwiegend über seine Schleife #4, den Kern des β-Barrels und die Schleife #1, während im Fall von P3D11 die Schleife #1, der Kern des β-Barrels und die Schleife #2 die Wechselwirkungen mit L2 bestimmen. Interessanterweise ist bei beiden Anticalinen der Beitrag der Schleife #3 zur Kontaktfläche im biomolekularen Komplex gering. Gleichzeitig zeigt diese Peptidschleife die größte strukturelle Abweichung von wtLcn2. Dies legt nahe, dass sich die Schleife #3 in beiden Fällen von der Kelchachse wegbiegen muss, um Platz für die dichte Komplexbildung mit dem jeweiligen CD98hc-Protein zu schaffen. Auch im Fall von Antikörpern sind nicht zwangsläufig alle der insgesamt sechs CDRs direkt an der Antigenbindung beteiligt. In beiden Anticalinen werden zudem nur etwa 50% der Kontaktfläche durch substituierte Seitenketten und die andere Hälfte durch konservierte Reste des Lcn2-Grundgerüsts vermittelt.

Das Anticalin C1B12 stellt somit hinsichtlich seiner grundlegenden Bindungseigenschaften (Affinität, Bindungskinetik, Epitopspezifität) ein ideales Surrogatprotein für den gegen das humane CD98hc-Protein gerichteten Leitkandidaten P3D11/D11vs dar. Dennoch ist die Anwendung dieses Bindeproteins *in vivo* aufgrund der beiden N-Glycane in der Schleifenregion L2 nicht ohne weiteres möglich, da diese der Bindung der extrazellulären Domäne von mCD98hc durch C1B12 im Wege steht. Dessen Anwendung erfordert daher die Erzeugung eines transgenen Mausmodells, in welchem entsprechende Glycosylierungsstellen mutiert sind, um die posttranslationale Verknüpfung von Zuckerstrukturen mit Asn³⁸⁵ (Sequen: NES³⁸⁵⁻³⁸⁷) und Asn³⁹⁹ (Sequen: NMT³⁹⁹⁻⁴⁰¹) zu unterbinden und so die Erkennung des mCD98hc-L2-Epitops durch C1B12 im ansonsten nativen Kontext zu ermöglichen.

Um dieses Konzept aus proteinfunktioneller Perspektive zu validieren, wurde eine entsprechende mCD98hcED-Mutante mit den Aminosäuresubstitutionen N³⁸⁵D sowie T⁴⁰¹A als lösliches Protein in *E. coli* sowie partiell glycosyliert – an Asn¹⁶⁶ und Asn²⁵⁹, jedoch nicht an den Positionen Asn³⁸⁵ und Asn³⁹⁹ – in humanen embryonalen Nierenzellen gen-

technisch hergestellt. Beide Proteine wurden bis zur Homogenität gereinigt, wobei monodisperse Präparationen der monomeren CD98hcED-Proteine erhalten wurden. Die apparente Molekülgröße in SEC und SDS-PAGE der nicht glykosylierten mCD98hcED-Mutante war vergleichbar der des nicht glykosylierten Wildtyp-Proteins. Die partielle Glykosylierung der mCD98hcED-Mutante hingegen verursachte erwartungsgemäß eine Zunahme der apparenten Größe im Vergleich zu den nicht glykosylierten mCD98hcED-Proteinen, jedoch nicht in demselben Ausmaß wie bei dem in HEK-Zellen produzierten vollständig glykosylierten mCD98hcED-Protein. Das Anticalin C1B12 behielt seine Bindungsaktivität gegenüber der unglykosylierten und partiell glykosylierten mCD98hc-Doppelmutante weitgehend bei, wobei die Affinität nur etwa um den Faktor 3 abnahm. Während diese beiden Mutationen die N-Glykosylierung auch *in vivo* an Asn¹⁶⁶ und Asn²⁵⁹ verhindern, beeinflusste das Fehlen beider Oligosaccharide weder die Proteinfaltung noch die Stabilität von mCD98hcED negativ, was sich anhand hoher Proteinausbeuten und stabilem Monomerverhalten der unglykosylierten und partiell glykosylierten Mutante mCD98hcEDg(N³⁸⁵D/T⁴⁰¹A) zeigte. Auch wenn die Glykosylierung von CD98hc für die Wechselwirkung mit dem Lektin Galectin-3 von Bedeutung ist (Dalton *et al.*, 2007), sollte die Interaktion durch die zwei verbliebenen Glykosylierungsstellen gewährleistet sein. Zudem beeinflussen die konservativen Aminosäuresubstitutionen im membran-distalen Anteil der TIM-Barrel-Domäne höchstwahrscheinlich nicht die Wechselwirkung mit den CD98lc-Proteinen. Nach Generierung dieses vorgeschlagenen Mausmodells eröffnet das in dieser Arbeit entwickelte Anticalin-Paar die Möglichkeit, pharmakokinetische und -dynamische Studien durchzuführen, um die zielgerichtete Adressierung von CD98hc *in vivo* nicht nur in der Onkologie, sondern auch bei Erkrankungen des Zentralnervensystems zu bewerten.

5. Zusammenfassung

Angesichts des weltweiten Anstiegs von Krebserkrankungen steht die Entwicklung biopharmazeutischer Wirkstoffe und Diagnostika sowie die Evaluierung neuer krankheitsrelevanter Zielmoleküle nach wie vor im Mittelpunkt biomedizinischer Forschungen. Die Theranostik beschreibt eine neue Strategie in der Biomedizin, die eine zielgerichtete Therapie mit fortgeschrittenen diagnostischen Verfahren – auch zur Überwachung des Behandlungserfolgs der Patienten – kombiniert, mit dem Ziel der präzisen personalisierten Patientenversorgung. In den letzten Jahren konnten sich Anticaline, durch Protein-Design generierte alternative Bindeproteine basierend auf dem Proteingerüst menschlicher Lipocaline, als neuartige Wirkstoffklasse mit vorteilhaften Eigenschaften gegenüber den Antikörpern etablieren. Diese besitzen aufgrund hoher Flexibilität bezüglich ihrer Bindungseigenschaften (Affinität, Spezifität, Valenz) und molekularer Formatierung großes Potenzial für den Einsatz als Theranostika.

Das Ziel dieser Arbeit war es, auf der Grundlage der Anticalin-Technologie neuartige Bindereagenzien für die schwere Polypeptidkette (engl.: heavy chain, hc) des Cluster of Differentiation 98 (CD98) zu entwickeln. CD98 steht für eine Proteinfamilie heterodimerer Aminosäuretransporter, in denen CD98hc mit einer von insgesamt sechs leichten Polypeptidketten (CD98lc) – als transportierende Einheit – kovalent verbrückt ist. CD98hc stellt eine hochinteressante Zielstruktur für diagnostische und therapeutische Anwendungen in der Biomedizin dar, nicht nur in der Onkologie sondern auch als potenzielle Zielstruktur für die nicht-invasive Adressierung von Wirkstoffen an das Gehirn.

Mit der Methode des Phage Display konnten aus einer naiven Lcn2-Bibliothek drei Anticaline mit hoher Affinität gegenüber der extrazellulären Domäne der humanen CD98hc selektiert werden. Das Anticalin P3D11 erschien aufgrund picomolarer Dissoziationskonstante ($K_D = 150 \text{ pM}$) und langer Komplex-Halbwertszeit ($\tau_{1/2} = 359 \text{ min}$) vielversprechend für die Anwendung im Bereich des molekularen Targetings. Aufgrund ausgeprägter Aggregationstendenz bei Temperaturen $\geq 37 \text{ °C}$ erwies es sich jedoch als notwendig P3D11 bezüglich seiner Faltungs- bzw. Temperaturstabilität zu optimieren. Durch evolutives Protein-Engineering unter Anwendung des *E. coli* Surface Display Selektionsverfahrens wurde die Variante D11vs mit signifikant erhöhter Schmelztemperatur und Stabilität wie auch einem um den Faktor drei erhöhten K_D -Wert erhalten. Die hohe und spezifische Bindungsaktivität gegenüber der nativen humanen CD98hc konnte durch mikroskopische und cytofluorimetrische Interaktionsanalysen mit Tumorzelllinien unter-

schiedlicher Ursprungsorgane verifiziert werden. Im Hinblick auf den zukünftigen Einsatz in der Krebsteragnostik wurde der Einsatz des Anticalin-Leitkandidaten D11vs in einem humanen Xenograft-Tumormodell in Mäusen untersucht. Hierfür wurde das Anticalin durch Anwendung der PASylation®-Technologie mit moderat verlängerter Plasma-Halbwertszeit ausgestattet, mit dem Chelatbildner Deferoxamin konjugiert und anschließend mit dem Radionuklid $^{89}\text{Zr(IV)}$ markiert. Mit diesem neuartigen Protein-Tracer konnten die Xenograft-Tumore in PET/CT-Aufnahmen deutlich und mit guter Abgrenzung zum umliegenden Gewebe visualisiert werden. Biodistributionsanalysen und autoradiographische Aufnahmen offenbarten starke und spezifische Akkumulation ($8,6 \pm 1,1\%$ ID/g), mit homogener Verteilung von D11vs in den Tumoren, sowie ein sehr günstiges Tumor-zu-Blut-Verhältnis der Radioaktivität von 11,8:1. Diese Studien stellen die erste erfolgreiche Nutzung von CD98hc als Zielstruktur für die nicht-invasive biomedizinische PET/CT-Bildgebung dar.

Die für Bindeproteine zugängliche extrazelluläre Domäne des Typ-II Transmembranproteins CD98hc zeigt allerdings starke spezie-spezifische Unterschiede, insbesondere zwischen dem menschlichen und dem murinen Orthologen auf. Aufgrund geringer Aminosäurekonservierung an der Proteinoberfläche und differenziellem Glycosylierungsmuster beider Proteine besitzt D11vs keine Kreuzreaktivität gegenüber CD98hc der Maus. Im Zuge struktureller Studien deutete sich an, dass die Entwicklung eines für beide Spezies geeigneten Bindereagens nur schwer zu realisieren ist. Aus diesem Grund wurde ein Surrogat-Anticalin analog zu dem human-spezifischen D11vs für präklinische Studien in der Maus selektiert. Dieses Anticalin, C1B12, bindet murines CD98hc mit sehr ähnlicher Affinität und Bindungskinetik im Vergleich zu D11vs. Zudem ergab die proteinkristallographische Strukturaufklärung beider Anticalin•CD98hc Komplexe, dass dieselbe exponierte Schleifenregion im membran-distalen Bereich der Zielmoleküle von Mensch und Maus gebunden wird. Aufgrund der extensiven Glycosylierung dieser Schleifenregion im murinen CD98hc, kann das Anticalin C1B12 allerdings nur in einem transgenen Mausmodell mit den Aminosäuresubstitutionen N³⁸⁵D sowie T⁴⁰¹A, womit die beiden sterisch interferierenden Oligosaccharide entfernt sind, für die präklinische Wirkstoffentwicklung genutzt werden.

Mit den in dieser Arbeit entwickelten Anticalinen gegen CD98hc des Menschen und der Maus stehen nun hochspezifische Bindereagenzien als vielversprechende Werkzeuge für präklinische und potenziell auch klinische Anwendungen im Bereich der Krebsteragnostik zur Verfügung.

6. Abkürzungen

AEX	Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
aTc	Anhydrotetracyclin
BAP	Biotin-Akzeptorpeptid
BSD	Bacterial Surface Display
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Buried Surface Area
CD	Circulardichroismus
CDR	Complementarity-Determining Region
CD98hc	Cluster of Differentiation 98 heavy chain
CD98lc	Cluster of Differentiation 98 light chain
m/hCD98hcED	CD98hc extrazelluläre Domäne von Maus/Mensch
CT	Computertomographie
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
Dfo	Deferoxamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI-TOF-MS	Electrospray Ionization – Time of Flight Massenspektrometrie
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
Fab	“Fragment Antigen Binding“ der Immunglobuline
Fc	“Fragment Crystallizable“ der Immunglobuline
FET	O-(2-[¹⁸ F]-Fluoroethyl)-L-Tyrosin
% ID/g	Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IgG ₁	Immunglobulin der Klasse G ₁
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
k _{on}	Assoziationsrate
k _{off}	Dissoziationsrate
K _D	Dissoziationskonstante

Lcn2	Humanes Lipocalin 2
mAk	Monoklonaler Antikörper
NGAL	Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OmpA	Outer Membrane Protein A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PDL	Poly-D-Lysin
RID	Radio-Immundiagnostik
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROI	Region of Interest
SAC	<i>Strep</i> Tactin-Affinitätschromatographie
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Natriumlaurylsulfat
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPR	Surface Plasmon Resonance
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TLC	Thin Layer Chromatography
T _m	Schmelztemperatur
τ _{1/2}	Halbwertszeit des biomolekularen Komplexes
V _H	Variable heavy chain der Immunglobuline
V _L	Variable light chain der Immunglobuline
v/v	Volume per Volume
wt	Wildtyp
w/v	Weight per Volume

7. Literatur

- Abou, D.S., Ku, T. & Smith-Jones, P.M. (2011) In vivo biodistribution and accumulation of ^{89}Zr in mice. *Nucl Med Biol* **38**, 675-681.
- Alizadeh, A.A., Aranda, V., Bardelli, A., Blanpain, C., Bock, C., Borowski, C., Caldas, C., Califano, A., Doherty, M., Elsner, M., Esteller, M., Fitzgerald, R., Korbel, J.O., Lichter, P., Mason, C.E., Navin, N., Pe'er, D., Polyak, K., Roberts, C.W., Siu, L., Snyder, A., Stower, H., Swanton, C., Verhaak, R.G., Zenklusen, J.C., Zuber, J. & Zucman-Rossi, J. (2015) Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med* **21**, 846-853.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L.S. (2004) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **32**, 115-119.
- Bajaj, J., Konuma, T., Lytle, N.K., Kwon, H.Y., Ablack, J.N., Cantor, J.M., Rizzieri, D., Chuah, C., Oehler, V.G., Broome, E.H., Ball, E.D., van der Horst, E.H., Ginsberg, M.H. & Reya, T. (2016) CD98-mediated adhesive signaling enables the establishment and propagation of acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell* **30**, 792-805.
- Barinka, C., Ptacek, J., Richter, A., Novakova, Z., Morath, V. & Skerra, A. (2016) Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel* **29**, 105-115.
- Barkovskiy, M., Ilyukhina, E., Dauner, M., Eichinger, A. & Skerra, A. (2018) An engineered lipocalin that tightly complexes the plant poison colchicine for use as antidote as well as bioanalytical applications. *Biol Chem* **400**, 351-366.
- Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P.J. (1999) A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* **8**, 921-929.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-242.
- Binder, U., Matschiner, G., Theobald, I. & Skerra, A. (2010) High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the Escherichia coli cell surface. *J Mol Biol* **400**, 783-802.
- Binder, U. & Skerra, A. (2017) PASylation[®]: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **31**, 10-17.
- Bixby, D., Wieduwilt, M.J., Akard, L.P., Khoury, H.J., Becker, P.S., Van Der Horst, E.H., Ho, W. & Cortes, J.E. (2015) A phase I study of IGN523, a novel anti-CD98 monoclonal antibody in patients with relapsed or refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood* **126**, 3809.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. & Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424.
- Brinkmann, U. & Kontermann, R.E. (2017) The making of bispecific antibodies. *MAbs* **9**, 182-212.
- Broer, A., Wagner, C.A., Lang, F. & Broer, S. (2000) The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J* **349**, 787-795.
- 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. *Bio Techniques* **5**, 376-379.

- Cai, S., Bulus, N., Fonseca-Siesser, P.M., Chen, D., Hanks, S.K., Pozzi, A. & Zent, R. (2005) CD98 modulates integrin $\beta 1$ function in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 118, 889-899.
- 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.
- Chapman, A.P. (2002) PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 531-545.
- Chen, R. & Snyder, M. (2013) Promise of personalized omics to precision medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5, 73-82.
- Chiduza, G.N., Johnson, R.M., Wright, G.S.A., Antonyuk, S.V., Muench, S.P. & Hasnain, S.S. (2019) LAT1 (SLC7A5) and CD98hc (SLC3A2) complex dynamics revealed by single-particle cryo-EM. *Acta Crystallogr D* 75, 660-669.
- Chiu, M.L. & Gilliland, G.L. (2016) Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol* 38, 163-173.
- Clarke, J., Leach, W., Pippig, S., Joshi, A., Wu, B., House, R. & Beyer, J. (2004) Evaluation of a surrogate antibody for preclinical safety testing of an anti-CD11a monoclonal antibody. *Regul Toxicol Pharmacol* 40, 219-226.
- Couch, J.A., Yu, Y.J., Zhang, Y., Tarrant, J.M., Fuji, R.N., Meilandt, W.J., Solanoy, H., Tong, R.K., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Gadkar, K., Prabhu, S., Ordonia, B.A., Nguyen, Q., Lin, Y., Lin, Z., Balazs, M., Scarce-Levie, K., Ernst, J.A., Dennis, M.S. & Watts, R.J. (2013) Addressing safety liabilities of TfR bispecific antibodies that cross the blood-brain barrier. *Sci. Transl. Med.* 5, 1-12.
- Dalton, P., Christian, H., Redman, C., Sargent, I. & Boyd, C. (2007) Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells – implication for placental cell fusion. *FEBS J* 274, 2715-2727.
- de la Ballina, L.R., Cano-Crespo, S., Gonzalez-Munoz, E., Bial, S., Estrach, S., Cailleteau, L., Tissot, F., Daniel, H., Zorzano, A., Ginsberg, M.H., Palacin, M. & Feral, C.C. (2016) Amino acid transport associated to Cluster of Differentiation 98 heavy chain (CD98hc) is at the cross-road of oxidative stress and amino acid availability. *J Biol Chem* 291, 9700-9711.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Palo Alto, CA, Delano Scientific.
- Deuschle, F.C., Schiefner, A. & Skerra, A. (2019) Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins* 87, 693-698.
- Deuschle, F.C., Morath, V., Schiefner, A., Brandt, C., Ballke, S., Reder, S., Steiger, K., Schwaiger, M., Weber, W. & Skerra, A. (2020a) Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications. *Theranostics* 10, 2172-2187.
- Deuschle, F.C., Schiefner, A., Brandt, C. & Skerra, A. (2020b) Design of a surrogate Anticalin[®] protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice. *Protein Sci* 8, 1774–1783.
- Deuschle, F.-C., Ilyukhina, E. & Skerra, A. (2020c) Anticalin[®] proteins: from bench to bedside. *Expert Opin Biol Ther*, online publiziert; DOI: 10.1080/14712598.2021.1839046
- Digomann, D., Kurth, I., Tyutyunnykova, A., Chen, O., Lock, S., Gorodetska, I., Peitzsch, C., Skvortsova, I., Negro, G., Aschenbrenner, B., Eisenhofer, G., Richter, S., Heiden, S., Pormann, J., Klink, B., Schwager, C., Dowle, A.A., Hein, L., Kunz-Schughart, L.A., Abdollahi, A., Lohaus, F., Krause, M., Baumann, M., Linge, A. & Dubrovskaja, A. (2019) The CD98 heavy chain is a marker and regulator of head and neck squamous cell carcinoma radiosensitivity. *Clin Cancer Res* 25, 3152-3163.

- DuBridg, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.
- Dugger, S.A., Platt, A. & Goldstein, D.B. (2018) Drug development in the era of precision medicine. *Nat Rev Drug Discov* 17, 183-196.
- Dy, G.K. & Adjei, A.A. (2008) Systemic cancer therapy: evolution over the last 60 years. *Cancer* 113, 1857-1887.
- El Ansari, R., Craze, M.L., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C.C., Ellis, I.O., Rakha, E.A. & Green, A.R. (2018) The multifunctional solute carrier 3A2 (SLC3A2) confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes. *Brit J Cancer* 118, 1115-1122.
- Elder, J.H. & Alexander, S. (1982) Endo- β -N-acetylglucosaminidase F: Endoglycosidase from *Flavobacterium meningosepticum* that cleaves both high-mannose and complex glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4540-4544.
- EMA (2007) Human medicine European public assessment report (EPAR): Soliris – Scientific Discussion. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/soliris>.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- Epstein, A.L., Herman, M.M., Kim, H., Dorfman, R.F. & Kaplan, H.S. (1976) Biology of the human malignant lymphomas III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer* 37, 2158-2176.
- Epstein, M.A. & Barr, Y.M. (1965) Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 34, 231-240.
- 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.
- Fenczik, C.A., Zent, R., Dellos, M., Calderwood, D.A., Satriano, J., Kelly, C. & Ginsberg, M.H. (2001) Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem* 276, 8746-8752.
- Feral, C.C., Zijlstra, A., Tkachenko, E., Prager, G., Gardel, M.L., Slepak, M. & Ginsberg, M.H. (2007) CD98hc (SLC3A2) participates in fibronectin matrix assembly by mediating integrin signaling. *J Cell Biol* 178, 701-711.
- Ferrige, A.G., Seddon, M.J., Jarvis, S., Skilling, J. & Aplin, R. (1991) Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 5, 374-377.
- 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.
- Fogh, J., Fogh, J.M. & Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
- Fort, J., de la Ballina, L.R., Burghardt, H.E., Ferrer-Costa, C., Turnay, J., Ferrer-Orta, C., Usón, I., Zorzano, A., Fernández-Recio, J., Orozco, M., Lizarbe, M.A., Fita, I. & Palacín, M. (2007) The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem* 282, 31444-31452.
- Foster, B., Bagci, U., Mansoor, A., Xu, Z. & Mollura, D.J. (2014) A review on segmentation of positron emission tomography images. *Comput Biol Med* 50, 76-96.
- Fotiadis, D., Kanai, Y. & Palacin, M. (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* 34, 139-158.

- Fraker, P.J. & Speck, J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* **80**, 849-857.
- Francke, U., Foellmer, B.E. & Haynes, B.F. (1983) Chromosome mapping of human cell surface molecules: monoclonal anti-human lymphocyte antibodies 4F2, A3D8, and A1G3 define antigens controlled by different regions of chromosome 11. *Somatic Cell Genet* **9**, 333-344.
- Friedrich, L. (2018) Generierung und Engineering von Bindungsproteinen gegen Hsp70 als Werkzeuge für Visualisierung und Therapie von Tumoren. *Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- Friedrich, L., Kornberger, P., Mendl, C.T., Multhoff, G., Schwaiger, M. & Skerra, A. (2018) Selection of an Anticalin[®] against the membrane form of Hsp70 via bacterial surface display and its theranostic application in tumour models. *Biol Chem* **399**, 235-252.
- Fuchs, R., Stracke, A., Holzmann, V., Luschin-Ebengreuth, G., Meier-Allard, N., Ebner, N., Lassacher, T.M., Absenger-Novak, M., Frohlich, E., Schittmayer, M., Cano Crespo, S., Palacin, M., Rinner, B. & Birner-Gruenberger, R. (2018) Prazosin induced lysosomal tubulation interferes with cytokinesis and the endocytic sorting of the tumour antigen CD98hc. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1865**, 1211-1229.
- Fukasawa, Y., Segawa, H., Kim, J.Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Matsuo, H., Cha, S.H., Endou, H. & Kanai, Y. (2000) Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem* **275**, 9690-9698.
- Furuya, M., Horiguchi, J., Nakajima, H., Kanai, Y. & Oyama, T. (2012) Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci* **103**, 382-389.
- 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.
- Gebauer, M. (2013) Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin. *Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- 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. (2012) Anticalins: small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol* **503**, 157-188.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2019) Engineering of binding functions into proteins. *Curr Opin Biotechnol* **60**, 230-241.
- Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. *University of Cambridge, UK*.
- Gilbreth, R.N. & Koide, S. (2012) Structural insights for engineering binding proteins based on non-antibody scaffolds. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 413-420.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**, 319-326.
- Haining, Z., Kawai, N., Miyake, K., Okada, M., Okubo, S., Zhang, X., Fei, Z. & Tamiya, T. (2012) Relation of LAT1/4F2hc expression with pathological grade, proliferation and angiogenesis in human gliomas. *BMC Clin Pathol* **12**, 4.

- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hansel, T.T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J.A. & George, A.J. (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 9, 325-338.
- Hayes, G.M., Chinn, L., Cantor, J.M., Cairns, B., Levashova, Z., Tran, H., Velilla, T., Duey, D., Lippincott, J., Zachwieja, J., Ginsberg, M.H. & E, H.v.d.H. (2015) Antitumor activity of an anti-CD98 antibody. *Int J Cancer* 137, 710-720.
- Heiss, P., Mayer, S., Herz, M., Wester, H.J., Schwaiger, M. & Senekowitsch-Schmidtke, R. (1999) Investigation of transport mechanism and uptake kinetics of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-tyrosine in vitro and in vivo. *J Nucl Med* 40, 1367-1373.
- Higel, F., Seidl, A., Sorgel, F. & Friess, W. (2016) N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *Eur J Pharm Biopharm* 100, 94-100.
- Histed, S.N., Lindenberg, M.L., Mena, E., Turkbey, B., Choyke, P.L. & Kurdziel, K.A. (2012) Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl Med Commun* 33, 349-361.
- Hohlbaum, A.M., Gille, H., Trentmann, S., Kolodziejczyk, M., Rattenstetter, B., Laarakkers, C.M., Katzmann, G., Christian, H.J., Andersen, N., Allersdorfer, A., Olwill, S.A., Meibohm, B., Audoly, L.P., Swinkels, D.W. & van Swelm, R.P.L. (2018) Sustained plasma hepcidin suppression and iron elevation by Anticalin-derived hepcidin antagonist in cynomolgus monkey. *Br J Pharmacol* 175, 1054-1065.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- 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.
- Hutterer, M., Nowosielski, M., Putzer, D., Jansen, N.L., Seiz, M., Schocke, M., McCoy, M., Gobel, G., la Fougere, C., Virgolini, I.J., Trinka, E., Jacobs, A.H. & Stockhammer, G. (2013) [18F]-fluoro-ethyl-L-tyrosine PET: A valuable diagnostic tool in neuro-oncology, but not all that glitters is glioma. *Neuro Oncol* 15, 341-351.
- Ikotun, O.F., Marquez, B.V., Huang, C., Masuko, K., Daiji, M., Masuko, T., McConathy, J. & Lapi, S.E. (2013) Imaging the L-type amino acid transporter-1 (LAT1) with Zr-89 immunoPET. *PLOS One* 8, e77476-e77476.
- Ilyukhina, E., Deuschle, F.C. & Skerra, A. (2020) Anticalin[®]-Proteine als neue Wirkstoffklasse für therapeutische Anwendungen. *Pharm Ind* 82, 283-289.
- Irani, V., Guy, A.J., Andrew, D., Beeson, J.G., Ramsland, P.A. & Richards, J.S. (2015) Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol* 67, 171-182.
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J Appl Crystallogr* 24, 409-411.
- Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P. & Bahadur, R.P. (2007) Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 1-8.
- Jose, J., Kramer, J., Klausner, T., Pohlner, J. & Meyer, T.F. (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178, 107-110.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F. & Jones, L.W. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16-23.

- Kaira, K., Ohde, Y., Endo, M., Nakagawa, K., Okumura, T., Takahashi, T., Murakami, H., Tsuya, A., Nakamura, Y., Naito, T., Kondo, H., Nakajima, T. & Yamamoto, N. (2011) Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep* 26, 931-937.
- Kaira, K., Oriuchi, N., Imai, H., Shimizu, K., Yanagitani, N., Sunaga, N., Hisada, T., Kawashima, O., Kamide, Y., Ishizuka, T., Kanai, Y., Nakajima, T. & Mori, M. (2009) CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol* 16, 3473-3481.
- Kalkhof, S. & Sinz, A. (2008) Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem* 392, 305-312.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. & Endou, H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273, 23629-23632.
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B. & Trout, B.L. (2011) Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol J* 6, 38-44.
- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J.S. & Mumford, D. (1975) An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology* 5, 319-334.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Konning, D. & Kolmar, H. (2018) Beyond antibody engineering: directed evolution of alternative binding scaffolds and enzymes using yeast surface display. *Microb Cell Fact* 17, 32.
- Koppula, P., Zhang, Y., Zhuang, L. & Gan, B. (2018) Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun* 38, 12.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.
- Langbein, T., Weber, W.A. & Eiber, M. (2019) Future of Theranostics: An Outlook on Precision Oncology in Nuclear Medicine. *J Nucl Med* 60, 13-19.
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J. & Laustsen, A.H. (2018) Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* 10, 236-251.
- Lippincott, J., Van der Horst, E., Htun, E.T., Zachwieja, J. & Tran, H. (2013) Anti-CD98 antibodies and methods of use thereof. *WO 2013/078377 A1*.
- Liu, L. (2018) Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein Cell* 9, 15-32.
- MacGregor, E.A. (1988) α -amylase structure and activity. *J Protein Chem* 7, 399-415.
- Matthews, B.W., Nicholson, H. & Becktel, 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.
- Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2015a) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MAbs* 7, 96-109.
- Mendler, C.T., Gehring, T., Wester, H.J., Schwaiger, M. & Skerra, A. (2015b) (89)Zr-labeled versus (124)I-labeled α HER2 Fab with optimized plasma half-life for high-contrast tumor imaging in vivo. *J Nucl Med* 56, 1112-1118.

- Moorkens, E., Meuwissen, N., Huys, I., Declerck, P., Vulto, A.G. & Simoons, S. (2017) The market of biopharmaceutical medicines: a snapshot of a diverse industrial landscape. *Front Pharmacol* **8**, 314.
- Moutinho, A.F., Trancoso, F.F. & Dutheil, J.Y. (2019) The impact of protein architecture on adaptive evolution. *Mol Biol Evol* **36**, 2013-2028.
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K. & Minato, N. (1999) 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* **274**, 3009-3016.
- Nakamura, T., Kawai, Y., Kitamoto, N., Osawa, T. & Kato, Y. (2009) Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine. *Chem Res Toxicol* **22**, 536-542.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V.E., MacKeigan, J.P., Porter, J.A., Wang, Y.K., Cantley, L.C., Finan, P.M. & Murphy, L.O. (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521-534.
- Papetti, M. & Herman, I.M. (2001) Controlling tumor-derived and vascular endothelial cell growth: role of the 4F2 cell surface antigen. *Am J Pathol* **159**, 165-178.
- Papin-Michault, C., Bonnetaud, C., Dufour, M., Almairac, F., Coutts, M., Patouraux, S., Virolle, T., Darcourt, J. & Burel-Vandenbos, F. (2016) Study of LAT1 expression in brain metastases: towards a better understanding of the results of positron emission tomography using amino acid tracers. *PLOS One* **11**, e0157139.
- Pardridge, W.M. (2002) Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 131-139.
- Paterson, J. & Webster, C.I. (2016) Exploiting transferrin receptor for delivering drugs across the blood-brain barrier. *Drug Discov. Today Technol.* **20**, 49-52.
- Pineda, M., Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., Lopez, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A. & Palacin, M. (1999) Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* **274**, 19738-19744.
- Prager, G.W., Feral, C.C., Kim, C., Han, J. & Ginsberg, M.H. (2007) CD98hc (SLC3A2) interaction with the integrin β subunit cytoplasmic domain mediates adhesive signaling. *J Biol Chem* **282**, 24477-24484.
- Prasetyanti, P.R. & Medema, J.P. (2017) Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer* **16**, 41.
- Rauth, S., Hinz, D., Borger, M., Uhrig, M., Mayhaus, M., Riemenschneider, M. & Skerra, A. (2016) High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer β -amyloid peptide. *Biochem J* **473**, 1563-1578.
- Ravasco, J., Faustino, H., Trindade, A. & Gois, P.M.P. (2019) Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chemistry* **25**, 43-59.
- Reynolds, B., Roversi, P., Laynes, R., Kazi, S., Boyd, C.A. & Goberdhan, D.C. (2009) Drosophila expresses a CD98 transporter with an evolutionarily conserved structure and amino acid-transport properties. *Biochem J* **420**, 363-372.
- 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.
- Rietbergen, M.M., Martens-de Kemp, S.R., Bloemena, E., Witte, B.I., Brink, A., Baatenburg de Jong, R.J., Leemans, C.R., Braakhuis, B.J. & Brakenhoff, R.H. (2014) Cancer stem cell

- enrichment marker CD98: A prognostic factor for survival in patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer* 50, 765-773.
- Rothe, C. & Skerra, A. (2018) Anticalin® proteins as therapeutic agents in human diseases. *BioDrugs* 32, 233-243.
- Salter, D.M., Krajewski, A.S., Sheehan, T., Turner, G., Cuthbert, R.J. & McLean, A. (1989) Prognostic significance of activation and differentiation antigen expression in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 159, 211-220.
- Sato, H., Tamba, M., Ishii, T. & Bannai, S. (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274, 11455-11458.
- Sato, Y., Heimeier, R.A., Li, C., Deng, C. & Shi, Y.-B. (2011) Extracellular domain of CD98hc is required for early murine development. *Cell Biosci* 1, 7-7.
- Schiefner, A., Gebauer, M., Richter, A. & Skerra, A. (2018) Anticalins reveal high plasticity in the mode of complex formation with a common tumor antigen. *Structure* 26, 649-656.
- Schiefner, A. & Skerra, A. (2015) The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc Chem Res* 48, 976-985.
- Schirmacher, V. (2019) From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *Int J Oncol* 54, 407-419.
- 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.
- Schlehuber, S. (2001) Evolutes Protein-Design eines „Anticalins“ mit Bindungsspezifität für Digoxigenin. *Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München*.
- 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., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, 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.
- 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. (2000a) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J Mol Recognit* 13, 167-187.
- Skerra, A. (2000b) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482, 337-350.
- Skerra, A. (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7, 683-693.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Nat Biotechnol* 9, 273-278.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Sojo, V., Dessimoz, C., Pomiankowski, A. & Lane, N. (2016) Membrane proteins are dramatically less conserved than water-soluble proteins across the tree of life. *Mol Biol Evol* 33, 2874-2884.

