

Erzeugung und Charakterisierung Ubiquitin-basierter Bindeproteine

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

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

von
Herrn Andreas Hoffmann

geb. am 19.09.1981 in Köthen/Anhalt

Gutachter

1. Dr. habil. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Jochen Balbach
3. Prof. Dr. Johannes Buchner

Tag und Ort der öffentlichen Verteidigung: 20.02.2012, Halle (Saale)

Zusammenfassung

Antikörper und deren Fragmente werden derzeit sehr erfolgreich als hochspezifische Bindemoleküle für therapeutische, diagnostische und analytische Zwecke verwendet. Es bestehen jedoch einige Nachteile, z. B. in der Herstellung oder vor allem für die Fragmente in der Stabilität. Deshalb wird versucht künstliche Bindeproteine auf Basis alternativer Gerüstproteine herzustellen.

Viele der künstlichen Bindeproteine binden analog zu den Antikörpern über mehr oder weniger flexible Peptidschleifen an die jeweilige Zielstruktur. Um bei der Bindung der Zielstruktur die entropischen Vorteile einer rigiden Sekundärstruktur zu nutzen, wurde in vorangehenden Arbeiten von der Firma Scil Proteins GmbH (Halle) im Ubiquitin ein Paratop im Bereich des beta-Faltblatts konstruiert. Zur Weiterentwicklung der künstlichen Bindeproteine auf Ubiquitin-Basis wurde in dieser Arbeit ein neues Paratop geschaffen. Dazu wurden sechs Aminosäurepositionen im Bereich der natürlichen Interaktionsfläche des Ubiquitins um I44 randomisiert. Die konstruierte Bibliothek weist einen hohen Anteil an löslich herstellbaren Varianten auf. Als Zielstruktur für die Evaluierung der Bibliothek wurde das pharmakologisch relevante Protein Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha ausgewählt und mit dem SUMO-Fusionssystem hergestellt. Durch Ribosomen-*display* und einen ELISA wurden aus der neuen Ubiquitin-Bibliothek Bindeproteine gegen TNF-alpha isoliert. Die Variante mit dem höchsten Bindungssignal und der besten Spezifität wurde detailliert analysiert. Bei der Sequenzierung fanden sich neben den sechs erwarteten Austauschen ein zusätzlicher Austausch und zwei Deletionen. Letztere zeigten sich für die Bindung als essentiell. Ein signifikanter struktureller Einfluss dieser Deletionen wurde anhand von CD-Spektren im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich. Darüber hinaus führten die Deletionen zu einer deutlichen Destabilisierung des gefalteten Proteins. Einen geringeren Einfluss auf thermische Stabilität und Struktur besaßen die sechs geplanten Substitutionen, weshalb die entsprechende Bindungsstelle als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Bibliotheken dienen kann.

Die beobachtete Affinität des Binders zu TNF-alpha im nanomolaren Bereich ist um mindestens eine Größenordnung höher als in den meisten Interaktionen des Ubiquitins mit der natürlichen Bindestelle um I44. Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde gezeigt, dass die Interaktion der Ubiquitin-Variante mit dem homotrimeren TNF-alpha auf einer 1:1-Stöchiometrie beruht. Im Gegensatz dazu weisen andere TNF-bindende Moleküle aufgrund der Dreifachsymmetrie des TNF-alpha eine 3:1-Stöchiometrie auf. Das Verhalten basiert möglicherweise auf einem bisher nicht charakterisierten Epitop im TNF-alpha und zeigt das Potential künstlicher Bindeproteine, für Antikörper schwer zugängliche Epitope zu erkennen.

Inhalt

Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Antikörper – universelle Bindemoleküle	1
1.2 Künstliche Bindeproteine.....	4
1.3 Erzeugung künstlicher Bindeproteine	6
1.4 Ubiquitin als alternatives Gerüstprotein.....	10
1.5 Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha als pharmakologisch relevante Zielstruktur	12
1.6 Zielstellung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Oligodesoxynukleotide	20
2.3 Plasmide	20
2.4 Mikroorganismen	21
2.5 Nährmedien und Antibiotika.....	21
2.6 Puffer und Lösungen	22
2.7 Enzyme.....	23
2.8 Kits, Standards und sonstige Materialien.....	24
2.9 Geräte und Zubehör.....	26
2.10 Software	28
2.11 Molekularbiologische Methoden	28
2.11.1 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.11.2 Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA.....	28
2.11.3 Ligierung von DNA-Fragmenten	29
2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.11.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	30
2.11.6 Sequenzierung von DNA-Molekülen.....	30
2.11.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
2.12 Evolutionäre Selektion durch Ribosomen- <i>display</i>	31
2.12.1 Erstellung einer Ubiquitin-DNA-Bibliothek für das Ribosomen- <i>display</i>	31
2.12.2 Gekoppelte Transkription und Translation <i>in vitro</i>	33
2.12.3 Immobilisierung zielspezifischer ternärer Komplexe	34
2.12.4 Isolierung und reverse Transkription der mRNA.....	34
2.12.5 Klonierung der DNA-Bibliotheken	35
2.13 Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
2.13.1 Stammhaltung und Anzucht von <i>E. coli</i>	35
2.13.2 Herstellung kompetenter Zellen	36

Inhalt

2.13.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	36
2.13.4	Expression im Schüttelkolben.....	37
2.13.5	Expression in 96- <i>deep well</i> -Platten.....	38
2.14	Proteinchemische und analytische Methoden	38
2.14.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.14.2	Proteinreinigung.....	38
2.14.2.1	Reinigung von Ubiquitin-Varianten.....	39
2.14.2.2	Reinigung von TNF-alpha mittels SUMO-Fusionsmethode.....	39
2.14.2.3	Analytische Größenausschlusschromatographie zur Komplexbestimmung.....	40
2.14.3	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	40
2.14.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	41
2.14.5	Amin-spezifische Modifikation von Proteinen	41
2.14.6	ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	41
2.14.7	Analytische Ultrazentrifugation	42
2.14.8	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	42
2.14.9	Massenspektrometrie.....	43
2.14.10	Zellkulturuntersuchung der Zytotoxizität von TNF-alpha	43
2.15	Spektroskopische Methoden	43
2.15.1	UV/Vis-Spektroskopie	43
2.15.2	Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie.....	44
2.15.3	Fluoreszenzspektroskopie	45
2.15.4	NMR-Spektroskopie	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Herstellung des Zielproteins TNF-alpha.....	47
3.1.1	Herstellung und Reinigung von TNF-alpha als SUMO-Fusion.....	48
3.1.2	Charakterisierung des rekombinanten TNF-alpha	49
3.1.2.1	Zirkulardichroismus(CD)-spektroskopische Untersuchung des TNF-alpha.....	50
3.1.2.2	Massenspektrometrische Untersuchung des TNF-alpha	50
3.1.2.3	Analytische Ultrazentrifugation	50
3.1.2.4	Biologische Aktivität mittels L929-Zellassay.....	50
3.1.2.5	Funktionale Charakterisierung von biotinyliertem TNF-alpha	51
3.2	Selektion einer Ubiquitin-Bibliothek gegen TNF-alpha	52
3.2.1	Konstruktion und Analyse der Ubiquitin-Bibliothek	52
3.2.1.1	PCR-basierte Erstellung der Ubiquitin-Bibliothek.....	52
3.2.1.2	Untersuchungen zur löslichen Herstellung von Bibliotheksvarianten	54
3.2.2	Isolierung TNF-alpha-bindender Ubiquitin-Varianten	55
3.2.2.1	Selektion der synthetisierten Ubiquitin-Bibliothek gegen TNF-alpha.....	55
3.2.2.2	Identifikation TNF-alpha-bindender Ubiquitin-Varianten.....	57

Inhalt

3.3	Charakterisierung eines Ubiquitin-basierten TNF-alpha-Binders.....	59
3.3.1	Untersuchung der Interaktion von TNF-alpha mit der Ubiquitin-Variante 10F .	59
3.3.1.1	Herstellung und Reinigung von 10F und verwandten Ubiquitin-Varianten im Schüttelkolben-Maßstab	59
3.3.1.2	TNF-alpha-Bindung von 10F und verwandten Ubiquitin-Varianten	60
3.3.1.3	Spezifität der Ubiquitin-Variante 10F	62
3.3.1.4	Charakterisierung der Affinität von 10F an TNF-alpha mittels ELISA.....	62
3.3.1.5	Isothermale Titrationskalorimetrie	62
3.3.1.6	NMR-spektroskopische Untersuchung des Komplexes	64
3.3.1.7	Analytische Ultrazentrifugation	67
3.3.1.8	Fluoreszenzkinetische Analyse der TNF-alpha-Trimerdissoziation	67
3.3.2	Strukturelle Untersuchung von 10F und verwandter Ubiquitin-Varianten	69
3.3.2.1	CD-spektroskopische Untersuchungen	69
3.3.2.2	Strukturelle Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie	69
3.3.2.3	Thermische Stabilität	70
4	Diskussion	74
4.1	Herstellung von funktionellem humanen TNF-alpha in <i>E. coli</i> mittels SUMO-Fusionsmethode	74
4.2	Design einer Ubiquitin-basierten Proteinbibliothek.....	76
4.3	Selektion eines künstlichen Bindeproteins gegen TNF-alpha.....	78
4.4	Untersuchung der Interaktion zwischen der selektierten Ubiquitin-Variante und TNF-alpha	79
4.5	Strukturelle Auswirkungen der Austausche in der TNF-alpha-bindenden Ubiquitin-Variante.....	82
5	Ausblick	85
6	Literaturverzeichnis.....	86
	Anhang.....	

Abkürzungen

A.U.	<i>arbitrary units</i>
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>absorbance units</i>
A _{xxx}	Extinktion bei der Wellenlänge xxx nm
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Ig-Kette
C _L	konstante Domäne der leichten Ig-Kette
CV	Säulenvolumen
Da	Dalton
DARPIN	<i>designed ankyrin-repeat protein</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	<i>electrospray ionization</i>
F _{ab}	<i>fragment antigen-binding</i>
F _c	<i>fragment crystallizable</i>
F _v	<i>fragment variable</i>
g	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
Ig	Immunglobulin
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
kbp	1000 Basenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NMR	Kernmagnetresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	<i>protein data bank</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RD	<i>Ribosomen-display</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
Tab.	Tabelle
T _m	mittlere Übergangstemperatur
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (Peroxidase-Substrat)
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure

Abkürzungen

u. a.	unter anderem
v/w	Volumen/Masse
V_H	variable Domäne der schweren Ig-Kette
V_L	variable Domäne der leichten Ig-Kette
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Antikörper – universelle Bindemoleküle

Die Antikörper bzw. Immunglobuline des Immunsystems der höheren Vertebraten stellen das Paradigma der universellen Bindemoleküle dar. Im Zuge der humoralen Immunantwort erkennen sie vielfältige Zielmoleküle und vermitteln hochspezifisch Effektorfunktionen. Sie lösen beispielsweise die Phagozytose von Mikroorganismen aus und aktivieren das Komplementsystem (Janeway *et al.*, 2001).