- Spear, B.B., Heath-Chiozzi, M. & Huff, J. (2001) Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med* 7, 201-204.
- St-Amour, I., Pare, I., Alata, W., Coulombe, K., Ringuette-Goulet, C., Drouin-Ouellet, J., Vandal, M., Soulet, D., Bazin, R. & Calon, F. (2013) Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1983-1992.
- Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderli, H., Mickey, G.H. & Paulson, D.F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274-281.
- Strauch, K.L. & Beckwith, J. (1988) An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 1576-1580.
- 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.
- Summer, D., Garousi, J., Oroujeni, M., Mitran, B., Andersson, K.G., Vorobyeva, A., Lofblom, J., Orlova, A., Tolmachev, V. & Decristoforo, C. (2018a) Cyclic versus noncyclic chelating scaffold for ⁸⁹Zr-labeled ZEGFR:2377 Affibody bioconjugates targeting epidermal growth factor receptor overexpression. *Mol Pharm* 15, 175-185.
- Summer, D., Rangger, C., Klingler, M., Laverman, P., Franssen, G.M., Lechner, B.E., Orasch, T., Haas, H., von Guggenberg, E. & Decristoforo, C. (2018b) Exploiting the concept of multivalency with ⁶⁸Ga- and ⁸⁹Zr-labeled fusarinine C-minigastrin bioconjugates for targeting CCK2R expression. *Contrast Media Mol Imaging*, 3171794.
- Sun, A., Liu, X. & Tang, G. (2018) Carbon-11 and Fluorine-18 labeled amino acid tracers for Positron Emission Tomography imaging of tumors. *Front Chem* 5, 124-124.
- Swartz, J.R. (2001) Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 12, 195-201.
- Teixeira, S., Di Grandi, S. & Kuhn, L.C. (1987) Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH2 terminus. *J Biol Chem* 262, 9574-9580.
- Terwisscha van Scheltinga, A.G., Lub-de Hooge, M.N., Hinner, M.J., Verheijen, R.B., Allersdorfer, A., Hulsmeyer, M., Nagengast, W.B., Schroder, C.P., Kosterink, J.G., de Vries, E.G., Audoly, L. & Olwill, S.A. (2014) In vivo visualization of MET tumor expression and anticalin biodistribution with the MET-specific anticalin ⁸⁹Zr-PRS-110 PET tracer. *J Nucl Med* 55, 665-671.
- Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y.B., Zorzano, A. & Palacin, M. (1998) Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem* 273, 32437-32445.
- Traxlmayr, M.W. & Shusta, E.V. (2017) Directed evolution of protein thermal stability using yeast surface display. *Methods Mol Biol* 1575, 45-65.
- Treacy, G. (2000) Using an analogous monoclonal antibody to evaluate the reproductive and chronic toxicity potential for a humanized anti-TNF α monoclonal antibody. *Hum Exp Toxicol* 19, 226-228.
- Turnay, J., Fort, J., Olmo, N., Santiago-Gomez, A., Palacin, M. & Lizarbe, M.A. (2011) Structural characterization and unfolding mechanism of human 4F2hc ectodomain. *Biochim Biophys Acta* 1814, 536-544.
- Turner, J.H. (2018) Recent advances in theranostics and challenges for the future. *Br J Radiol* 91, 20170893.

- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Ponten, F. (2015) Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419.
- Verma, M. (2012) Personalized medicine and cancer. *J Pers Med* 2, 1-14.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispen, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520-536.
- Vosjan, M.J., Perk, L.R., Visser, G.W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E. & van Dongen, G.A. (2010) Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 5, 739-743.
- Wahl, R.L., Herman, J.M. & Ford, E. (2011) The promise and pitfalls of positron emission tomography and single-photon emission computed tomography molecular imaging-guided radiation therapy. *Semin Radiat Oncol* 21, 88-100.
- Wakefield, I., Stephens, S., Foulkes, R., Nesbitt, A. & Bourne, T. (2011) The use of surrogate antibodies to evaluate the developmental and reproductive toxicity potential of an anti-TNF α PEGylated Fab' monoclonal antibody. *Toxicol Sci* 122, 170-176.
- Walsh, G. (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36, 1136-1145.
- Wang, Q., Tiffen, J., Bailey, C.G., Lehman, M.L., Ritchie, W., Fazli, L., Metierre, C., Feng, Y.J., Li, E., Gleave, M., Buchanan, G., Nelson, C.C., Rasko, J.E. & Holst, J. (2013) Targeting amino acid transport in metastatic castration-resistant prostate cancer: Effects on cell cycle, cell growth and tumor development. *J Natl Cancer Inst* 105, 1463-1473.
- Weber, F., Bohrmann, B., Niewoehner, J., Fischer, J.A.A., Rueger, P., Tiefenthaler, G., Moelleken, J., Bujotzek, A., Brady, K., Singer, T., Ebeling, M., Iglesias, A. & Freskgård, P.-O. (2018) Brain shuttle antibody for Alzheimer's disease with attenuated peripheral effector function due to an inverted binding mode. *Cell Rep* 22, 149-162.
- Weiner, G.J. (2015) Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 15, 361-370.
- Wipf, D., Ludewig, U., Tegeder, M., Rentsch, D., Koch, W. & Frommer, W.B. (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends Biochem Sci* 27, 139-147.
- Wollscheid, B., Bausch-Fluck, D., Henderson, C., O'Brien, R., Bibel, M., Schiess, R., Aebersold, R. & Watts, J.D. (2009) Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol* 27, 378-386.
- Yan, R., Zhao, X., Lei, J. & Zhou, Q. (2019) Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature* 568, 127-130.
- Yang, H., Zou, W., Li, Y., Chen, B. & Xin, X. (2007) Bridge linkage role played by CD98hc of anti-tumor drug resistance and cancer metastasis on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 6, 942-947.
- 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.
- Ye, Y., Wang, M., Wang, B., Yang, X.-M. & Chen, Z.-N. (2017) CD98, a potential diagnostic cancer-related biomarker, and its prognostic impact in colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* 10, 5418-5429.

- Yu, L., Wu, X., Cheng, Z., Lee, C.V., LeCouter, J., Campa, C., Fuh, G., Lowman, H. & Ferrara, N. (2008) Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 522-527.
- Zhan, C. & Lu, W. (2012) The blood-brain/tumor barriers: Challenges and chances for malignant gliomas targeted drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 2380-2387.
- Zuchero, Y.J., Chen, X., Bien-Ly, N., Bumbaca, D., Tong, R.K., Gao, X., Zhang, S., Hoyte, K., Luk, W., Huntley, M.A., Phu, L., Tan, C., Kallop, D., Weimer, R.M., Lu, Y., Kirkpatrick, D.S., Ernst, J.A., Chih, B., Dennis, M.S. & Watts, R.J. (2016) Discovery of novel blood-brain barrier targets to enhance brain uptake of therapeutic antibodies. *Neuron* 89, 70-82.

8. Anhang I – Nachdruck der eingebundenen Veröffentlichungen

Veröffentlichung 1

Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc

Autoren: Friedrich-Christian Deuschle¹, André Schiefner¹ und Arne Skerra

Fachzeitschrift: Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.
87, 693-698

Verlag: John Wiley and Sons

Publikationsdatum: 08.04.2019 (online Version)

DOI: 10.1002/prot.25686

Der vollständige Originalartikel wurde mit der Genehmigung des Verlags John Wiley and Sons (RightsLink[®] Lizenzierungsnummer: 4658170382650; Lizenz erteilt am 29.08.2019) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.

¹Diese Autoren haben im gleichen Maße zu dieser Arbeit beigetragen

Received: 5 December 2018 | Revised: 2 April 2019 | Accepted: 4 April 2019

DOI: 10.1002/prot.25686

STRUCTURE NOTE

Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc

Friedrich-Christian Deuschle | André Schiefner | Arne Skerra

Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Freising, Germany

CorrespondenceAndré Schiefner and Arne Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany.
Emails: schiefner@wzw.tum.de (A. Sc.) and skerra@tum.de (A. Sk.)**Abstract**

The CD98 heavy chain (CD98hc) constitutes both a promising cell surface target for the treatment of cancers and a transcytosis receptor potentially useful for the brain delivery of therapeutics. However, pharmacokinetic studies and safety assessment of cognate antibodies or nonimmunoglobulin binding proteins in rodents is hampered by cross-species variability of both amino acid sequence and glycosylation pattern. Here, we report the crystal structure of the murine CD98hc extracellular domain and a comprehensive comparison with its human ortholog, revealing only one conserved surface patch that is neither shielded by glycosylation nor by the cell membrane with an accessible surface area typical for an antibody epitope. Our results imply the necessity of a surrogate approach for CD98hc-specific binding proteins with predictive power for clinical investigations.

KEYWORDS

blood-brain barrier, ectodomain, protein homology, species difference, tumor target

1 | INTRODUCTION

The heavy chain of the cluster of differentiation 98 (CD98hc, also known as 4F2hc or FRP-1) represents a multifunctional, N-glycosylated type-II transmembrane protein, which is disulfide-linked to one of six multipass CD98 light chains (CD98lc) to form heterodimeric amino acid transporters.^{1,2} Apart from its regulatory role in the cell surface presentation of CD98lc polypeptides (eg, LAT-1),³ which effect transport of essential amino acids, CD98hc participates in cellular signaling through interaction with integrin β_1 - and β_3 -subunits,^{4,5} thereby promoting cellular spreading, migration, survival and growth.

In line with these biological functions, overexpression of CD98hc has been observed in various solid and hematological malignancies, such as non-small cell lung cancer (NSCLC),⁶ breast cancer,⁷ colorectal cancer⁸ and acute myeloid leukemia (AML).⁹ In general, the overexpression of CD98 is associated with poor prognosis for cancer patients,^{10,11} thus rendering it a promising tumor target for diagnosis and therapy. Indeed, treatment of patient-derived AML cells and of established human lymphoma cell lines with a clinical stage humanized

anti-CD98hc monoclonal antibody (mAb IGN523) was shown to block cancer growth in xenograft studies.¹²

Beyond implications for cancer therapy, recent studies identified CD98hc as a novel transcytosis receptor at the blood-brain barrier (BBB), which appears suitable for the noninvasive drug delivery to the brain via the molecular Trojan horse strategy.^{13,14} In this approach, the transport of a systemically administered therapeutic agent across the BBB into the parenchyma is enabled by fusion with a specific binding protein for the transcytosis receptor. In fact, when targeting murine CD98hc with an antibody *in vivo*, brain delivery of an anti-BACE1 bispecific mAb was strongly increased in comparison to an IgG control antibody.¹⁴

Thus, CD98hc constitutes a very attractive biomedical target for the development of specific binding proteins such as antibodies or non-immunoglobulin (non-Ig) binding proteins like Anticalins¹⁵ for various theranostic applications. However, to allow a comprehensive preclinical assessment of potential biopharmaceuticals with predictive power for clinical development, including pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in rodents, corresponding binding proteins either have to show significant species cross-reactivity or surrogate molecules need to be

Friedrich-Christian Deuschle and André Schiefner contributed equally to this work.

generated.¹⁶ In particular, for biomedical targets with low sequence conservation among species and also differential glycosylation patterns, generation of surrogate pairs is often indispensable and has been reported for several clinically approved antibodies (eg, infliximab, efalizumab, eculizumab or certulizumab pegol; see Table S1).

Of note, the extracellular domains of murine and human CD98hc (mCD98hc-ED and hCD98hc-ED, respectively) share only a relatively low sequence identity of 71% combined with an inconsistent glycosylation pattern. Therefore, while the structure of hCD98hc-ED has been described recently,¹⁷ structural information for the mCD98hc-ED appears of utmost interest for the design of biological agents suitable for the preclinical assessment of this receptor. Here, we report the crystal structure of the mCD98hc-ED at 2.1 Å resolution and provide a detailed comparison with that of hCD98hc-ED.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Crystallization and X-ray structure determination

Description of the methods used for protein expression and purification are available as Supporting Information. Purified mCD98hc-ED was concentrated to 19.5 mg/mL and subjected to crystallization by vapor diffusion in hanging drops at 20°C. Diffraction quality crystals of plate-like morphology were obtained by mixing 1 µL of mCD98hc-ED with 1 µL of reservoir solution containing 24% (w/v) polyethylene glycol 3350, 100 mM Bis-tris propane/HCl pH 7.0 and 200 mM Na₂SO₄. The crystals were transferred into cryo-protectant consisting of reservoir solution supplemented with 20% (v/v) ethylene glycol and flash frozen in liquid nitrogen.

X-ray diffraction data were collected at the Helmholtz-Zentrum Berlin, BESSY beamline 14.2,¹⁸ and reduced with XDS¹⁹ (Table 1). The crystal structure was solved by molecular replacement with Phaser²¹ using hCD98hc-ED (Protein Data Bank [PDB] entry 2DH2)¹⁷ as search model. Manual rebuilding and refinement were performed with Coot²² and Refmac5,²³ respectively (Table 1). Atomic coordinates and structure factors of mCD98hc-ED have been deposited in the PDB (www.rcsb.org/pdb) under the accession code 6I9Q.

2.2 | Structural analyses

Structural alignments were performed with SALIGN, and macromolecular pocket sizes were determined with CASTp.^{24,25} Searches for structural homologs were accomplished with the DALI structure comparison tool.²⁶ Electrostatic surface potentials were calculated with APBS²⁷ while theoretical *pI* values were obtained from ProtParam.²⁸ Crystal packing analysis was performed with PISA²⁹ and molecular graphics were prepared with PyMOL (Schrödinger, Cambridge, MA). Complex N-glycans were modeled in an exemplary plausible conformation with Sweet-II and combined with the crystal structure coordinates using GlyProt,^{30,31} assuming complex N-glycosylation of CD98hc as previously determined by mass spectrometry for breast cancer cell

TABLE 1 Data collection and refinement statistics^a

Data collection	
Space group	I422
Unit cell parameters	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	97.38, 97.38, 218.98
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Wavelength (Å)	0.9184
Resolution (Å)	35.0-2.10 (2.20-2.10)
Completeness (%)	99.9 (99.9)
Number unique reflections	31 196 (3984)
Multiplicity	26.6 (28.1)
Mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	21.4 (2.8)
<i>R</i> _{meas} (%)	13.3 (148.0)
Wilson B-factor (Å ²)	42.8
Refinement	
Resolution (Å)	34.45-2.10 (2.15-2.10)
Reflections (working)	29 690 (2159)
Reflections (test) ^b	1505 (111)
<i>R</i> _{cryst} (%)	17.5 (26.9)
<i>R</i> _{free} (%)	21.8 (37.2)
Protein molecules per au	1
Number of atoms: protein/solvent ^c	3337/208
B-values of atoms: protein/solvent (Å ²)	40.7/44.3
Ramachandran plot ^d : favored/outliers (%)	96.7/0.5
RMSD bonds (Å)/angles (°)	0.01/1.58

Abbreviation: RMSD, root-mean-square deviation.

^aValues in parentheses refer to the highest resolution shell.

^bTest set corresponds to 5% of all reflections.

^cSolvent refers to waters, ions as well as ordered buffer or cryoprotectant molecules.

^dRamachandran statistics were calculated with MolProbity.²⁰

lines.³² A schematic drawing of the modeled glycan side chains is provided in Figure S2.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Structure of mCD98hc-ED

Crystals of mCD98hc-ED grew in space group I422 with one molecule per asymmetric unit (au) and diffracted X-rays to 2.1 Å resolution (Table 1). All residues of the ectodomain were resolved in the electron density, whereas the N-terminal Strep-tag II was disordered. Like the previously described orthologous hCD98hc-ED,¹⁷ the structure of mCD98hc-ED resembles the fold of the α -amylase/glycoside hydrolase family 13, which comprises a central TIM barrel core domain (residues 108-432) and a C-terminal β -sandwich domain (residues 433-526; Figure 1). Currently, the most similar structure deposited in the PDB is that of the cell-membrane-associated α -amylase SusG (PDB entry 3K8K) from *Bacteroides thetaiotaomicron*, a Gram-negative gut symbiont.³³ SusG comprises 650 residues; of those,

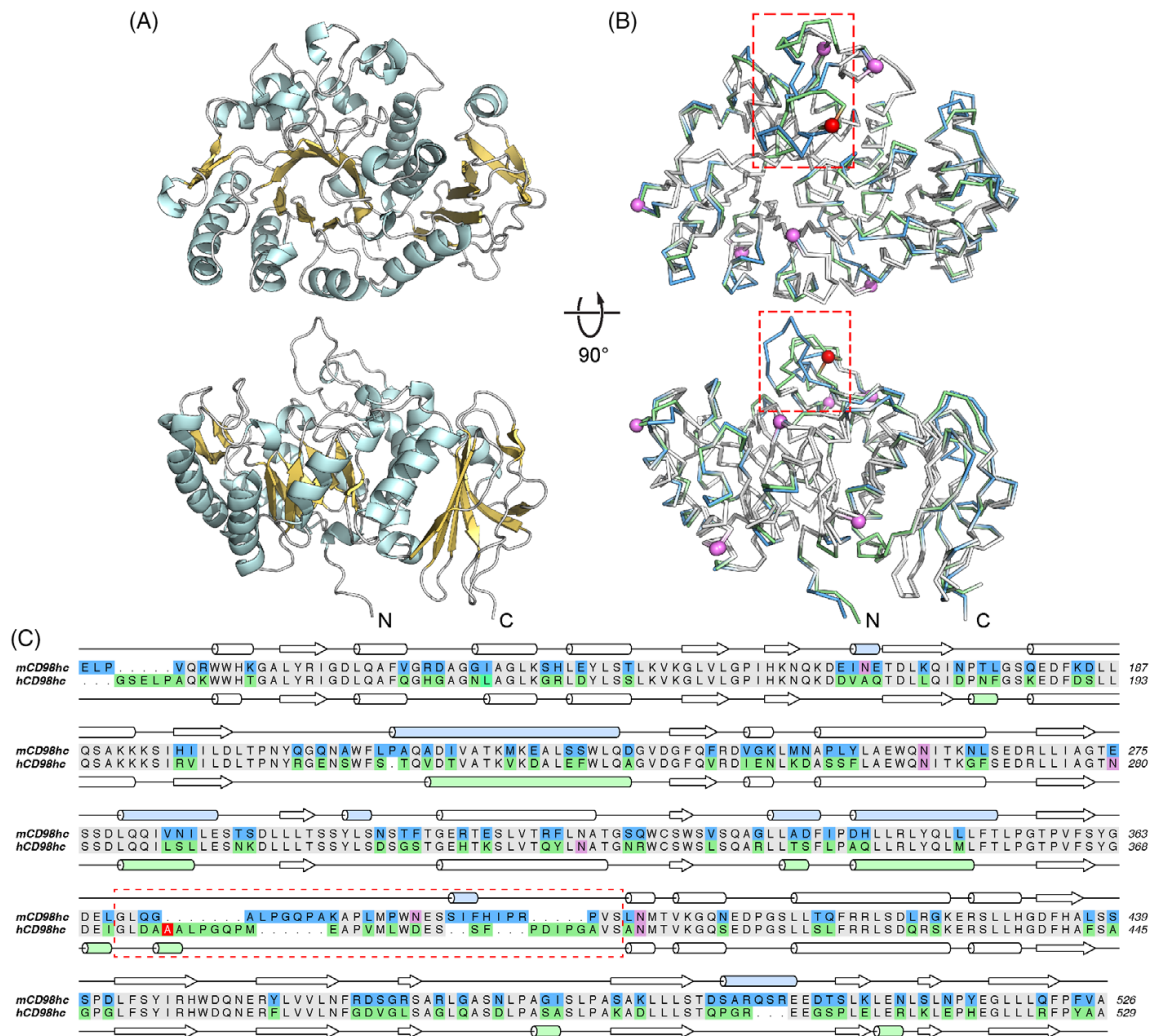


FIGURE 1 Structural comparison of the murine and human CD98hc ectodomains. A, Structural overview of mCD98hc-ED with secondary structure elements colored cyan (helix) and yellow (strand). B, Superposition of mCD98hc-ED and hCD98hc-ED depicted as ribbon diagrams. Common residues that match in position are colored gray, whereas differing residues are highlighted blue and green for mCD98hc-ED and hCD98hc-ED, respectively. The peptide loop that shows the largest structural variation is marked by a red frame. N-glycosylation sites (violet) and the additional (inserted) residue of hCD98hc-ED (red) are depicted by spheres. C, Structure-based sequence alignment. Differences in amino acid sequence and secondary structure (if differing in length by at least two residues) are highlighted blue (mCD98hc-ED) and green (hCD98hc-ED). N-glycosylation sites and the inserted residue in the peptide loop are labeled as in panel B

365 C α positions are equivalent to mCD98hc-ED, with 23% identical residues, resulting in a root-mean-square deviation (RMSD) of 2.7 Å. Notably, similar to m/hCD98hc, the SusG enzyme is anchored via a hydrophobic α -helix in the bacterial outer membrane which indicates that CD98hc may have been acquired through horizontal gene transfer and subsequently adapted as a component of heterodimeric amino-acid transporters. Despite the conserved prominent groove on the C-terminal side of the TIM barrel (Figure 2) which harbors the active site of SusG, CD98hc appears to have lost any sugar binding capability, as was also demonstrated for hCD98hc.¹⁷ Furthermore,

both the nucleophile and the acid/base catalyst (residues D388 and E431 of SusG) are substituted in mCD98hc and hCD98hc by Arg and Gly, respectively, rendering both catalytically inactive.

3.2 | Comparison of mCD98hc-ED with hCD98hc-ED

Although mCD98hc and hCD98hc share 71% sequence identity, the contribution of identical residues to the solvent accessible surface area is only 50%. The structural alignment of both ectodomains revealed

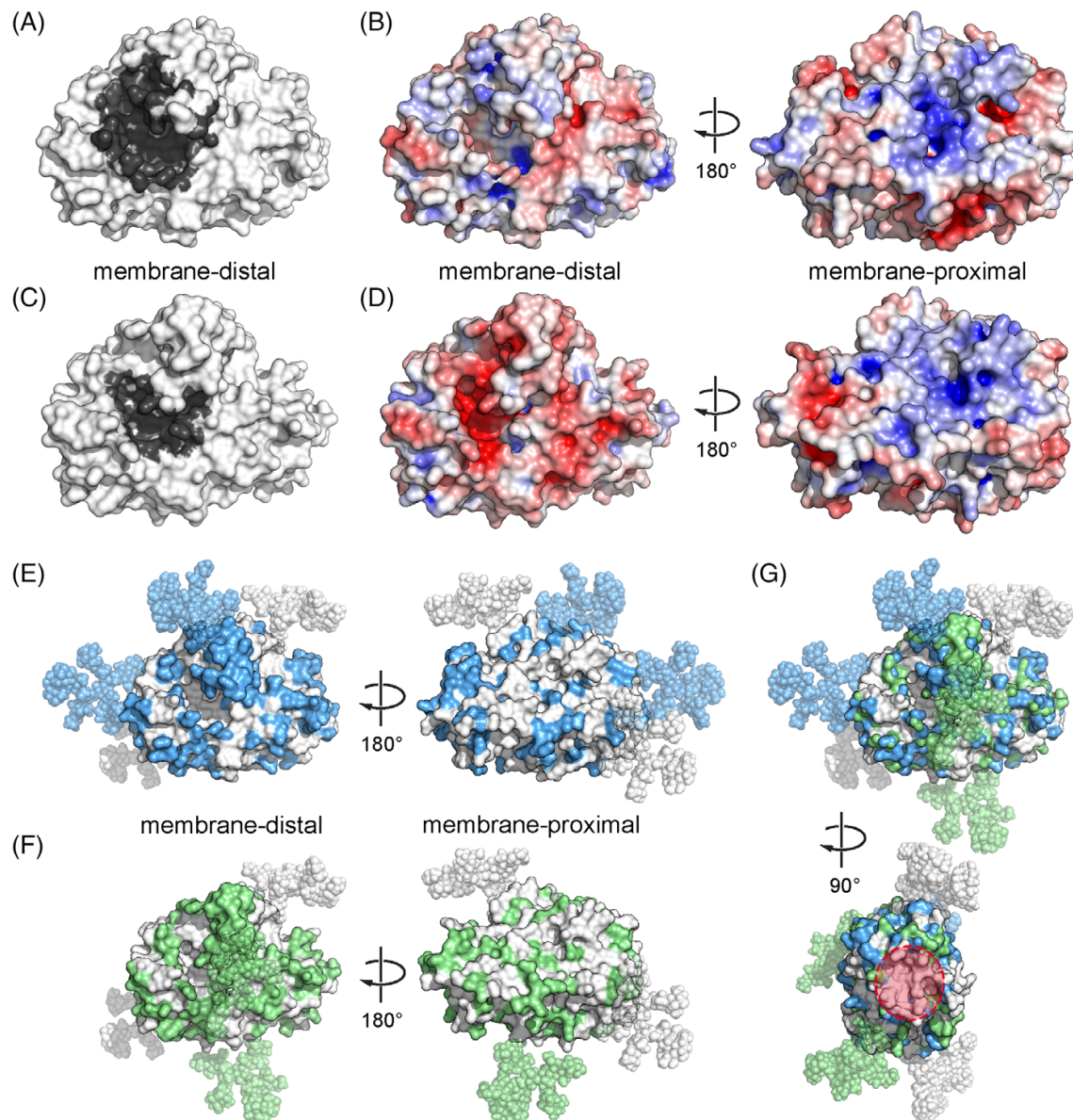


FIGURE 2 Surface properties of the murine and human CD98hc ectodomains: A and B, mCD98hc; C and D, hCD98hc. The large groove at the membrane-distal side (left) is depicted in dark gray. Electrostatic surface potentials of the membrane-distal (middle) and membrane-proximal (right) sides are colored from $-5 k_B T/e$ (red) to $+5 k_B T/e$ (blue). E and F, Accessible surface areas in the presence of complex N-glycosylations. Oligosaccharides were modeled based on glycomic analyses of tumor cell lines.³² All sugar moieties adopt a geometrically plausible conformation, but in fact represent only a snapshot of the conformational ensemble. A scheme of the glycan structure is depicted in Figure S2. Identical surface residues according to the structural alignment shown in Figure 1 as well as conserved N-linked oligosaccharides are shaded gray, whereas differing surface residues and glycosylations are colored blue and green for mCD98hc-ED and hCD98hc-ED, respectively. G, Superposition of all N-glycans known for mCD98hc-ED and hCD98hc-ED in the context of the murine protein, which reveals surface areas accessible for cross-reactive binding proteins. The red circle highlights the only conserved surface patch that has sufficient size for recognition by an antibody

403 matching C α positions within a cut-off distance of 3.5 Å, resulting in an RMSD of 0.96 Å. The largest conformational difference was found for the peptide loop (residues 367–397 in mCD98hc) that follows the

last β -strand of the TIM barrel and largely determines the size of the groove at the membrane-distal surface of CD98hc (Figure 1B,C). In mCD98hc this peptide segment is shorter by one residue, resulting in

31 equivalent C α positions with a local RMSD of 5.2 Å. Due to these differences, shape and size of the groove vary significantly between the murine and human orthologs. Pocket area and volume are considerably larger for mCD98hc, with 1309 Å² and 2776 Å³, respectively, than for hCD98hc, with 886 Å² and 1364 Å³ (Figure 2A,C).

Comparison of the electrostatics revealed a slightly more acidic surface for hCD98hc-ED, which is consistent with its theoretical *pI* value of 5.2 vs 5.9 for mCD98hc-ED (Figure 2). While both protein domains show a similar positive potential at the membrane-proximal side, which could favor attractive electrostatic interactions with the phospholipid bilayer or the CD98hc, the membrane-distal surface has essentially neutral charge for mCD98hc-ED whereas a negative potential prevails for hCD98hc-ED, mainly within and around the prominent groove. On the other hand, the hydrophobic surface pattern of the human and murine CD98hc-ED is comparable. Interestingly, overall the membrane-proximal surface appears to be slightly more hydrophilic than the membrane-distal surface in both cases.

Notably, there is an eminent contribution of N-glycans to the distinct surface properties of the two CD98hc-ED orthologs. According to glycoproteomic analyses,³⁴ both hCD98hc-ED and mCD98hc-ED exhibit four occupied N-glycosylation sites. However, only two of these sites are conserved among the two species, which, in addition to the low surface amino acid conservation, further increases their structural difference. Glycomic analyses of hCD98hc obtained from breast cancer cell lines such as MCF7 revealed heavily fucosylated termini of the N-glycans, including Lewis^x and Lewis^y moieties, which constitute characteristic tumor antigens.³² To illustrate the spatial requirements, we have modeled these complex oligosaccharides on both the mCD98hc-ED and hCD98hc-ED (Figure 2 and Figure S2). In mCD98hc, the glycans are arranged in an equatorial manner such that the entire membrane-distal surface, including the prominent groove, remains accessible (Figure 2E). Interestingly, one of the unique glycans is attached to the peptide segment in mCD98hc-ED that deviates in its conformation from hCD98hc-ED as described above. In contrast, the nonconserved glycans of hCD98hc protrude from the membrane-distal surface of the protein domain. One of the glycans partially covers the prominent groove and, thus, should interfere with the binding of potential ligands, if any (Figure 2F). As expected, no glycans are found on the membrane-proximal surface.

In the isolated state, both mCD98hc-ED and hCD98hc-ED are monomeric proteins as demonstrated by analytical size exclusion chromatography (SEC), nonreducing SDS-PAGE (cf. Figure S1 and Table S2) as well as crystal packing analysis. In contrast, a previous structural report suggested that hCD98hc shows a tendency to form homodimers at high concentration in the eukaryotic cell membrane.¹⁷ However, the residues within the putative dimer interface are only partially conserved between mCD98hc and hCD98hc. In fact, glycosylation at Asn323 of hCD98hc-ED should even interfere with such a dimer contact through steric hindrance. Hence, homodimer formation does not appear to be a general mechanism for m/hCD98hc-mediated physiological processes or pathologies.

3.3 | Implications for the species-specific recognition of CD98hc by antibodies

In the light of the medical relevance of CD98hc, the cross-species reactivity of newly generated binding proteins, such as mAbs or non-Ig scaffolds, is of major interest. The preclinical development of several approved therapeutic antibodies, for example, against TNF α , C5, and C11a, involved a surrogate approach (cf. Table S1). A similar lack in cross-species reactivity has been encountered during the development of antibody fragments that target the transferrin receptor (TfR),³⁵ a well-established transcytosis receptor for drug delivery across the BBB. Considering that TNF α , C5, C11a, and TfR share even greater similarity between mouse and man, with 76%, 78%, 73%, and 76% sequence identity, respectively, a surrogate approach for the development of binding proteins against CD98hc (with a corresponding value of 71%) appears necessary.

The major protruding epitope on the surface of CD98hc is the deviating peptide segment discussed above (Figure 1). However, this epitope is obviously not suitable for cross-reactive reagents due to its different amino acid sequences and the N-glycosylation site exclusive for mCD98hc-ED. This notion is supported by the clinical-stage mAb IGN523, which recognizes a corresponding epitope (residues 374–401, cf. Figure 1) in hCD98hc with picomolar affinity but shows no detectable affinity for mCD98hc.^{9,36}

Due to their considerable size and conformational flexibility, N-glycans can either shield a particular epitope or hamper the association kinetics of a binding reagent. As a consequence of the composite glycosylation pattern there are only very few surface patches accessible both in mCD98hc-ED and hCD98hc-ED. The only conserved spot that is neither shielded by glycosylation nor by the cell membrane is located laterally and has an accessible surface area of about 900 Å² (Figure 2G), which corresponds to a typical size of epitopes recognized by antibodies or non-Ig scaffolds.^{37,38} Still, its interaction with large binding proteins, such as antibodies, might be sterically hindered in the native environment because of its proximity to the membrane.

Consequently, smaller biomolecular formats such as antibody fragments or non-Ig scaffolds might be better suited to target this region of CD98hc. Nevertheless, our structural study indicates that targeting both hCD98hc-ED and mCD98hc-ED by cross-reactive binding proteins with therapeutically relevant affinities will likely pose a challenge.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, for allocation of synchrotron radiation beamtime and travel support, and thank Dr. Christian Feiler for his support at beamline 14.2.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.-C.D., A.Sc., and A.Sk. designed the research. F.-C.D. and A.Sc. performed the experiments and data analysis. F.-C.D., A.Sc., and A.Sk. wrote the paper. All authors have approved the final version of the manuscript. No financial interests have been declared.

ORCID

Friedrich-Christian Deuschle  <https://orcid.org/0000-0001-5603-3109>

André Schiefner  <https://orcid.org/0000-0001-5215-4122>

Arne Skerra  <https://orcid.org/0000-0002-5717-498X>

REFERENCES

- Parmacek MS, Karpinski BA, Gottesdiener KM, Thompson CB, Leiden JM. Structure, expression and regulation of the murine 4F2 heavy chain. *Nucleic Acids Res.* 1989;17:1915-1931.
- Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34:139-158.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem.* 1999;274:3009-3016.
- Cantor JM, Ginsberg MH, Rose DM. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev.* 2008;223:236-251.
- Zent R, Fenczik CA, Calderwood DA, Liu S, Dellos M, Ginsberg MH. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin β cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 2000;275:5059-5064.
- Imai H, Kaira K, Oriuchi N, et al. Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2010;30:4819-4828.
- El Ansari R, Craze ML, Diez-Rodríguez M, et al. The multifunctional solute carrier 3A2 (SLC3A2) confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes. *Br J Cancer.* 2018;118:1115-1122.
- Nguyen HT, Dalmaso G, Torkvist L, et al. CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:1733-1747.
- Hayes GM, Chinn L, Cantor JM, et al. Antitumor activity of an anti-CD98 antibody. *Int J Cancer.* 2015;137:710-720.
- Kaira K, Oriuchi N, Imai H, et al. CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:3473-3481.
- Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* 2012;103:382-389.
- Bajaj J, Konuma T, Lytle NK, et al. CD98-mediated adhesive signaling enables the establishment and propagation of acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2016;30:792-805.
- Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:131-139.
- Zuchero YJ, Chen X, Bien-Ly N, et al. Discovery of novel blood-brain barrier targets to enhance brain uptake of therapeutic antibodies. *Neuron.* 2016;89:70-82.
- Richter A, Eggenstein E, Skerra A. Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.* 2014;588:213-218.
- de Haan L. Preclinical safety considerations for the development of antibody-based therapeutics. In: Tabrizi MA, Bornstein GG, Klakamp SL, eds. *Development of Antibody-Based Therapeutics: Translational Considerations.* New York, NY: Springer; 2012:255-284.
- Fort J, de la Ballina LR, Burghardt HE, et al. The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282:31444-31452.
- Mueller U, Darowski N, Fuchs MR, et al. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J Synchrotron Radiat.* 2012;19:442-449.
- Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66:125-132.
- Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W375-W383.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst.* 2007;40:658-674.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66:486-501.
- Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67:355-367.
- Braberg H, Webb BM, Tjioe E, Pieper U, Sali A, Madhusudhan MS. SALIGN: a web server for alignment of multiple protein sequences and structures. *Bioinformatics.* 2012;28:2072-2073.
- Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W363-W367.
- Holm L, Rosenström P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W545-W549.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10037-10041.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:W597-W603.
- Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol.* 2007;372:774-797.
- Bohne A, Lang E, von der Lieth CW. W3-SWEET: carbohydrate modeling by internet. *J Mol Model.* 1998;4:33-43.
- Lütke T, Bohne-Lang A, Loss A, Goetz T, Frank M, von der Lieth CW. GLYCOSCIENCES.de: an internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology.* 2006;16:71R-81R.
- Powlesland AS, Hitchen PG, Parry S, et al. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology.* 2009;19:899-909.
- Koropatkin NM, Smith TJ. SusG: a unique cell-membrane-associated α -amylase from a prominent human gut symbiont targets complex starch molecules. *Structure.* 2010;18:200-215.
- Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2009;27:378-386.
- Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, et al. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron.* 2014;81:49-60.
- Lippincott J, Van der Horst ETH, Zachwieja J, Tran H. Anti-CD98 antibodies and methods of use thereof. WO 2013/078377 A1.
- Gilbreth RN, Koide S. Structural insights for engineering binding proteins based on non-antibody scaffolds. *Curr Opin Struct Biol.* 2012;22:413-420.
- Janin J, Rodier F, Chakrabarti P, Bahadur RP. Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63:1-8.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Deuschle F-C, Schiefner A, Skerra A. Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins.* 2019;1-6. <https://doi.org/10.1002/prot.25686>

Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc

Friedrich-Christian Deuschle[#], André Schiefner^{#,*} and Arne Skerra^{*}

Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising,
Germany

SUPPORTING INFORMATION

SUPPORTING METHODS

Coding sequences for mCD98hc-ED (UniProt ID P10852-1, residues Glu105–Ala526) and hCD98hc-ED (UniProt ID P08195-2, residues Glu111–Ala529) were synthesized as a double-stranded DNA string with preferred *Escherichia coli* codon usage (GeneArt / Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Germany). To prevent unspecific covalent dimer formation during protein production, the Cys residue responsible for heterodimer formation with CD98lc *in vivo* was omitted in the constructs. The synthetic genes were cloned via *KasI* and *HindIII* restriction sites on the vector pASK-IBA5(+) (IBA, Göttingen, Germany), which also encodes an N-terminal *Strep*-tag II.¹ Recombinant proteins were produced in *E. coli* strain BL21 (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) in 2 L 2xYT medium supplemented with 100 mg/l ampicillin using a 5 L shake flask. Protein expression was induced at a cell density of $OD_{550} \approx 1.0$ by addition 0.5 mg/L anhydrotetracycline for 12 h at 26 °C.² Cells were harvested by centrifugation, resuspended in *Strep*-Tactin affinity chromatography buffer (50 mM NaCl,

1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH8.0) and disrupted with a PandaPLUS 2000 homogenizer (GEA Niro Soavi, Parma, Italy).

The recombinant ectodomains were purified from the bacterial cell extract by *Strep*-Tactin affinity chromatography.³ Appropriate fractions were pooled and dialyzed against 20 mM Tris/HCl pH 8.0. Further purification was achieved by anion-exchange chromatography using a Resource Q column with 6 ml bed volume (GE Healthcare, Munich, Germany) equilibrated with the same buffer and using a linear concentration gradient of 0–300 mM NaCl. Finally, preparative size-exclusion chromatography (SEC) was performed on a 24 ml Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare), using 100 mM NaCl, 0.02 % NaN₃, 10 mM HEPES/NaOH pH 7.5 as running buffer, directly prior to protein crystallization. The purified proteins were concentrated by ultrafiltration using Amicon Ultra centrifugal filter units with 10 kDa cut-off (Merck Millipore, Billerica, MA). Protein concentrations were determined using a NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) with molar absorption coefficients⁴ of 69,900 M⁻¹·cm⁻¹ for *Strep*-mCD98hc-ED and 68,410 M⁻¹·cm⁻¹ for *Strep*-hCD98hc-ED.

Analytical SEC and SDS-PAGE

Analytical SEC was performed using a 24 ml Superdex 75 10/300 GL column and phosphate-buffered saline, PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4), as running buffer at a flow rate of 0.5 ml/min. For apparent molecular weight determination, the column was calibrated with the following standard proteins (Sigma-Aldrich, Munich, Germany): alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). The void volume of the column was determined using Blue Dextran. Based on the elution volumes, the partition coefficients K_{av} were calculated and used to interpolate the apparent molecular masses of the analyzed proteins. SDS-PAGE was performed using a high molarity Tris buffer system⁵ followed by Coomassie brilliant blue staining with or without 2-mercaptoethanol.

Structure of the murine CD98hc ectodomain

p. 3

ESI mass spectrometry

Mass spectra of purified m/hCD98hc-ED were measured on a maXis mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Mass spectra were recorded in the positive ion mode and deconvoluted with the Bruker Compass Data Analysis Software using the MaxEnt algorithm⁶ (**Table S2**). To measure the intact protein mass (under denaturing conditions), the purified proteins were dialyzed against 10 mM ammonium acetate pH 6.6 followed by the addition of 50 % (v/v) methanol and 0.1 % (v/v) acetic acid. The protein samples were applied to the mass spectrometer via a syringe pump operated at 180 μ L/h. The following conditions for the ion-transfer were used: 3400 V capillary voltage, 500 V endplate offset, 4 L/min dry gas at 200 °C temperature, 0.3 bar nebulizer pressure and 10 eV collision energy.

SUPPORTING REFERENCES

1. Voss S, Skerra A. 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* 1997;10:975-982.
2. Skerra A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 1994;151:131-135.
3. Schmidt TG, Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2007;2:1528-1535.
4. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 1999;112:531-552.
5. Fling SP, Gregerson DS. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 1986;155:83-88.
6. Ferrige AG, Seddon MJ, Jarvis S, Skilling J, Aplin R. Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1991;5:374-377.
7. Treacy G. Using an analogous monoclonal antibody to evaluate the reproductive and chronic toxicity potential for a humanized anti-TNF α monoclonal antibody. *Hum Exp Toxicol* 2000;19:226-228.
8. Wakefield I, Stephens S, Foulkes R, Nesbitt A, Bourne T. The use of surrogate antibodies to evaluate the developmental and reproductive toxicity potential of an anti-TNF α PEGylated Fab' monoclonal antibody. *Toxicol Sci* 2011;122:170-176.
9. EMA. Human medicine European public assessment report (EPAR): Soliris – Scientific Discussion. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/soliris>. 2007.
10. Clarke J, Leach W, Pippig S, Joshi A, Wu B, House R, Beyer J. Evaluation of a surrogate antibody for preclinical safety testing of an anti-CD11a monoclonal antibody. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004;40:219-226.
11. Powlesland AS, Hitchen PG, Parry S, Graham SA, Barrio MM, Elola MT, Mordoh J, Dell A, Drickamer K, Taylor ME. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology* 2009;19:899-909.

SUPPORTING TABLES

Table S1: Approved therapeutic antibodies involving a surrogate approach due to low cross-species sequence identity and inconsistent glycosylation patterns of the antigens (targets)

Therapeutic antibody	Infliximab ⁷ and Certulizumab pegol ⁸		Eculizumab ⁹		Efalizumab ¹⁰	
	TNF α		C5		C11a	
Species	Mouse	Human	Mouse	Human	Mouse	Human
UniProt ID	P06804	P01375	P06684	P01031	P20701	P24063
Residues ^a	G57-L235	G57-L233	Q19-E1680	Q19-C1676	Y24-H1087	Y26-L1090
Identity [%]	76		78		73	
Number of glycosylation sites ^b	2	1	1	3	1	1

^a Residue ranges correspond to the extracellular domain of TNF α , C5 without signal peptide and the C11a extracellular domain without signal peptide, respectively.

^b Experimentally confirmed glycosylation sites according to UniProt (www.uniprot.org).

Table S2: Size determination of *Strep*-mCD98hc-ED and *Strep*-hCD98hc-ED

	Theoretical mass [Da]	Mass (ESI-qTOF) [Da]	Apparent mass (SEC) [kDa]
<i>Strep</i> -mCD98hc-ED	48315.8	48313.9 ($\Delta = 1.9$)	50
<i>Strep</i> -hCD98hc-ED	47437.5	47437.0 ($\Delta = 0.5$)	54

SUPPORTING FIGURES

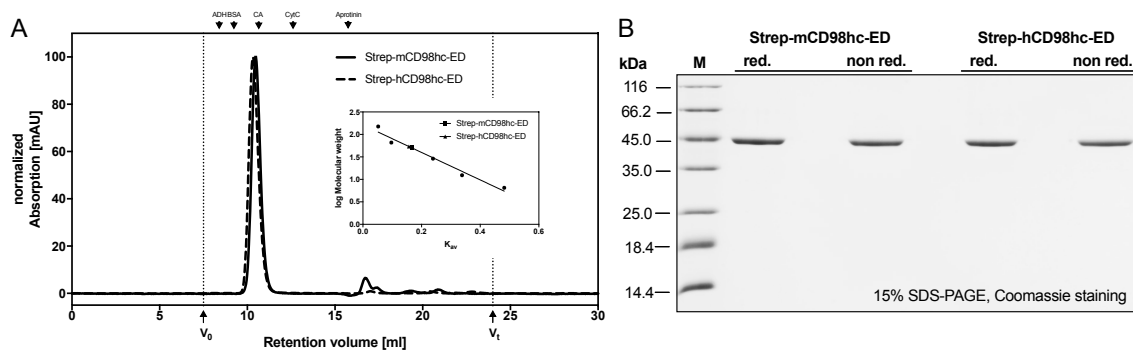


Figure S1: Biochemical characterization of *Strep*-mCD98hc-ED and *Strep*-hCD98hc-ED. (A) Analytical SEC and (B) SDS-PAGE.

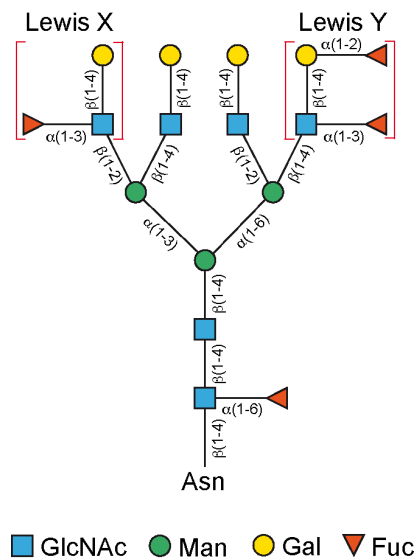


Figure S2: Schematic representation of modeled N-glycans. The oligosaccharide represents an average glycan structure found on the CD98hc-ED in human breast cancer cells.¹¹

Veröffentlichung 2

Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications

Autoren: Friedrich-Christian Deuschle, Volker Morath, André Schiefner, Corinna Brandt, Simone Ballke, Sybille Reder, Katja Steiger, Markus Schwaiger, Wolfgang Weber and Arne Skerra

Fachzeitschrift: Theranostics. 10, 2172-2187

Verlag: Ivyspring International Publisher

Publikationsdatum: 12.01.2020

DOI: 10.7150/thno.38968

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution CC-BY License in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt. Die Autoren besitzen das vollständige Urheberrecht des Artikels, wodurch der Nachdruck der Veröffentlichung keiner weiteren Einwilligung des Ivyspring International Publisher Verlags benötigt.



Research Paper

Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications

Friedrich-Christian Deuschle¹, Volker Morath², André Schiefner¹, Corinna Brandt¹, Simone Ballke³, Sybille Reder², Katja Steiger³, Markus Schwaiger², Wolfgang Weber² and Arne Skerra¹✉

1. Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany
2. Department of Nuclear Medicine, Klinikum rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 München, Germany
3. Institute of Pathology, Klinikum rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 München, Germany

✉ Corresponding author: Prof. Dr. Arne Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany. Phone: +49 8161 71 4351; Fax: +49 8161 71 4352; e-mail: skerra@tum.de

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). See <http://ivyspring.com/terms> for full terms and conditions.

Received: 2019.08.02; Accepted: 2019.11.07; Published: 2020.01.12

Abstract

Enhanced amino acid supply and dysregulated integrin signaling constitute two hallmarks of cancer and are pivotal for metastatic transformation of cells. In line with its function at the crossroads of both processes, overexpression of CD98hc is clinically observed in various cancer malignancies, thus rendering it a promising tumor target.

Methods: We describe the development of Anticalin proteins based on the lipocalin 2 (Lcn2) scaffold against the human CD98hc ectodomain (hCD98hcED) using directed evolution and protein design. X-ray structural analysis was performed to identify the epitope recognized by the lead Anticalin candidate. The Anticalin – with a tuned plasma half-life using PASylation[®] technology – was labeled with ⁸⁹Zr and investigated by positron emission tomography (PET) of CD98-positive tumor xenograft mice.

Results: The Anticalin P3D11 binds CD98hc with picomolar affinity and recognizes a protruding loop structure surrounded by several glycosylation sites within the solvent exposed membrane-distal part of the hCD98hcED. *In vitro* studies revealed specific binding activity of the Anticalin towards various CD98hc-expressing human tumor cell lines, suggesting broader applicability in cancer research. PET/CT imaging of mice bearing human prostate carcinoma xenografts using the optimized and ⁸⁹Zr-labeled Anticalin demonstrated strong and specific tracer accumulation (8.6 ± 1.1 %ID/g) as well as a favorable tumor-to-blood ratio of 11.8.

Conclusion: Our findings provide a first proof of concept to exploit CD98hc for non-invasive biomedical imaging. The novel Anticalin-based α hCD98hc radiopharmaceutical constitutes a promising tool for preclinical and, potentially, clinical applications in oncology.

Key words: cancer theranostics, CD98hc, lipocalin, PASylation, protein engineering, tumor targeting

Introduction

Elevated amino acid transport, altered cell adhesion and migration as well as adhesive signaling constitute crucial factors for cancer development and growth and play a critical role for metastatic transformation of cells. The cluster of differentiation 98 heavy chain (CD98hc, also known as 4F2hc, SLC3A2 or FRP-1) is involved in both pathophysiological processes and therefore represents an interesting therapeutic target [1]. In the Human

Protein Atlas [2] CD98hc (gene name / entry: SLC3A2) shows broad expression in healthy tissues as well as cancers, predominantly as an unfavorable prognostic marker.

Structurally, CD98hc is a type-II-transmembrane glycoprotein which is disulfide-linked to one of six known multi-pass CD98 light chains (CD98lc), all of which are permease-type amino acid transporters with different specificities [3], namely Lat-1 [4], Lat-2

[5], y+Lat-1 [6], y+Lat-2 [7], asc-1 [8] and xCT [9]. CD98hc has two major biochemical functions (Figure 1A). First, it acts as a molecular chaperone for membrane trafficking, stabilization and proper function of the CD98lc [10, 11], thus boosting the transport of amino acids and contributing to cell survival and growth. Of note, beside serving as building blocks for biosynthesis, the amino acids transported by the CD98 complex and their metabolites/derivatives can exert further cellular effects, as described for L-leucine (mTOR1 pathway activation [12]) and L-cystine (regulation of redox homeostasis [13]), which are transported by the CD98hc/Lat-1 and CD98hc/xCT heterodimers, respectively [14]. Second, CD98hc directly contributes to intracellular integrin signaling and is involved in integrin-mediated cell to cell interactions via cellular adhesion molecules, such as VCAM-1, thereby influencing cell growth, survival, spreading and migration [15-19].

In line with its important role in cellular metabolism and adhesive signaling, overexpression of CD98hc has been detected in solid and hematological human malignancies, including colorectal cancer [20], non-small cell lung cancer (NSCLC) [21, 22], triple-negative breast cancer [23, 24], metastatic prostate cancer [25] as well as lymphoma [26] and leukemia [15, 22]. Recent studies have indicated that abundant expression of CD98hc in cancer is associated with poor clinical prognosis [20, 21], treatment response [27, 28] as well as overall survival [24, 29, 30]. Furthermore, high CD98hc expression is linked to a progressive and metastatic phenotype in several human neoplasms; consequently, assessment of CD98hc expression should aid the biological characterization of malignancies [31-34].

Likewise, elevated expression of the covalently associated CD98lc components Lat-1 [35, 36], Lat-2 [37] and xCT [38, 39] is also observed in human cancers, with Lat-1 constituting the most abundant tumor marker. In fact, cancers from several tissues highly express both CD98hc and Lat-1, suggesting that this receptor heterodimer bears particularly high oncogenic potential. Interestingly, in some cancers a cooperative overexpression of CD98hc and Lat-1, contrasting with Lat-1 alone, has emerged as an independent factor of poor prognosis for patients [24, 40, 41].

Therefore, the specific recognition and/or targeting of CD98hc by appropriate protein reagents offers potential for cancer theranostics. To date, the most advanced protein drug candidate is the humanized α hCD98hc monoclonal antibody (mAb) IGN523, which has shown robust preclinical anti-tumor activity in patient-derived lymphoma as

well as NSCLC xenograft tumor models and a favorable safety profile in a phase I clinical study [22, 42]. However, protein reagents suitable for the non-invasive diagnostic imaging of CD98hc have not been described to date. On the other hand, certain small molecules are available to target Lat-1, demonstrating that this CD98lc subtype is also a promising target for tumor imaging and therapy. These include inhibitor drugs with proven preclinical antitumor activity in different cancer types [43] and the radiolabeled amino acid analogues [18 F]-fluoroethyl-L-tyrosine (FET) and trans-1-amino-3- [18 F]-fluorocyclobutanecarboxylic acid (FACBC). While FET is widely used in Europe for PET imaging of brain tumors [44], the leucine analog FACBC has recently been approved in the United States and Europe for PET imaging of recurrent prostate cancer [45]. Apart from that, a 89 Zr-labeled α Lat-1 mAb has shown tumor uptake in a colorectal cancer xenograft model [46]. However, mAbs suffer from drawbacks as imaging reagents, due to their poor tissue penetration and unfavorable pharmacokinetics, which causes low imaging contrast [47]. Furthermore, the direct targeting of CD98hc would offer additional information on pathophysiological processes beyond the amino acid transport catalyzed by the associated CD98lc.

Here, we describe the development and preclinical investigation of a hCD98hc-specific Anticalin. Anticalins constitute an emerging class of artificial binding proteins obtained by combinatorial design based on the compact and robust human lipocalin scaffold [48]. Due to their human origin, these proteins have low immunogenic potential and Anticalins with various target specificities have demonstrated safety in clinical trials [49]. Anticalins are particularly well suited for applications in cancer therapy and diagnostics due to their small size and good tissue penetration, tunable pharmacokinetics (e.g. via PEGylation or PASylation [47, 50]), the possibility for site-specific labeling (with PET/SPECT radioisotopes or optical imaging probes), drug conjugation (toxins) and flexible formatting options as fusion proteins [49].

Materials and Methods

Phage display selection and production of hCD98hcED-specific lipocalin variants

Selection of hCD98hc-specific lipocalin variants was performed via filamentous phagemid display from a combinatorial library comprising 1×10^{10} variants based on Lcn2 randomized at 20 positions within the structurally variable loops [51]. Biotinylated recombinant hCD98hcED (cf.

Supplementary Information) was immobilized on streptavidin- or NeutrAvidin-coated paramagnetic beads (Sigma-Aldrich, Munich, Germany and Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, respectively), then incubated with the phagemid library (starting titer 1×10^{12}) and, following extensive washing, bound phagemids were eluted under denaturing conditions using 4 M urea. After five consecutive cycles, pooled phasmid DNA from the enriched library was prepared and subcloned on pNGAL98 in order to perform high-throughput ELISA screening from microcultures expressing the soluble lipocalin variants with a C-terminal *Strep*-tag II, as previously described [51]. Briefly, the periplasmic extract was prepared in a microtiter plate and transferred to a 96-well MaxiSorp plate (Thermo Fisher Scientific) that had been coated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *Strep*MAB-Immo (IBA, Göttingen, Germany). After 1 h incubation and washing steps, bound lipocalin variants were incubated with the biotinylated hCD98hcED, followed by detection of lipocalin•target complexes using ExtrAvidin/alkaline phosphatase (AP) conjugate (Sigma-Aldrich). Signals were developed with 0.5 mg/mL p-nitrophenyl phosphate in AP buffer (0.1 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris/HCl, pH 8.8) and absorbance was measured at 405 nm with a Synergy 2 photometer (BioTek Instruments, Winooski, VT). For clones showing significant binding towards hCD98hcED the expression cassette on the phasmid was sequenced, and the soluble lipocalin variant was subsequently produced at preparative scale in *E. coli* JM83 with a C-terminal His₆-tag using the plasmid pNGAL118 [51]. After periplasmic protein extraction, the recombinant protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using a Ni(II)-charged HisTrap HP column (GE Healthcare, Munich, Germany) and finally subjected to size-exclusion chromatography (SEC) in PBS (4 mM KH_2PO_4 , 160 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl pH 7.4) on a 24 mL Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare). Plasmid construction and production of PASylated lipocalin variants D11vs-PAS200, D11vs-PAS200-Cys and wild type (wt) Lcn2-PAS200-Cys was performed according to published procedures [52] and followed by purification via IMAC and SEC essentially as described above.

Biomolecular interaction analysis

Real time surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy was performed on a BIAcore 2000 system (BIAcore, Uppsala, Sweden) at 25 °C using HBS-T (20 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20) as running buffer. The

purified biotinylated m/hCD98hcED produced in *E. coli* or in MEXi-293E cells (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protein solution in HBS-T; see Supplementary Information) was immobilized ($\Delta\text{RU} \approx 225$) on a streptavidin-functionalized sensorchip using the Biotin CAPture kit (GE Healthcare). Single cycle kinetic experiments were performed using five consecutive injections from a 1:2 dilution series of the purified lipocalin variant at a flow rate of 25 $\mu\text{L}/\text{min}$, each with 288 s contact time, and a long 3500 s dissociation time after the fifth injection. For conventional multi cycle kinetic experiments, association and dissociation were recorded for eight samples from a consecutive 1:2 dilution series of the purified lipocalin variant. Rate constants of association and dissociation were calculated from reference-corrected sensorgrams by fitting to a global 1:1 Langmuir binding model using BIAevaluation software (BIAcore). The equilibrium dissociation constant (K_D value) was calculated as $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. To test competitive binding of the lipocalin variants P3D11, P3A12 and P1E4 to immobilized hCD98hcEDg (cf. Supplementary Information), 100 nM of P3D11 was first injected, followed by an injection of either 100 nM P3A12 or 100 nM P1E4. Injections of HBS-T served as negative control (cf. Figure S2E).

Error-prone library construction and selection via bacterial surface display

Stability and affinity engineering of the lipocalin variant P3D11 was accomplished by directed evolution using bacterial surface display (BSD) as previously described [52-54]. Briefly, error-prone PCR was executed using the GeneMorph II random mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with 10 pg of the preamplified coding region for the lipocalin variant P3D11 used as DNA template. After digest of the PCR product with *Bst*XI, the randomized DNA fragment was ligated with the backbone of pNGAL146 and used for electrotransformation of *E. coli* JK321 [55], yielding 5×10^9 transformants, which were plated on LB agar medium supplemented with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin (LB/Amp). The bacterial lawn was scraped from the plate(s), resuspended in 50 mL liquid LB/Amp medium to reach an initial $\text{OD}_{550} = 0.15$ and incubated at 37 °C. Gene expression was induced at $\text{OD}_{550} = 0.5$ by addition of 10 ng/mL anhydrotetracycline (aTc) for 2.5 h. Approximately 2×10^8 cells were sedimented by centrifugation and resuspended in PBS in the presence of biotinylated hCD98hcED at different concentrations (cycles 1 and 2: 100 nM; cycles 3 and 4: 10 nM; cycles 5 and 6: 1 nM) followed by incubation for 1 h at 4 °C. After centrifugation and one washing step with PBS, the bacteria were incubated with

25 µg/mL streptavidin/phycoerythrin (PE) conjugate (Biolegend, San Diego, CA) and 3 µM Fab A3C5-DY634 conjugate [56] in PBS for 30 min, followed by a last washing step in PBS. Bacteria were sorted on a FACSAria IIu instrument (BD Bioscience, Heidelberg, Germany) using a 488 nm LASER diode in combination with a 585/42 band pass filter or a 633 nm HeNe LASER with a 660/20 band pass filter for excitation/detection of PE and DY634 fluorescence, respectively. Sorted bacteria were plated on LB/Amp agar, incubated at 37 °C for 12 h and then subjected to a new sorting cycle. After cycle no. 6, single clone analysis was performed by cytofluorometric analysis of individually cultured colonies. FACS data were processed using FlowJo ver.10 software (FlowJo, Ashland, OR).

Flow cytofluorometric of cell lines

The human cancer cell lines Ramos [57], Raji [58], SU-DHL-4 [59], PC-3 [60], DU-145 [61] and Caco-2 [62] (from local collections) were cultivated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (containing 2.0 g/L NaHCO₃ and stable L-glutamine; Biochrom, Berlin, Germany), supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; PAA Laboratories, Pasching, Austria) at 37 °C under humidified 5% CO₂ atmosphere. The HEK293T cell line and a corresponding CD98hc knock-out clone [63] were maintained under cultivation conditions as published [64]. Adherent cells (PC-3, DU-145, Caco-2 and HEK293T-based cell lines) were washed with PBS (w/o Ca²⁺ and Mg²⁺; Biochrom) and detached using PBS (w/o Ca²⁺ and Mg²⁺) supplemented with 0.5 mM EDTA for 10 min at 37 °C. Cells growing in suspension (Ramos, Raji and SU-DHL-4) were directly washed with PBS (w/o Ca²⁺ and Mg²⁺). For each measurement, 250,000 viable cells were resuspended in 250 µL FACS buffer (PBS + 10% (v/v) FBS) supplemented with 1 µM D11vs-PAS200-Cy5.5 (cf. Supplementary Information) and incubated for 1 h at 4 °C. Competition experiments were performed by adding a 10-fold molar concentration of either unlabeled D11vs-PAS200 or the soluble hCD98hcEDg. The Sulfo-Cy5.5 conjugate of recombinant wtLcn2-PAS200 was used as a negative control in some experiments (see text). After incubation, cells were centrifuged and washed three times in PBS and finally resuspended in 250 µL FACS buffer. Flow cytofluorometric experiments were performed on a FACSAria IIu instrument using an excitation wavelength of 650 nm and an emission band-path filter of 780/60 nm.

Immunofluorescence microscopy

PC-3 and Caco-2 cells were cultivated at 37 °C on

poly-D-lysine (PDL) coated Lab-Tek II chamber slides (Thermo Fisher Scientific) in RPMI 1640 medium containing 2.0 g/L NaHCO₃ and stable L-glutamine, supplemented with 10% (v/v) FBS, until 60–70% confluence was reached. After three times washing with PBS, the cells were incubated with 1 µM D11vs-PAS200-Cy5.5 for 1 h at 37 °C, followed by another three washing steps. Ramos cells, on the other hand, were grown in suspension and stained, after centrifugation and resuspension, in a similar manner, followed by transfer to a PDL coated Lab-Tek II chamber slide. For control experiments, the D11vs-PAS200-Cy5.5 conjugate was either premixed with a 10-fold molar concentration of unlabeled D11vs-PAS200 or wtLcn2-PAS200-Cy5.5 was applied. Cells were fixed and counterstained by 5 min incubation with ice-cold methanol containing 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich). Digital fluorescence images were recorded on an Axiovert 40 CFL microscope equipped with an AxioCam MRm camera (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) using 365/12 nm (DAPI) and 716/40 nm (Cy5.5) band-pass filters.

Circular dichroism (CD) spectroscopy and thermal denaturation

CD spectra and thermal unfolding of purified lipocalin variants were measured using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Pfungstadt, Germany) equipped with a PT-423S Peltier element and controlled by Spectra manager software (ver. 1.53.05). Proteins were dialyzed against 20 mM KP_i pH 7.5, 50 mM K₂SO₄ and applied at a concentration of 1 µM. In order to identify the wavelength with maximum change in CD signal for thermal denaturation studies, spectra were first recorded with a 1 mm path length quartz cuvette (Hellma, Müllheim, Germany) from 190 to 250 nm both at 20 °C and 90 °C. Thermal unfolding of the lipocalin variants was then measured at a wavelength of 214 nm by heating from 20 °C to 90 °C at a rate of 60 K/h. Data were fitted to an equation for a one-step unfolding transition, and the melting temperature (T_m), enthalpy of unfolding (ΔH_m) and Gibb's free energy of unfolding (ΔG⁰) at ambient temperature were calculated as previously described [65].

In vivo xenograft studies

Animal experiments were conducted with permission from the District Government of Upper Bavaria (application no.: 55.2-1-54-2532-216-15). CB17-SCID mice at an age of 6 weeks (♂ and ♀) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and held under specific pathogen free (SPF) conditions. Mice were injected

subcutaneously above the right shoulder with 100 μ L RPMI 1640 medium (without supplements) containing 6×10^6 PC-3 or Ramos cells. On day 12 post injection (p.i.) the tumor had reached a diameter of ~ 0.5 cm and the mice were used for *in vivo* studies.

^{89}Zr Positron Emission Tomography (PET)

For ^{89}Zr -labeling of Dfo-conjugated [66] D11vs-PAS200 (cf. Supplementary Information), 250 μ g of the protein conjugate solution which had been dialyzed against 250 mM Na-acetate pH 5.5 was incubated with 200 μ L 0.5 M Hepes/NaOH pH 7.0, 50 μ L 0.5 M gentisic acid and 111 MBq $^{89}\text{Zr(IV)}$, obtained in 1 M oxalic acid (Perkin Elmer, Waltham, MA) and neutralized with 3 M Na_2CO_3 . After 1 h incubation at 37 $^\circ\text{C}$, radiolabeling was confirmed by radio thin layer chromatography (radio-TLC) on chromatography paper strips (TLC-SG; Agilent Technologies) using Na-citrate pH 5.0 as mobile phase. The radio-labeled protein tracer was separated from reagents by gel filtration using a PD-10 column (GE Healthcare) equilibrated with 0.9% NaCl solution (B. Braun, Melsungen, Germany). Radiochemical purity of the protein tracer was confirmed by radio-TLC prior to its use for injections.

For the biodistribution study, mice were injected with the protein tracer via the tail vein at a dose of 3.96 ± 0.12 MBq. For blocking experiments, a 100-fold or 250-fold molar equivalent of unlabeled D11vs-PAS200 was injected 2 h prior to the tracer injection. Static PET/CT imaging was performed at indicated time points under isoflurane anesthesia in an Inveon PET/CT small-animal scanner (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) with 20 min PET and 5 min CT signal acquisition. Data were analyzed with the Inveon Research Workplace software (Siemens Medical Solutions) and reconstructed using the 0.8 mm high resolution OSEM-3D algorithm. Quantification of regions of interest (ROI) was performed by threshold-based image segmentation with a lower threshold at 50% of the hottest voxel for *in vivo* PET and a threshold of 10 kBq/mL for *ex vivo* PET images.

Biodistribution analysis and tissue autoradiography

Tumor, blood and organs were dissected from the sacrificed animals at the end of the experiment in order to determine weight and quantify radioactivity using a 2480 Wizard² automatic gamma counter (Perkin Elmer). 1% of the injected protein tracer dose was applied as reference. Uptake values were calculated as %ID/g and corrected for radioactive decay from the time point of injection.

After radioactivity measurement, the tumor was

transversally bisected and used for immunohistochemistry and autoradiography analysis. For autoradiography, the tumor was embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) in a mold and frozen. Subsequently, 10 μ m sections were cut using a CM1950 cryostat (Leica Biosystems, Nußloch, Germany) and the sections were mounted on a superfrost microscopic slide (Thermo Fisher Scientific). The slide was placed, together with a 1:2 dilution row of the radiotracer, in silicon isolators (Grace Bio-Labs, Bend, OR) on a storage phosphor screen BAS-IP super resolution film (GE Healthcare) for one week, followed by quantification using a CR 25 BIO autoradiography scanner (Dürr Medical, Bietigheim-Bissingen, Germany) and data analysis with AIDA software ver. 4.24.036 (Raytest, Straubenhardt, Germany). Pictures chosen show the sections with the highest exposure level in order to allow optimal comparison of blocked and unblocked tumor sections.

Histology and immunohistochemistry

Tumor tissue was fixed in 10% (w/v) neutral-buffered formalin solution (Otto Fischar, Saarbrücken, Germany) for 48 h and stored at 4 $^\circ\text{C}$ until the radioactivity had decayed. Tissue samples were dehydrated using an automated system (ASP300S; Leica Biosystems) and subsequently embedded in paraffin. Serial 2 μ m sections were prepared with a rotary microtome (HM355S; ThermoFisher Scientific) and subjected to histological and immunohistochemical analysis. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed on deparaffinized sections with Eosin and Mayer's Haemalaun (Morphisto, Frankfurt am Main, Germany). Immunohistochemistry was performed using a Bond RXm system (Leica Biosystems) with primary antibodies against CD98hc (E-5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and CD31 (Dianova, Hamburg, Germany) using 1:750 and 1:100 dilutions, respectively. Briefly, slides were deparaffinized using deparaffinization solution (Leica Biosystems), pretreated with Epitope retrieval solution 1 (corresponding to citrate buffer, pH 6) for 30 min (CD98hc) or pretreated with Epitope retrieval solution 2 (corresponding to EDTA based buffer, pH 9) for 30 min (CD31). Bound antibody was detected with a polymer refine detection kit without post primary reagent and with an intermediate rabbit anti-rat secondary antibody (diluted 1:400; Leica Biosystems) and signals were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Representative images were collected on an Aperio AT2 digital pathology slide scanner using ImageScope (ver.12.3) software

(both from Leica Biosystems).

Statistics

For mean comparison between two groups of animals, the Student's *t* test for unpaired data was used. *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$). Experimental data were analyzed using Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA), and standard deviations (S.D.) are indicated.

Results

Selection of a hCD98hcED-specific Anticalin with picomolar affinity

The soluble monomeric extracellular domain of human CD98hc (UniProt ID P08195-2, residues Glu111–Ala529; calculated mass 48.4 kDa) was produced both as unglycosylated protein in *E. coli* (hCD98hcED) and fully glycosylated in human embryonic kidney (HEK) 293E cells (hCD98hcEDg) (Figure S1). The four experimentally verified N-glycosylation sites [67] of the native hCD98hc, Asn264, Asn280, Asn323 and Asn405, account for 32% of the apparent mass of the recombinant hCD98hcEDg (73.1 kDa), in agreement with its elution behavior in analytical SEC and its retarded mobility in SDS-PAGE (Figure S1 and Table S1). This extensive glycosylation of hCD98hcED may hamper *in vitro*

phage display selection of cognate Anticalins due to limited sterical accessibility of potential surface epitopes, as previously seen in the selection of Anticalins against the prostate-specific membrane antigen (PSMA) [68]. To avoid the necessity of glycan removal, which requires harsher conditions to prevent incomplete deglycosylation, we used the unglycosylated ectodomain produced in *E. coli* as the initial molecular target for phage display selection. N-terminal fusion of the biotin acceptor peptide (BAP) [69] resulted in the intracellular enzymatic attachment of a single biotin group to hCD98hcED upon co-expression of the BirA ligase (verified via western blot analysis, data not shown) for both expression systems used. This modification allowed immobilization of the purified ectodomain to (strept)avidin-coated beads, or surfaces, in an orientation that resembles the *in vivo* situation for the type II membrane protein, rendering its epitopes accessible for binding of lipocalin variants during phage display selection, ELISA screening and *in vitro* binding studies.