Die Grundlage der Erkennung unterschiedlichster Zielstrukturen bildet die Architektur der Antikörper. Im Allgemeinen formen vier Untereinheiten, je zwei identische leichte (L-Kette, ca. 25 kDa) und je zwei identische schwere Polypeptidketten (H-Kette, ca. 50 kDa), ein Immunglobulinmolekül (Abb. 1). Die einzelnen Ketten weisen mehrere Immunglobulindomänen von ca. 110 Aminosäuren mit hauptsächlich antiparalleler beta-Faltblattstruktur auf. Eine zentrale, intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert die einzelnen Domänen jeweils. Die leichten Ketten enthalten eine variable (V_L) und eine konstante (C_L) Domäne, während die schweren Ketten eine variable (V_H) und mehrere konstante (C_{H1} bis C_{H3} bei den Immunglobulin-Klassen A, D und G; C_{H1} bis C_{H4} bei den Klassen E und M) Domänen besitzen. Zwischen der C_{H1} - und der C_{H2} -Domäne befindet sich eine Scharnierregion (*hinge*), in der beide schwere Ketten abhängig von Antikörperklasse und Spezies über zwei bzw. drei intermolekulare Disulfidbrücken assoziiert sind. Die leichten Ketten sind ebenfalls über eine Disulfidbrücke mit den schweren Ketten verknüpft. Durch Proteolyse mit Papain und partielle Reduktion können sogenannte F_{ab} -Fragmente hergestellt werden. Sie bestehen aus einer vollständigen leichten Kette sowie der variablen und der ersten konstanten Domäne einer schweren Kette (Abb. 1). Beide Ketten bleiben durch eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft. Zusätzlich entsteht ein F_c -Fragment, das aus den restlichen konstanten Domänen der schweren Ketten gebildet wird und welches die Effektorfunktionen vermittelt. Durch limitierte Proteolyse kann auch das F_v -Fragment als kleinste antigenbindende Einheit gewonnen werden. Es besteht lediglich aus den nicht kovalent verbundenen variablen Domänen der leichten und schweren Kette, die gemeinsam die Antigenbindung vermitteln. Die konservierten Bereiche (*framework regions*) der beta-sandwich-Struktur der Immunglobulindomäne bieten ein stabiles Gerüst für drei hypervariable Schleifen, die auch als *complementarity determining regions* (CDRs) bezeichnet werden. Somit bilden insgesamt sechs CDRs die Antigenbindestelle, das Paratop. Die hohe Variabilität bezüglich Aminosäuresequenz und Struktur eben dieses Bereichs ermöglicht die universelle Bindungsfähigkeit der Antikörper.

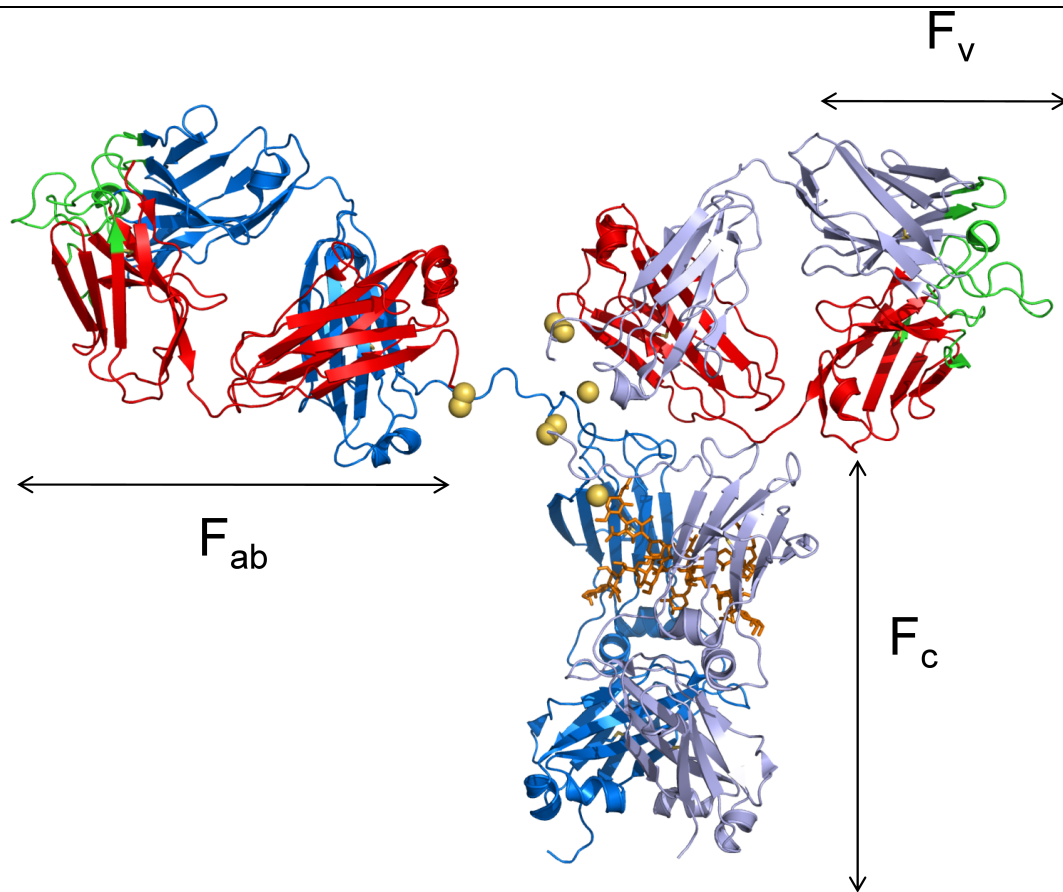


Abbildung 1: Aufbau eines IgG₁-Moleküls.

Antikörper bestehen aus zwei identischen leichten (rot) und zwei identischen schweren Ketten (blau). Untereinander sind die Ketten durch Disulfidbrücken (gelb) verknüpft. Die schweren Ketten des IgG₁-Subtyps weisen drei konstante Domänen (C_H) auf. C_H2 und C_H3 bilden dabei den F_c-Teil, in dem Glykosylierungen (orange) vorhanden sind. C_H1 gehört zusammen mit der konstanten Domäne der leichten Kette (C_L) und den variablen Domänen der beiden Ketten (V_L und V_H) zum F_{ab}-Fragment. Die variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bilden ein F_v-Fragment. Dort befinden sich je Domäne drei hypervariable Schleifen (grün), die *complementarity determining regions* (CDRs), welche für die Antigenbindung verantwortlich sind. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Code 1hzh).

Aufgrund des vielfältigen Repertoires an Zielstrukturen dominierten Antikörper in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung von Biomolekülen mit spezifischen Bindungseigenschaften. Sie finden Anwendung in der Analytik (Engvall und Perlmann, 1971; Voshol *et al.*, 2009), medizinischen Diagnostik (Weber *et al.*, 2008) und Therapie (Dimitrov und Marks, 2009) oder als Katalysatoren chemischer Reaktionen (Hilvert, 2000). Bei der ELISA-Methode, als Beispiel für die diagnostische Verwendung, werden die Zielmoleküle häufig mit polyklonalen Antikörpern detektiert. Diese werden durch das natürliche Immunsystem oder die Immunisierung von Labortieren gewonnen und stellen ein Gemisch von Antikörpern mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität dar. Sie können also unter Umständen unterschiedliche Bereiche auf den Antigenen, sogenannte Epitope, erkennen. Mit Hilfe der Hybridom-Technologie (Köhler und Milstein, 1975) wurde es möglich, monoklonale Antikörper herzustellen. Dadurch können Antikörper mit identischer Epitopspezifität und

1 Einleitung

gleichen funktionellen, chemischen sowie strukturellen Eigenschaften in beliebigen Mengen produziert werden. Unspezifische Interaktionen, wie sie z. B. mit polyklonalen Antikörpern vorkommen, können so weitgehend vermieden werden. Monoklonale Antikörper finden hauptsächlich in der Tumordiagnostik und der Affinitätschromatographie Anwendung. Im Jahr 1986 erfolgte zudem die erste Zulassung eines aus der Maus isolierten, monoklonalen Antikörpers für therapeutische Zwecke. Solche speziesfremden Antikörper können jedoch unerwünschte Immunreaktionen in Patienten hervorrufen, worauf die Entwicklung humanisierter Maus-Antikörper vorangetrieben wurde. Dazu wurden die Maus-CDRs in humane Gerüststrukturen eingesetzt. Die Möglichkeit, heute vollständig humane, monoklonale Antikörper aus Phagen-*display*-Bibliotheken und transgenen Mäusen zu gewinnen, lässt die Bedeutung für therapeutische Anwendungen weiter ansteigen (Weiner, 2006). Im Jahr 2010 waren bereits mehr als 30 Antikörper für verschiedene Indikationen zugelassen sowie 26 weitere in klinischen Studien der Phase III (Beck *et al.*, 2010). Um einen erhöhten therapeutischen Nutzen durch höhere Wirkortspezifität oder gezieltere Aktivierung von Effektorfunktionen zu erzielen, werden aktuell Antikörper mit zusätzlichen Paratopen – z. B. durch Einführung zusätzlicher variabler Domänen (Metz *et al.*, 2011) – entwickelt, die gleichzeitig an zwei oder mehr verschiedene Zielmoleküle binden.

Ogleich ihrer Vorteile bezüglich Affinität und Spezifität weisen Antikörper auch bestimmte Nachteile auf, die zur Einschränkung ihrer Verwendung in einigen Bereichen führen. Die komplizierte Architektur aus vier Polypeptidketten erfordert bei der rekombinanten Herstellung aufwändige Klonierungsschritte und die gleichzeitige Expression zweier Strukturgene. Im bakteriellen Zytoplasma gelingt die Produktion von Antikörpern nur mit geringen Ausbeuten. Das reduzierende Milieu verhindert die Disulfidbrückenausbildung und somit die korrekte Faltung, was zur Aggregation führt. Zudem fehlen die Voraussetzungen für notwendige posttranslationale Modifikationen. Die Biosynthese funktioneller, monoklonaler Antikörper erfolgt deshalb in eukaryotischen Zellen. Nur hier finden die richtige Verknüpfung der Disulfidbrücken und die korrekte Glykosylierung statt. Die momentan einzige universelle Methode zur Gewinnung von vollständigen Antikörpern in ausreichenden Mengen beruht auf der kostenintensiven Herstellung in *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen. Trotz der Verbesserung und Optimierung von Produktionsmethoden erfolgt die Verwendung von Volllängenantikörpern momentan hauptsächlich im therapeutischen Bereich, in dem die Herstellung nur einen geringen Kostenanteil ausmacht (Kelley, 2009). Für die Anwendung im industriellen Großmaßstab, z. B. in der Affinitätschromatographie, sind sie aufgrund der kostenintensiven Herstellung und der ungenügenden Stabilität gegenüber den harschen Bedingungen zur Säulenregeneration ungeeignet. Die Bivalenz der Antikörper - in jedem Molekül befinden sich zwei identische Bindungsstellen - führt unter Umständen zu nachteiligen, agonistischen Effekten durch Rezeptordimerisierungen und beschränkt so wiederum die

therapeutische Anwendung. Für bestimmte therapeutische Indikationen sind die F_c -Teil-vermittelten Effektorfunktionen, wie antikörperabhängige zellvermittelte Zytolyse (ADCC) und komplementabhängige Zytolyse (CDC), unerwünscht. Die Molekülgröße der Immunglobuline verhindert eine effiziente Penetration dichten Gewebes, z. B. in einigen Tumoren (Chester und Hawkins, 1995), und verringert so den therapeutischen Nutzen ebenfalls. Eine durch die Wechselwirkungen mit F_c -Rezeptoren und die langsame Eliminierung aus der Blutbahn bedingte lange Serumhalbwertszeit kann aus therapeutischer Sicht vorteilhaft sein, ist beim diagnostischen Einsatz aber unerwünscht. Nicht zuletzt schränkt die patentrechtliche Situation die Entwicklung und Verwendung der Antikörper ein.