Anticalin candidates were selected from a Lcn2 random library with a combinatorial complexity of 1×10^{10} , which had served for the development of other hapten- and protein-specific Anticalins in the past [51]. After six selection cycles with hCD98hcED, three independent cognate lipocalin variants were identified by ELISA screening. These were expressed

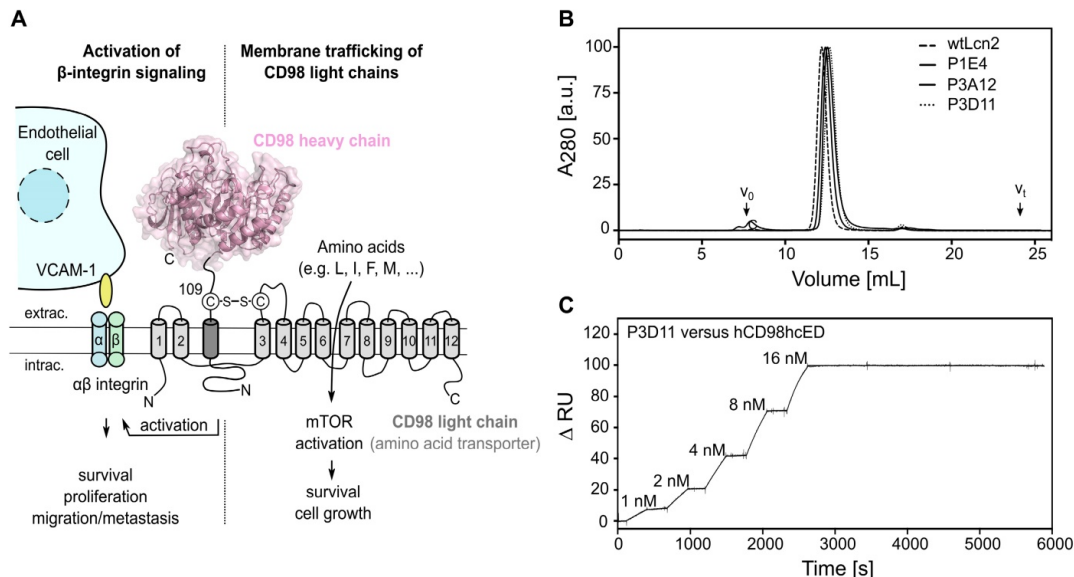


Figure 1. Phage display selection of lipocalin variants with affinity towards the ectodomain of hCD98hc. (A) Graphical depiction of CD98hc linked to a CD98 light chain via a disulfide bridge, illustrating the two main biochemical functions: amino acid transport and integrin signaling. The structure of the CD98hc ectodomain, which was employed as a recombinant protein for phage display selection of Anticalins is highlighted in pink. (B) Analytical SEC of the CD98hc-specific lipocalin variants P1E4, P3A12 and P3D11 that were selected via phage display, in comparison with wtLcn2 (all purified as soluble proteins expressed in *E. coli*), revealing monomeric protein preparations (minor aggregate contaminations elute at the void volume, V_0). (C) SPR real-time binding analysis (single cycle) of the high-affinity variant P3D11 versus hCD98hcED, demonstrating a picomolar dissociation constant (see Table 1).

as soluble proteins in *E. coli* at the shake flask scale and purified to homogeneity, resulting in monomeric proteins with apparent molecular sizes similar to recombinant wild type (wt) Lcn2 (Figures 1B and S2A-B, Table S2). To determine the rate constants of association and dissociation of the selected Anticalin candidates, SPR real-time interaction analyses were performed using both the glycosylated and unglycosylated immobilized CD98hcED. The three lipocalin variants showed equilibrium dissociation constants (K_D) in the single-digit to sub-nanomolar range (Figures 1C and S2C-D, Tables 1 and S3). The lipocalin variant P3D11 revealed a particularly low K_D value of 150–170 pM for hCD98hcED and hCD98hcEDg, as well as a long complex half-life of 6 h, hence suggesting suitability for tumor targeting *in vivo* (Figure 1C). Interestingly, competitive SPR experiments indicated that all three Anticalins recognize overlapping epitopes on hCD98hcED (Figure S2E, shown for P3D11 and P3A12), despite considerable sequence deviation especially between the variants P1E4 and P3D11 (cf. Figure S2A).

Protruding loops of hCD98hcED constitute the major epitope recognized by the engineered lipocalin

To identify the epitope region and to understand the structural mechanisms of the tight molecular interaction between P3D11 and the CD98hc ectodomain, we crystallized this lipocalin variant in complex with hCD98hcED (carrying an N-terminal *Strep*-tag II) after isolation of the 1:1 complex via SEC (Figure S3). Crystals belonged to the space group C2, with two complexes per asymmetric unit, allowing collection of a synchrotron X-ray data set and

refinement of the structure to a resolution of 1.8 Å (Table S4).

Table 1: Affinities for hCD98hcED and thermal stabilities of engineered lipocalin variants

Protein	Affinity				Stability		
	K_D [nM]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$\tau_{1/2}$ [min]	T_m [°C]	ΔH_m [kJ/mol]	ΔG_u [kJ/mol]
P1E4	4.5 ± 0.026^a	2.5×10^6	1.1×10^{-2}	1.1	68.8	812	104.0
P3A12	2.8 ± 0.024^b	6.2×10^4	1.7×10^{-4}	67.7	64.1	635	73.6
P3D11	0.15 ± 0.003^b	2.2×10^5	3.2×10^{-5}	359	55.2	368	33.8
D11vs	0.06 ± 0.007^b	4.5×10^5	2.6×10^{-5}	442	63.5	646	73.9

^a multi cycle kinetics

^b single cycle kinetics

hCD98hcED revealed a glycoside hydrolase fold, comprising a central TIM barrel core domain (residues 114–438) and a C-terminal β -sandwich domain (residues 439–529) as previously described [70]. The engineered lipocalin binds to a membrane-distal part of hCD98hcED via the four variable loops #1–#4 at the open end of its β -barrel (Figure 2A–B). The β -barrel axis of P3D11 is tilted by $\sim 45^\circ$ with regard to the TIM barrel axis of hCD98hcED. The contact interface between both proteins involves a buried surface area (BSA) of 1473 Å² (1424 Å² on the side of the lipocalin and 1521 Å² on the one of hCD98hcED) as well as 15 hydrogen bonds and 3 salt bridges (Table S5), resulting in the largest interface observed for Anticalin•protein complexes thus far [71]. The interaction is favored by electrostatics as P3D11 is positively charged, which complements the predominantly negatively charged epitope on hCD98hcED, also reflecting the calculated *pI* values of 8.8 and 5.2 for P3D11 and hCD98hcED, respectively (Figure S4A).

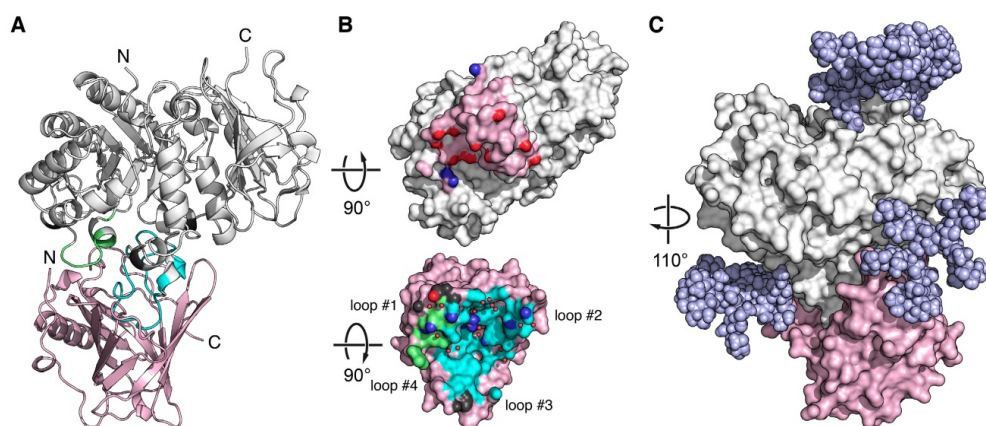


Figure 2: X-ray structure of an Anticalin in complex with the human CD98hc ectodomain. (A) Cartoon representation of the P3D11•hCD98hcED complex (P3D11 pink, hCD98hcED gray). The epitope loops L1 and L2 of hCD98hc are colored green and cyan, respectively. (B) Illustration of the interface after separating the two complex partners. Molecular contact surfaces are colored according to the opposite structure (cf. panel A) with hydrogen bond donors and acceptors highlighted blue and red, respectively, and hydrogen-bonded water molecules depicted as red spheres. (C) Surface representation of the P3D11•hCD98hcED complex including a model of the four complex N-glycans (light blue spheres) on the target protein.

The epitope of hCD98hcED essentially comprises two loops, L1 (residues 128–137) and L2 (374–404), which follow on the first and the eighth β -strand of the TIM barrel, respectively. Almost 75% of the contact interface is contributed by L2, which penetrates deeply into the binding pocket of the engineered lipocalin, while L1 contributes approximately 20% to the total BSA (Table S5). Further to the direct protein•protein contacts, 16 water molecules mediate hydrogen bonds at the interface. Based on the distribution of hydrogen bond donors, acceptors as well as water molecules, the P3D11 binding site towards hCD98hcED can be dissected into two areas, a rather polar region around the lipocalin loops #1 and #2 as well as a predominantly apolar region around loops #3 and #4 (Figures 2B and S4B).

Interestingly, binding of P3D11 causes an induced fit on the side of hCD98hcED. Superposition of the hCD98hcED $\text{C}\alpha$ positions in the complex with P3D11 with those for hCD98hcED crystallized alone (PDB entry 2DH2) [70], excluding the epitope loops L1 and L2, revealed an RMSD value of 0.97 Å (for 375 equivalent $\text{C}\alpha$ positions), whereas both loops L1 and L2 show a larger deviation in this context by on average 1.6 and 1.8 Å, respectively (Figure S5A). Likewise, P3D11 shows conformational differences among its loops #1–#4 compared with wtLcn2 (PDB code 1L6M); yet, these may also be caused by the many sequence changes (Figure S5B), as observed for other Anticalin structures before.

Although the selection of P3D11 was performed with the unglycosylated hCD98hcED, its affinity for the glycosylated hCD98hcEDg was indistinguishable (Tables 1 and S3). Modeling of the glycan moieties on the hCD98hcED shows that the Anticalin binds the protruding L1/L2 epitope in close proximity to two of the N-linked oligosaccharides without steric hindrance (Figure 2C). Interestingly, P3D11 does not show any crossreactivity with the murine antigen (mCD98hcED) as investigated via SPR measurements (data not shown), which can be explained by significant differences both in the amino acid sequence and in the glycosylation pattern between the two CD98hc orthologs. In particular, loop L2 of mCD98hcED is shorter by one residue, carries an additional N-glycosylation site and shows considerable sequence changes [72]. Notably, this observation is in line with the properties of the clinical-stage mAb IGN523, which also recognizes loop L2 (residues 374–401) of hCD98hcED with picomolar affinity but shows no detectable affinity towards mCD98hc [22, 73].

Directed evolution results in an Anticalin with improved affinity and stability

Despite its tight binding activity towards hCD98hcED, the lipocalin variant P3D11 suffered from low thermal stability, a caveat for further preclinical as well as clinical development (Table 1). To tackle this issue, stability engineering was performed via directed evolution using bacterial surface display (BSD) starting from an error-prone library with moderate amino acid mutation rate (approximately two amino acid exchanges on average; Figure S6A). To select variants of P3D11 with enhanced thermal stability, expression of the membrane-anchored protein in *E. coli* was induced at 37 °C (compared with 26 °C used in the initial selection) and only bacteria showing both a strong hCD98hcED binding signal and high cell surface display level were gated in the FACS experiment (Figure 3A).

After six enrichment cycles, the lipocalin library exhibited a pronounced average binding signal after incubation with 1 nM hCD98hcED, whereas almost no signal was detectable for the initial clone P3D11 if tested under the same conditions. Single clone analysis with 1 nM hCD98hcED verified strong binding of several new P3D11 variants (D11.1 shown as an example; see Figures 3B and S6B), whereas just very modest binding was detected for P3D11 under these conditions, and no signal for wtLcn2, as expected. Considering that P3D11 exhibits already quite a low K_D value of 150 pM for hCD98hcED, the increased binding signal is likely caused by the more efficient bacterial surface display due to improved protein folding and/or stability of its variants. Subsequent sequence analysis revealed that replacement of Gly81 and Phe71 in the P3D11 sequence by Val and Ser, respectively, were crucial in this regard (Figure S6C). Consequently, the variant D11vs, which carries both mutations, was produced as a soluble protein at preparative scale and characterized with respect to its thermal stability and target affinity.

CD thermal unfolding studies at physiological pH demonstrated a significant rise by 8.3 °C in the melting temperature (T_m) for D11vs ($T_m = 63.5$ °C) compared to P3D11 (Figure 3C and Table 1). Importantly, also the cooperativity of the unfolding transition was much steeper, corresponding to a higher enthalpy of denaturation (ΔH_m) as well as extrapolated free energy of denaturation (ΔG_U) under standard conditions (25 °C). This is in line with our observation of a lower tendency of D11vs to aggregate during incubation at 37 °C compared to P3D11 (Figure S6D). Additionally, D11vs showed even higher affinity towards hCD98hcED, with a K_D value

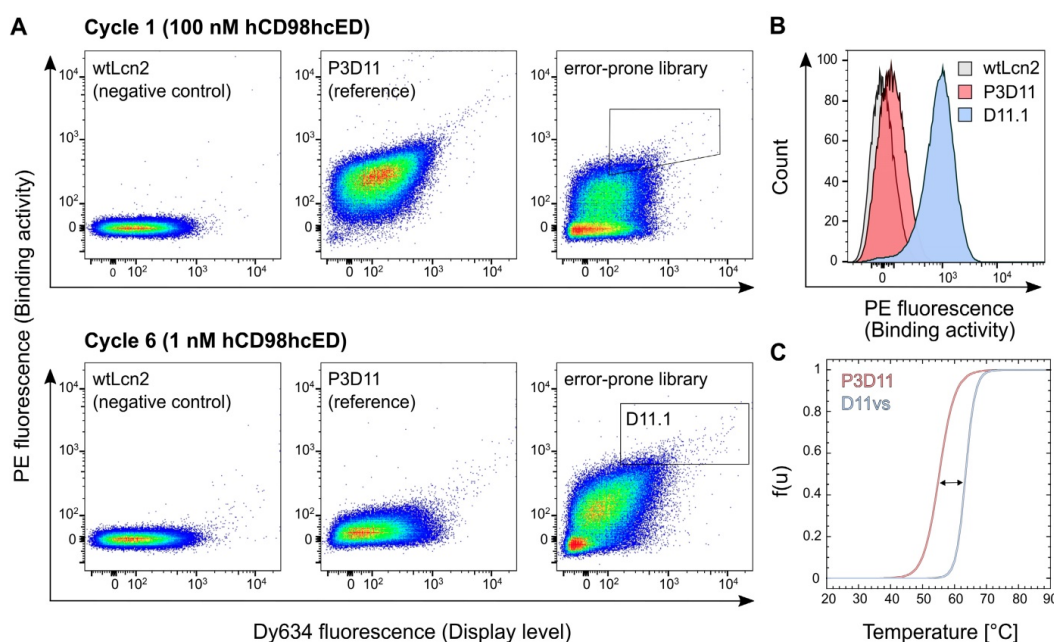


Figure 3. Affinity and stability engineering of the lipocalin variant P3D11 via bacterial surface display. (A) FACS analysis of *E. coli* cells presenting wtLcn2 (as negative control, left), the initial lipocalin variant P3D11 (as reference, middle) and the error-prone library (right), each incubated with 100 nM (cycle 1, upper panel) or 1 nM (cycle 6, lower panel) biotinylated hCD98hcED. (B) Single clone FACS analysis, using 1 nM biotinylated hCD98hcED, of P3D11 versus the second generation variant, D11.1, obtained after six selection cycles, in comparison with wtLcn2. (C) Thermal denaturation of P3D11 and its improved version D11vs measured by CD spectroscopy.

of 60 pM, due to both faster association and slower dissociation rate constants (Figure S6E and Table 1).

The enhanced stability and affinity of D11vs can be explained on the basis of the crystal structure solved for the P3D11•hCD98hcED complex: Gly81 was introduced during the initial selection campaign, where it replaced Arg81 of wtLcn2, thus creating space for tight interaction with the target (Figure S6C). However, due to the lack of a β -carbon, glycine causes a higher backbone conformational flexibility [74] which destabilizes the β -barrel. Accordingly, substitution by valine leads to enhanced protein stability while filling a hydrophobic cavity lined by the lipocalin residues Tyr68, Gly81, Phe83 and Leu94 (Figure S7A), of which also Tyr68 was introduced during the initial selection. In addition, Val81 increases the contact area with hCD98hcED, which likely contributes to the enhanced affinity (Figure S7B). On the other hand, replacement of Phe71 by Ser enables the formation of stabilizing hydrogen bonds to Asn174 and Lys50 within the Anticalin (Figure S7C), and the smaller side chain may enable its loop #2 to bend slightly away from the β -barrel axis, thus creating a better sterical situation for target binding.

D11vs binds human CD98hc on various tumor cell lines

For *in vivo* studies in mice, a modified version of

D11vs with moderately prolonged plasma half-life was designed using PASylation technology [75]. To this end, a structurally disordered polypeptide comprising in total 200 proline, alanine and serine residues (PAS200) was genetically fused to the C-terminus of the engineered lipocalin (Figure S8A), thus increasing its hydrodynamic molecular volume, which leads to a retarded kidney filtration [50]. In the context of *in vivo* imaging applications, previous investigations have shown that fine-tuning of the pharmacokinetics in this manner can boost protein tracer accumulation and tumor contrast [47]. Furthermore, D11vs-PAS200 was equipped with an engineered Cys residue at the C-terminus of the PAS-tag to enable site-specific conjugation with chemical groups for *in vitro* and *in vivo* imaging as well as drug delivery (Figure S8 and Table S2).

The ability of D11vs-PAS200 to bind hCD98hc in a native cellular environment was investigated by cytofluorometry and immunofluorescence microscopy using human cancer cell lines of different origins that exhibit high expression of this tumor marker. Flow cytometric analysis of the B-cell lymphoma cell lines SU-DHL-4, Raji and Ramos, the prostate carcinoma cells DU-145 and PC-3 and the colorectal adenocarcinoma cell line Caco-2 using Sulfo-Cy5.5-labeled D11vs-PAS200 revealed strong binding to the membrane-associated target (Figure

4A). Competition experiments with excess unlabeled D11vs-PAS200 as well as soluble hCD98hcEDg resulted in signal suppression. The specificity of the Anticalin towards native hCD98hc was further confirmed by using a HEK293T knock-out cell line with an inactivated SLC3A2 gene (encoding the CD98hc membrane protein) [63], which also led to no FACS signal (Figure S9). Furthermore, immunofluorescence microscopy experiments with D11vs-PAS200-Cy5.5 revealed pronounced membrane and also cytoplasmic staining of Ramos, PC-3 and Caco-2 cancer cells (Figure 4B-D). Cell staining was effectively blocked when adding a 10-fold molar concentration of the unlabeled lipocalin variant, again demonstrating target specificity. As expected, no fluorescence staining for any of the tested cell lines was detected when using the Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated wtLcn2.

D11vs shows strong and specific signals in human tumor PET imaging of xenograft mouse models

The applicability of the PASylated Anticalin D11vs for the *in vivo* targeting of hCD98hc was evaluated by a PET/CT imaging study with the ^{89}Zr -labeled protein in two murine xenograft tumor models. For this purpose, the human cancer cell lines Ramos and PC-3 were chosen, considering that

CD98hc was described as a promising tumor marker for lymphoma [26] as well as other hematological cancers [15] and is known to be overexpressed in metastatic prostate cancer [25, 76]. In a first study, ten female mice, five with a Ramos (Figure S10) and five with a PC-3 (Figure 5) xenograft, were injected with ~ 3 MBq of the radiolabeled protein, followed by PET/CT imaging at time points $t = 24, 48$ and 72 h p.i. To assess target specificity of the injected Anticalin in PC-3 xenografts, two of the five mice per group received a 100-fold molar amount of the unlabeled PASylated Anticalin 2 h before ^{89}Zr -tracer injection. After 24 h, the best imaging contrast and high accumulation of 3.0 ± 0.3 %ID/g was observed for the PC-3 tumors, with decreasing tumor to background contrast after 48 and 72 h.

Threshold-based segmentation of the PET images (Figure 5B) showed a significant ($p = 0.024$) difference in radiotracer accumulation between tracer-injected mice ($N=3$) and those mice which were additionally injected with unlabeled Anticalin ($N=2$). Apart from the strong uptake by the tumors, elimination-related accumulation of radioactivity in liver, kidney and bladder was observed. Moreover, signals were seen in the joints, which can be explained by accumulation of liberated Zr(IV) due to the limited complex stability of the non-cyclic chelator Dfo [77]. Notably, signals detected in joints and kidneys

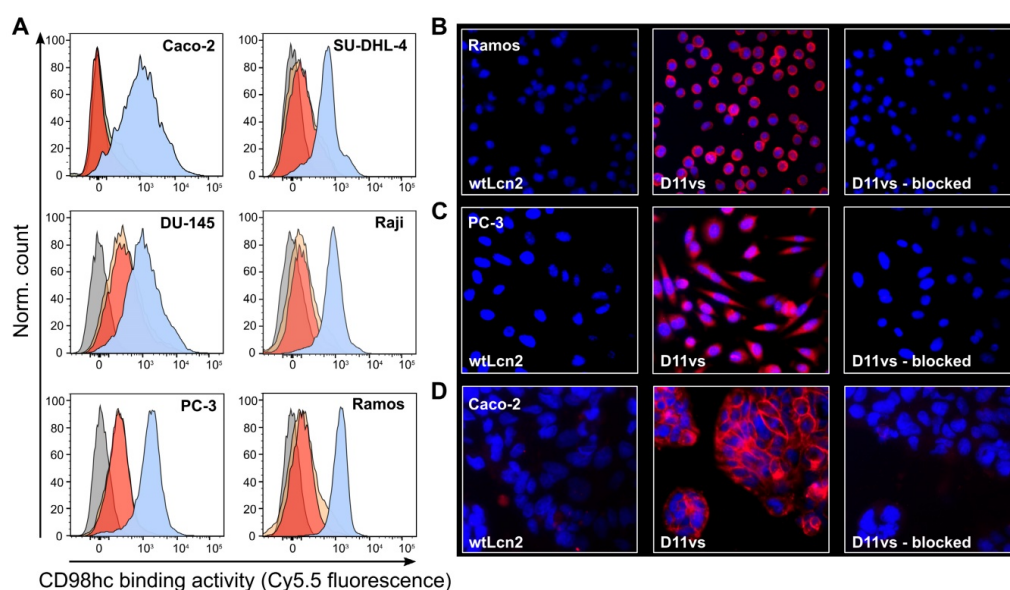


Figure 4. Cytofluorometric and immunofluorescence microscopy of CD98hc expressing human cancer cell lines using a PASylated Anticalin. (A) Flow cytometry analysis of cell lines from colorectal adenocarcinoma (Caco-2), prostate carcinoma (DU-145 and PC-3) and B-cell lymphoma (SU-DHL-4, Raji and Ramos) with Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated D11vs (blue histograms). In a control experiment, a 10-fold molar concentration of either unlabeled D11vs-PAS200 or soluble hCD98hcEDg was co-applied for competition (red and yellow histograms, respectively). Untreated cell lines are shown in gray. (B, C, D) Immunofluorescent detection (red) of hCD98hc using Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated D11vs shown for (B) Ramos, (C) PC-3 and (D) Caco-2 cells (middle). In control experiments, the cells were treated with Sulfo-Cy5.5-labeled wtLcn2 (left), or binding of Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated D11vs was competed with a 10-fold molar concentration of unlabeled D11vs-PAS200 (right). Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue).

showed no significant difference in mice with or without blocked CD98hc epitopes, which confirms a tracer-independent uptake of radioactivity into these tissues (Figure 5B). Furthermore, the ^{89}Zr -labeled D11vs-PAS200-Dfo tracer allowed good visualization of the Ramos xenografts 24 h p.i., yet with lower contrast as compared to the PC-3 tumors. Of note, the Ramos xenografts grew faster and more infiltrating than the PC3 xenografts, which made it difficult to accurately delineate these tumors on the PET images. Consequently, the PC-3 xenografts were chosen for further experiments.

After *in vivo* PET imaging, explanted PC-3 tumors were used for autoradiography of tissue cross sections. In this analysis, a homogeneous distribution of the radiotracer within the PC-3 tumor was detected (Figure 5C), with signals strongly reduced in tumors collected from the blocked mice. Concomitant immunohistochemical analysis of vessel distribution (via staining of CD31) as well as hCD98hc abundance, using cognate antibodies, revealed a well-vascularized tumor with high expression of hCD98hc for both PC-3 and Ramos xenografts (Figures 5D and S11).

In order to confirm these imaging results and to obtain quantitative data from *ex vivo* biodistribution experiments at the optimal time point 24 h p.i., a second study using male CB17-SCID mice bearing

PC-3 tumors was conducted (Figure 6). Two cohorts, each with five mice, were injected with either $3.96 \pm 0.12 \text{ MBq } ^{89}\text{Zr}$ -labeled D11vs-PAS or with the protein tracer in combination with a 250-fold molar amount of the unlabeled PASylated Anticalin (at $t = -2 \text{ h}$). After 24 h, PET/CT scans were performed, tumors were explanted, subjected to an *ex vivo* PET scan and, finally, a biodistribution analysis was conducted. PET/CT images of the mice without prior blocking of hCD98hc showed pronounced accumulation of radioactivity in the tumor, whereas the tumors were barely visible in the blocked mice, in line with the *ex vivo* PET/CT ROI segmentation analysis ($p = 0.027$). Finally, the biodistribution study revealed high accumulation of radioactivity ($8.6 \pm 1.1\% \text{ ID/g}$) in the tumor (vs. $5.4 \pm 1.1\% \text{ ID/g}$ in the blocked cohort, $p = 0.0032$), with good tumor-to-blood and tumor-to-muscle ratios of 3.5 and 11.8, respectively. Radioactivity in the excretion-related organs matched the observations above, with additionally pronounced accumulation in the spleen. This can be explained by the formation of insoluble Zr-phosphate [78]. In summary, the novel hCD98hc-specific PASylated Anticalin tracer showed high and specific tumor uptake in two xenograft models with excellent contrast, providing a proof of concept for exploiting CD98hc in non-invasive diagnostic imaging.

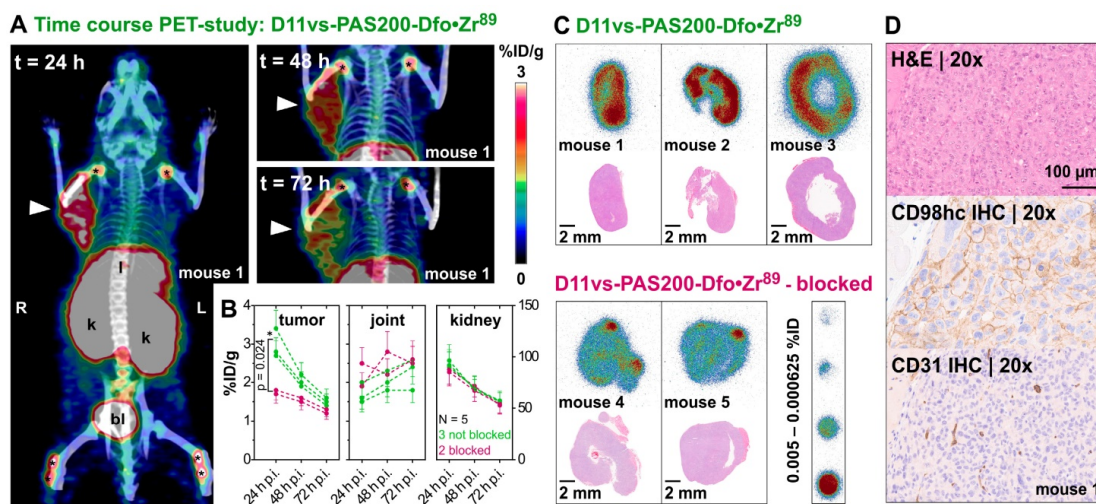


Figure 5. *In vivo* PET/CT imaging of a prostate carcinoma xenograft model. (A) Mice (♀) bearing PC-3 xenografts were injected i.v. with $2.85 \pm 0.15 \text{ MBq}$ D11vs-PAS200-Dfo- ^{89}Zr and subjected to PET/CT imaging 24, 48 and 72 h post injection. Prominent signals were apparent in the xenograft tumor (arrowhead) as well as liver (l), kidneys (k), bladder (bl) and joints (*). (B) PET images were analyzed by threshold-based image segmentation (lower threshold at 50% of the hottest voxel), and activity trajectories were plotted. Data for mice with (green) and without (red) blocked target are shown. Epitope blocking was accomplished by i.v. injection of a 100-fold molar amount of the unlabeled PASylated Anticalin 2 h prior to application of the protein tracer. (C) Consecutive $10 \mu\text{m}$ cryosections were prepared from the tumor tissue followed by autoradiography and H&E staining. (D) The second half of each tumor was embedded in paraffin and sections were stained for CD98hc and CD31 (blood vessels), using appropriate antibodies, as well as with H&E.

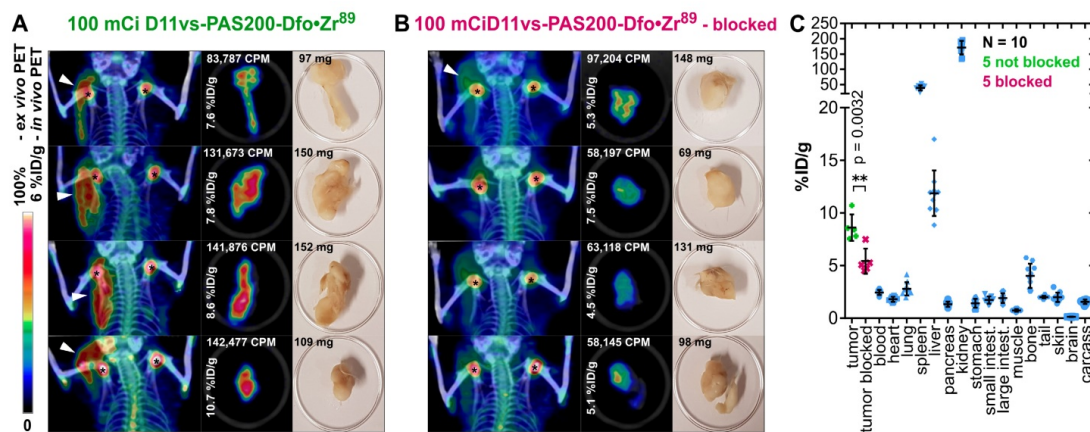


Figure 6. *In vivo* and *ex vivo* PET/CT imaging and biodistribution analysis. (A) Mice (♂) bearing PC-3 tumors were injected with 3.96 ± 0.12 MBq D11vs-PAS200-Dfo-⁸⁹Zr whereas mice in the blocked group (B) additionally received a 250-fold molar amount of unlabeled D11vs-PAS200 2 h prior to the protein tracer injection. For each mouse the *in vivo* PET/CT, *ex vivo* PET/CT and a photograph of the explanted tumor are depicted. (C) For biodistribution analysis, the mouse organs were dissected and their radioactivity and weight were quantified to allow calculation of the %ID/g values.

Discussion

Due to its pathophysiological significance, CD98hc constitutes a highly attractive biomedical target for diagnostic as well as therapeutic applications in oncology. However, no CD98hc-specific reagents for *in vivo* imaging, and only few therapeutic drug candidates addressing this target, are available to date.

We have developed an Anticalin with exquisite specificity and high (picomolar) affinity towards the extracellular domain of hCD98hc. The initial Anticalin candidates were selected from a random library based on human Lcn2, an abundant siderophore-binding plasma protein. This previously designed library [51], which carries an optimally distributed set of randomized amino acid positions within the binding site of this protein scaffold, was successfully applied in previous studies to generate Anticalins against proteinaceous biomedical targets (ED-B, Hsp70, VEGFR-3 or PSMA) [51, 52, 68, 79], peptides (monomeric A β) [80] and hapten-type ligands (colchicine, Y(III)-DTPA, petrobactin) [53, 81]. The lipocalin variants initially selected towards hCD98hcED from this naïve Lcn2 library exhibited K_D values already in the pico- to single-digit nanomolar range as well as stable monomeric behavior, which once again validates the utility of this protein scaffold and the library design.

Based on its favorable association and dissociation rate constants, with a remarkable complex dissociation half-life of ~6 h, P3D11 was chosen as the lead candidate for further characterization and optimization, eventually resulting in the Anticalin D11vs. X-ray structural analysis of the P3D11•hCD98hcED complex revealed

deep penetration of the epitope loop L2, located in the membrane-distal part of the hCD98hc ectodomain, into the cup-shaped ligand pocket of the Anticalin, with a buried paratope surface area of 1424 Å². Competition analysis for binding of the glycosylated hCD98hc_g showed that all selected Anticalins in this study, including P3D11, recognize the same epitope region. P3D11 and P3A12 share a set of amino acid exchanges relative to wtLcn2, with 8 identical residues among the 20 randomized positions. Both Anticalins exhibit highly similar sequence stretches in loop #1, loop #2, as well as their adjoining β -strand segments A/B and C/D (Figure S2A), which contribute to the interface in the P3D11•hCD98hcED complex (Table S5).

While N-glycosylation of CD98hc has no influence on the target affinity of both P3D11 (or its improved version D11vs) and P3A12, binding of the third Anticalin candidate, P1E4, is significantly diminished (~100-fold). This behavior can be explained by minor variation in the mutual orientations between hCD98hcED and the different Anticalins, which may influence the sensitivity towards sterically demanding carbohydrate side chains in the neighborhood despite recognition of overlapping epitopes (Figure 2C). A similar kind of structural paratope plasticity was previously observed for a set of Anticalins directed against the extra-domain B of oncofetal fibronectin [71]. Of note, the clinical-stage mAb IGN523 targets the same loop L2 (residues 374–401) of hCD98hcED, also with picomolar affinity [22, 73]. Treatment of patients in a phase I clinical trial did not lead to severe adverse effects, suggesting that this epitope of CD98hc can be targeted safely.

In spite of its remarkable antigen affinity, suitable for *in vivo* tumor targeting, the Anticalin candidate P3D11 suffered from low thermal stability and pronounced aggregation after prolonged incubation at 37 °C. To overcome this obstacle, we employed directed evolution via moderate random mutagenesis in combination with high throughput sorting using a recently developed system for the bacterial surface display of Anticalins [54]. By applying an elevated temperature during protein expression, the selection of variants showing improved protein folding and stability was enforced. With just two additional amino acid substitutions – Phe71Ser and Gly81Val (located in loop #2 and β -strand D, respectively) – the variant D11vs exhibited both improved affinity (approximately three-fold) as well as significantly increased melting temperature (by ~8 °C; cf. **Figure 3C and Table 1**), thus nicely illustrating the power of directed evolution for stability engineering of Anticalin proteins (**Figure S6C**).