Einige der aufgeführten Nachteile lassen sich durch die Nutzung von Antikörperfragmenten, wie F_{ab} oder *single chain* F_v (scF_v), anstelle der kompletten Moleküle vermeiden. Entsprechende Methoden ermöglichen beispielsweise die kostengünstige Produktion der Fragmente im Periplasma von *E. coli* (Skerra und Plückthun, 1988). Das teilweise oder gänzliche Fehlen der konstanten Domänen führt zum einen zu einer verringerten Molekülgröße und somit einer verbesserten Gewebepenetration sowie einer zumindest aus diagnostischer Sicht günstigen, verringerten Serumhalbwertszeit. Zum anderen können keine unerwünschten Effektorfunktionen vermittelt werden. Die Abwesenheit der konstanten Domänen führt jedoch zu einer signifikanten Destabilisierung der Fragmente im Vergleich zu den kompletten Antikörpermolekülen.

1.2 Künstliche Bindeproteine

Aufgrund der Einschränkungen der Antikörper und Antikörperfragmente, die hauptsächlich auf ihrer komplizierten Struktur und ihren biophysikalischen Eigenschaften beruhen, wurde vor etwa 20 Jahren begonnen, als Alternative künstliche Bindeproteine zu entwickeln. Bezüglich Affinität und Spezifität gelten die Antikörper als Vorbild.

Als strukturelle Grundlage dienen Gerüstproteine (*scaffolds*), die sowohl immunglobulinartige Faltung als auch eine völlig verschiedenartige Topologie besitzen können (Binz *et al.*, 2005; Hey *et al.*, 2005; Gebauer und Skerra, 2009). Gemeinsam sind den dabei verwendeten Gerüstproteinen eine einfache Architektur und eine hohe thermodynamische Stabilität. Sie bestehen zumeist aus einer einzelnen Polypeptidkette und besitzen keine posttranslationalen Modifikationen sowie keine intrinsischen Cysteine. Dies ermöglicht die zytoplasmatische Herstellung in *E. coli*, welche im Gegensatz zur periplasmatischen Produktion höhere Ausbeuten ermöglicht. Zudem sind keine aufwändigen und kostenintensiven Prozesse wie die Rückfaltung *in vitro* oder die Expression in eukaryotischen Zellen notwendig. Dadurch wird der Einsatz bei Verfahren im industriellen Großmaßstab möglich. Die geringe Größe der Gerüstproteine von meist unter 20 kDa bietet weitere Vorteile. Neben einer effizienten

1 Einleitung

Gewebepenetration bei therapeutischen Anwendungen werden genetische Modifikation und Fusionen erleichtert. So lassen sich Fusionskonstrukte erzeugen, die Effektorfunktionen analog zu den Antikörpern vermitteln und z. B. gezielt das Immunsystem aktivieren. Die Verwendung von Gerüstproteinen humanen Ursprungs verringert die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Immunogenität. Eine übersichtliche Patentsituation vereinfacht die Entwicklung und Anwendung neuer Produkte.

Verwendungsmöglichkeiten für künstliche Bindeproteine finden sich ebenso wie bei den Antikörpern unter anderem in Therapie, Diagnostik und Forschung. Im Jahr 2009 erfolgte in den USA die erste Zulassung eines alternativen Bindeproteins für therapeutische Zwecke (Beck *et al.*, 2010). Ecallantid, ein Inhibitor der Serinprotease Plasma-Kallikrein, wird zur Behandlung des hereditären Angioödem eingesetzt. Isoliert wurde der Inhibitor mittels Phagen-*display* aus Bibliotheken der ersten Kunitz-Domäne des humanen Lipoprotein-assoziierten Koagulationsinhibitors (Ley *et al.*, 1996; Lehmann, 2008). Durch iterativen Austausch von Aminosäureresten in zwei oberflächenexponierten Schleifen wurde eine inhibitorische Konstante K_i von 44 pM erzielt. Drei Disulfidbrücken stabilisieren das 7 kDa große Gerüstprotein bzw. dessen Varianten, machen jedoch die Herstellung in der Hefe *Pichia pastoris* notwendig (Markland *et al.*, 1996). Während der klinischen Studien zeigten einige Patienten eine Immunreaktion auf das Präparat, wobei der größte Teil nachweislich auf die Erkennung von *Pichia pastoris*-Proteinen zurückzuführen war (Lehmann, 2008). Mehrere weitere künstliche Bindeproteine befinden sich aktuell in klinischen Studien (Beck *et al.*, 2010).

Als diagnostische Anwendung sind der Einsatz im ELISA, bei der Durchflusszytometrie oder Immunohistochemie möglich. Zum Beispiel werden Affibodies – Bindeproteine, die auf der Z-Domäne des Protein A aus *Staphylococcus aureus* basieren – mit einem C-terminalen Cystein versehen (Ahlgren *et al.*, 2009; Chernomordik *et al.*, 2010). Über dieses erfolgt die Kopplung des Radionuklids ^{99m}Tc oder eines Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffs. Entsprechende Konstrukte, die an den human epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) binden, werden zur *in vivo*-Detektion von Tumoren evaluiert, in denen dieser Rezeptor überexprimiert wird. Analog wurden auch *designed ankyrin repeat proteins* (DARPs) gegen HER2 zur Tumordetektion getestet (Zahnd *et al.*, 2010). Dabei zeigte sich, dass aufgrund der geringen Molekülgröße der künstlichen Bindeproteine im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern und *single chain-F_v*s eine bessere Gewebepenetration und somit ein höherer Kontrast zum umgebenden Gewebe erreicht wird. Eine weitere Möglichkeit der diagnostischen Verwendung ist der ELISA-Einsatz nach Fusion mit Enzymen wie z. B. bei der Kopplung von beta-Galaktosidase an Affibodies (Rönnmark *et al.*, 2003).

Die hohe Stabilität, kompakte Faltung und kosteneffiziente Herstellung vieler künstlicher Bindeproteine ermöglichen ihren Einsatz in der Affinitätschromatographie (Nord *et al.*, 2000;

Fiedler *et al.*, 2006). Auch die hohe pH-Stabilität und die Reversibilität der Entfaltung favorisieren die Verwendung künstlicher Bindeproteine gegenüber der von Antikörpern. So sind *cleaning in place*-Methoden mit extremen pH-Werten oder chemischen Denaturierungsmitteln anwendbar. Die Einführung einzelner, oberflächenexponierter Cysteine ermöglicht die gerichtete, chemische Kopplung solcher Bindeproteine an eine Chromatographiematrix.

In der Forschung können künstliche Bindeproteine beispielsweise als Enzyminhibitoren eingesetzt werden. Affibodies werden von der Firma Finnzymes als reversible DNA-Polymeraseinhibitoren für *hot start*-Polymerasereagenzien eingesetzt. Da die Stabilität der künstlichen Bindeproteine im Gegensatz zu Antikörpern nicht von Disulfidbrücken beeinflusst wird, eignen sie sich auch zum Einsatz im reduzierenden Milieu des Zytosols. Als Inhibitoren intrazellulärer Signaltransduktionsproteine können sie so z. B. *knockout*-Phänotypen generieren. Damit bieten sie eine alternative Methode zu RNA-Interferenz oder Gen-*knockout*. Ein Beispiel ist die *in vivo*-Inhibierung intrazellulärer Kinasen durch DARPs (Amstutz *et al.*, 2005).

1.3 Erzeugung künstlicher Bindeproteine

Zur Generierung spezifischer Bindungseigenschaften ist die Veränderung von oberflächenexponierten Aminosäureresten der Gerüstproteine notwendig. Dabei existieren verschiedene Ansätze (Binz *et al.*, 2005; Hey *et al.*, 2005). Analog zu den Antikörpern können mehrere Schleifen, die auf einem unflexiblen Gerüst exponiert sind, als Paratop dienen (Abb. 2A). Ein Beispiel hierfür ist die humane Fibronectin III-Domäne, die eine Immunglobulin-ähnliche Faltung aufweist (Koide *et al.*, 1998). Zwei antiparallele beta-Faltblätter werden durch drei exponierte Schleifen ähnlich den CDRs verbunden. Im Gegensatz zu den Antikörpern wird die Domäne jedoch nicht zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert. Durch Substitutionen, Insertionen und Deletionen in den Schleifen werden neue Bindungseigenschaften erzeugt. Ein nicht Immunglobulin-ähnliches *scaffold* stellt das Bilin-bindende Protein aus der Lipocalin-Familie dar (Schlehuber und Skerra, 2002). Das Protein weist eine *beta-barrel*-Struktur auf. Durch Austausche in vier Schleifen, welche die Faltblattstränge verbinden, können Binder gegen Haptene und Proteine – sogenannte Anticaline – erzeugt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung einzelner Schleifen, die meist von variabler Länge sind oder bereits über eine gewisse Affinität zur Zielstruktur verfügen (Abb. 2B). Als Beispiel kann hier die bereits erwähnte, in Protease-Inhibitoren vorkommende Kunitz-Domäne dienen, auf deren Grundlage ein Wirkstoff zur Inhibierung der fibrinolytisch aktiven Protease Plasmakallikrein entwickelt wurde (Ley *et al.*, 1996). Durch Austausche in der Bindungsschleife wurden Affinität und Spezifität hinsichtlich des Zielmoleküls optimiert. Souriau *et al.* (2005)

1 Einleitung

fügten Peptidschleifen mit zufälliger Aminosäuresequenz in das Gerüstprotein Min-23 ein, welches ein Disulfidbrücken-stabilisiertes beta-Faltblatt-Motiv aufweist.

Die Peptidschleifen, die in Antikörpern und künstlichen Bindeproteinen die Bindungseigenschaften vermitteln, zeigen häufig strukturelle Veränderungen durch die Interaktion mit der Zielstruktur. Die Fixierung der mehr oder weniger flexiblen Schleifen während der Bindung führt zu ungünstigen entropischen Effekten. Eine höhere Ausgangskomplementarität der Geometrien von Paratop und Epitop sowie eine verringerte intrinsische Flexibilität tragen zur Reduktion entropischer Verluste bei. Durch eine strukturelle Vororganisation der Bindungsstelle zeigen affinitätsmaturierte Antikörper verringerte entropische Bindungsbeiträge (Sundberg und Mariuzza, 2002). Entsprechend werden bei bestimmten Gerüstproteinen Substitutionen in rigiden Sekundärstrukturbereichen vorgenommen (Abb. 2C). Der entropische Vorteil dieses Prinzips geht mit dem Risiko einer reduzierten Variabilität bezüglich der erkennbaren Zielstrukturen einher. Ein Beispiel für diese Strategie sind die Affibodies, bei denen durch 13 Substitutionen in zwei alpha-Helices der Z-Domäne des *Staphylococcus* Protein A neue Bindungseigenschaften erzeugt werden (Nord *et al.*, 1997). In den DARPins erfolgen die Austausche in beta-turn- und alpha-Helix-Strukturen (Binz *et al.*, 2004). In humanem gammaB-Kristallin und Ubiquitin werden Aminosäurereste in beta-Faltblättern zur Paratopgenerierung herangezogen (Ebersbach *et al.*, 2007; Fiedler *et al.*, 2004).

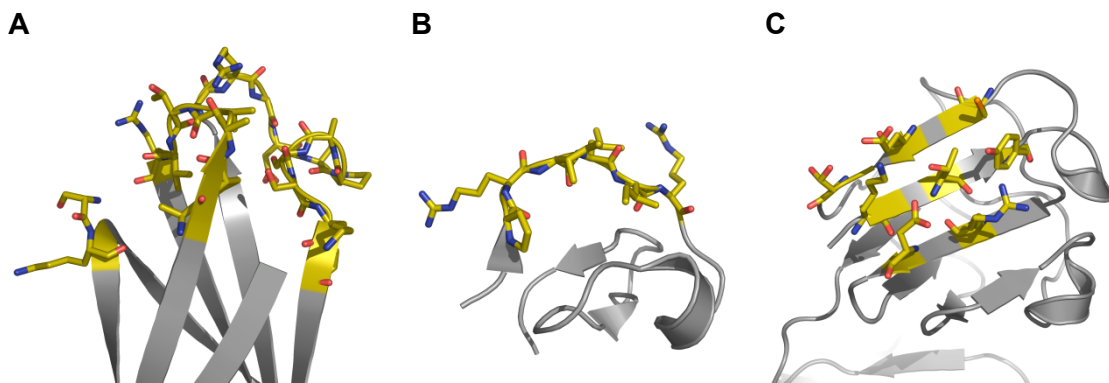


Abbildung 2: Strukturelle Basis von künstlichen Bindestellen auf alternativen Gerüstproteinen.

Die verschiedenen Konzepte zur Generierung eines künstlichen Paratops: (A) Imitation eines Antikörperepitops durch Randomisierung mehrerer Peptidschleifen, wie bei der Fibronectin III-Domäne, (B) Verwendung einer einzelnen Peptidschleife auf einem rigiden Grundgerüst, z. B. bei dem Trypsin-Inhibitor EETI-II, oder (C) Austausch von oberflächenexponierten Aminosäureresten in Sekundärstrukturelementen, wie im humanen gammaB-Kristallin, ermöglichen im Zusammenspiel mit der Architektur des *scaffolds* die Ausbildung von ausgedehnten Flächen für die Interaktion mit Proteinen, von flexiblen Peptidschleifen für die Penetration von Spalten, aber auch die Formung von Kavitäten und Spalten für die Bindung kleiner Moleküle (Hey *et al.*, 2005). Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Codes 1fna, 1h9h und 1amm).

1 Einleitung

Auch bei den bereits erwähnten Anticalinen, welche auf der Lipocalin-Familie basieren, erfolgen Aminosäureaustausche, zusätzlich zu den Peptidschleifen, in den Faltblattsträngen der *beta-barrel*-Struktur (Kim *et al.*, 2009).

Für die Herstellung künstlicher Bindeproteine werden häufig kombinatorische Bibliotheken auf der Grundlage des *scaffolds* erzeugt. Das geschieht auf DNA-Ebene durch zufällige Mutationen in den Codons der gewünschten Aminosäuren. Je nach Mutationsstrategie wird die statistische Verteilung der 20 Aminosäuren dabei gewichtet. Bei der NNK-Motiv-basierten Synthese sind beispielsweise alle 32 Codons erlaubt, die mit Guanin oder Thymidin enden. So kommen hier nur ein Stopp- und ein Cystein-Codon vor. Die trinukleotidbasierte Synthese ermöglicht das gezielte Mischen von Codon-Verhältnissen und somit das Weglassen unerwünschter Aminosäuren (Virnekäs *et al.*, 1994). Werden alle 20 Aminosäuren zugelassen, ergibt sich beispielsweise im Fall von DARPinS mit 14 randomisierten Positionen eine theoretische Bibliotheksgröße von etwa $1,6 \times 10^{18}$ Varianten. Bei der Auswahl der randomisierten Aminosäurepositionen existieren ebenfalls diverse Strategien. Häufig werden als Ausgangspunkt zur Paratoperzeugung Reste genutzt, die bereits in natürlichen Interaktionen des Gerüstproteins involviert sind. So sind die randomisierten Schleifen der Lipocalin-basierten Anticaline ursprünglich in die Bindung von Haptenen involviert (Schlehuber und Skerra, 2002). Auch in den DARPinS sind die Austauschpositionen bekannte Ligandeninteraktionsstellen natürlicher *ankyrin repeat*-Proteine (Binz *et al.*, 2004). Weniger verbreitet ist die Erzeugung von *de novo*-Bindungsstellen, wie zum Beispiel im humanen gammaB-Kristallin (Ebersbach *et al.*, 2007). Das Augenlinsenprotein besitzt keine natürlichen Bindungsstellen.

In den erzeugten Bibliotheken werden mit Hilfe von Selektions- bzw. *screening*-Verfahren Varianten mit hoher Affinität und Spezifität gesucht. Verwendung finden hier unter anderem das Ribosomen-*display* (Hanes und Plückthun, 1997; Binz *et al.*, 2004), das Phagen-*display* (Smith, 1985; Ebersbach *et al.*, 2007; Steiner *et al.*, 2008), das mRNA-*display* (Roberts und Szostak, 1997; Xu *et al.*, 2002), das CIS-*display* (Odegrip *et al.*, 2004) und das *display* auf Hefe- oder Bakterienzellen (Boder und Wittrup, 1997; Francisco *et al.*, 1993; Lipovsek *et al.*, 2007; Kronqvist *et al.*, 2008). Entwickelt wurden einige dieser Methoden ursprünglich für die Herstellung von Antikörperfragmenten und Antikörpern unter Umgehung der Immunisierung von Tieren.

Das Ribosomen-*display* bietet den Vorteil, dass es *in vitro* durchgeführt wird. Deshalb wird die verwendbare Bibliotheksgröße nicht durch die Transformationseffizienz von lebenden Zellen, z. B. *E. coli* mit 10^9 - 10^{10} Transformanten/ μ g DNA, limitiert, sondern allein durch die Anzahl im Ansatz verfügbarer Ribosomen. Dies ermöglicht die Selektion mit Bibliotheken von bis zu 10^{14} Varianten (Amstutz *et al.*, 2001). Die DNA-Bibliothek wird genetisch mit einer *spacer*-Sequenz (Ankersequenz) fusioniert und dann *in vitro* transkribiert (Abb. 3). Bei der *in vitro*-Translation

1 Einleitung

der mRNA fixiert die Ankersequenz das translatierte Protein am Ribosom und ermöglicht gleichzeitig das vollständige Verlassen des ribosomalen Ausgangstunnels und damit die Einnahme der nativen Struktur. Aufgrund der Abwesenheit von Stopp-Codons in der mRNA erfolgt keine Dissoziation der ternären Komplexe aus mRNA, translatiertem Protein und Ribosom. Zusätzlich werden diese durch eine hohe Mg^{2+} -Konzentration und, in geringerem Maße, eine niedrige Temperatur stabilisiert. Die ternären Komplexe werden dann direkt für die Selektion an immobilisierbaren bzw. immobilisierten Liganden benutzt. Nicht oder schwach bindende Komplexe werden durch Waschschritte entfernt, während hochaffine Varianten am Zielmolekül hängen bleiben. Die mRNA der selektierten Komplexe wird in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Das Verfahren wird sowohl für die Selektion neuer Bindemoleküle als auch für die Affinitätsmaturierung angewendet (Zahnd *et al.*, 2007). Die Selektion bezüglich anderer Eigenschaften als der Bindung, wie z. B. der Stabilität ist möglich (Matsuura und Plückthun, 2003), wird jedoch durch die Destabilisierung der ternären Komplexe unter ungünstigen Bedingungen, z. B. einem extremen pH-Wert, und die nicht kovalente Kopplung von Genotyp und Phänotyp limitiert.

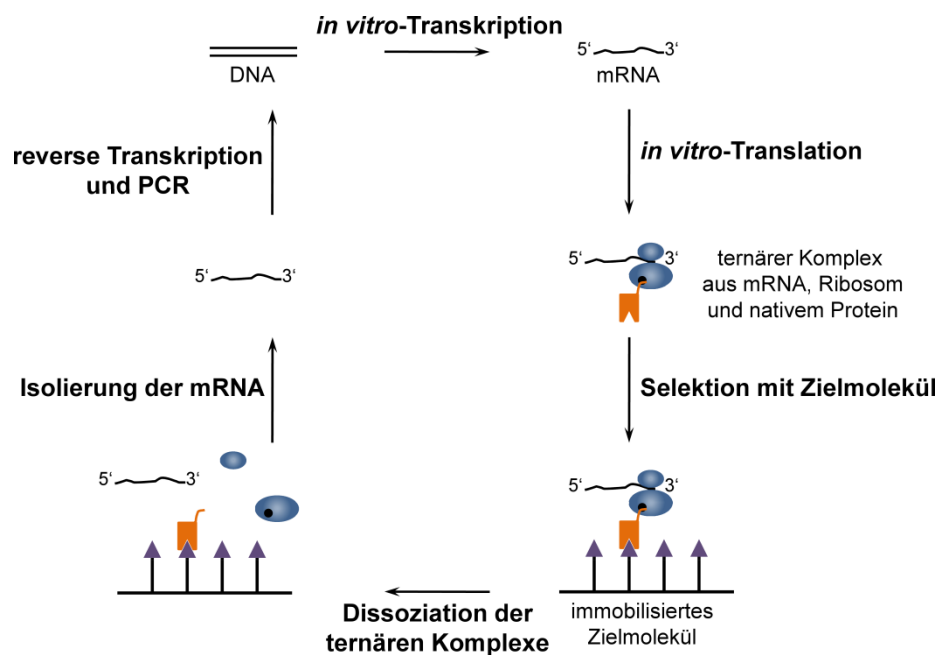


Abbildung 3: Prinzip des Ribosomen-*display*. (Modifiziert nach Hanes *et al.*, 2000)

Zunächst wird eine Bibliothek der Bindemoleküle *in vitro* transkribiert und translatiert. Aufgrund der Abwesenheit von Stop-Codons in der mRNA bleiben mRNA und natives Protein über das Ribosom verbunden. Diese ternären Komplexe werden in der Selektion gegen die Zielstruktur verwendet. Nicht bindende Moleküle werden durch Waschschritte entfernt. Darauf folgend wird die mRNA der noch gebundenen Komplexe eluiert und gereinigt. Durch reverse Transkription und anschließende Amplifikation der cDNA können Mutationen eingeführt werden und es wird eine mit bindenden Molekülen angereicherte DNA-Bibliothek erhalten, die im nächsten *display*-Zyklus eingesetzt wird.