Small animal PET/CT imaging and biodistribution analysis with the ^{89}Zr -labeled D11vs radiotracer, whose plasma half-life was optimized using PASylation technology, showed high accumulation in PC-3 xenograft tumors with good imaging contrast and pronounced specificity, as blocking of CD98hc binding by co-application of unlabeled D11vs-PAS200 reduced tracer accumulation by ~40%. These findings were in line with *in vitro* cytofluorometry and immunofluorescence microscopy, where highly specific binding of D11vs on several CD98hc-positive human cancer cell lines, but not under conditions of a blocked CD98hc epitope, was evident. Tracer uptake in kidney, liver, spleen and joints of the xenograft mice was as expected due to the known *in vivo* release of $^{89}\text{Zr(IV)}$ from the radiochelator [77, 82]. Superior ^{89}Zr -chelating reagents with higher *in vivo* stability, as for example fusarinine C, a cyclic siderophore from *Aspergillus fumigatus* [83, 84], may be an option for future experiments.

In conclusion, we have selected and engineered a human CD98hcED-specific Anticalin with high affinity and successfully applied it for CD98hc-targeted PET imaging. This novel radiopharmaceutical demonstrated high tumor uptake in prostate carcinoma as well as B-cell lymphoma xenograft mouse models with excellent tumor visualization. To our knowledge, this is the first *in vivo* imaging study of CD98hc overexpression on tumor cells described in the literature. Considering the clinical importance of elevated CD98hc expression in several human cancers, this Anticalin, charged with appropriate radionuclides or toxic payloads,

constitutes a promising new tool for preclinical and, potentially, clinical applications in oncology.

Abbreviations

BAP: biotin acceptor peptide; BSD: bacterial surface display; CD: circular dichroism; CT: computer tomography; CD98hc: Cluster of Differentiation 98 heavy chain; CD98lc: Cluster of Differentiation 98 light chain; FACBC: trans-1-amino-3- ^{18}F -fluorocyclobutanecarboxylic acid; FACS: fluorescence-activated cell sorting; FET: ^{18}F -fluoroethyl-L-tyrosine; m/hCD98hcED: mouse/human CD98hc extracellular domain; ΔG^0 : Gibb's free energy of unfolding; ΔH_m : enthalpy of unfolding; %ID/g: percent injected dose per gram tissue; IMAC: immobilized metal ion affinity chromatography; K_D : equilibrium dissociation constant; mAb: monoclonal antibody; PET: positron emission tomography; RMSD: root-mean-square deviation; ROI: region of interest; SPR: surface plasmon resonance; TLC: thin layer chromatography; T_m : melting temperature; wtLcn2: wild type Lipocalin 2

Supplementary Material

Supplementary methods, figures, and tables.
<http://www.thno.org/v10p2172s1.pdf>

Acknowledgements

The authors wish to thank the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, for allocation of synchrotron radiation beamtime and financial travel support as well as Christian Feiler for his support at the beamline 14.2. Furthermore, we thank Klaus Wachinger and Marie Motyka (Lehrstuhl für Biologische Chemie, TUM), Birgit Blechert, Miriam Bräuer, Markus Mittelhäuser and Sandra Schäfer (Klinik für Nuklearmedizin, TUM) as well as Olga Seelbach (Institute of Pathology, TUM) for excellent technical assistance. We are grateful to Profs. Bernhard Küster and Hannelore Daniel (TUM) for providing the cell lines Raji, SU-DHL-4 and Caco-2 and to Prof. Manuel Palacín and Sara Cano (both at IRB Barcelona) for generously providing the HEK293T and its CD98hc knock-out cell lines. This study was supported by the German Research Foundation (DFG) in frame of the Collaborative Research Centre 824 (projects A08 and Z02). Anticalin® is a registered trademark of Pieris Pharmaceuticals GmbH. PASylation® is a registered trademark of XL-protein GmbH.

Author Contributions

F.-C.D., V.M. and A.Sk. conceived the overall study and interpreted the data. F.-C.D., V.M., A.Sc. and A.Sk. wrote the manuscript. F.-C.D. selected,

engineered and characterized the lipocalin variants, crystallized the protein complex, designed and performed *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* experiments and analyzed the data. V.M. designed and performed *ex vivo* and *in vivo* experiments and analyzed the data. A.Sc. determined the crystal structure, analyzed and interpreted the data. C.B. designed and performed *in vitro* experiments. S.R. acquired the *in vivo* imaging data. S.B. and K.S. performed and interpreted the histopathological analysis. M.S. and W.W. gave advice on experimental design and interpreted data. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing Interests

A.Sk. is cofounder and shareholder of Pieris Pharmaceuticals, Inc. and of XL-protein GmbH. M.S. has received a commercial research grant from Siemens Medical Solutions and has been acting as consultant for Siemens. W.W. serves on advisory boards and receives compensation from Bayer, Blue Earth Diagnostics, Endocyte and Pentixapharm; also, he has received research support from BMS, Imaginab, Ipsen and Piramal.

References

- Cantor JM, Ginsberg MH. CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J Cell Sci.* 2012; 125: 1373-82.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; 347: 1260419.
- Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* 2013; 34: 139-58.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem.* 1998; 273: 23629-32.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem.* 1999; 274: 19738-44.
- Torrents D, Estevez R, Pineda M, Fernandez E, Lloberas J, Shi YB, et al. Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem.* 1998; 273: 32437-45.
- Broer A, Wagner CA, Lang F, Broer S. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. *Biochem J.* 2000; 349: 787-95.
- Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, et al. Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *J Biol Chem.* 2000; 275: 9690-8.
- Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274: 11455-8.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3009-16.
- Yan R, Zhao X, Lei J, Zhou Q. Structure of the human LAT1-4F2hc heterodimeric amino acid transporter complex. *Nature.* 2019; 568: 127-30.
- Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell.* 2009; 136: 521-34.
- Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, Gan B. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun.* 2018; 38: 12.
- Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015; 34: 111.
- Bajaj J, Konuma T, Lytle NK, Kwon HY, Ablack JN, Cantor JM, et al. CD98-mediated adhesive signaling enables the establishment and propagation of acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2016; 30: 792-805.
- Cantor JM, Ginsberg MH, Rose DM. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev.* 2008; 223: 236-51.
- Henderson NC, Collis EA, Mackinnon AC, Simpson KJ, Haslett C, Zent R, et al. CD98hc (SLC3A2) interaction with $\beta 1$ integrins is required for transformation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54731-41.
- Miyamoto YJ, Mitchell JS, McIntyre BW. Physical association and functional interaction between $\beta 1$ integrin and CD98 on human T lymphocytes. *Mol Immunol.* 2003; 39: 739-51.
- Zent R, Fenczik CA, Calderwood DA, Liu S, Dellos M, Ginsberg MH. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin β cytoplasmic domains. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5059-64.
- Ye Y, Wang M, Wang B, Yang X-M, Chen Z-N. CD98, a potential diagnostic cancer-related biomarker, and its prognostic impact in colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017; 10: 5418-29.
- Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 3473-81.
- Hayes GM, Chinn L, Cantor JM, Cairns B, Levasheva Z, Tran H, et al. Antitumor activity of an anti-CD98 antibody. *Int J Cancer.* 2015; 137: 710-20.
- El Ansari R, Craze ML, Diez-Rodriguez M, Nolan CC, Ellis IO, Rakha EA, et al. The multifunctional solute carrier 3A2 (SLC3A2) confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes. *Brit J Cancer.* 2018; 118: 1115-22.
- Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* 2012; 103: 382-9.
- Wang Q, Tiffen J, Bailey CG, Lehman ML, Ritchie W, Fazli L, et al. Targeting amino acid transport in metastatic castration-resistant prostate cancer: Effects on cell cycle, cell growth and tumor development. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 1463-73.
- Salter DM, Krajewski AS, Sheehan T, Turner G, Cuthbert RJ, McLean A. Prognostic significance of activation and differentiation antigen expression in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1989; 159: 211-20.
- Digomann D, Kurth I, Tyutyunnykova A, Chen O, Lock S, Gorodetska I, et al. The CD98 heavy chain is a marker and regulator of head and neck squamous cell carcinoma radiosensitivity. *Clin Cancer Res.* 2019; 25: 3152-63.
- Yang H, Zou W, Li Y, Chen B, Xin X. Bridge linkage role played by CD98hc of anti-tumor drug resistance and cancer metastasis on cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2007; 6: 942-7.
- Kaira K, Ohde Y, Endo M, Nakagawa K, Okumura T, Takahashi T, et al. Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol Rep.* 2011; 26: 931-7.
- Rietbergen MM, Martens-de Kemp SR, Bloemena E, Witte BI, Brink A, Baatenburg de Jong RJ, et al. Cancer stem cell enrichment marker CD98: A prognostic factor for survival in patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer.* 2014; 50: 765-73.
- Prager GW, Poettler M, Schmidinger M, Mazal PR, Susani M, Zielinski CC, et al. CD98hc (SLC3A2), a novel marker in renal cell cancer. *Eur J Clin Invest.* 2009; 39: 304-10.
- Isoda A, Kaira K, Iwashina M, Oriuchi N, Tominaga H, Nagamori S, et al. Expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) as a prognostic and therapeutic indicator in multiple myeloma. *Cancer Sci.* 2014; 105: 1496-502.
- Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms. *Cancer Sci.* 2008; 99: 2380-6.
- Toyoda M, Kaira K, Shino M, Sakakura K, Takahashi K, Takayasu Y, et al. CD98 as a novel prognostic indicator for patients with stage III/IV hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2015; 37: 1569-74.
- Hayashi K, Anzai N. Novel therapeutic approaches targeting L-type amino acid transporters for cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol.* 2017; 9: 21-9.
- Salisbury TB, Arthur S. The regulation and function of the L-type amino acid transporter 1 (LAT1) in cancer. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 2373.

37. Barollo S, Bertazza L, Watutantrige-Fernando S, Censi S, Cavedon E, Galuppini F, et al. Overexpression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 2 (LAT2): Novel markers of neuroendocrine tumors. *PLoS One* 2016; 11: e0156044.
38. Sugano K, Maeda K, Ohtani H, Nagahara H, Shibutani M, Hirakawa K. Expression of xCT as a predictor of disease recurrence in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35: 677-82.
39. Ji X, Qian J, Rahman SMJ, Siska PJ, Zou Y, Harris BK, et al. xCT (SLC7A11)-mediated metabolic reprogramming promotes non-small cell lung cancer progression. *Oncogene.* 2018; 37: 5007-19.
40. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, et al. Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Sci.* 2009; 100: 249-54.
41. Nakanishi K, Ogata S, Matsuo H, Kanai Y, Endou H, Hiroi S, et al. Expression of LAT1 predicts risk of progression of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch A.* 2007; 451: 681-90.
42. Bixby D, Wieduwilt MJ, Akard LP, Khoury HJ, Becker PS, Van Der Horst EH, et al. A phase I study of IGN523, a novel anti-CD98 monoclonal antibody in patients with relapsed or refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2015; 126: 3809.
43. Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: Targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res.* 2015; 5: 1281-94.
44. Klasner BD, Krause BJ, Beer AJ, Drzezga A. PET imaging of gliomas using novel tracers: A sleeping beauty waiting to be kissed. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010; 10: 609-13.
45. Savir-Baruch B, Zanoni L, Schuster DM. Imaging of prostate cancer using fluciclovine. *Urol Clin North Am.* 2018; 45: 489-502.
46. Ikotun OF, Marquez BV, Huang C, Masuko K, Daiji M, Masuko T, et al. Imaging the L-type amino acid transporter-1 (LAT1) with Zr-89 immunoPET. *PLoS One* 2013; 8: e77476-e.
47. Mendler CT, Friedrich L, Laitinen I, Schlapschy M, Schwaiger M, Wester HJ, et al. High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MABs.* 2015; 7: 96-109.
48. Richter A, Eggenstein E, Skerra A. Anticalins: Exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.* 2014; 588: 213-8.
49. Rothe C, Skerra A. Anticalin® proteins as therapeutic agents in human diseases. *BioDrugs.* 2018; 32: 233-43.
50. Schlapschy M, Binder U, Borger C, Theobald I, Wachinger K, Kislung S, et al. PASylation: A biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel.* 2013; 26: 489-501.
51. Gebauer M, Schiefner A, Matschiner G, Skerra A. Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol.* 2013; 425: 780-802.
52. Friedrich L, Kornberger P, Mendler CT, Multhoff G, Schwaiger M, Skerra A. Selection of an Anticalin® against the membrane form of Hsp70 via bacterial surface display and its theranostic application in tumour models. *Biol Chem.* 2018; 399: 235-52.
53. Barkovskiy M, Ilyukhina E, Dauner M, Eichinger A, Skerra A. An engineered lipocalin that tightly complexes the plant poison colchicine for use as antidote as well as bioanalytical applications. *Biol Chem.* 2018; 400: 351-66.
54. Binder U, Matschiner G, Theobald I, Skerra A. High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. *J Mol Biol.* 2010; 400: 783-802.
55. Jose J, Kramer J, Klausner T, Pohlner J, Meyer TF. Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga β autotransporter pathway. *Gene.* 1996; 178: 107-10.
56. Costa J, Grabenhorst E, Nimtz M, Conradt HS. Stable expression of the Golgi form and secretory variants of human fucosyltransferase III from BHK-21 cells. *J Biol Chem.* 1997; 272: 11613-21.
57. Klein G, Giovannella B, Westman A, Stehlin JS, Mumford D. An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by *in vitro* infection. *Intervirology.* 1975; 5: 319-34.
58. Epstein MA, Barr YM. Characteristics and mode of growth of tissue culture strain (EB1) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 1965; 34: 231-40.
59. Epstein AL, Herman MM, Kim H, Dorfman RF, Kaplan HS. Biology of the human malignant lymphomas III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer.* 1976; 37: 2158-76.
60. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979; 17: 16-23.
61. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 1978; 21: 274-81.
62. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 58: 209-14.
63. Fuchs R, Stracke A, Holzmann V, Luschin-Ebengreuth G, Meier-Allard N, Ebner N, et al. Prazosin induced lysosomal tubulation interferes with cytokinesis and the endocytic sorting of the tumour antigen CD98hc. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018; 1865: 1211-29.
64. de la Ballina LR, Cano-Crespo S, Gonzalez-Munoz E, Bial S, Estrach S, Cailleteau L, et al. Amino acid transport associated to cluster of differentiation 98 heavy chain (CD98hc) is at the cross-road of oxidative stress and amino acid availability. *J Biol Chem.* 2016; 291: 9700-11.
65. Schlehuber S, Skerra A. Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called ‘anticalin’ – using a molecular random approach. *Biophys Chem.* 2002; 96: 213-28.
66. Vosjan MJ, Perk LR, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc.* 2010; 5: 739-43.
67. Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, O'Brien R, Bibel M, Schiess R, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2009; 27: 378-86.
68. Barinka C, Ptacek J, Richter A, Novakova Z, Morath V, Skerra A. Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel.* 2016; 29: 105-15.
69. Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci.* 1999; 8: 921-9.
70. Fort J, de la Ballina LR, Burghardt HE, Ferrer-Costa C, Turnay J, Ferrer-Orta C, et al. The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007; 282: 31444-52.
71. Schiefner A, Gebauer M, Richter A, Skerra A. Anticalins reveal high plasticity in the mode of complex formation with a common tumor antigen. *Structure.* 2018; 26: 649-56.
72. Deuschle FC, Schiefner A, Skerra A. Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins.* 2019; 87: 693-8.
73. Lippincott J, Van Der Horst E, Zachwieja J, Tran H. Anti-CD98 antibodies and methods of use thereof. *WO 2013/078377 A1.*
74. Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84: 6663-7.
75. Binder U, Skerra A. PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2017; 31: 10-7.
76. Papetti M, Herman IM. Controlling tumor-derived and vascular endothelial cell growth: role of the 4F2 cell surface antigen. *Am J Pathol.* 2001; 159: 165-78.
77. Fischer G, Seibold U, Schirmacher R, Wangler B, Wangler C. ⁸⁹Zr, a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges. *Molecules.* 2013; 18: 6469-90.
78. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice. *Nucl Med Biol.* 2011; 38: 675-81.
79. Richter A, Skerra A. Anticalins directed against vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) with picomolar affinities show potential for medical therapy and *in vivo* imaging. *Biol Chem.* 2017; 398: 39-55.
80. Rauth S, Hinz D, Börger M, Uhrig M, Mayhaus M, Riemenschneider M, et al. High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer β -amyloid peptide. *Biochem J.* 2016; 473: 1563-78.
81. Dauner M, Eichinger A, Lucking G, Scherer S, Skerra A. Reprogramming human siderocalin to neutralize petrobactin, the essential iron scavenger of anthrax bacillus. *Angew Chem Int Ed* 2018; 57: 14619-23.
82. Mendler CT, Gehring T, Wester HJ, Schwaiger M, Skerra A. ⁸⁹Zr-labeled versus ¹²⁴I-labeled α HER2 Fab with optimized plasma half-life for high-contrast tumor imaging *in vivo*. *J Nucl Med.* 2015; 56: 1112-8.
83. Sumner D, Garousi J, Oroujeni M, Mitran B, Andersson KG, Vorobyeva A, et al. Cyclic versus noncyclic chelating scaffold for ⁸⁹Zr-labeled ZEGFR:2377 Affibody bioconjugates targeting epidermal growth factor receptor overexpression. *Mol Pharm.* 2018; 15: 175-85.
84. Sumner D, Rangger C, Klingler M, Laverman P, Franssen GM, Lechner BE, et al. Exploiting the concept of multivalency with ⁶⁸Ga- and

⁸⁹Zr-labeled fusarinine C-minigastrin bioconjugates for targeting CCK2R expression. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018; 3171794.

SUPPORTING INFORMATION

Development of a high affinity Anticalin directed against human CD98hc for theranostic applications

Friedrich-Christian Deuschle¹, Volker Morath², André Schiefner¹, Corinna Brandt¹, Simone Ballke³, Sybille Reder², Katja Steiger³, Markus Schwaiger², Wolfgang Weber² and Arne Skerra^{1*}

¹ Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

² Department of Nuclear Medicine, Klinikum rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 München, Germany

³ Institute of Pathology, Klinikum rechts der Isar, School of Medicine, Technical University of Munich, 81675 München, Germany

*Corresponding author:

Prof. Dr. Arne Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany

Phone: +49 8161 71 4351; Fax: +49 8161 71 4352; e-mail: skerra@tum.de

SUPPORTING METHODS

Soluble production and purification of the monobiotinylated human and murine CD98hc ectodomains

The human and murine CD98hcED (UniProt ID P08195-2, residues Glu111–Ala529, and UniProt ID P10852-1, residues Glu105–Ala526, respectively) were produced in *E. coli* strain BL21 (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany) using the expression plasmid pASK-IBA5(+)-BAP-m/hCD98hcED (Figure S1A) and in human embryonic kidney (HEK) 293E cells (MEXi-293E expression system; IBA Lifesciences, Göttingen, Germany) transiently transfected with pDSG-BM-His₆-BAP-m/hCD98hcEDg-Igk-BirA-*Strep*DEL (*Strep*DEL corresponds to a fusion between the *Strep*-tag II amino acid sequence, WSHPQFEK [1], and the endoplasmic reticulum retention signal sequence, KDEL [2]).

For expression in *E. coli*, BL21 was co-transformed with pBirAcm (Avidity, Aurora, CO) encoding biotin ligase, and heterologous gene expression was induced with 0.5 mg/L anhydrotetracycline (aTc) and 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 12 h at 26 °C in 2 L 2xYT medium. Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in anion-exchange chromatography (AEX) buffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and disrupted with a PandaPLUS 2000 homogenizer (GEA Niro Soavi, Parma, Italy). The recombinant CD98hc ectodomain was purified from the whole cell extract by AEX using a MacroCap Q column (GE Healthcare, Munich, Germany) equilibrated with AEX buffer using a 3-step gradient (step 1: 50 mM; step 2: 190 mM; step 3: 500 mM NaCl). Appropriate fractions from step 2 were pooled, dialyzed against 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and applied to a 5 mL column carrying a streptavidin mutant which allows binding of biotinylated proteins and competitive elution via an excess of free biotin (unpublished). After elution using 5 mM biotin in the same buffer, preparative size-exclusion chromatography (SEC) was performed on a 24 mL Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) using PBS (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4) as running buffer.

Production of the m/hCD98hcEDg in MEXi-293E cells was essentially performed as recommended by the vendor of this expression system. Briefly, cells were cultivated in MEXi culture medium supplemented with 50 mg/l G-418 and 8 mM L-alanyl-L-glutamine at 37 °C under humidified 5% CO₂ atmosphere. 250 mL culture medium containing 5×10⁶ cells/mL were transfected with 5 µg plasmid DNA per 1×10⁶ cells, previously mixed at a 1:3 mass ratio with 25 kDa linear polyethyleneimine (PEI; Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) in MEXi transfection medium. After 4 h incubation at 37 °C, 500 mL of MEXi cultivation medium was added and secretory expression was continued for 4 days. After sedimentation of the cells by centrifugation, the supernatant was dialyzed against immobilized metal ion affinity

chromatography (IMAC) buffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl), and IMAC was performed on a Ni(II)-charged HisTrap HP column (GE Healthcare). Elution fractions obtained after applying a linear concentration gradient of 0–300 mM imidazole/HCl in IMAC buffer were pooled, followed by streptavidin affinity chromatography and preparative SEC as described above.

Analytical SEC and SDS-PAGE

Analytical SEC was performed on a 24 mL Superdex 200 10/300 GL column using PBS at a flow rate of 0.5 mL/min. For apparent molecular weight determination, the column was calibrated with the following standard proteins (Sigma-Aldrich, Munich, Germany): thyroglobulin (669 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). The void volume of the column was determined using Blue Dextran (Sigma-Aldrich). Based on the elution volumes, the partition coefficients K_{av} were calculated and used to interpolate, via linear regression, the apparent molecular sizes of the analyzed proteins.

SDS-PAGE was performed using a high molarity Tris buffer system [3] with or without the addition of 2-mercaptoethanol in the sample buffer, followed either by staining with Coomassie brilliant blue or, for corresponding protein conjugates, by direct detection of Sulfo-Cy5.5 fluorescence using an Ettan DIGE fluorescence scanner (GE Healthcare) with an excitation wavelength of 635/30 nm and a 680/30 nm emission band-path filter.

Enzymatic cleavage of N-linked sugars from m/hCD98hcEDg

N-linked glycans were enzymatically removed from m/hCD98hcEDg produced in MEXi-293E cells using Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F; New England Biolabs, Ipswich, MA). 5 µg protein in PBS were first denatured in the presence of 0.5% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and 40 mM dithiothreitol (DTT) for 10 min at 100 °C. Subsequently, a 1/10 volume of 500 mM NaPi pH 7.5 and of 10% (v/v) NP-40 as well as 250 units of PNGase F were added. After incubation for 1 h at 37 °C the sample was subjected to SDS-PAGE for comparison with the untreated ectodomain (Figure S1D).

Protein crystallization and structure determination

For protein crystallization, a variant of hCD98hcED with N-terminal *Strep*-tag II was produced in the *E. coli* strain BL21 as previously described [4] (Figure S1A). After incubation with the purified lipocalin variant P3D11 at 1:1 molar ratio for 1 h at 4 °C, the P3D11•hCD98hcED

complex was isolated via SEC on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) and directly eluted in crystallization buffer comprising 10 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.02% (w/v) NaN₃. The complex was concentrated to 15.7 mg/mL using a 30 kDa MWCO Amicon ultracentrifugation filter (Merck Millipore, Burlington, MA) and subjected to crystallization by vapor diffusion in hanging drops at 20 °C. Diffraction quality crystals were obtained by mixing 1 µL of the P3D11•hCD98hcED solution with 1 µL of reservoir solution containing 18% (w/v) PEG3350 and 100 mM Na-malonate pH 4.75. Suitable crystals were transferred into cryoprotectant consisting of 19% (w/v) PEG3350, 100 mM Na-malonate pH 5.0 and 20% (v/v) ethylene glycol prior to flash cooling in liquid nitrogen.

X-ray diffraction data were collected at the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, BESSY beamline 14.2 [5] and reduced with the XDS package [6] (Table S4). The crystal structure was solved by molecular replacement with Phaser [7] using the hCD98hcED (PDB entry 2DH2) [8] and the α ED-B Anticalin N7A (PDB entry 4GH7) [9] as search models. Manual rebuilding and refinement were performed with Coot [10] and Refmac5 [11], respectively. Translation, libration and screw (TLS) groups were determined with TLSMD [12]. The asymmetric unit of space group C2 contained two P3D11•hCD98hcED complexes, of which the complex comprising the chain pairs A and B was used for the analysis described in this report due to the overall lower B-factors. Complex N-glycans were modeled on hCD98hcED as previously described [4].

Site-specific thiol labelling of PASylated lipocalin variants via maleimide chemistry

For site-specific labelling at the engineered C-terminal Cys side chain (Figure S8), maleimide-functionalized deferoxamine (Dfo; Macrocylics, Plano, TX) or Sulfo-Cyanine 5.5 (Lumiprobe, Hannover, Germany) was used. To ensure the presence of a free thiol group for homogeneous C-terminal labelling, without cleaving the intramolecular disulfide bridge of the lipocalin variant, the purified protein was incubated with a 20-fold molar concentration of DTT for 1 h at 20 °C in PBS pH 7.4. Then, the buffer was exchanged against 50 mM NaP_i pH 5.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA by gel filtration on a PD-10 column (GE Healthcare). After adjusting the pH to 7.4 using an appropriate volume of Na₃PO₄ and quantification of the protein concentration, a 5-fold molar concentration of the respective coupling reagent was added and incubated for 12 h at 4 °C. Residual reagents were removed using a Superdex 200 10/300 GL column equilibrated in PBS (pH 7.4). Successful 1:1 coupling with Dfo or Sulfo-Cy5.5 was verified using ESI-MS (Figure S8C-D) and the target affinity of each conjugate was measured by SPR spectroscopy (Table S2).

ESI mass spectrometry

Mass spectra of proteins were measured on a maXis mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the positive ion mode. To measure the intact protein mass (under denaturing conditions), the purified protein was dialyzed against 10 mM ammonium acetate pH 6.6 followed by the addition of 50% (v/v) methanol and 0.1% (v/v) acetic acid and applied to the mass spectrometer via a syringe pump operated at 180 μ L/h. The following conditions for the ion-transfer were used: 3400 V capillary voltage, 500 V endplate offset, 4 l/min dry gas at 200 °C temperature, 0.3 bar nebulizer pressure and 3 eV collision energy. Raw spectra were deconvoluted with the Bruker Compass Data Analysis Software using the MaxEnt algorithm [13] (cf. Table S2).

SUPPORTING REFERENCES

1. Voss S, Skerra A. 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.* 1997; 10: 975-82.
2. Denecke J, De Rycke R, Botterman J. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* 1992; 11: 2345-55.
3. Fling SP, Gregerson DS. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem.* 1986; 155: 83-8.
4. Deuschle FC, Schiefner A, Skerra A. Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins.* 2019; 87: 693-8.
5. Mueller U, Darowski N, Fuchs MR, Förster R, Hellmig M, Paithankar KS, et al. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J Synchrotron Radiat.* 2012; 19: 442-9.
6. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D.* 2010; 66: 125-32.
7. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 2007; 40: 658-74.
8. Fort J, de la Ballina LR, Burghardt HE, Ferrer-Costa C, Turnay J, Ferrer-Orta C, et al. The structure of human 4F2hc ectodomain provides a model for homodimerization and electrostatic interaction with plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007; 282: 31444-52.
9. Gebauer M, Schiefner A, Matschiner G, Skerra A. Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol.* 2013; 425: 780-802.
10. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D* 2010; 66: 486-501.
11. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D* 2011; 67: 355-67.
12. Painter J, Merritt EA. TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models. *J Appl Crystallogr.* 2006; 39: 109-11.
13. Ferrige AG, Seddon MJ, Jarvis S, Skilling J, Aplin R. Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 1991; 5: 374-7.
14. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: W375-W83.

15. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 10037-41.
16. Eichinger A, Nasreen A, Kim HJ, Skerra A. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem*. 2007; 282: 31068-75.
17. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002; 10: 1033-43.
18. Schiefner A, Gebauer M, Richter A, Skerra A. Anticalins reveal high plasticity in the mode of complex formation with a common tumor antigen. *Structure*. 2018; 26: 649-56.
19. Schönfeld D, Matschiner G, Chatwell L, Trentmann S, Gille H, Hülsmeier M, et al. 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*. 2009; 106: 8198-203.
20. Skerra A. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1482: 337-50.
21. Binder U, Matschiner G, Theobald I, Skerra A. High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the Escherichia coli cell surface. *J Mol Biol*. 2010; 400: 783-802.
22. Fuchs R, Stracke A, Holzmann V, Luschin-Ebengreuth G, Meier-Allard N, Ebner N, et al. Prazosin induced lysosomal tubulation interferes with cytokinesis and the endocytic sorting of the tumour antigen CD98hc. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018; 1865: 1211-29.

SUPPORTING TABLES**Table S1.** Size determination of the glycosylated and unglycosylated m/hCD98hcED via SEC

Protein	Theoretical mass [kDa]	Apparent size (SEC) [kDa]	Apparent size increase [%] ^a
hCD98hcED	48.4	49.4	-
mCD98hcED	49.3	51.6	-
hCD98hcEDg	49.3	73.1	32.4
mCD98hcEDg	50.2	79.8	37.1

^a caused by the N-linked glycosylation of h/mCD98hcED upon production in MEXi-293E cells versus *E. coli* BL21

Table S2. Protein mass determination of the Anticalins P1E4, P3A12, P3D11, D11vs and the PASylated D11vs versions via ESI-MS

Protein	Theoretical mass [Da]	Measured mass [Da]	Mass difference to uncoupled [Da]
P1E4	21656.6	21656.6 ($\Delta 1.0$)	-
P3A12	21340.2	21339.4 ($\Delta 0.8$)	-
P3D11	21100.8	21101.1 ($\Delta 0.3$)	-
D11vs	21082.8	21082.7 ($\Delta 0.1$)	-
D11vs-PAS200	37933.5	37933.6 ($\Delta 0.1$)	-
D11vs-PAS200-Cys	38036.7	n.d.	-
D11vs-PAS200-Dfo	38748.5 (Dfo: 711.8)	39749.4 ($\Delta 0.9$)	712.7
D11vs-PAS200-Cy5.5	39060.9 (S-Cy5.5: 1024.3)	39062.1 ($\Delta 1.2$)	1025.4

n.d. = not determined

Table S3. Affinities of lipocalin variants for hCD98hcEDg determined via SPR analysis

Lipocalin variant	K_D ^a [nM]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$\tau_{1/2}$ ^b [min]
P1E4	162 ± 20.9	5.6×10^5	9.0×10^{-2}	<1
P3A12	1.9 ± 0.012	2.2×10^4	4.0×10^{-4}	29
P3D11	0.17 ± 0.004	3.0×10^5	5.0×10^{-5}	230
D11vs	0.05 ± 0.003	4.6×10^5	2.2×10^{-5}	523
D11vs-PAS200	0.44 ± 0.011	1.1×10^5	4.7×10^{-5}	245
D11vs-PAS200-Cys	0.32 ± 0.012	1.1×10^5	3.4×10^{-5}	338
D11vs-PAS200-Dfo	0.25 ± 0.003	3.1×10^5	7.7×10^{-5}	149
D11vs-PAS200-Cy5.5	0.31 ± 0.008	1.9×10^5	5.8×10^{-5}	198

^a all measured via single cycle kinetics

^b $\tau_{1/2}$ calculated from $\ln(2)/k_{off}$

Table S4. X-ray data collection for the P3D11•hCD98hcED complex and refinement statistics^a

<i>Data collection</i>	
Space group	C2
Unit cell parameters	a = 202.81 Å, b = 46.05 Å, c = 137.09 Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 106.64^\circ$
Wavelength [Å]	0.9184
Resolution [Å]	30.0 - 1.80 (1.90 - 1.80)
Completeness [%]	99.8 (99.9)
Unique reflections	113253 (16844)
Multiplicity	6.8 (7.0)
Mean I/ σ (I)	23.9 (2.3)
R _{meas} [%]	4.9 (93.4)
Wilson B-factor [Å]	37.4
<i>Refinement</i>	
Resolution [Å]	30.0 - 1.80 (1.85 - 1.80)
Reflections (working)	111018 (8149)
Reflections (test) ^b	2234 (187)
R _{cryst} [%]	18.4 (60.8)
R _{free} [%]	22.6 (67.0)
Protein molecules per au	4
Number of atoms: protein / solvent ^c	9356 / 909
B-values of atoms: protein / solvent [Å ²]	33.3 / 39.2
Ramachandran plot ^d : favored / outliers [%]	96.8 / 0.2
RMSD bonds [Å] / angles [°]	0.02 / 1.76

^a Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

^b Test set corresponds to 2% of all reflections.

^c Solvent refers to waters, ions, ordered buffer or cryoprotectant molecules

^d Ramachandran statistics were calculated with MolProbity [14].