1.4 Ubiquitin als alternatives Gerüstprotein

In Bezug auf künstliche Bindeproteine mit geringer Immunogenität sind humane Gerüstproteine von besonderem Interesse. So wird beispielsweise das humane *scaffold* Ubiquitin von der Firma Scil Proteins GmbH (Halle) zur Herstellung künstlicher Bindeproteine, sogenannter Affiline, verwendet. Ubiquitin ist 8,4 kDa schwer und kommt ubiquitär im Zytosol von eukaryotischen Zellen vor. Bemerkenswert ist die Konservierung der Aminosäuresequenz. Bei einem Vergleich von Ubiquitin aus *Saccharomyces cerevisiae* und dem Menschen, beide 76 Aminosäuren lang, finden sich nur drei Austausche. Auch die Funktion ist in allen Eukaryoten konserviert. Dies vereinfacht die Testung von Ubiquitin-basierten Bindeproteinen in Tiermodellen. Über den Carboxy-Terminus, der mit einem Diglycin-Motiv versehen ist, erfolgt die Verknüpfung mit Lysin-Seitenketten von Proteinen (Ubiquitinylierung), welche dadurch selektiv für den Abbau markiert werden (Hershko und Ciechanover, 1998). Lysinreste im Ubiquitin ermöglichen die Bildung von Polyubiquitin-Ketten. Die Verknüpfung erfolgt ATP-abhängig über eine Enzymkaskade und ist reversibel.

Ein fünfsträngiges, antiparalleles Faltblatt und eine dagegen gepackte alpha-Helix bilden das Faltungsmotiv des Ubiquitins mit seinem sehr kompakten hydrophoben Kern (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Proteine mit einer ähnlichen Struktur werden zur Superfamilie der „Ubiquitin-ähnlichen Proteine“ zusammengefasst (Murzin *et al.*, 1995). Dazu gehören u.a. Elongin B, Rad23, NEDD8, die SUMO-Familie und ISG15. Letzteres ist aus zwei Ubiquitin-artigen Domänen aufgebaut. Einige der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, wie NEDD8, SUMO und ISG15 werden, ebenso wie Ubiquitin, über ein C-terminales Diglycin-Motiv an Lysinreste konjugiert (Yeh *et al.*, 2000; Melchior, 2000). In Funktion und Ziel der jeweiligen Modifikationen unterscheiden sich alle Proteine voneinander. Die Enzymkaskaden, welche für die Konjugation verantwortlich sind, ähneln denen für die Ubiquitinylierung, sind aber nicht identisch. So existieren für jedes der Proteine spezifische E1-, E2-, und E3-Ligasen. Isopeptidasen katalysieren, wie beim Ubiquitin, die Abspaltung vom Substrat.

Neben der intrazellulären Bedeutung besitzt Ubiquitin auch weniger gut untersuchte extrazelluläre Funktionen. Durch Bindung an den Chemokin-Rezeptor CXCR4 moduliert es beispielsweise die angeborene und die adaptive Immunantwort (Majetschak, 2011).

Trotz der Vielzahl von Interaktionspartnern beschränkt sich die Bindung von natürlichen Liganden hauptsächlich auf drei Flächen im Ubiquitin (Hurley *et al.*, 2006) (Abb. 4). Die bekannteste Erkennungsstelle bildet der hydrophobe Bereich von I44 und H68. Dort binden vor allem helixartige Ubiquitin-Erkennungsmotive, die z. B. in den Enzymen der Ubiquitinylierungskaskade zu finden sind. Angrenzend an diese Reste werden auch L8 und I36

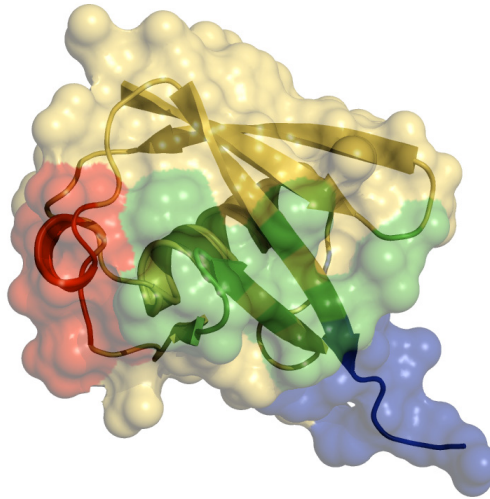


Abbildung 4: Natürliche Interaktionsstellen im Ubiquitin.

Die Interaktionen mit natürlichen Bindungspartnern konzentrieren sich im Ubiquitin auf drei Regionen: um I44 (grün), um D58 (rot) und am C-Terminus (blau). Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Code 1ubi).

von einigen Liganden in die Bindung einbezogen. Eine weitere, autarke Interaktionsfläche befindet sich um D58 (Lee *et al.*, 2006). Der hauptsächlich polare Bereich interagiert mit der A20 Zinkfinger-Domäne. Ein drittes Epitop stellt der C-Terminus des Ubiquitins dar. Unter Einbeziehung der Reste um I36 bindet dort ebenfalls eine Zinkfinger-Domäne.

Eine gute Voraussetzung für die Nutzung von Ubiquitin als Grundlage für die Generierung künstlicher Bindeproteine sind seine proteinchemischen Eigenschaften. Neben einer hohen Resistenz gegenüber extremen pH-Werten und denaturierenden Reagenzien ist dies auch seine große thermische Stabilität (Vijay-Kumar *et al.*, 1987; Makhatadze *et al.*, 1998). So liegt die Entfaltungstemperatur unter physiologischen Pufferbedingungen bei über 100 °C. Um die spektroskopischen Eigenschaften des Ubiquitins zu verbessern, wird von der Scil Proteins GmbH (Halle) als *scaffold* eine Ubiquitin-Variante verwendet, in welcher das Phenylalanin an Position 45 durch ein Tryptophan substituiert ist (Khorasanizadeh *et al.*, 1993; Fiedler *et al.*, 2004). Dies ermöglicht eine bessere Analyse durch Routine-Methoden, wie die Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie oder Faltungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie. Die Variante sollte auch in dieser Arbeit verwendet werden.

Die Erzeugung von Affilinen bei der Scil Proteins GmbH (Halle) basiert auf der Generierung neuer Bindeeigenschaften im Ubiquitin. Dabei wurden zur Konstruktion der *de novo*-Bindestelle oberflächenexponierte Aminosäurereste im beta-Faltblatt sowie angrenzenden Bereichen randomisiert, um möglichst große Wechselwirkungen mit dem Bindungspartner zu erreichen. Der hydrophobe Kern wurde intakt belassen. Es wurden im aminoterminalen beta-Faltblattstrang die Positionen 2, 4 und 6, in einer Schleife die Positionen 62 und 63 und am Beginn des C-terminalen beta-Faltblattstranges die Positionen 64, 65 und 66 ausgetauscht

(Abb. 5A). *In silico*-Untersuchungen zeigten keinen signifikanten Einfluss von Substitutionen an diesen Positionen auf die strukturelle Integrität des Gesamtproteins (Wiederstein und Sippl, 2005, interner Forschungsbericht Scil Proteins, 2002). Diese Ergebnisse konnten in praktischen Experimenten bestätigt werden. So wurden aus Bibliotheken, die durch zufällige Substitutionen an den acht aufgeführten Positionen generiert wurden, stabile Ubiquitin-Varianten isoliert, die spezifisch an Zielmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine binden (Fiedler *et al.*, 2004). Die Erkennung der Ubiquitin-Varianten aus den generierten Bibliotheken durch anti-Ubiquitin-Antiseren zeigt die Konservierung der Tertiärstruktur. Dennoch zeigten sich in der naiven Bibliothek zahlreiche Varianten, die in *E. coli* nicht löslich produziert werden konnten.

Durch gentechnische Einführung von Cysteinen in das eigentlich cysteinfreie Ubiquitin bietet sich die Möglichkeit für gezielte Modifikationen, z. B. die Dimerisierung durch Bismaleimide (Goldberg *et al.*, 1991). Als Ergebnis der chemischen Dimerisierung wurde die Generierung von Aviditätseffekten, also einer erhöhten Bindungsstärke, gezeigt (persönliche Mitteilung Arnd Steuernagel, 2010). Mittlerweile wird das Konzept mehrerer Ubiquitindomänen in einem Bindemolekül von der Scil Proteins GmbH (Halle) bereits im Rahmen der Bibliothekskonstruktion angewandt. Dabei erfolgt die genetische Fusion zweier Ubiquitin-Bibliotheken mit insgesamt 14 Randomisierungspositionen über ein kurzes Peptid. Das resultierende Bibliotheksformat erlaubt die Selektion von Varianten mit höherer Affinität im Vergleich zur Monomerbibliothek.

Um die Ubiquitin-basierten Affilin-Bibliotheken weiterzuentwickeln, wurden und werden alternative Bibliotheksconfigurationen getestet. So erfolgte beispielsweise die Evaluierung der alpha-Helix des Ubiquitins (Abb. 5B) in Bezug auf die Eignung als Paratop (Schraeml und Fiedler, 2008).

1.5 Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha als pharmakologisch relevante Zielstruktur

Um die Evaluierung von Bibliotheken eines Gerüstproteins zu ermöglichen, werden üblicherweise Modellproteine als Zielstrukturen eingesetzt, die eine schnelle Charakterisierung von selektierten Varianten mittels etablierter Methoden zulassen. Das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha ist infolge seiner pharmakologischen Relevanz ein vielfach verwendetes Zielmolekül bei der Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe auf Basis monoklonaler Antikörper und auch künstlicher Bindeproteine. Ursprünglich wurde dieses Protein identifiziert, da es *in vitro* zum Absterben bestimmter Tumorzellenlinien führt (Carswell *et al.*, 1975). Die Entdeckung, dass TNF-alpha und Cachectin, welches Endotoxin-augelöstes

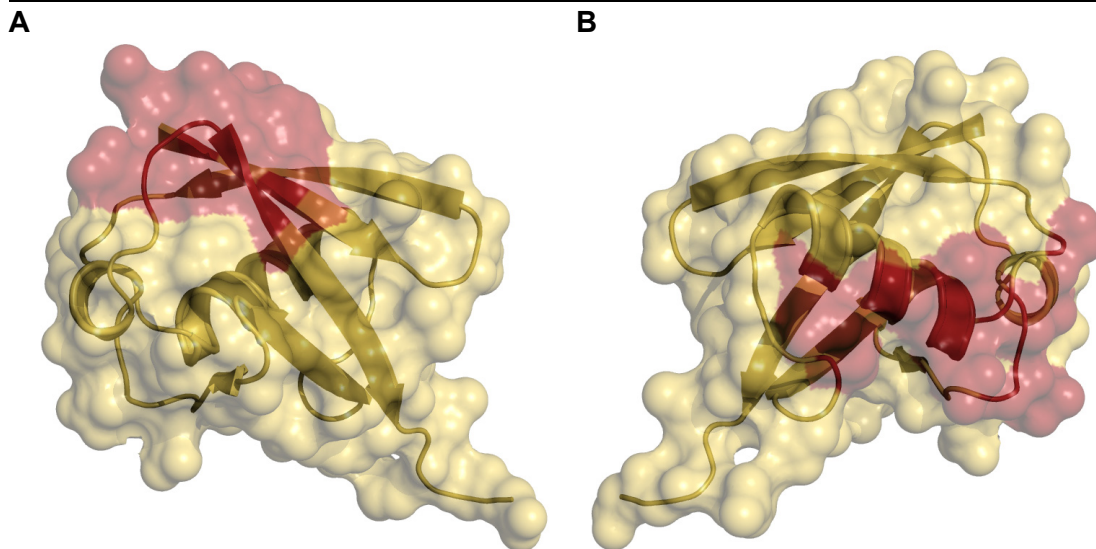


Abbildung 5: Bestehende Bibliothekskonfigurationen zur Erzeugung künstlicher Bindeproteine auf Grundlage des Ubiquitins.

Die Paratope vorangehender Bibliotheken im beta-Faltblattbereich (A) und im alpha-Helixbereich (B) des Ubiquitins liegen außerhalb der natürlichen Erkennungsstellen (vgl. Abb. 4) und sind somit *de novo*-Bindestellen. Zur besseren Veranschaulichung wurde das Molekül mit der Helix-seitigen Bindungsstelle (B) um 180° gedreht. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Code 1ubi).

Fieber, Schock und Kachexie vermittelt, das gleiche Molekül sind, gelang durch die Klonierung und rekombinante Expression des humanen TNF-alpha-Gens etwa zehn Jahre später (Marmenout *et al.*, 1985; Pennica *et al.*, 1984; Shirai *et al.*, 1985; Beutler und Cerami, 1986). TNF-alpha wird im menschlichen Körper von verschiedenen Zelltypen als integrales Transmembranprotein mit einer Molekularmasse von 26 kDa hergestellt. Es bildet dabei nicht kovalent verknüpfte Homotrimere. Mittels signalgesteuerter Proteolyse durch die membranständige Metalloprotease *TNF-alpha converting enzyme* (TACE) kann ein lösliches Homotrimer abgespalten werden (Black *et al.*, 1997), welches aus Monomeren von 17 kDa besteht (Abb. 6). Jede Untereinheit enthält eine Disulfidbrücke, deren Ausbildung für eine volle biologische Aktivität notwendig ist. Der Austausch der Cysteine gegen Alanine oder eine Salzbrücke führt zur Verringerung der Aktivität, jedoch nicht zu signifikanten konformationellen Unterschieden (Arakawa *et al.*, 1990; Narachi *et al.*, 1987). Strukturell bestehen die Protomere des löslichen Trimers hauptsächlich aus zwei antiparallelen Faltblättern mit einer *jelly roll*-Topologie (Eck und Sprang, 1989). Die Assoziation zu einem glockenförmigen Komplex mit einer Dreifach-Symmetrie erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten. Die furchenartige Rezeptorbindestelle wird von jeweils zwei Untereinheiten gebildet (Van Ostade *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wird die Dissoziation des Trimers in Monomere als Möglichkeit zur Inaktivierung *in vivo* diskutiert (Corti *et al.*, 1992a; Smith und Baglioni, 1987). Die beobachteten Dissoziationskonstanten der

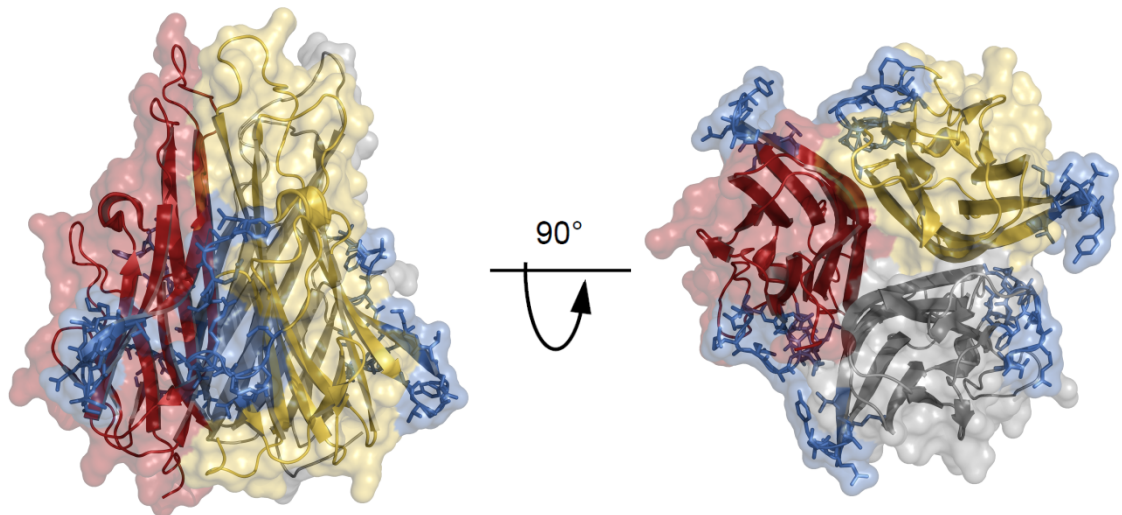


Abbildung 6: Aufbau der löslichen Form des Tumornekrose-Faktor (TNF)-alpha.

Die lösliche Form des TNF-alpha wird proteolytisch aus einer membrangebundenen Pro-Form freigesetzt. Die drei identischen Untereinheiten sind nicht kovalent verbunden. Durch die Dreifachsymmetrie befinden sich im Molekül drei furchenartige Rezeptorbindestellen (blau), die von jeweils zwei Untereinheiten gleichzeitig gebildet werden. Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Code 1tnf).

Trimere und der entsprechenden Komplexe mit den Rezeptoren (Grell *et al.*, 1998) sind aber jeweils in ähnlich niedrigen picomolaren Bereichen zu finden. Die beobachtete Halbwertszeit der Trimerdissoziation variiert von 4 bis 20 h und ist stark von den Pufferbedingungen abhängig (Alzani *et al.*, 1995; Poiesi *et al.*, 1993). Detergenzien und DMSO können den Trimerzerfall beträchtlich beschleunigen (He *et al.*, 2005), wobei eine Reassoziierung der relativ instabilen Monomere möglich ist (Corti *et al.*, 1992a). Dem Dissoziationsschritt geht vermutlich eine konformationelle Umlagerung voraus (Alzani *et al.*, 1995). Sowohl die lösliche als auch die membranständige Form sind in der Lage, durch Bindung an die beiden TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR-1 und TNFR-2) ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk zu aktivieren (Idriss und Naismith, 2000; Faustman und Davis, 2010).

Dies führt zu einer zentralen Rolle des Proteins in Prozessen der Apoptose, Entzündungsvermittlung und Immunität. Sein Potential als Antitumorwirkstoff wird mittlerweile zur Tumorthherapie genutzt (Lejeune *et al.*, 2006). Neuere Daten zeigen jedoch, dass TNF-alpha auch zum Fortschreiten einer Tumorerkrankung beitragen kann (Balkwill, 2006). Inzwischen stellt es insbesondere ein etabliertes pharmakologisches Zielmolekül für die Behandlung von Entzündungskrankheiten, wie z.B. Rheumatoider Arthritis oder Psoriasis, dar (Naguwa, 2005; Rutgeerts *et al.*, 2009; Ghezzi und Cerami, 2005). Der erste für diese Indikationen zugelassene, biotechnologisch produzierte TNF-Inhibitor war Etanercept im Jahr 1998. Dieses ist eine Fusion von zwei extrazellulären Teilen des TNFR-2 mit dem F_c-Teil des humanen IgG-Moleküls. Im Jahr 2008 führte das Fusionsprotein die Liste der biotechnologischen Pharmazeutika mit Erlösen von 6,2 Milliarden US-Dollar an und zeigte

somit das pharmakologische Potential von TNF-alpha. Etanercept blockiert die Rezeptorbindestelle des TNF-alpha und verhindert dadurch die Signaltransduktion. Ähnlich fungieren die beiden pharmazeutisch zugelassenen, monoklonalen Antikörper Infliximab und Adalimumab. Mittlerweile wurden auch künstliche Bindeproteine auf Grundlage diverser Gerüstproteine gegen TNF-alpha erzeugt. Durch Selektion mittels Phagen-*display* wurden ein Affibody (Jonsson *et al.*, 2009) sowie ein Tetranectin (Byla *et al.*, 2010) erhalten, die beide inhibitorische Aktivität aufweisen. Weiterhin wurden TNF-alpha bindende DARPin (Steiner *et al.*, 2008) und Bindeproteine basierend auf der zehnten Fibronectin III-Domäne (Xu *et al.*, 2002) isoliert. Entsprechend der hohen Affinität der Rezeptoren zum TNF-alpha benötigen TNF-Inhibitoren für eine biologische Aktivität enorm hohe Affinitäten. Typischerweise werden subnanomolare Dissoziationskonstanten beobachtet (Byla *et al.*, 2010; Kaymakcalan *et al.*, 2009). Die trimere Struktur des TNF-alpha führt zu einer gewissen Heterogenität bezüglich des Bindungsverhaltens der Inhibitoren, insbesondere im Hinblick auf die Oligomer/Monomer-Spezifität. Etanercept erkennt aufgrund seiner Bindestelle, welche simultan zwei TNF-Untereinheiten benötigt, nur das intakte Homotrimer. Hingegen binden die inhibitorischen, monoklonalen Antikörper auch die monomere Form, da sie zur Interaktion nur eine Untereinheit benötigen (Jespers *et al.*, 1994; Kaymakcalan *et al.*, 2009; Kohno *et al.*, 2006). Neben den Bindungsstellen, die von TNF-Inhibitoren erkannt werden, existieren an der Proteinoberfläche auch noch weitere Epitope, die von Antikörpern erkannt werden (Corti *et al.*, 1992b). An den Kontaktflächen der Monomere existieren zusätzlich kryptische Epitope, die für Antikörper z. B. nur nach Behandlung von TNF-alpha mit Detergenzien zugänglich sind. Dort bindet auch ein kleines Effektormolekül, das ebenfalls inhibitorische Aktivität zeigt (He *et al.*, 2005). Dessen Mechanismus beruht hier auf der Begünstigung der Dissoziation des TNF-alpha-Trimers. Neben der Erforschung von Wirkung und Komplikationen bekannter TNF-Inhibitoren zu deren Verbesserung wird weiterhin nach neuen TNF-Inhibitoren gesucht (Chan *et al.*, 2010; Jonsson *et al.*, 2009).