Table S5. Contacts between the P3D11 and hCD98hcED in the crystallized complex

	BSA [\AA^2]	BSA mutated [\AA^2]	HB / SB ^a
P3D11	1424	767	15 / 3
Loop #1	486	156	5 / 2
Loop #2	175	169	2 / -
Loop #3	90	1.0	1 / -
Loop #4	97	77	1 / -
β -barrel	576	364	6 / 1
hCD98hcED	1521	-	15 / 3
Loop L1	288	-	6 / 1
Loop L2	1111	-	6 / 1

^a Hydrogen bonds (HB) / Salt bridges (SB), counting one SB per ion pair

SUPPORTING FIGURES

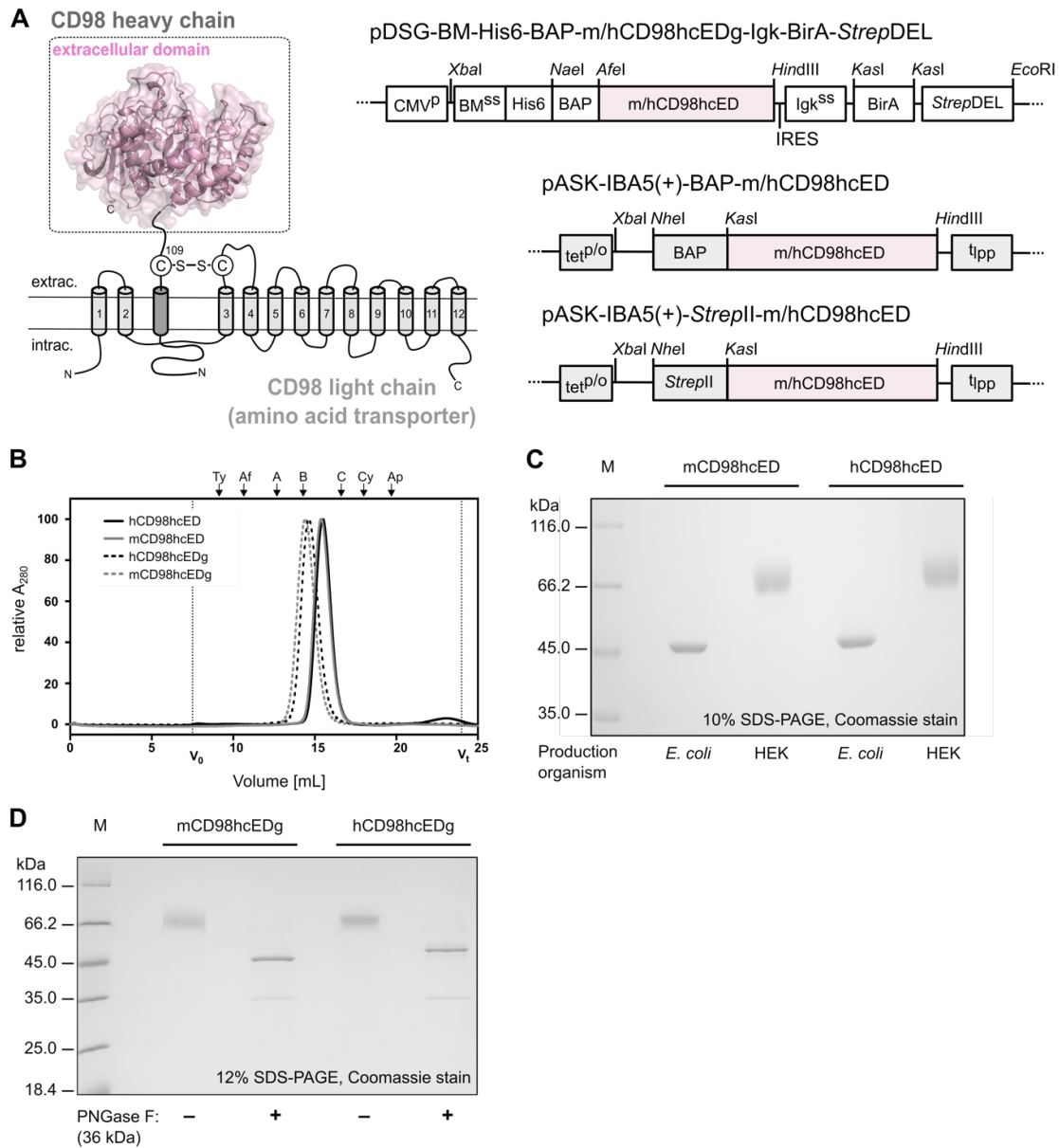


Figure S1. Biochemical characterization of the monobiotinylated human and murine CD98hc ectodomain produced in *E. coli* and MEXi-293E cells. (A) Schematic illustration of the covalently linked CD98hc/lc membrane receptor and plasmid constructs used for the soluble expression of the unglycosylated and glycosylated m/hCD98hc ectodomain. The extracellular domain of CD98hc used for Anticalin selection is highlighted by a rectangle. (B) Apparent size determination of the glycosylated and unglycosylated m/hCD98hcED using analytical SEC, verifying a considerable mass increase due to glycosylation (Table S1). (C) SDS-PAGE of m/hCD98hcEDg purified from MEXi-293E cells or *E. coli*, confirming glycosylation after production in the eukaryotic expression system as apparent from the much larger size. (D) Enzymatic cleavage of N-linked sugars from m/hCD98hcEDg by PNGase F (visible as a faint band at ~36 kDa) and comparison with the glycosylated ectodomain via SDS-PAGE.

An Anticalin targeting CD98hc

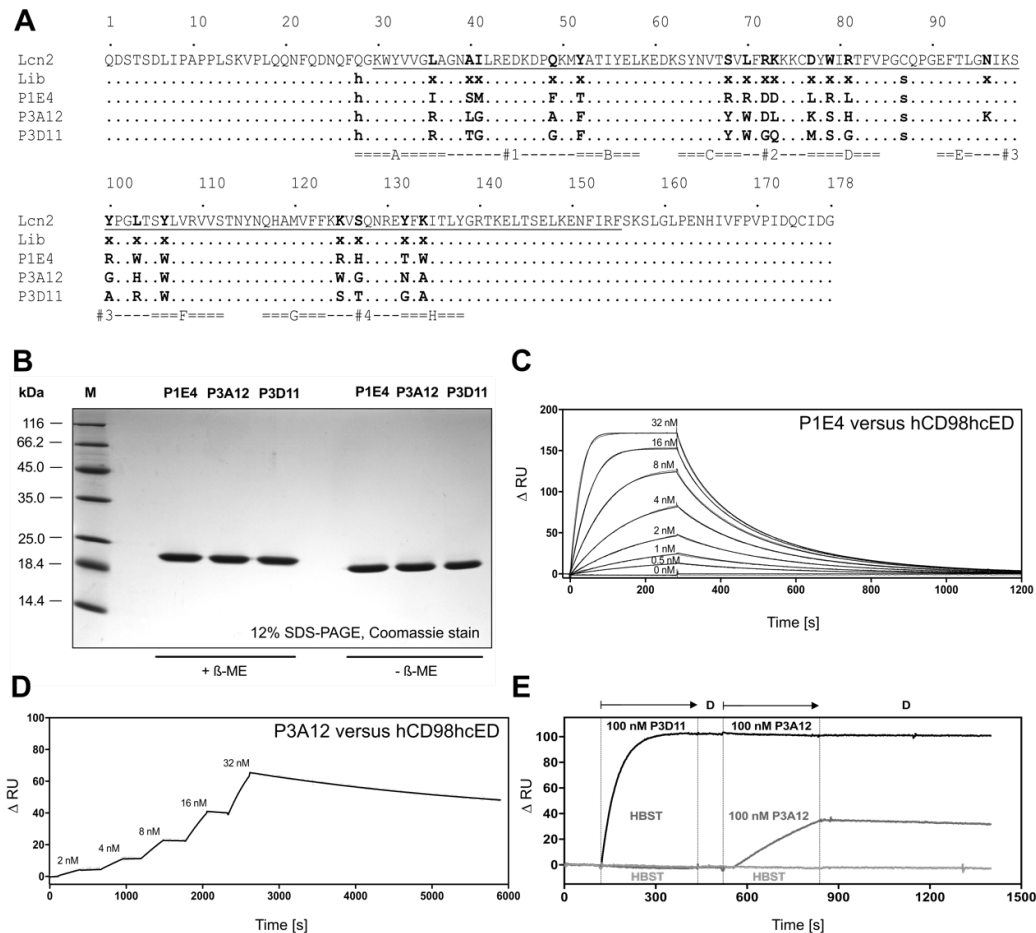


Figure S2. Sequence analysis, expression and functional characterization of the selected lipocalin variants P1E4, P3A12 and P3D11. (A) Amino acid sequence alignment compared to wtLcn2. The central randomized gene cassette flanked by a pair of *Bst*XI sites is underlined, β -stands and structurally hypervariable loops are labeled with letters A–H and numbers #1–#4, respectively. (B) Coomassie-stained SDS-PAGE of the recombinant lipocalin variants after production in *E. coli*. The increased electrophoretic mobility under non-reducing conditions indicates formation of the single structural disulfide bridge in the Lcn2 scaffold. (C, D) Biomolecular interaction analysis between the immobilized hCD98hc ectodomain produced in *E. coli* (Δ RU = 225) and the selected lipocalin variants P3A12 and P1E4 via SPR measurements using multi-cycle (C) and single-cycle (D) procedures. (E) Competitive binding analysis between the lipocalin variants P3D11 and P3A12 by SPR measurement. Binding sites on hCD98hcEDg were saturated with an injection of 100 nM P3D11 followed by injection of 100 nM P3A12, which did not cause an additive RU signal (black line). In contrast, injection of buffer followed by 100 nM P3A12, without prior blocking of the hCD98hcED epitope with P3D11, led to a binding signal for P3A12 (dark gray line). Mock buffer injections are shown as negative control (light gray line).

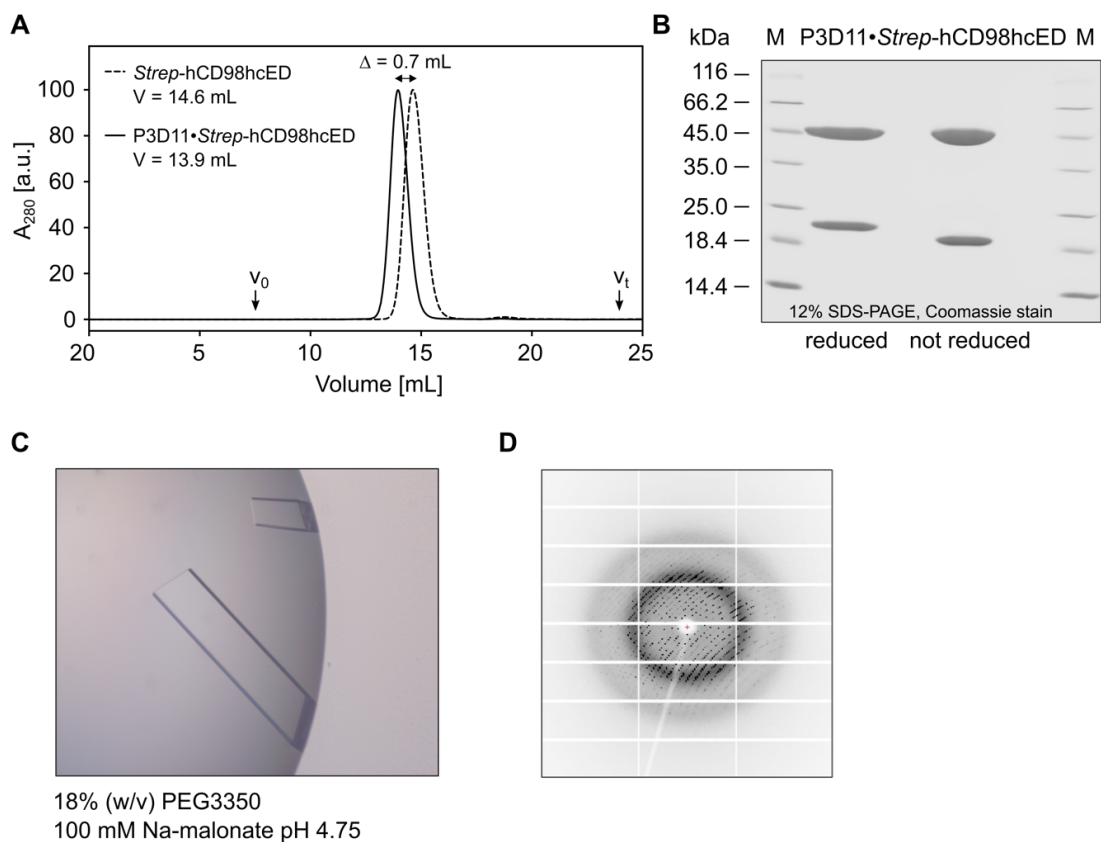


Figure S3. Crystallization of the P3D11•hCD98hcED complex. (A) SEC purification of the 1:1 complex prepared by mixing both recombinant proteins. (B) Analytical SDS-PAGE of the isolated P3D11•hCD98hcED complex with and without the addition of 2-mercaptoethanol. (C) Diffraction quality crystals obtained by vapor diffusion in hanging drops at 20 °C in 18% (w/v) PEG3350 and 100 mM Na-malonate pH 4.75. (D) X-ray diffraction pattern of the large crystal in (C) collected at a wavelength of 0.9184 Å using a Pilatus 2M detector.

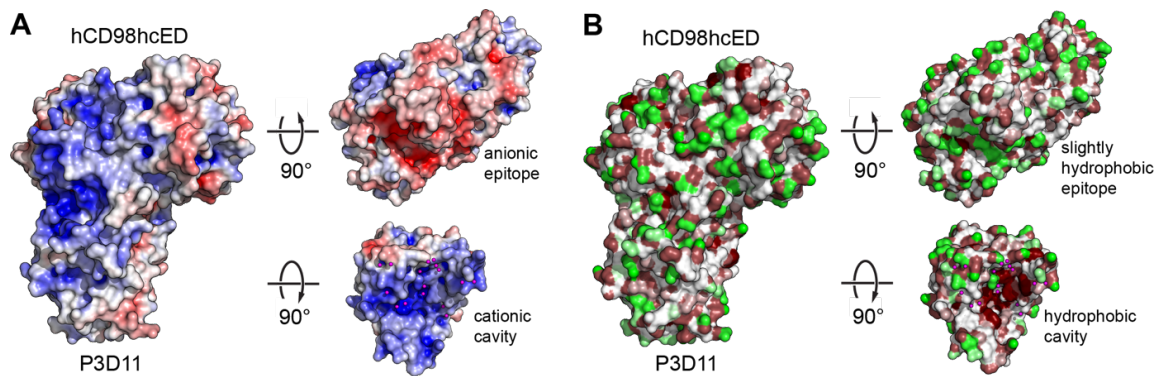


Figure S4. Electrostatic and hydrophobic properties of the P3D11-hCD98hcED complex interface. (A) Electrostatic surface potentials were calculated with APBS [15] and colored from $-10 k_B T/e$ (red) to $+10 k_B T/e$ (blue). (B) Surface hydrophobicity values are shown from brown (hydrophobic) over white (neutral/peptide backbone) to green (polar) [16].

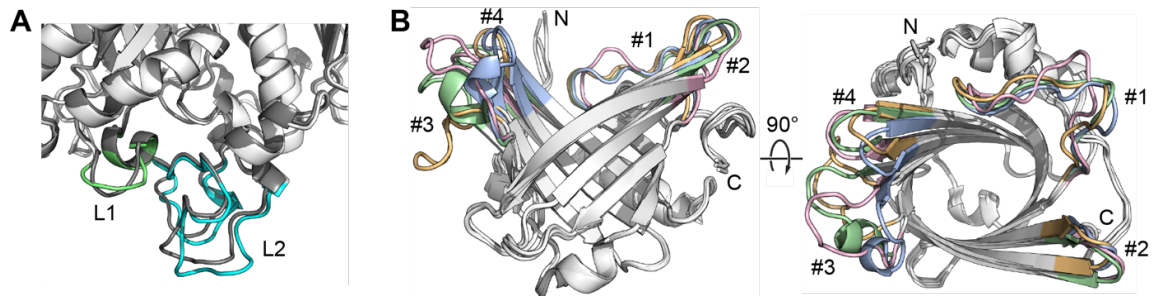


Figure S5. Conformational variations in the components of the P3D11·hCD98hcED complex. (A) Conformational changes of the hCD98hcED loops L1 (green) and L2 (cyan) upon complex formation with P3D11 in comparison with the unbound hCD98hcED (dark gray; PDB code 2DH2). (B) Structural superposition of P3D11 with wtLcn2 (PDB code 1L6M) [17], the fibronectin-specific Anticalin N7E (PDB code 5N47) [18] and the CTLA4-specific Anticalin PRS#003 (PDB code 3BX7) [19] using 58 C α positions that are structurally conserved among the lipocalins [20]. The structurally variable loops are colored pink, blue, yellow and green for P3D11, wtLcn2, N7E and PRS#003, respectively.

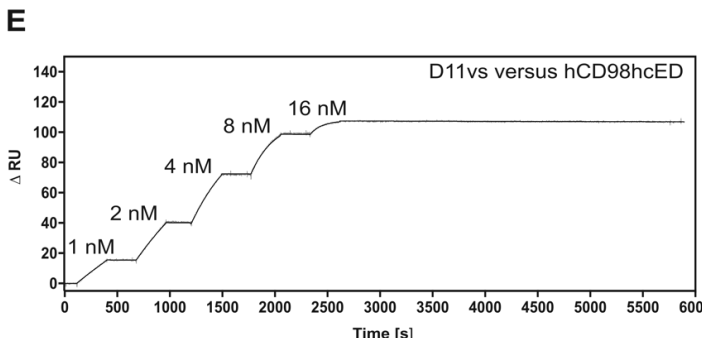
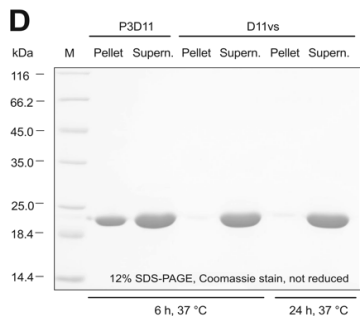
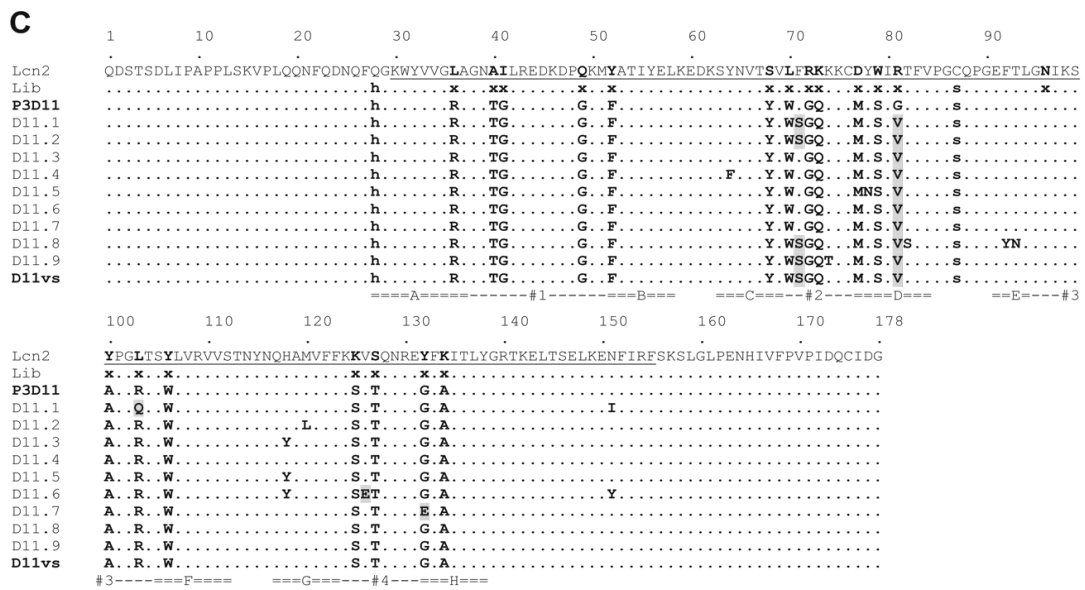
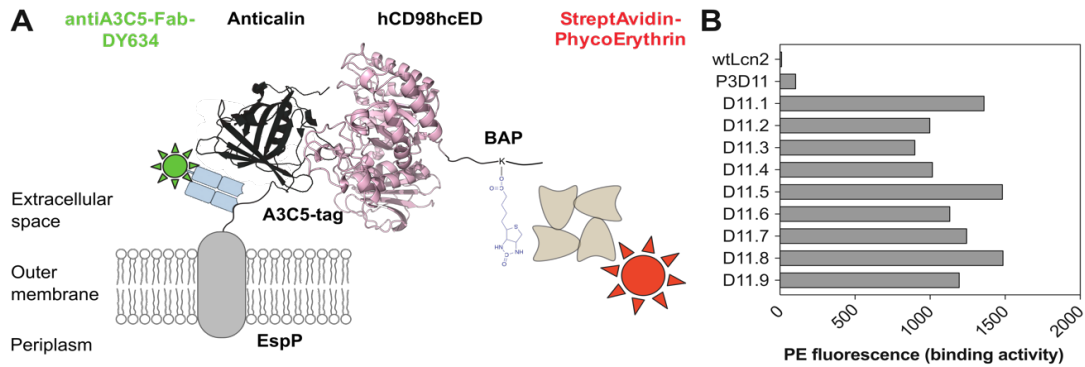


Figure S6. Engineering of the lipocalin variant P3D11 via error prone PCR and bacterial surface display. (A) Schematic depiction of the Lcn2 scaffold presented on the outer membrane of *E. coli* via fusion with the engineered β -domain of the auto-transporter protein EspP [21]. (B) Single clone FACS analysis in the presence of 1 nM biotinylated hCD98hcED after six BSD selection cycles. The mean intensity of PE fluorescence is shown for the individual improved lipocalin variants in comparison with the starting variant P3D11 and with wtLcn2. (C) Amino acid sequence alignment of the improved lipocalin variants derived from P3D11. The variant D11vs was constructed based on this sequence information. (D) Stability testing of the lipocalin variant P3D11 and its engineered version D11vs via incubation at 37 °C for 6 or 24 h followed by SDS-PAGE analysis, indicating aggregate formation (i.e., protein pellet) in the case of P3D11. (E) SPR real-time binding study of the improved variant D11vs toward hCD98hcED using single cycle kinetics. The deduced kinetic constants are listed in Table 1.

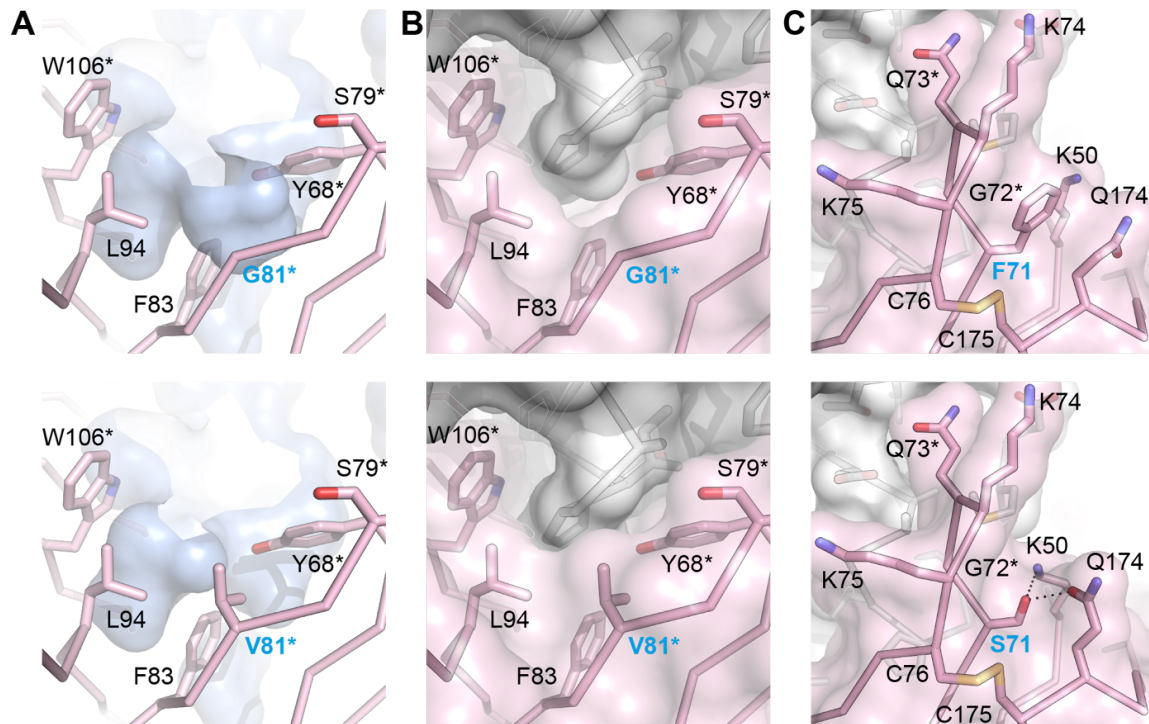


Figure S7. Structural context of side chain substitutions that increase stability and/or target affinity of P3D11. Residues that differ from the Lcn2 scaffold are labeled with asterisks. (A) Hydrophobic cavity (light blue) at the open end of the β -barrel of the lipocalin lined by residues Tyr68, Gly81, Phe83 and Leu94 (top). Substitution of Gly at position 81 by Val partially fills this cavity (bottom). (B) In addition, Val81 improves the contact interface with hCD98hc. (C) Substitution of Phe71 by Ser disrupts the π -stacking between Phe71 and Gln174 but permits hydrogen bond formation with Gln174 and Lys50.

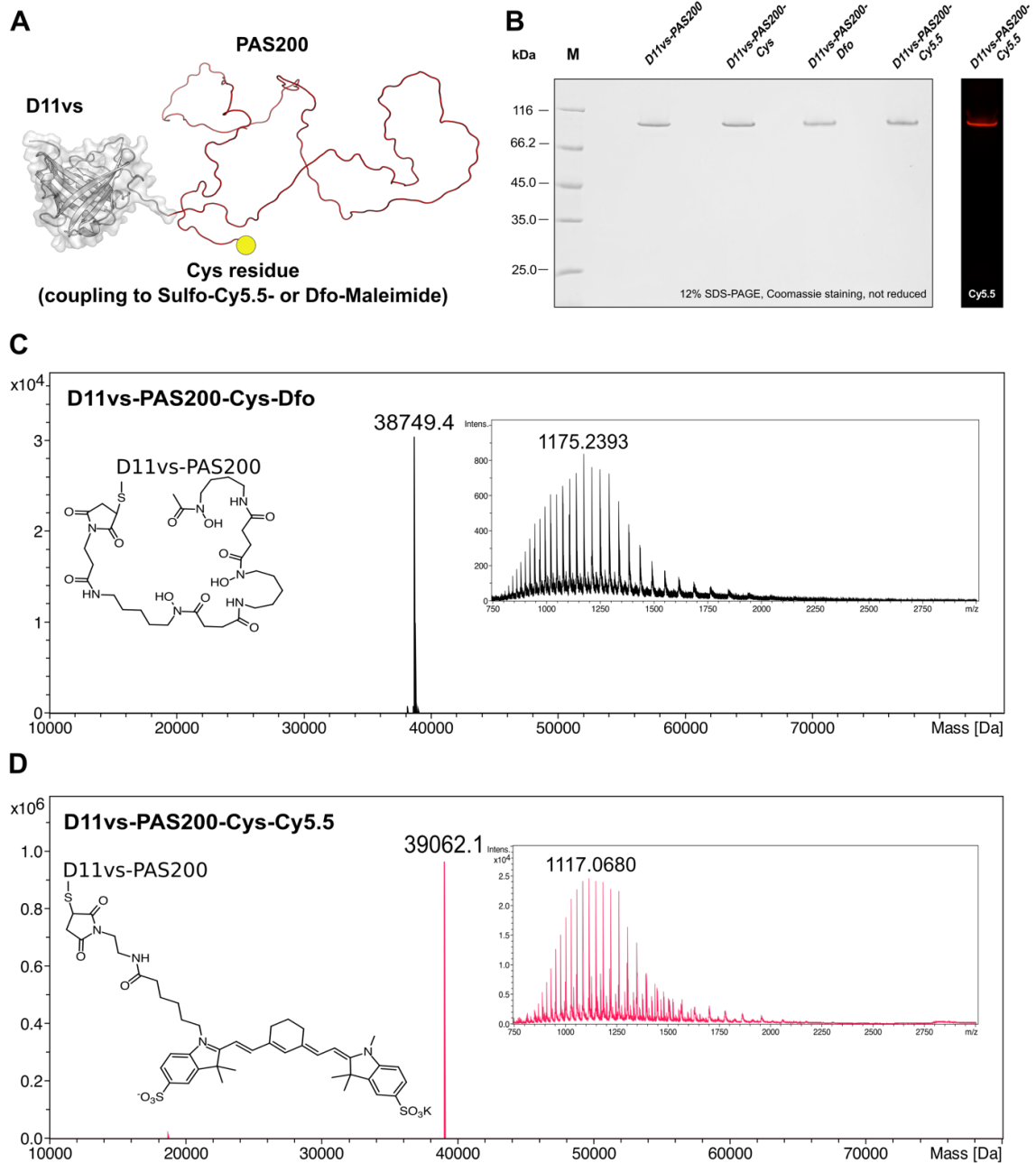


Figure S8. Characterization of PASylated D11vs and its conjugates. (A) Molecular model of the Anticalin D11vs (gray) with a C-terminally attached PAS200 polypeptide (red), including an engineered Cys residue (yellow) at the end. (B) Non-reducing SDS-PAGE of the PASylated D11vs variants used for *in vitro* and *in vivo* studies. For the D11vs-PAS200-Cy5.5 conjugate (rightmost lane), fluorescence was also detected on a fluorescence scanner. (C and D) ESI-MS (deconvoluted, raw data are shown as inset) for D11vs-PAS200-Cys after coupling to Sulfo-Cy5.5 (C) or Dfo (D) using maleimide chemistry, thus confirming homogeneous site-specific labelling (Table S2).

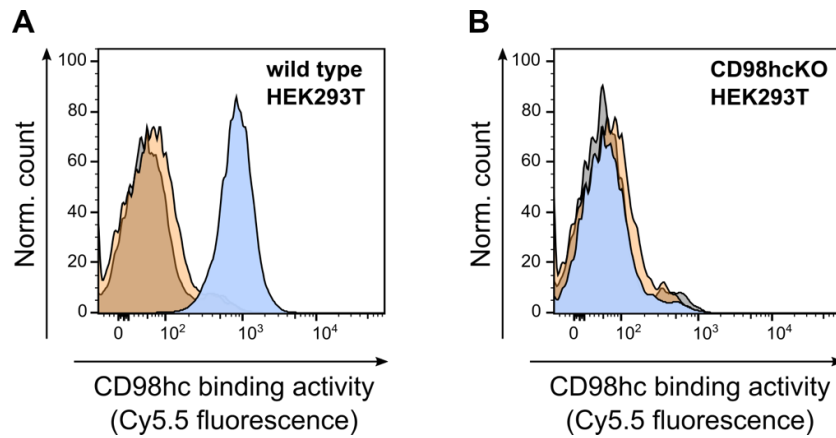


Figure S9. Cytofluorometric staining of CD98hc expressing HEK293T cells in comparison with a derivative CD98hc knock-out (KO) cell line using a PASylated Anticalin. (A) Flow cytometry of wild type HEK293T cells with Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated D11vs (blue histogram). In control experiments, a 10-fold molar concentration of soluble hCD98hcEDg was co-applied for competition (orange histogram) or the cells were treated with Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated wtLcn2 (gray histogram). (B) To test the specificity of the Sulfo-Cy5.5-labeled PASylated D11vs, a HEK293T cell line with a CRISPR/Cas9-mediated SLC3A2 gene knock-out was investigated using the same reagents [22].

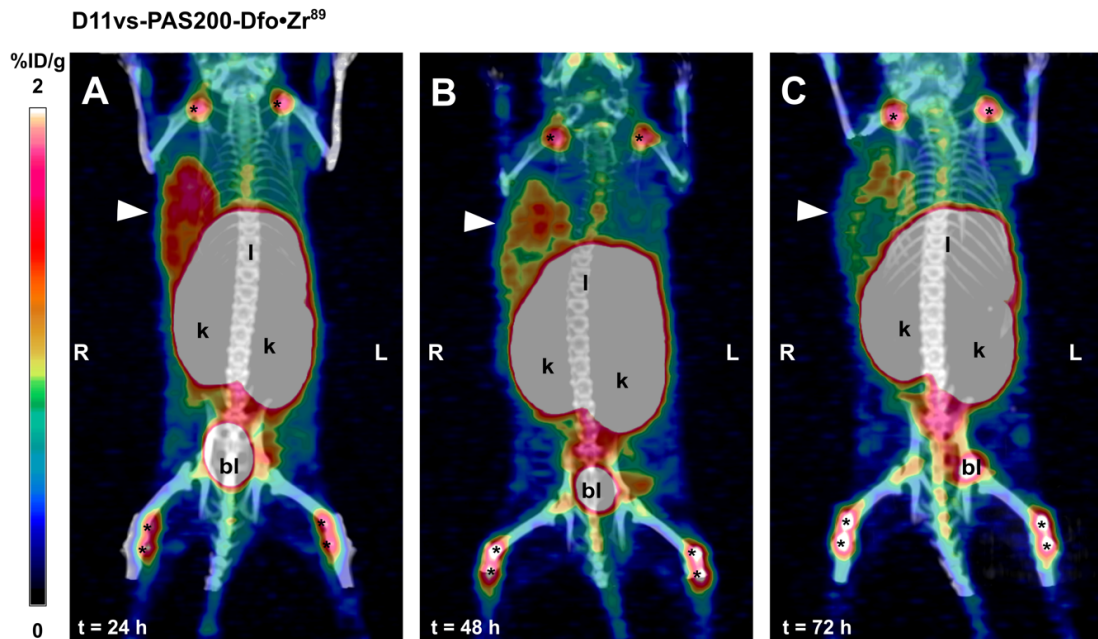


Figure S10. *In vivo* ⁸⁹Zr PET/CT imaging study with PASylated D11vs in a Non-Hodgkin's lymphoma xenograft model. Mice (♀) bearing a Ramos xenograft were injected i.v. with 2.9 MBq D11vs-PAS200-Dfo-Zr⁸⁹ followed by PET/CT imaging at time points (A) 24, (B) 48 and (C) 72 h p.i. Signals were detected in the xenograft tumor (arrowheads), liver (l), kidneys (k), bladder (bl) and the joints (*).

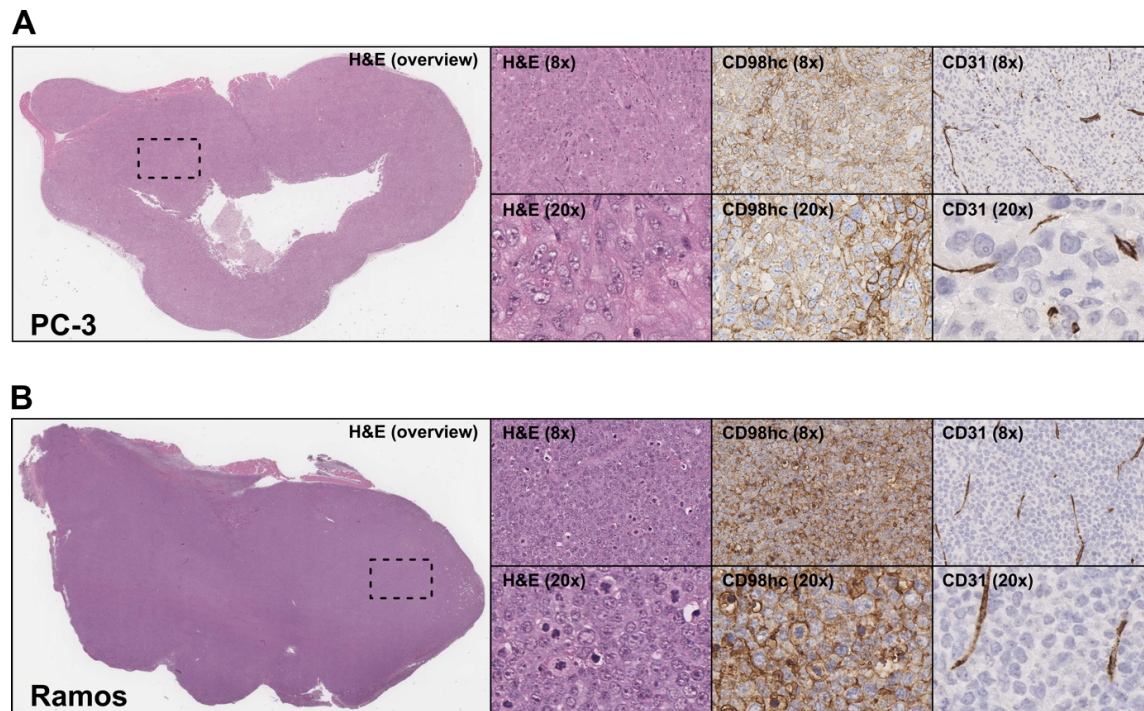


Figure S11. Immunohistochemical characterization of PC-3 and Ramos xenograft tumor sections. Tissue sections of PC-3 (A) and Ramos (B) tumors were stained with H&E as well as with antibodies against CD31 (blood vessels) and CD98hc (magnification is indicated). PC-3 tumor xenografts appeared as solid growing carcinomas with central necrosis. Tumor cells showed numerous mitoses and pale, vacuolated nuclei with multiple nucleoli. The tumors were well-vascularized and showed moderate to strong membrane expression of CD98hc in 80% of the cells, with slight intratumoral heterogeneity. Ramos xenografts were also well-vascularized, consisting of large blastoid cells (lymphoblasts) with high mitotic activity. CD98hc expression was evident in 100% of these cells as revealed by moderate to severe membrane staining.