Für die Suche nach neuen TNF-alpha-Bindern und deren initiale Charakterisierung wird häufig die lösliche Form des Zytokins eingesetzt. Diese lässt sich gut durch rekombinante Herstellung, z.B. in *E. coli* oder in *Pichia pastoris*, gewinnen (Curnis und Corti, 2004; Sreekrishna *et al.*, 1989). Um umfangreiche Modifikationen an N- oder C-Terminus des Proteins mit negativen Auswirkungen auf die biologische Aktivität (Fonda *et al.*, 2002) zu vermeiden, wurden diverse Strategien entwickelt, um das Protein ohne Affinitätsanhänge zu reinigen (Paquet *et al.*, 1994). Bei der Produktion als anhangsfreies Protein wird das für die Expression obligate Startmethionin vor dem nativen humanen N-Terminus Val77 jedoch nicht vollständig abgespalten und es entsteht ein inhomogenes Produkt (Curnis und Corti, 2004; He *et al.*, 2005). In dieser Arbeit sollte deshalb homogenes, anhangsfreies TNF-alpha für die Selektion mit der

konstruierten Ubiquitin-Bibliothek und der anschließenden Charakterisierung durch Spaltung eines Fusionsproteins hergestellt werden.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Bei der Herstellung künstlicher Bindeproteine existieren mehrere Strategien für die Auswahl von Aminosäurepositionen zur Generierung eines Paratops. Ziel dabei ist es, unter Erhalt der nativen Struktur und mit nur geringen Stabilitätsverlusten eine möglichst große, potentielle Bindefläche zu schaffen. Steht eine entsprechende Anzahl an ähnlichen Proteinen zur Verfügung, so können durch Sequenzvergleiche variable Bereiche im Gerüstprotein von konstanten Resten unterschieden werden. Dieses Prinzip des Konsensus-Designs wurde beispielsweise bei der Entwicklung der DARPins und der Avimere verwendet (Binz *et al.*, 2004; Silverman *et al.*, 2005). Stehen weniger Informationen zur Verfügung, kann alternativ eine natürliche Bindestelle als Startpunkt für eine Bindestelle mit den gewünschten Eigenschaften dienen. Als weitere Möglichkeit können, wie z. B. während der Entwicklung vorangehender Ubiquitin-Bibliotheken, *de novo*-Bindestellen aufgrund von Stabilitätsberechnungen, visuellen Inspektionen oder durch iterative Austausche erzeugt werden (Fiedler *et al.*, 2004; Schraeml und Fiedler, 2008). Aus solchen Bibliotheken konnten tatsächlich spezifische Bindemoleküle isoliert werden. Um mit zukünftigen Ubiquitin-Bibliotheken höhere Affinitäten bei gleichzeitig verbesserter Stabilität der Varianten zu erzielen, sollte in dieser Arbeit alternativ ein Paratop, ausgehend von Aminosäureresten um I44, die in Interaktionen mit dem Ubiquitin-interagierenden Motiv involviert sind, evaluiert werden (Abb. 7). Die erwähnte *in silico*-Studie zeigte für den Austausch der meisten dieser Reste keine signifikanten Destabilisierungseffekte. In den bisherigen Bibliotheken wurde die Umprogrammierung dieser natürlichen Bindestelle nicht in Betracht gezogen. Es sollte eine entsprechende naive Ubiquitin-Bibliothek mit sechs Randomisierungspositionen konstruiert und bezüglich der Sequenzqualität und Herstellbarkeit der Varianten untersucht werden. Aus der Bibliothek sollten mittels Ribosomen-*display* und anschließendem ELISA spezifisch an TNF-alpha bindende Varianten isoliert werden. Für die Selektion und die anschließende Charakterisierung der bindenden Ubiquitin-Varianten sollte anhangsfreies TNF-alpha mit Hilfe des SUMO-Fusionssystems hergestellt werden. Da TNF-alpha ein pharmakologisch relevantes Zielmolekül darstellt, wurde in Arbeiten anderer bereits eine Vielzahl von Antikörpern und künstlichen Bindeproteinen dagegen isoliert und charakterisiert. Die Nutzung dort etablierter Methoden sollte die Untersuchung der gereinigten Ubiquitin-Variante erleichtern und den Vergleich mit anderen TNF-alpha-Bindern ermöglichen. Neben Affinität und Spezifität sollten thermodynamische Parameter der Interaktion, wie Enthalpie und Entropie sowie die Stöchiometrie bestimmt werden. Es sollte weiterhin Aufschluss über die Auswirkungen der Aminosäureaustausche in der zu charakterisierenden Variante auf die Stabilität und Faltung des

Gerüstproteins erhalten werden. Dazu sollte die proteinchemische Analyse der Ubiquitin-Variante, hinsichtlich thermischer Stabilität, Sekundär- und Tertiärstruktur, erfolgen. Um Hinweise für die Gestaltung zukünftiger Bibliotheken zu gewinnen, sollte der Einfluss ausgewählter Reste sowohl auf die Bindung des Zielmoleküls, als auch auf die proteinchemischen Parameter im Vergleich zum Gerüstprotein untersucht werden.

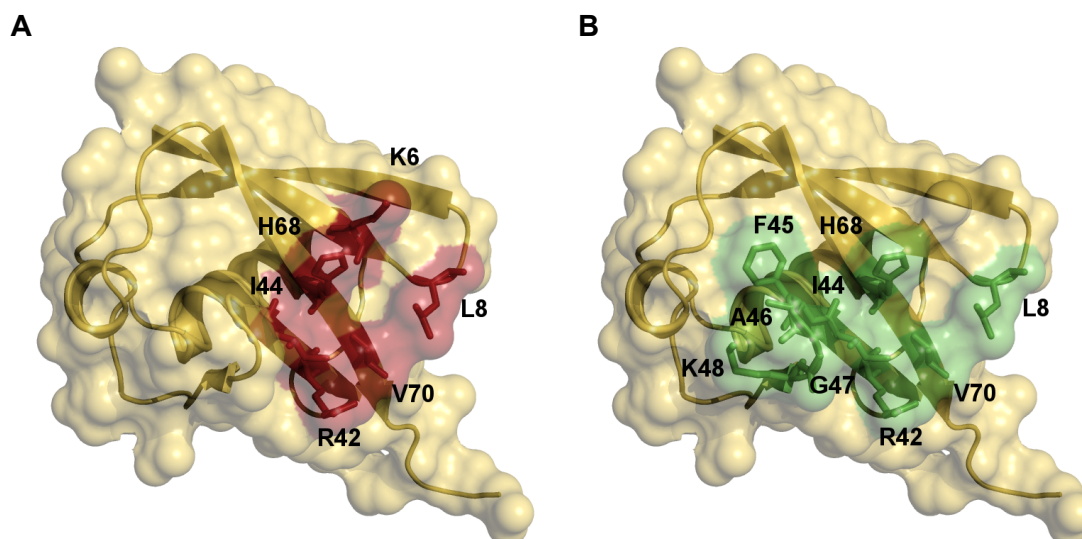


Abbildung 7: Vergleich des neuen Paratops mit der natürlichen Erkennungsstelle des Ubiquitins um I44.

Das in dieser Arbeit verwendete Bibliotheksparatop (A, rot) liegt im Bereich einer natürlichen Interaktionsstelle im Ubiquitin um I44 (B, grün). Die Abbildung wurde mit PyMOL erstellt (PDB-Code 1ubi).

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien mindestens mit dem Reinheitsgrad p. A. von den folgenden Anbietern bezogen (Tab. 1).

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat (ATP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Agarose GTQ	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose NuSieve GTG	Cambrex Bio Science Rockland (Rockland, ME, USA)
Ammoniumchlorid	Applichem (Darmstadt)
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Soytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson (Heidelberg)
BlockerBSA in TBS	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
Borsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt)
BugBuster Protein Extraction Reagent	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Carbenicillin	Carl Roth (Karlsruhe)
Cobalt(II)-chlorid	Applichem (Darmstadt)
Coomassie R250	Applichem (Darmstadt)
Difco Select Soytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt)
dNTP-Mix (10 mM jedes Nukleotid)	Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA (für die Molekularbiologie)	Applichem (Darmstadt)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (1 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
6-(Fluorescein-5-carboxamido)-hexansäure-succinimidylester	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
D(+)-Glucose	Carl Roth (Karlsruhe)
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Applichem (Darmstadt)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)

2 Material und Methoden

Heparin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem (Darmstadt)
Kaliumhydroxid	Applichem (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Alpha-Lactose-Monohydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumacetat (für die Molekularbiologie)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)
Morpholinethansulfonsäure (MES)	Applichem (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methotrexat-Agarose	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumcarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (20 %)	Applichem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriummolybdat-Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumselenit	Applichem (Darmstadt)
Natriumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Applichem (Darmstadt)
NHS-Fluorescein	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem (Darmstadt)
rRNA, 16S und 23S, <i>E. coli</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
Salzsäure (37 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Schwefelsäure (96 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	Applichem (Darmstadt)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
TMB One (Peroxidase-Substrat)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
TMB Plus (Peroxidase-Substrat)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
Tris (für die Molekularbiologie)	Applichem (Darmstadt)
tRNA, <i>E. coli</i>	Roche Applied Science (Mannheim)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
Wasser, HPLC-grade	Merck (Darmstadt)
Wasser, Nuklease-frei	Fermentas (St. Leon-Rot)
Zinksulfat-Heptahydrat	Applichem (Darmstadt)

2.2 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide (Primer, Tab. 2) wurden von den Firmen metabion (Martinsried) oder Thermo Fisher Scientific (Ulm) bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide.