Veröffentlichung 3

Development of a surrogate Anticalin[®] directed against CD98hc for pre-clinical studies in mice

Autoren: Friedrich-Christian Deuschle, André Schiefner, Corinna Brandt und Arne Skerra

Fachzeitschrift: Protein Science. 8, 1774-1783

Verlag: John Wiley and Sons

Publikationsdatum: 28.05.2020 (online Version)

DOI: 10.1002/pro.3894

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution CC-BY-NC-ND License sowie zusätzlicher Genehmigung des Verlags John Wiley and Sons (RightsLink[®] Lizenzierungsnummer: 4850730415759; Lizenz erteilt am 16.06.2020) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.

Design of a surrogate Anticalin protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice

Friedrich-Christian Deuschle  | André Schiefner  | Corinna Brandt  |
Arne Skerra 

Lehrstuhl für Biologische Chemie,
Technische Universität München,
Freising, Germany

Correspondence

Arne Skerra, Lehrstuhl für Biologische
Chemie, Technische Universität
München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5,
85354 Freising, Germany.
Email: skerra@tum.de

Funding information

Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grant/
Award Number: CRC 824 (A08)

Abstract

The human CD98 heavy chain (CD98hc) offers a promising biomedical target both for tumor therapy and for drug delivery to the brain. We have previously developed a cognate Anticalin protein with picomolar affinity and demonstrated its effectiveness in a xenograft animal model. Due to the lack of cross-reactivity with the murine ortholog, we now report the development and X-ray structural analysis of an Anticalin with high affinity toward CD98hc from mouse. This binding protein recognizes the same protruding epitope loop—despite distinct structure—in the membrane receptor ectodomain as the Anticalin selected against human CD98hc. Thus, this surrogate Anticalin should be useful for the preclinical assessment of CD98hc targeting in vivo and support the translational development for medical application in humans.

KEYWORDS

cancer theranostics, CD98hc, lipocalin, mouse model, protein engineering

1 | INTRODUCTION

The cluster of differentiation (CD) 98 encompasses a family of heterodimeric amino acid transporters (HATs) comprising a glycosylated type-II-transmembrane heavy chain protein (CD98hc, also referred to as 4F2hc or SLC3A2) which is covalently linked via a disulfide-bridge with one of six different light chain transporters (CD98lc, e.g., LAT-1¹ or xCT²). These HATs exhibit different specificities for the transport of cationic, neutral, small neutral, or negatively charged amino acids as well as thyroid hormones (T₃ and T₄) and L-3,4-dihydroxyphenylalanine.³

CD98hc acts as a molecular chaperon that stabilizes the CD98lc proteins and facilitates their proper membrane integration, which is essential for HAT function.^{4,5} Beyond its supporting role for amino acid transport,

CD98hc directly interacts with integrin β -subunits via its cytosolic N-terminal domain and the single transmembrane helix, thereby regulating adhesive cellular signaling, proliferation, survival, and migration.^{6–8} Thus, CD98hc influences both activation of intracellular integrin signaling (including FAK and Akt phosphorylation⁹) as well as integrin-dependent cell-to-cell contacts (e.g., via VCAM-1 expressed on endothelial cells¹⁰ and extracellular fibronectin matrix assembly).¹¹

In accordance with its role at the crossroad of integrin function and cell metabolism, CD98hc is highly expressed in various blood cancers, including lymphoma¹² and leukemia,^{10,13} and in solid tumors such as colorectal cancer,¹⁴ non-small cell lung cancer,^{13,15} triple-negative breast cancer,^{16,17} and metastatic prostate cancer.¹⁸ Thus, CD98hc has emerged as a molecular

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 The Authors. *Protein Science* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of The Protein Society.

target with potential for applications in cancer therapy and diagnosis. Indeed, investigations in several preclinical tumor models using monoclonal antibodies (mAb) or small molecule inhibitors directed toward CD98hc or CD98lc's, respectively, have demonstrated suppression of tumor growth.^{10,13,19}

Apart from that, CD98hc was described as a novel transcytosis receptor expressed in the brain endothelium which can be utilized for the delivery of therapeutics to the central nervous system.²⁰ Efficient crossing of the blood–brain barrier (BBB) constitutes the main obstacle for the development of both biopharmaceuticals and small molecule drugs for the diagnosis and/or treatment of neurological disorders. In fact, a bispecific antibody directed against mouse CD98hc as well as to the Alzheimer amyloid precursor protein (APP) cleavage enzyme β -secretase (BACE1) showed strong accumulation in the brain after systemic dosing in a preclinical mouse model and, accordingly, a reduction in A β burden.²⁰

We recently described the development of a high affinity Anticalin (P3D11) against human CD98hc which specifically recognizes a protruding loop structure in the membrane distal part of its extracellular domain (hCD98hcED).²¹ Of note, this part of the CD98 heterodimer is accessible regardless of the dynamic interchain motions.²² A half-life optimized version of this Anticalin demonstrated specific binding to the cell surface protein on human cancer cell lines from different tissue origins and was successfully used, after ⁸⁹Zr-radiolabeling, for the in vivo positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) imaging in a human cancer xenograft mouse model.²¹

However, this Anticalin exclusively recognizes the human membrane protein, which can be explained both by the low amino acid sequence conservation between the human and murine CD98hc orthologs at the solvent-accessible surface (~50%) as well as their differing glycosylation patterns as previously described.²³ To enable preclinical evaluation, including pharmacokinetics and safety assessment, experimental studies in rodents are of major importance. Especially for the development of BBB-penetrating agents, targeting of the murine CD98hc is crucial, due to the lack of corresponding humanized transgenic mouse strains or of reliable in vitro models to mimic the human BBB.

Here, we describe the development of a surrogate Anticalin protein directed against the murine CD98hc extracellular domain (mCD98hcED) with very similar binding characteristics compared to the Anticalin P3D11 that recognizes the human receptor, as evidenced by functional assessment as well as X-ray crystallography.

2 | RESULTS AND DISCUSSION

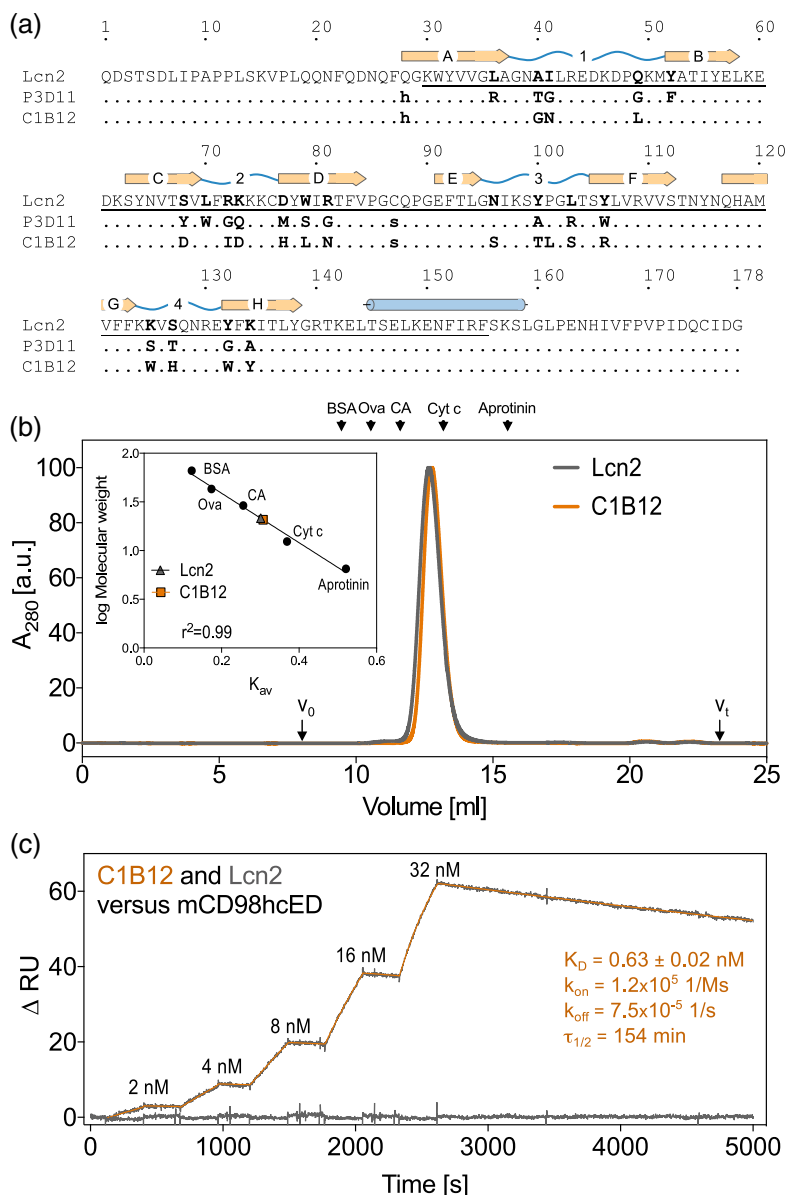
2.1 | Selection of a mCD98hcED-specific Anticalin with picomolar affinity

For selection via filamentous phagemid display a combinatorial library based on the human lipocalin 2 (Lcn2) scaffold carrying 20 randomized amino acid positions was used.²⁴ The unglycosylated mCD98hcED produced in *Escherichia coli* was immobilized to paramagnetic beads via a biotin group and employed as molecular target for the selection experiment while considering two aspects: (a) if expressed by a mammalian host cell the extensive glycosylation of mCD98hc (which accounts for ~40% of its apparent molecular mass²¹) could hamper the initial in vitro selection process of novel Anticalins via sterical hindrance and/or electrostatic repulsion from the charged oligosaccharides, as seen before in a selection campaign against prostate-specific membrane antigen²⁵; (b) the differing glycosylation patterns of the human and murine CD98hc orthologs might prevent the selection of lipocalin variants against the homologous loop structure in mCD98hcED (Residues 362–411) as recognized on hCD98hcED by the previously described Anticalin P3D11.²³

After six selection cycles, a pronounced enrichment of lipocalin variants toward the mCD98hcED was detectable (Figure S1a). From this population, the Anticalin candidate C1B12 was identified via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) screening, where the corresponding clone gave rise to a strong and specific binding signal when probed with the biotinylated (unglycosylated) target protein (Figure S1b). As anticipated, most of the 20 randomized positions within the wild-type (wt)Lcn2 scaffold were mutated in the encoded amino acid sequence of the variant C1B12. Interestingly, there was no consensus in the set of amino acid exchanges if compared with the previously selected α hCD98hc Anticalin P3D11 (Figure 1a). The Anticalin candidate C1B12 was produced as a soluble protein in *E. coli* and purified to homogeneity, yielding a monomeric protein with an apparent molecular size in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) similar to Lcn2, which was further confirmed by analytical size-exclusion chromatography (SEC) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (Figure 1b, S1(c–f), Table S1).

Real-time surface plasmon resonance (SPR) analysis resulted in an equilibrium dissociation constant (K_D) of 630 pM toward the immobilized unglycosylated mCD98hcED, with a rather long complex half-life of 2.5 hr, hence revealing similar binding characteristics compared to the α hCD98hc Anticalin P3D11 ($K_D = 150$ pM)²¹

FIGURE 1 Biophysical characterization of the mCD98hcED Anticalin C1B12. (a) Amino acid sequence alignment of the selected lipocalin variant C1B12 compared to wtLcn2 and to the ohCD98hc Anticalin P3D11. The central randomized gene cassette flanked by two *Bst*XI sites is underlined; β -strands and structurally hypervariable loops are labeled with letters A–H and numbers #1–#4, respectively. Randomized positions in the Lcn2 sequence are highlighted bold. (b) Analytical SEC profile of the mCD98hc-specific Anticalin C1B12 in comparison with recombinant wtLcn2, revealing monodispersity and a monomeric oligomerization status. From calibration runs with protein size standards a molecular weight of 20.7 kDa was deduced for C1B12 (inset). (c) Real-time SPR analysis of the Anticalin C1B12 versus mCD98hcED (produced in *E. coli*), demonstrating a picomolar dissociation constant. As expected, no binding activity of wtLcn2 toward this molecular target was detectable



(Figure 1c). Furthermore, the SPR experiments indicated that C1B12 recognizes an epitope on the unglycosylated mCD98hcED that is not fully conserved in hCD98hcED whereas, on the other hand, the epitope appeared to be shielded by N-glycosylation of a specific sequon in the murine protein (Figure S2). These findings demonstrated that both Anticalin proteins, C1B12 and P3D11, target similar epitopes at the membrane-distal side of the CD98hcED.

2.2 | X-ray structure of the C1B12-mCD98hcED complex

To gain deeper insight into the mode of epitope recognition of the murine target receptor by the Anticalin C1B12, the three-dimensional structure of its complex with mCD98hcED was elucidated by X-ray crystallography. To ensure a 1:1 stoichiometry, the C1B12-mCD98hcED complex was isolated by preparative SEC prior to crystallization

(Figure S3a–c). Crystals of mCD98hcED-C1B12 grew in space group $P2_12_12$ with two complexes per asymmetric unit. The X-ray structure of the bimolecular complex was refined to a resolution of 2.75 Å (Figure S3(d,e), Table 1).

Like its human ortholog, mCD98hcED exhibits a glycoside hydrolase fold comprising a triose-phosphate isomerase (TIM) barrel core domain (Residues 108–432) and a C-terminal β -sandwich domain (Residues 433–526) as previously described.²³ The Anticalin C1B12 binds to the membrane-distal part of mCD98hcED via its four engineered loops, #1–#4 (Figure 2), as anticipated. The contact interface involves a total buried surface area (BSA) of 1,363 Å², with 1,340 Å² on the side of the lipocalin and 1,386 Å² on the one of mCD98hcED,

including 15 hydrogen bonds and 3 salt bridges (Tables S2 and S3).

mCD98hcED is recognized by the Anticalin via three epitope regions, here referred to as L2, L3, and L4. The majority of the contacts are contributed by L2 (Residues 362–411), that is, the loop downstream of the eighth β -strand of the TIM barrel. L2 reaches deeply into the ligand pocket of the lipocalin variant C1B12 and contributes 76% to the interface. Upon binding to C1B12, L2 undergoes a significant conformational change (Table S3) compared with the uncomplexed mCD98hcED.²³ The largest structural difference is observed at its tightly buried tip (Residues 392–395, Ile-Pro-Arg-Pro; cf. Figure S4), with an average C α root mean square deviation of 12 Å versus the uncomplexed L2 (after superposition of the TIM barrel core). Notably, this conformational change is accompanied by concerted *cis/trans* and *trans/cis* isomerizations of the peptide bonds N-terminal to residues Pro393 and Pro395 in L2, respectively. Further contacts between the Anticalin and mCD98hcED are mediated by L3 (Residues 340–345), including parts of both the loop and the α -helix that follow the seventh β -strand of the TIM barrel, as well as the discontinuous stretch of L4 (Residues 493–499 and 513–515) in the C-terminal β -sandwich domain (Figure 2b, Table S3).

TABLE 1 X-ray data collection and refinement statistics

Data collection	
Space group	$P2_12_12$
Unit cell parameters	$a = 105.04 \text{ \AA}$, $b = 107.74 \text{ \AA}$, $c = 133.87 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Wavelength [Å]	0.9184
Resolution [Å]	35.0–2.75 (2.85–2.75) ^a
Completeness [%]	99.1 (96.6)
Unique reflections	39,856 (3,894)
Multiplicity	13.2 (11.7)
Mean $I/\sigma(I)$	15.4 (2.5)
R_{meas} [%]	20.5 (112.8)
Wilson B -factor [Å]	42.7
Refinement	
Resolution [Å]	34.71–2.75 (2.82–2.75)
Reflections (working)	37,895 (2,701)
Reflections (test) ^b	1,961 (116)
R_{cryst} [%]	22.0 (34.2)
R_{free} [%]	27.0 (39.6)
Protein molecules per asymmetric unit	4
Number of atoms: protein/solvent ^c	9,424/206
B -values of atoms: protein/solvent [Å ²]	47.6/39.0
Ramachandran plot ^d : favored/outliers [%]	96.1/0.2
RMSD bonds [Å]/angles [°]	0.002/1.182

Abbreviation: RMSD, root mean square deviation.

^aValues in parentheses refer to the highest resolution shell.

^bThe test set corresponds to 5% of all reflections.

^cSolvent refers to ions, water, buffer, or cryoprotectant molecules.

^dRamachandran statistics were calculated with MolProbity.²⁶

2.3 | Structural comparison of the surrogate Anticalin pair

Both Anticalins, C1B12 and P3D11, recognize their CD98hc targets with affinities in the pM range while exhibiting comparable BSA values and the same number of hydrogen bonds and salt bridges in the three-dimensional structures of the corresponding complexes (Table S2). Superposition of C1B12·mCD98hcED with P3D11·hCD98hcED via the homologous murine/human CD98hc target molecules and subsequent analysis of the binding mode of C1B12 in relation to P3D11 revealed a 153° rotation around the lipocalin β -barrel axis and a 14 Å shift toward the C-terminus of the CD98hcED (Figure 2). As result, P3D11 predominantly binds the epitope regions L1 and L2 of hCD98hcED,²¹ whereas C1B12 interacts with L2, L3, and L4 of mCD98hcED, as explained above (Figures 2 and S5).

Nevertheless, in both cases the protruding L2 loop constitutes the major epitope and contributes ~75% of all contacts, even though this structural element is approached by the two Anticalins from different directions. The engineered lipocalin C1B12 predominantly recognizes L2 via its loop #4, the β -barrel core and loop #1, whereas loop #1, the β -barrel core and loop #2 dominate the interactions of P3D11 with L2 (Figure 2,

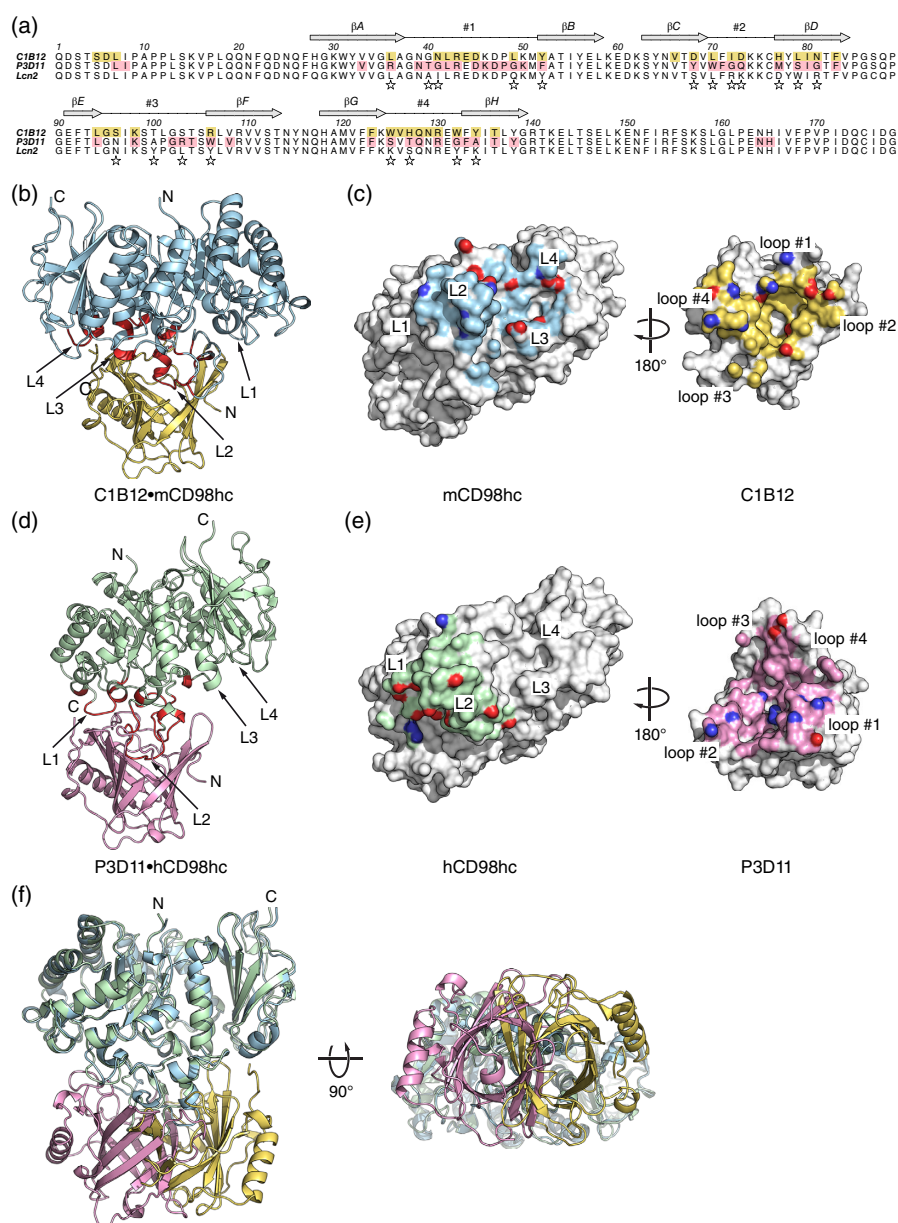


FIGURE 2 Structural comparison of the Anticalin complexes with the murine and human CD98hc target proteins. (a) Contact analysis of the two Anticalins C1B12 and P3D11. Residues that interact with mCD98hc and hCD98hc, respectively, are highlighted in the amino acid sequence with the same color (yellow or pink, respectively) as used for each Anticalin in the crystal structures shown below. Stars denote the randomized positions in the wtLcn2 sequence. (b, d) Crystal structure of C1B12 (yellow) in complex with mCD98hc (light blue) (Table 1) in comparison with P3D11 (pink) in complex with hCD98hc (light green) (PDB ID: 6S8V). The two Anticalins are shown in the same orientation and the residues in both CD98hc epitopes are highlighted red (Table S3). (c, e) View of the buried molecular surfaces for C1B12-mCD98hc and P3D11-hCD98hc, respectively, after separation of the complex partners. The contacting residues are colored like the individual molecules in (b) and (d), whereas noncontacting residues are shown in light gray. Hydrogen bond as well as salt bridge donor/acceptors are highlighted blue and red, respectively. (f) Superposition of the murine and human CD98hcED target proteins reveals differences in the mode of recognition by their cognate Anticalins, C1B12 and P3D11, as evident from their relative rotation by almost 180° and the mutual shift

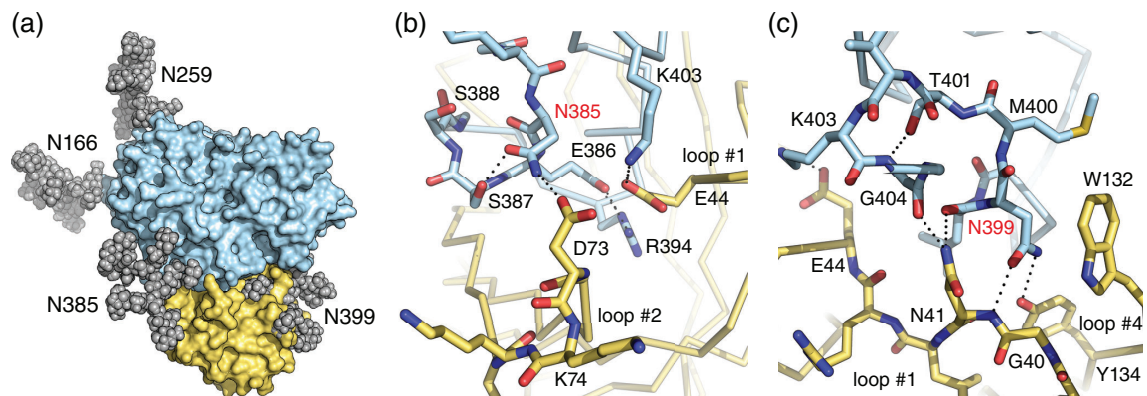


FIGURE 3 Effect of N-glycosylation on the interaction between mCD98hc and C1B12. (a) mCD98hcED with modeled glycan structures and the bound Anticalin C1B12 in the crystallized complex,²³ illustrating potential interference of the oligosaccharides attached to Asn385 and, in particular, Asn399. (b, c) Close-up views of contacts between the Asn385 (b) and Asn399 (c) side chains in the unglycosylated mCD98hcED and the bound Anticalin C1B12

Table S2). Interestingly, in both Anticalins the contribution of loop #3 to the interface with the target is marginal, but at the same time this loop shows the largest structural deviation from wtLcn2 (Figure S4, Table S2). This suggests that in both Anticalins loop #3 has to bend away from the calyx axis to create space for tight complex formation with CD98hc.

Comparison of the electrostatics revealed a slightly less acidic membrane-distal surface for mCD98hcED than for hCD98hcED, which is consistent with their differing theoretical *pI* values of 5.9 and 5.2, respectively.²³ In particular, L2 shows a different Coulomb potential in the context of the two Anticalins, which is slightly positive for mCD98hcED but slightly negative for hCD98hcED (Figure S5). These surface charges are complemented by the negatively or positively charged electrostatic potential of the ligand-binding sites in the lipocalin variants C1B12 and P3D11, respectively. Still, both Anticalins also match the slightly hydrophobic character of L2 in the two CD98hcED target molecules (Figure S5).

2.4 | Role of N-glycosylation for the molecular recognition of mCD98hcED as a protein target

In vivo, the L2 epitope region of mCD98hc is N-glycosylated at two positions, Asn385 and Asn399, of which Asn385 is unique to the murine ortholog.^{23,27} Although this Asn residue in the target protein forms a hydrogen bond with loop #2 of the Anticalin C1B12 in the crystal structure of the complex, its location at the fringe of the interface suggests that this N-glycosylation

should have minor influence on the binding interaction (Figure 3). On the other hand, a free Asn399 side chain is essential for the tight interaction with C1B12 as it forms hydrogen bonds with Asn41 and Tyr134 as well as a stacking interaction with Trp132 of the Anticalin (Figure 3c). Obviously, N-glycosylation at this site should abolish binding between C1B12 and the mCD98hcED, which is consistent with the findings from our SPR experiments (cf. Figure S2, Table S4).

Consequently, to utilize C1B12 as a viable surrogate Anticalin for targeting mCD98hc in vivo, N-glycosylation ideally at both Asn residues should be prevented in order to avoid disruption of the epitope. In the case of Asn399 this may be simply achieved by altering the third position of the NMT glycosylation sequon, Thr401, to Ala. Due to its smaller side chain, Ala causes only minimal structural perturbation within the mCD98hc epitope, just accompanied by loss of a hydrogen bond with the main chain nitrogen of Gly404 (Figure 3c). In the light of its proximity to the C1B12 epitope, as explained above, glycosylation of Asn385 might interfere with binding of the Anticalin, too. However, this can be resolved via substitution by Asp, the equivalent residue in the human ortholog (UniProt ID P08195-2: Asp392).²³ Such a double mutant of mCD98hc may be incorporated into a transgenic mouse model, for example, by replacing exon no. 8 by a mutated version with the help of CRISPR/Cas9 technology.²⁸

In order to validate this concept from a protein functional perspective, the corresponding mCD98hcED (N385D/T401A) mutant was produced both as a soluble protein in *E. coli* BL21 and (partially) glycosylated—at Asn166 and Asn259, but not at Positions 385 and 399—in

human embryonic kidney (HEK) cells. Both proteins were purified to homogeneity, yielding monodisperse and monomeric preparations (Figure S6). The apparent molecular size in SEC and SDS-PAGE of the unglycosylated mCD98hcED(N385D/T401A) was similar to the unglycosylated wild-type protein. In contrast, glycosylation of the mCD98hcED(N385D/T401A) led to an increase in the apparent size compared to both unglycosylated proteins, as expected, but not to the same extent as for the fully glycosylated wild-type mCD98hcED produced in HEK cells. Notably, the double substitution just marginally affected binding activity by the Anticalin C1B12, irrespective of the remaining glycosylation at Asn166 and Asn259 (Table S4).

Thus, the Anticalin C1B12 would be suitable for *in vivo* targeting of the mutant mCD98hc(N385D/T401A) in a transgenic mouse model. While the two proposed mutations in mCD98hc abolish N-glycosylation within the epitope region, the lack of oligosaccharides at both positions, Asn385 and Asn399, does not affect protein folding or stability of mCD98hcED. Furthermore, even though glycosylation of CD98hc plays a role for interaction with galectin-3 *in vivo*,²⁹ the recognition by this carbohydrate-binding protein should be maintained with the remaining two glycosylation sites.

3 | CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Targeting of CD98hc *in vivo* constitutes a promising approach for several biomedical applications. However, due to its high cross-species variability, both concerning the amino acid surface and glycosylation pattern, it is difficult to raise antibodies or other binding proteins with suitable species cross-reactivity. At the same time, substitution of the entire CD98hcED in a transgenic mouse by the human counterpart could likely provoke functional impairment due to the distinct protein properties. To enable a surrogate strategy for preclinical research, we have developed a high affinity Anticalin toward mCD98hc with very similar affinity and mode of epitope recognition as our previously developed α hCD98hc Anticalin, P3D11.²¹ The preclinical application of the C1B12 Anticalin in a rodent animal model *in vivo* would require the generation of a transgenic mouse that carries just two point mutations in mCD98hc. Assuming availability of such a mouse model, our surrogate α mCD98hc/ α hCD98hc Anticalin pair bears potential for pharmacokinetic and -dynamic studies to assess the *in vivo* targeting of CD98hc for diagnostic and therapeutic applications in oncology as well as diseases of the central nervous system.

4 | MATERIALS AND METHODS

4.1 | Phage display selection and preparation of mCD98hcED-specific lipocalin variants

Production of the biotinylated recombinant mCD98hcED both in *E. coli* BL21 and in MEXi-293E cells was performed as previously described.²¹ To generate the mCD98hcED double mutant N385D/T401A, amino acid substitutions were introduced using the QuikChange site-directed mutagenesis technique (Agilent, Santa Clara, CA) with appropriate oligodeoxynucleotide pairs (Eurofins, Ebersberg, Germany) carrying the mutated codons. To be used as a target for phage display selection, unglycosylated mCD98hcED was immobilized on paramagnetic beads (Sigma-Aldrich, Munich, Germany and Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, respectively) coated with NeutrAvidin (Cycles 1, 3, and 5) or streptavidin (Cycles 2, 4, and 6) in an alternating fashion. The functionalized beads were incubated with a phagemid library of the randomized Lcn2 scaffold²⁴ (starting titer 1×10^{12}) and, after extensive washing with phosphate-buffered saline (PBS; 4 mM KH_2PO_4 , 160 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl pH 7.4), bound phagemids were eluted using 4 M urea. After six consecutive phagemid panning cycles, pooled phasmid DNA from the enriched library (i.e., the amplified phagemids eluted in the last step) was prepared and subcloned on pNGAL98 in order to perform ELISA screening using microcultures expressing the soluble lipocalin variants equipped with a C-terminal *Strep*-tag II.³⁰

Therefore, the periplasmic extract was prepared in a microtiter plate and transferred to a 96-well MaxiSorp plate (Thermo Fisher Scientific) which had been coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *Strep*MAB-Immo (IBA, Göttingen, Germany). After 1 hr incubation and washing steps, the selectively adsorbed lipocalin variants were incubated with the biotinylated mCD98hcED or, as negative control, biotinylated ovalbumin or PBS, followed by detection of the bound biotinylated target protein with ExtrAvidin/alkaline phosphatase (AP) conjugate (Sigma-Aldrich). Signals were developed with 0.5 mg/ml p-nitrophenyl phosphate in AP buffer (0.1 M NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 M Tris/HCl pH 8.8), and the absorbance was measured at 405 nm in a Synergy 2 photometer (BioTek Instruments, Winooski, VT). For clones expressing lipocalin variants that revealed a significant binding signal toward mCD98hcED, the plasmid was isolated and the expression cassette was subjected to DNA sequencing.

Then, the corresponding soluble lipocalin variant was produced with a C-terminal His₆-tag using the plasmid pNGAL118 at preparative scale in a 2 L culture of *E. coli* JM83 in 2xYT medium according to a published

procedure.²⁴ After periplasmic protein extraction, the recombinant protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography using a Ni(II)-charged HisTrap HP column (GE Healthcare, Munich, Germany) and further subjected to SEC in PBS on a 24 ml Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare). Protein purity and integrity were assessed using SDS-PAGE and ESI-MS, respectively, as previously described.²¹

4.2 | Biomolecular interaction analysis

Real-time SPR spectroscopy were performed as previously described.²¹ Briefly, the biotinylated murine CD98hcED, or its double mutant N385D/T401A, produced in *E. coli* or in MEXi-293E cells (5 µg/ml protein solution in 10 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05% [vol/vol] Tween) was immobilized ($\Delta RU \approx 225$) to a streptavidin-coated sensorchip using the Biotin CAPture kit (GE Healthcare). Single cycle kinetic experiments were performed on a Biacore 2000 instrument (GE Healthcare) using five consecutive injections from a 1:2 dilution series of the purified lipocalin variant at a flow rate of 25 µl/min with 288 s contact time, followed by a long 3,500 s dissociation time for the highest concentration. Rate constants of association and dissociation were calculated from reference-corrected sensorgrams by fitting to a 1:1 Langmuir binding model using BIAevaluation software. The equilibrium dissociation constant (K_D) was calculated as the quotient k_{off}/k_{on} . Furthermore, to investigate binding toward the fully glycosylated mCD98hcED (mCD98hcEDg; produced in MEXi-293E cells), or to assess cross-reactivity with hCD98hcED (produced in *E. coli*), only a single concentration (1 µM) of the lipocalin variant C1B12 was injected using the same conditions as described above.

4.3 | Protein crystallization, structure determination and analysis

For protein crystallization, unglycosylated mCD98hcED was produced with an N-terminal *Strep*-tag II in *E. coli* BL21 as previously described.²³ After incubation with the Anticalin C1B12 at 1:1 molar ratio for 2 hr at 4°C, the C1B12-mCD98hcED complex was isolated via SEC on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) and eluted in crystallization buffer (10 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.02% [wt/vol] Na₃). The complex was concentrated to ~30 mg/ml using a 30 kDa cut-off Amicon ultrafiltration unit (Merck Millipore, Burlington,

MA) and subjected to crystallization by vapor diffusion at 20°C using an in-house precipitant screen. Diffraction quality crystals of plate-like morphology were obtained in hanging drops by mixing 0.5 µl C1B12-mCD98hcED with 0.5 µl reservoir solution containing 12% (wt/vol) polyethylene glycol 8,000 and 0.2 M Li₂SO₄. The crystals were transferred into cryo-protectant solution consisting of reservoir solution supplemented with 25% (vol/vol) ethylene glycol and flash frozen in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, BESSY beamline 14.2,³¹ and reduced with the XDS package³² (Table 1). The crystal structure was solved by molecular replacement with Phaser³³ using coordinate sets of the mCD98hcED (PDB ID: 6I9Q²³) and the Anticalin P3D11 (PDB entry: 6S8V²¹) as separate search models. Manual rebuilding and refinement were performed with Coot³⁴ and Refmac5,³⁵ respectively (Table 1). Electrostatic surface potentials were calculated with APBS,³⁶ molecular packing analyses were performed with PISA³⁷ and molecular graphics were prepared with PyMOL (Schödingler, Cambridge, MA). The asymmetric unit of space group P2₁2₁2 contained two highly similar C1B12-mCD98hcED complexes, of which the complex comprising the chain pair A and B was used for further analysis due to its overall lower B-factors. Complex N-glycans were modeled on mCD98hcED as previously described.²³ Atomic coordinates and structure factors for the C1B12-mCD98hcED complex have been deposited in the PDB (www.rcsb.org/pdb) under the accession code 6SUA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, for allocation of synchrotron radiation beamtime and travel support and Dr. Christian Feiler for assistance at BESSY beamline 14.2. This work was financially supported by the German Research Foundation (DFG) in frame of the Collaborative Research Centre 824 (project A08). Anticalin[®] is a registered trademark of Pieris Pharmaceuticals GmbH.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Friedrich-Christian Deuschle: Conceptualization; investigation; methodology; validation; visualization; writing-original draft; writing-review and editing. **André Schiefner:** Conceptualization; investigation; methodology; validation; visualization; writing-original draft; writing-review and editing. **Corinna Brandt:** Investigation; validation; visualization; writing-original draft. **Arne Skerra:** Conceptualization; funding acquisition; project administration; resources; supervision; validation; visualization; writing-original draft; writing-review and editing.

CONFLICT OF INTEREST

A. Skerra is founder and shareholder of Pieris Pharmaceuticals, Inc.

ORCID

Friedrich-Christian Deuschle  <https://orcid.org/0000-0001-5603-3109>

André Schiefner  <https://orcid.org/0000-0001-5215-4122>

Corinna Brandt  <https://orcid.org/0000-0003-4443-6095>

Arne Skerra  <https://orcid.org/0000-0002-5717-498X>

REFERENCES

- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem.* 1998;273:23629–23632.
- Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem.* 1999;274:11455–11458.
- Fotiadis D, Kanai Y, Palacin M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;34:139–158.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem.* 1999;274:3009–3016.
- Yan R, Zhao X, Lei J, Zhou Q. Structure of the human LAT1-4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. *Nature.* 2019;568:127–130.
- Cantor JM, Ginsberg MH, Rose DM. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev.* 2008;223:236–251.
- Fenczik CA, Zent R, Dellos M, et al. Distinct domains of CD98hc regulate integrins and amino acid transport. *J Biol Chem.* 2001;276:8746–8752.
- Feral CC, Nishiya N, Fenczik CA, Stuhlmann H, Slepak M, Ginsberg MH. CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:355–360.
- Cai S, Bulus N, Fonseca-Siesser PM, et al. CD98 modulates integrin $\beta 1$ function in polarized epithelial cells. *J Cell Sci.* 2005;118:889–899.
- Bajaj J, Konuma T, Lytle NK, et al. CD98-mediated adhesive signaling enables the establishment and propagation of acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2016;30:792–805.
- Feral CC, Zijlstra A, Tkachenko E, et al. CD98hc (SLC3A2) participates in fibronectin matrix assembly by mediating integrin signaling. *J Cell Biol.* 2007;178:701–711.
- Salter DM, Krajewski AS, Sheehan T, Turner G, Cuthbert RJ, McLean A. Prognostic significance of activation and differentiation antigen expression in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1989;159:211–220.
- Hayes GM, Chinn L, Cantor JM, et al. Antitumor activity of an anti-CD98 antibody. *Int J Cancer.* 2015;137:710–720.
- Ye Y, Wang M, Wang B, Yang X-M, Chen Z-N. CD98, a potential diagnostic cancer-related biomarker, and its prognostic impact in colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2017;10:5418–5429.
- Kaira K, Oriuchi N, Imai H, et al. CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:3473–3481.
- El Ansari R, Craze ML, Diez-Rodriguez M, et al. The multifunctional solute carrier 3A2 (SLC3A2) confers a poor prognosis in the highly proliferative breast cancer subtypes. *Brit J Cancer.* 2018;118:1115–1122.
- Furuya M, Horiguchi J, Nakajima H, Kanai Y, Oyama T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* 2012;103:382–389.
- Wang Q, Tiffen J, Bailey CG, et al. Targeting amino acid transport in metastatic castration-resistant prostate cancer: Effects on cell cycle, cell growth and tumor development. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:1463–1473.
- Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: Targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res.* 2015;5:1281–1294.
- Zuchero YJ, Chen X, Bien-Ly N, et al. Discovery of novel blood-brain barrier targets to enhance brain uptake of therapeutic antibodies. *Neuron.* 2016;89:70–82.
- Deuschle FC, Morath V, Schiefner A, et al. Development of a high affinity Anticalin[®] directed against human CD98hc for theranostic applications. *Theranostics.* 2020;10:2172–2187.
- Chiduzha GN, Johnson RM, Wright GSA, Antonyuk SV, Muench SP, Hasnain SS. LAT1 (SLC7A5) and CD98hc (SLC3A2) complex dynamics revealed by single-particle cryo-EM. *Acta Crystallogr.* 2019;D75:660–669.
- Deuschle FC, Schiefner A, Skerra A. Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins.* 2019;87:693–698.
- Gebauer M, Schiefner A, Matschiner G, Skerra A. Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol.* 2013;425:780–802.
- Barinka C, Ptacek J, Richter A, Novakova Z, Morath V, Skerra A. Selection and characterization of Anticalins targeting human prostate-specific membrane antigen (PSMA). *Protein Eng Des Sel.* 2016;29:105–115.
- Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, et al. MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W375–W383.
- Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C, et al. Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol.* 2009;27:378–386.
- Wright AV, Nunez JK, Doudna JA. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell.* 2016;164:29–44.
- Dalton P, Christian H, Redman C, Sargent I, Boyd C. Membrane trafficking of CD98 and its ligand galectin 3 in BeWo cells—Implication for placental cell fusion. *FEBS J.* 2007;274:2715–2727.
- Gebauer M, Skerra A. Anticalins: small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol.* 2012;503:157–188.
- Mueller U, Darowski N, Fuchs MR, et al. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J Synchrotron Radiat.* 2012;19:442–449.

32. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr.* 2010;D66:125–132.
33. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Cryst.* 2007;40:658–674.
34. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Cryst.* 2010;D66:486–501.
35. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst.* 2011;D67:355–367.
36. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10037–10041.
37. Krissinel E, Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol.* 2007;372:774–797.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Deuschle F-C, Schiefner A, Brandt C, Skerra A. Design of a surrogate Anticalin protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice. *Protein Science.* 2020;1–10. <https://doi.org/10.1002/pro.3894>

Surrogate Anticalin targeting murine CD98hc

p. 1

SUPPORTING INFORMATION

Development of a surrogate Anticalin[®] protein directed against CD98hc for preclinical studies in mice

Friedrich-Christian Deuschle, André Schiefner, Corinna Brandt and Arne Skerra*

Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising,
Germany

*Corresponding author:

Prof. Dr. Arne Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München,
Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany

Phone: +49 8161 71 4351; Fax: +49 8161 71 4352; e-mail: skerra@tum.de

Short title: Surrogate Anticalin targeting murine CD98hc

Key words: CD98hc, cancer theranostics, lipocalin, protein engineering, surrogate ligand

SUPPORTING METHODS

SEC and SDS-PAGE analysis

Analytical SEC was performed on a 24 ml Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare, Munich, Germany) using PBS at a flow rate of 0.5 ml/min. The column was calibrated with the following standard proteins (Sigma-Aldrich, Munich, Germany): bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). The void volume of the column was determined using blue dextran (Sigma-Aldrich). Based on the elution volumes, the partition coefficients, K_{av} , were calculated and used to interpolate the apparent molecular sizes of the analyzed proteins. SDS-PAGE was performed using a high molarity Tris buffer system¹ with or without 2-mercaptoethanol (β -ME) added to the SDS sample buffer, followed by staining with Coomassie brilliant blue.

ESI mass spectrometry

Mass spectra of proteins were measured on a maXis mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the positive ion mode as previously described.² To measure the intact protein mass (under denaturing conditions), the purified protein was dialyzed against 10 mM ammonium acetate pH 6.6, followed by the addition of 50 % (v/v) methanol and 1 % (v/v) acetic acid, and applied to the mass spectrometer via a syringe pump operated at 180 μ L/h. The following conditions for the ion-transfer were used: 3400 V capillary voltage, 500 V endplate offset, 4 L/min dry gas at 200 °C, 0.3 bar nebulizer pressure and 3 eV collision energy. Raw spectra were deconvoluted with the Bruker Compass Data Analysis Software using the MaxEnt algorithm³ (cf. Table S1).

SUPPORTING REFERENCES

1. Fling SP, Gregerson DS Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem.* 1986; 155:83-88.
2. Deuschle FC, Schiefner A, Skerra A Structural differences between the ectodomains of murine and human CD98hc. *Proteins.* 2019; 87:693-698.
3. Ferrige AG, Seddon MJ, Jarvis S, Skilling J, Aplin R Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 1991; 5:374-377.
4. Skerra A Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1482:337-350.
5. Krissinel E, Henrick K Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol.* 2007; 372:774-797.
6. Eichinger A, Nasreen A, Kim HJ, Skerra A Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem.* 2007; 282:31068-31075.

Table S1. Size determination of the lipocalin variant C1B12

	Theoretical mass [Da]	Mass (ESI-MS) [Da]	Apparent mass (SEC) [kDa]
C1B12	21430.3	21429.9 ($\Delta = 0.4$)	20.7
wtLcn2*	21521.5	–	21.5

* Recombinant mature wtLcn2 comprising residues Q21–G198 (UniProt ID: P80188-1) and carrying the amino acid substitutions Q48H and C107S as well as a C-terminal His₆-tag

Table S2: Analysis of the interfaces between the engineered lipocalins C1B12 and P3D11 and CD98hcED from mouse and man, respectively

	All	Loop				β -Barrel
		#1	#2	#3	#4	
Residue range	7-177	38-51	70-76	95-105	125-132	– ^a
No. of residues	171	14	7	11	8	58
Contact residues ^b with CD98hc – total / mutated						
C1B12	36 / 18	6 / 3	3 / 3	3 / 1	7 / 3	17 / 8
P3D11	45 / 18	11 / 3	4 / 3	4 / 1	5 / 3	21 / 8
BSA ^c with CD98hc (\AA^2) – total / mutated						
C1B12	1340 / 739	230 / 122	98 / 98	62 / 33	422 / 163	401 / 323
P3D11	1423 / 766	485 / 155	175 / 169	90 / 1	97 / 77	484 / 364
Hydrogen bonds ^c with CD98hc – total / mutated						
C1B12	15 / 5	4 / 1	1 / 1	- / -	4 / -	3 / 3
P3D11	15 / 7	5 / 1	2 / 2	1 / -	1 / -	6 / 4
Salt bridges ^c with CD98hc – total / mutated						
C1B12	3 / -	2 / -	- / -	- / -	- / -	- / -
P3D11	3 / 2	2 / -	- / -	- / -	- / -	1 / 1
C α RMSD to wtLcn2 ^d (\AA)						
C1B12	3.09	4.90	0.93	12.01	2.70	0.40
P3D11	1.92	3.29	1.62	5.69	3.80	0.54

^a Residues corresponding to the eight conserved β -strands of the lipocalin:⁴ 28-37, 52-58, 63-69, 77-84, 91-94, 106-113, 118-124, 133-139.

^b Contact residues are defined as residues with $>1 \text{\AA}^2$ buried surface area (BSA).

^c BSA, numbers of hydrogen bonds and of salt bridges (only counting one salt bridge per residue pair) were determined with PISA.⁵

^d Root mean square deviations (RMSD) were calculated for each loop segment after superposition of the set of 58 conserved β -barrel residues via C α positions.

Table S3: Contact residues and conformational changes of the Anticalin-bound CD98hcED proteins from mouse and man

	mCD98hc				
	Core	L1	L2	L3	L4
Residue range	108-120, 133-339, 346-361, 412-492, 500-512, 516-526	121-132	362-411	340-345	493-499, 513-515
BSA [\AA^2]	20	-	1053	146	167
Hydrogen bonds	-	-	9	3	3
Salt bridges	-	-	2	-	1
RMSD ^a vs. apo	0.69	0.39	4.00	0.41	1.06
	hCD98hc				
	Core	L1	L2	L3	L4
Residue range	114-126, 139-344, 351-366, 418-498, 506-515, 519-529	127-138	367-417	345-350	499-505, 516-518
BSA [\AA^2]	99	273	1149	-	-
Hydrogen bonds	1	6	8	-	-
Salt bridges	1	1	1	-	-
RMSD ^a vs. apo	0.99	1.50	1.48	0.43	0.87

^a RMSD values of the C α positions for the epitopes L1, L2, L3 and L4 were calculated after superposing the C α positions of the core residues. The uncomplexed structures of murine and human CD98hcED (PDB IDs: 6I9Q and 2DH2, respectively) were used for comparison.

Table S4: SPR analysis of the Anticalin C1B12 with mCD98hcED and its N385D/T401A mutants produced in *E. coli* or fully/partially glycosylated in HEK cells.

mCD98hcED protein	K_D^a [nM]	k_{on} [$M^{-1} \times s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$\tau_{1/2}^b$ [min]
Wild-type (<i>E. coli</i>)	0.63 ± 0.02	1.2×10 ⁵	7.5×10 ⁻⁵	154
Wild-type (HEK)	not detectable			
N385D/T401A (<i>E. coli</i>)	1.80 ± 0.05	3.3×10 ⁴	5.9×10 ⁻⁵	195
N385D/T401A (HEK) ^c	1.98 ± 0.02	4.2×10 ⁴	8.3×10 ⁻⁵	140

^a measured via single cycle kinetics

^b $\tau_{1/2}$ calculated from $\ln(2)/k_{off}$

^c glycosylated at Asn166 and Asn259 but not at amino acid positions 385 and 399

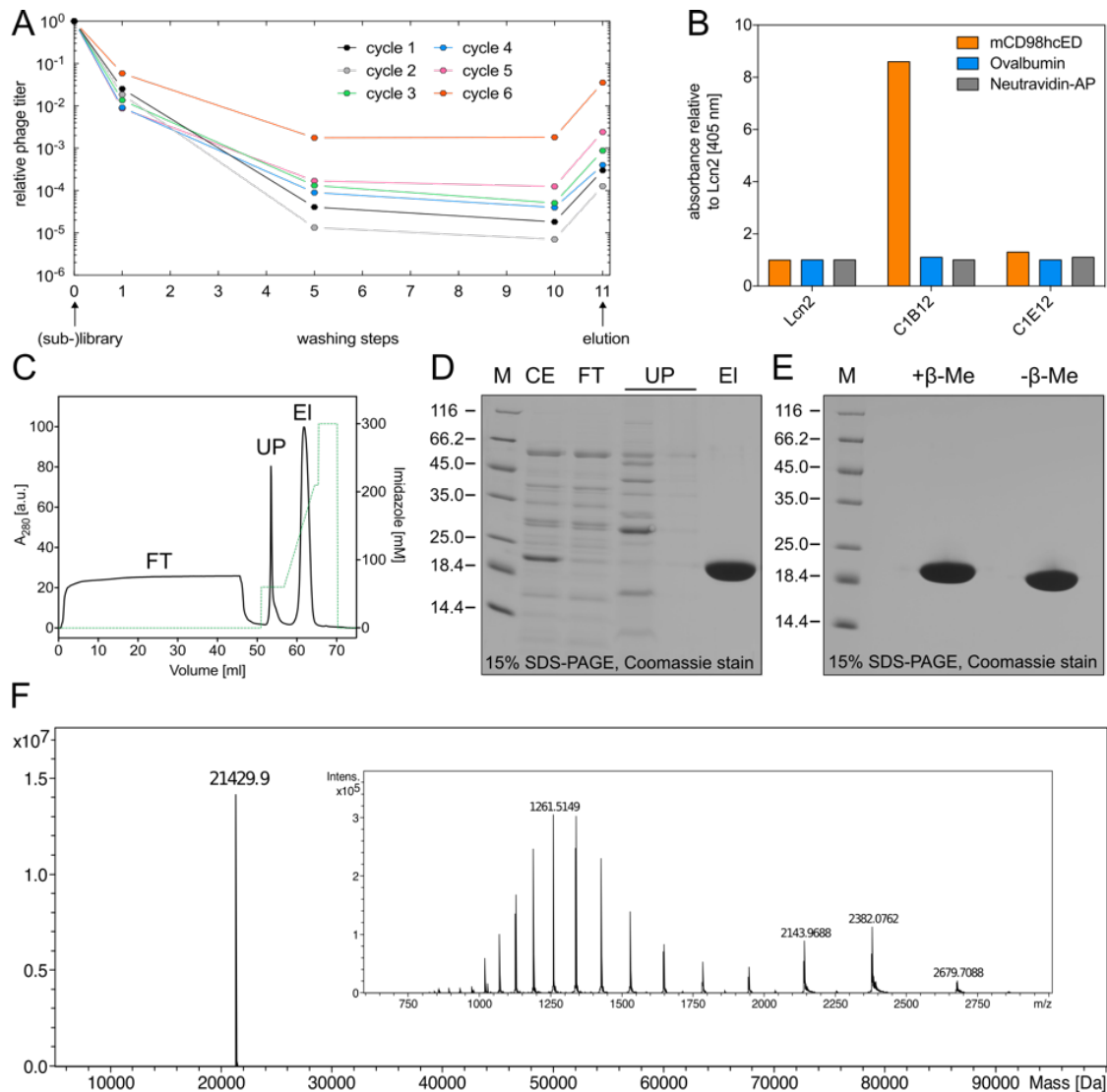


Figure S1. Phage display selection and bacterial production of the lipocalin variant C1B12. (A) Steady rise of the phagemid titer after each phage display selection cycle indicated the enrichment of lipocalin variants towards the soluble target protein. (B) ELISA screening of crude *E. coli* extracts for mCD98hc-specific lipocalin variants revealed a strong and specific binding signal for the clone C1B12. For comparison, the recombinant wtLcn2 and a lipocalin variant without detectable binding towards mCD98hc were included in this panel. (C) IMAC purification of C1B12 after production in *E. coli* JM83 as a soluble protein: CE = periplasmic cell extract; FT = flow through; UP = unrelated proteins; EI = elution. (D) SDS-PAGE analysis (β -ME added) of fractions from the IMAC purification shown in (C). (E) SDS-PAGE analysis of purified C1B12 after final preparative SEC with and without β -ME added to the sample buffer. (F) ESI-MS of the purified Anticalin C1B12 (deconvoluted, raw data are shown as inset).

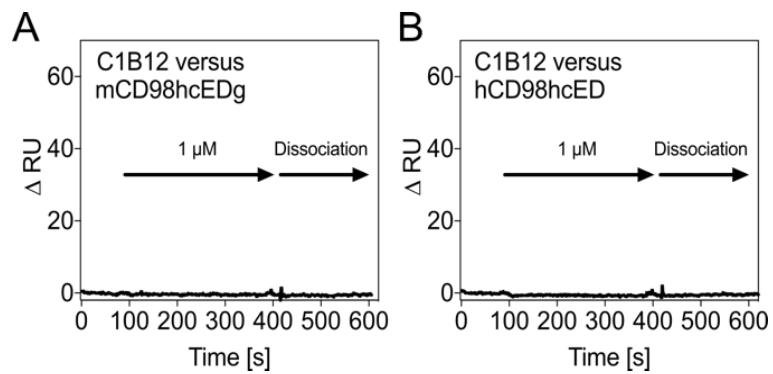


Figure S2. Real-time SPR binding analysis of Anticalins directed against CD98hcEDg from different species. Sensorgrams of 1 μM C1B12 versus (A) fully glycosylated mCD98hcEDg and (B) hCD98hcED using the same conditions as in Fig. 1C (only a single sample injection was applied).

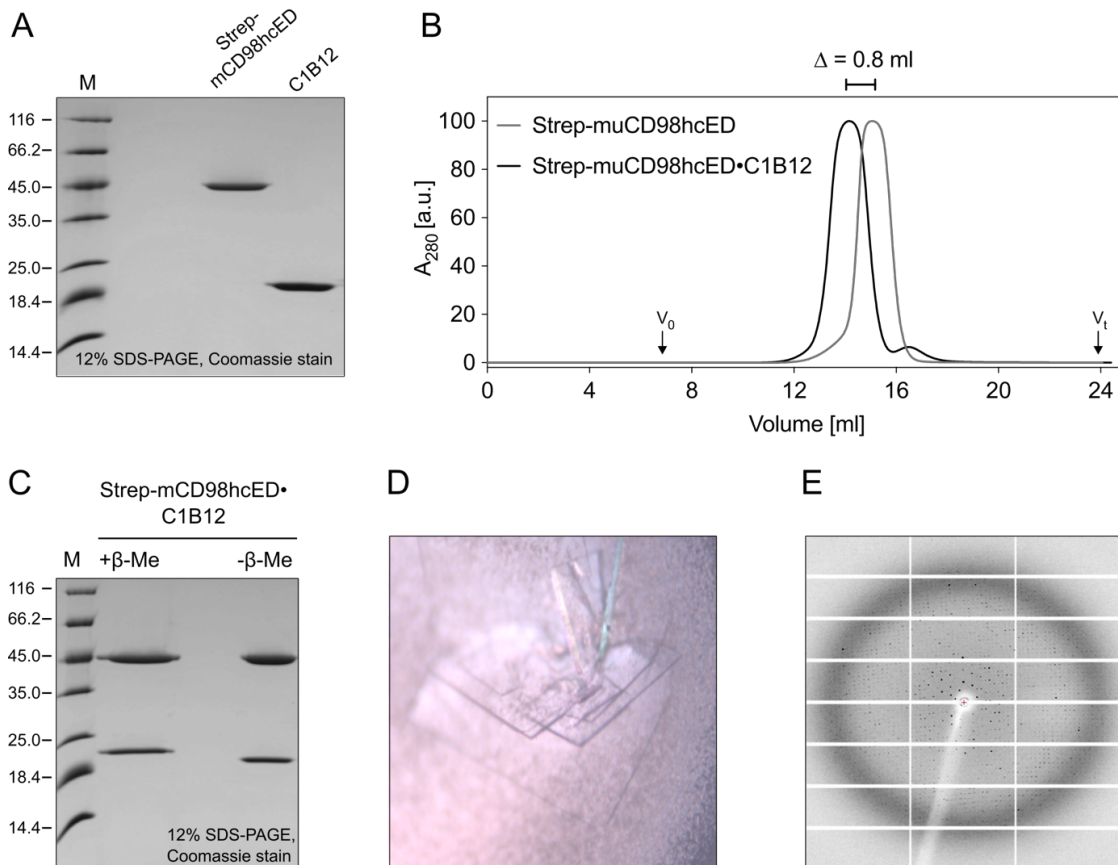


Figure S3. Crystallization of the C1B12•mCD98hcED complex. (A) SDS-PAGE analysis of the purified *Strep*-mCD98hcED and the engineered lipocalin C1B12 before complex formation (without addition of β -ME). (B) SEC purification of the 1:1 complex (black) prepared by mixing both recombinant proteins, in comparison to *Strep*-mCD98hcED alone (grey). (C) SDS-PAGE of the purified C1B12•mCD98hcED complex with and without the addition of β -ME. Note that the engineered lipocalin carries one disulfide bridge whereas the mCD98hcED lacks disulfide bonds. (D) Diffraction quality crystals obtained by vapor diffusion in hanging drops at 20 °C in the presence of 12 % (w/v) PEG 8000 and 0.2 M Li_2SO_4 . (E) Diffraction pattern of the crystal shown in (D) collected at a wavelength of 0.9184 Å using the Pilatus3 2M detector (Dectris, Baden, Switzerland) at BESSY beamline 14.2.

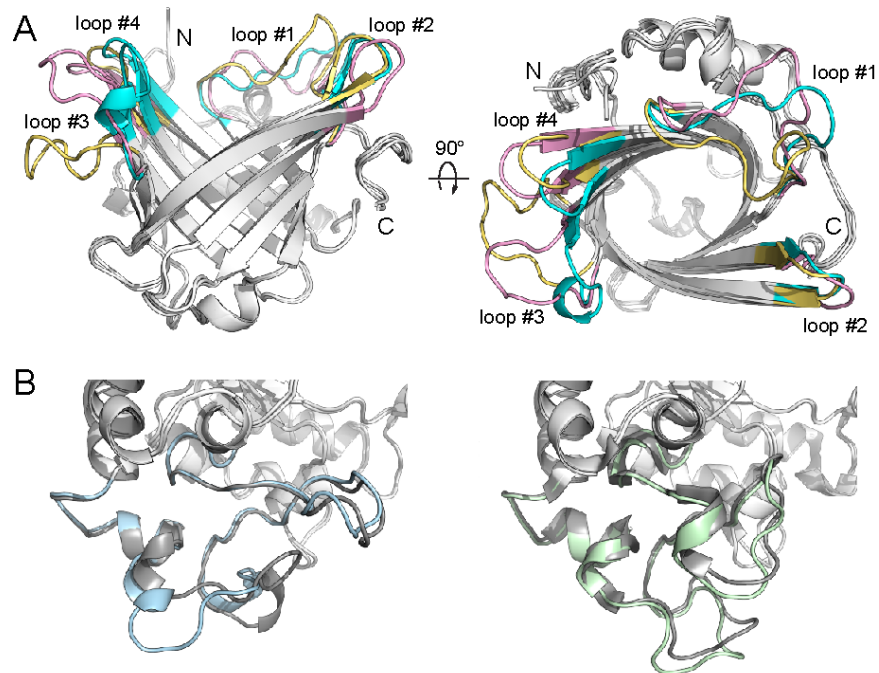


Figure S4. Conformational differences in the cognate Anticalins and the extracellular domains of murine and human CD98hc after complex formation. (A) Structural superposition of the Anticalins C1B12 (yellow) and P3D11 (pink; PDB ID: 6S8V) with wtLcn2 (cyan; PDB ID: 1L6M). (B) Conformational changes of mCD98hcED in complex with C1B12 (light blue) and of hCD98hcED in complex with P3D11 (light green, PDB ID: 6S8V) compared to their uncomplexed states (gray; PDB IDs: 6I9Q and 2DH2, respectively).

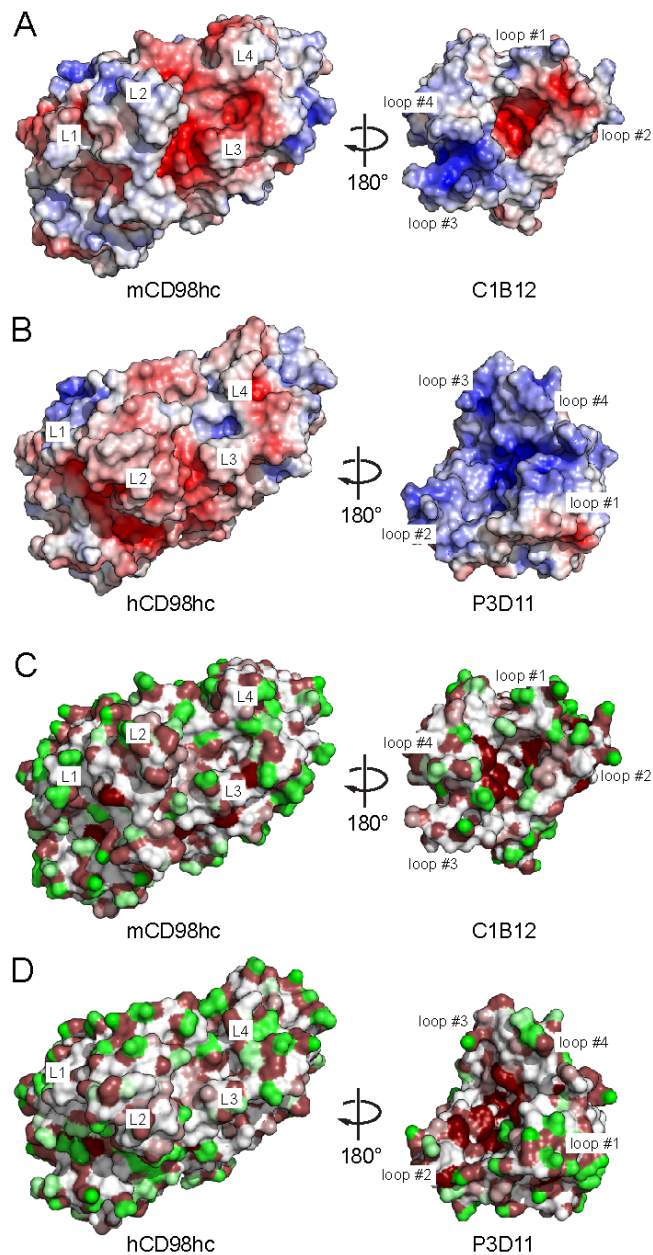


Figure S5. Electrostatic and hydrophobic interface properties in the C1B12·mCD98hcED and P3D11·hCD98hcED complexes. (A, B) Electrostatic surface potentials are colored from $-5 k_B T/e$ (red) to $+5 k_B T/e$ (blue), revealing patterns consistent with the theoretical pI values of 5.9, 7.1, 5.2 and 8.8 for mCD98hcED, Anticalin C1B12, hCD98hcED and Anticalin P3D11, respectively. (C, D) Group-wise surface hydrophobicity values are colored from green (polar) over white (neutral/peptide backbone) to brown (apolar).⁶

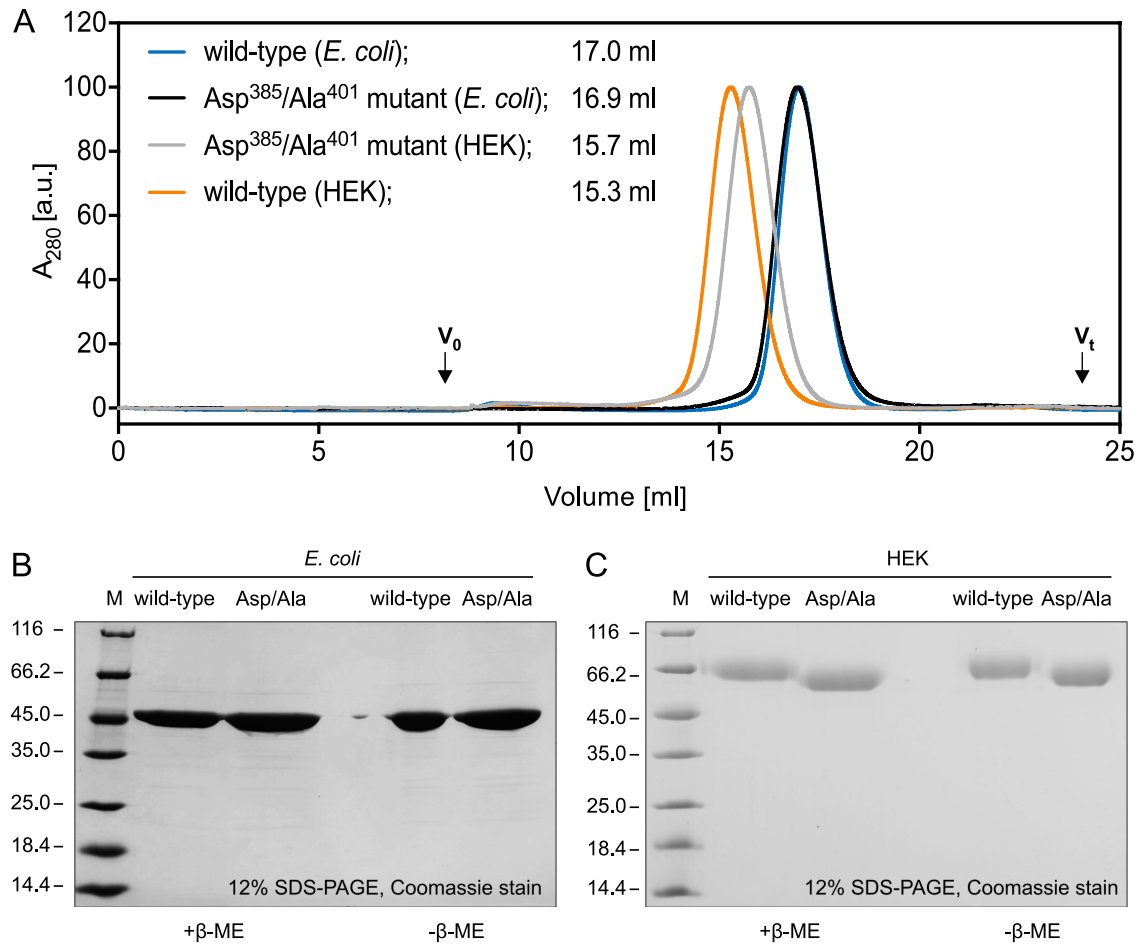


Figure S6. Biochemical characterization of mCD98hcED and its N385D/T401A mutant produced in *E. coli* and in HEK cells. (A) Analytical SEC of wild-type mCD98hcED and the N385D/T401A mutant produced in *E. coli* or HEK cells. Both proteins expressed in *E. coli* show similar apparent sizes. However, the fully glycosylated wild-type mCD98hcEDg produced in HEK cells exhibits strongly enlarged size, as expected, whereas the partially glycosylated N385D/T401A mutant reveals a reduced size in comparison. (B and C) SDS-PAGE of wild-type mCD98hcED and its N385D/T401A mutant purified from *E. coli* (B) or HEK cells (C), confirming full or partial glycosylation, respectively, after production in the eukaryotic expression system as evident from the different apparent band sizes.