Primer	Sequenz (5' nach 3')
DIUBIF1	GGAGATATACATATGCAGATCTTCGTGNNKACCNNKACTGGTAAAACCATTA CTCTGGAAGTGGAACCG
DIUBIF2	GCCAAAATCCAGGATAAAGAGGGCATTCCGCCGGATCAGCAGNNKCTGNNKT GGGCAGGTAAACAGCTGGAGGACGG
DIUBIF3	GCGATTATAACATCCAGAAAGAAAGCACGCTGNNKCTGNNKCTGCGCCTGCG GGGTGGCAGC
DIUBIHelpC	CCAGAGCCAGCGAATTCACCTACCCCTTTGTCTGTCG
DIUBIHelpN	GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAGATCTTCGT G
DIUBIR1	GCGAATTCACCTACCCCTTTGTCTGTCGTCGTCCTTTGTAGTCGCTGCCACCCC GCAGGCGC
DIUBIR3	GCTTTCTTTCTGGATGTTATAATCGCTCAGGGTACGACCGTCTCCAGCTGT TTACC
DIUBIR4	CCCTCTTTATCCTGGATTTTGGCTTTTCACGTTTTTCGATGGTATCAGACGGTT CCACTTCCAGAGTAATGG
DIUBITNF_insertDY	GCGATTATAACATCCAGAAAGAAAGCACGCTG
DIUBIXhorev	CCAGAGCTAGACTCGAGACTACCCCTTTGTCTGTCG
F1	GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG AGATATACATATG
F1A	CATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC
forwMunRD	GTGGCGGCGGAGGTAGTCAATTGGCTGGCTCTGGAGCTGGTGC
RT27	GGACACGGACCGAACTCGGTTGCGAGG
spacer119	GGACACGGACCGAACTCGGTTGCGAGGTGGAACAGCTGCCGGAAGCACC
SPDXhoIFlag3	CCAGAGCTAGACTCGAGGCCACCCCGCAGGCGCAG

2.3 Plasmide

Für die Klonierung und Expression fanden die in Tab. 3 aufgeführten Plasmide Verwendung.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pET-SUMOadapt	Expressionsplasmid auf pET-SUMO-Basis zur nahtlosen Klonierung des Zielgens, Kanamycin-Resistenz	Eva Bosse-Doenecke, M.-Luther-Universität Halle-Wittenberg
pET-SUMO-TNF	Expressionsplasmid für SUMO-Fusion des humanen TNF-alpha	diese Arbeit

2 Material und Methoden

pET-20b-2xStop	modifizierter pET-20b(+) mit zusätzlichem Stop-Codon zur Erhöhung der Terminationsstringenz; Expressionsvektor für Ubiquitin-Varianten, Ampicillin-Resistenz	Scil Proteins GmbH, Halle
pET-20b-2xStop-WUBI	pET-20b-2xStop mit Gen für Ubiquitin F45W	Scil Proteins GmbH, Halle
pET-41b(+)	alternativer Expressionsvektor für Ubiquitin-Varianten, Kanamycin-Resistenz	Novagen, Darmstadt
pIVEX2.3RD	enthält Ribosomen- <i>display</i> -Anker-Sequenz	Scil Proteins GmbH, Halle
pLS-TNFalpha	Vektor mit synthetischem TNF-alpha-Gen	TopGeneTech, Montreal, CDN

2.4 Mikroorganismen

Für die Plasmidvermehrung und die rekombinante Proteinherstellung wurden die in Tab. 4 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac⁻ F'[proAB lacI^qZΔM15 ::Tn10]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
DH5alpha	$\phi 80$ <i>lacZΔM15 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 deoR phoA Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Invitrogen
NovaBlue(DE3)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 relA1 lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15 ::Tn10] λ(DE3)</i>	Novagen
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm λ(DE3)</i>	Studier und Moffatt (1986)

2.5 Nährmedien und Antibiotika

Für die Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen wurden die folgenden Medien (Tab. 5) verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Nährmedien.

Medium/Lösung	Komponenten
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit zusätzlich 15 g/l Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 % Mg ²⁺ -Stammlösung (1 M MgSO ₄ , 1 M MgCl ₂), 20 mM Glucose
2× TBY-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 5 g/l MgSO ₄

2 Material und Methoden

1× ZY-Lösung	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt
50× M-Lösung	1,25 M Na ₂ HPO ₄ , 1,25 M KH ₂ PO ₄ , 2,5 M NH ₄ Cl, 0,25 M Na ₂ SO ₄
50× 5052-Lösung	25 % Glycerin, 25 g/l Glucose, 100 g/l alpha-Lactose-Monohydrat
50× 505-Lösung	25 % Glycerin, 25 g/l Glucose
1000× Spurenelemente-Lösung	60 mM HCl, 50 mM FeCl ₃ , 20 mM CaCl ₂ , 10 mM MnCl ₂ , 10 mM ZnSO ₄ , 2 mM CoCl ₂ , 2 mM CuCl ₂ , 2 mM NiCl ₂ , 2 mM Na ₂ MoO ₄ , 2 mM Na ₂ SeO ₃ , 2 mM H ₃ BO ₃
ZYM-5052-Autoinduktions-Medium	1× ZY-Lösung, 1× M-Lösung, 1× 5052-Lösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,5× Spurenelemente-Lösung
2× N-Lösung	0,1 M Na ₂ HPO ₄ , 0,1 M KH ₂ PO ₄ , 0,1 M NH ₄ Cl*, 10 mM Na ₂ SO ₄
N-505-Medium	1× N-Lösung, 1× 505-Lösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,5× Spurenelemente-Lösung
N-5052-Autoinduktions-Medium	1× N-Lösung, 1× 5052-Lösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,5× Spurenelemente-Lösung

*Für die Markierung von Proben für die NMR-Spektroskopie wurde ¹⁵N-isotopenmarkiertes Ammoniumchlorid eingesetzt.

Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert oder die Komponenten sterilfiltriert. Nach Erkalten auf Raumtemperatur wurden bei Bedarf die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Tab. 6).

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration in der Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration im Medium (µg/ml)
Ampicillin	100 (in ddH ₂ O)	100
Carbenicillin	100 (in 50 % Ethanol)	100
Kanamycin	50 (in ddH ₂ O)	50 (100)*
Tetracyclin	12,5 (in Ethanol)	12,5

*Bei Verwendung in Autoinduktionsmedien wurde die Kanamycinkonzentration verdoppelt.

2.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit sterilfiltriertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde nach Bedarf mit Essigsäure, HCl, NaOH oder KOH eingestellt. Die Puffer für die Chromatographie wurden sterilfiltriert, entgast und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Chromatographie:

NPI-20	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8,0
NPI-40	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 40 mM Imidazol pH 8,0

2 Material und Methoden

NPI-500	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol pH 8,0 1× PBS, 1 mM EDTA pH 7,4
---------	--

Für das Ribosomen-*display*:

WB (Waschpuffer ohne Detergens)	50 mM Tris/HAc pH 7,5, 150 mM NaCl, 50 mM MgAc
WBT (Waschpuffer mit Detergens)	1× WB, 0,05 % Tween-20
BWB (Blockierungspuffer)	1× WB, 10 % BlockerBSA in TBS
SB (Stopppuffer)	1× WB, 0,05 % Tween-20, 10 % BlockerBSA in TBS, 4 mM GSSG, 2,5 mg/ml Heparin
EB (Elutionspuffer)	50 mM Tris/HAc pH 7,5, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mg/ml rRNA, 1 mg/ml tRNA

Sonstige Puffer und Lösungen:

PBS	137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 15 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Coomassie-Färbelösung	40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie R250
5× SDS-Probenpuffer	40 % Glycerin, 250 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 % (w/v) SDS, 0,6 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % beta-Mercaptoethanol
MES-Puffer (pH 7,3)	50 mM MES, 50 mM Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA
6× DNA-Auftragspuffer	15 % Ficoll 400, 30 mM EDTA, 0,06 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (w/v) SDS
TAE	40 mM Tris/HAc pH 8,5, 2 mM EDTA
TB-Puffer	10 mM HEPES pH 6,7, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂

2.7 Enzyme

Die folgenden Enzyme und Immunkonjugate fanden Verwendung in dieser Arbeit (Tab. 7).

Tabelle 7: Verwendete Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
<i>Restriktionsenzyme</i>	
<i>EcoRI</i>	NEB (Frankfurt/M.)
<i>Eco31I</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Eco81I</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>MfeI</i> (<i>MunI</i>)	NEB (Frankfurt/M.)
<i>NotI</i> (FastDigest)	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>XbaI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>XhoI</i>	Fermentas (St. Leon-Rot)

Polymerasen

Pwo-DNA-Polymerase	Roche Applied Science (Mannheim)
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
GoTaq-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)
Transcriptor Reverse Transkriptase	Roche Applied Science (Mannheim)

Immunkonjugate

anti-FLAG-M2-Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
anti-His ₆ -Peroxidase-Konjugat (BMG-His-1)	Roche Applied Science (Mannheim)
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)

Sonstige

Alkalische Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
BAFF, human (TNFSF13B)	NEB (Frankfurt/M.)
Benzonase (25 U/μl)	Novagen (Darmstadt)
DNase I	Ambion (Darmstadt)
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Lymphotoxin-alpha, human (TNFSF1)	NEB (Frankfurt/M.)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Applichem (Darmstadt)
Nervenwachstumsfaktor, human (NGF)	Scil Proteins (Halle/S.)
RNasin plus RNase Inhibitor	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligase (5 bzw. 30 U/μl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
TNF-alpha, human (TNFSF2)	NEB (Frankfurt/M.), Peprotech (Hamburg)
TNF-alpha, Maus (TNFSF2)	Scil Proteins (Halle/S.)
TNF-alpha, Ratte (TNFSF2)	Scil Proteins (Halle/S.)

2.8 Kits, Standards und sonstige Materialien

Tabelle 8 enthält die verwendeten Kits, Standards und sonstige Materialien.

Tabelle 8: Verwendete Kits, Standards und Materialien.

Materialien	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Kits</i>	
GeneJet PCR Cloning Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN (Hilden)
PureSystem Classic II	Wako Chemicals (Neuss)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QIAGEN (Hilden)

2 Material und Methoden

Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System Promega (Mannheim)

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega (Mannheim)

Standards

1 kbp-DNA-Leiter Fermentas (St. Leon-Rot)

100 bp-DNA-Leiter Fermentas (St. Leon-Rot)

Molekularmassenstandards: Conalbumin GE Healthcare (Uppsala, S)
(75 kDa), Carboanhydrase (29 kDa),
Ribonuklease A (13,7 kDa), Aprotinin
(6,5 kDa)

NuPAGE Mark 12 MW Standard Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

PageRuler Unstained Protein Ladder Fermentas (St. Leon-Rot)

Sonstige Materialien

1,5 ml-Reaktionsgefäße ProteinLowBind (für Eppendorf (Hamburg)
das Ribosomen-*display*)

96-*deep well*-Platten, PP TreffLab (Degersheim, CH)

96-*well*-Fluoreszenzplatten, PS, non-binding Greiner Bio-One (Frickenhausen)

96-*well*-Mikrotiterplatten, PP Greiner Bio-One (Frickenhausen)

96-*well*-Mikrotiterplatten, PS, Maxisorp Nunc (Wiesbaden)

Abdeckfolien BREATHseal Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Abdeckfolien EASYseal Greiner Bio-One (Frickenhausen)

Dialysekapseln QuixSep Carl Roth (Karlsruhe)

Dialyseschlauch Spectra/Por-7, MWCO 1 kDa Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)

DNA-ExitusPlus Applichem (Darmstadt)

Dynabeads M-270 Streptavidin Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Dynabeads MyOne T1 Streptavidin Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Dynabeads ProteinA Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Dynabeads ProteinG Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Elektroporationsküvetten (1 mm) BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)

Membranfilter (PES, 0,22 µm) Sartorius (Göttingen)

NuPAGE Novex Bis-Tris-Gel (4-12 %), 1 mm Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Parafilm Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL, USA)

pH-Indikatorstäbchen Carl Roth (Karlsruhe)

RNase Blaster Solution Clontech Laboratories (Mountain View, CA, USA)

Spritzenvorsatzfilter (0,22 bzw. 0,44 µm)	TPP (Trasadingen, CH)
Vivaspin 20-Zentrifugalfilter, MWCO 3 kDa	Sartorius (Göttingen)
Vivaspin 4-Zentrifugalfilter, MWCO 5 kDa	Sartorius (Göttingen)
VivaSpin 500-Zentrifugalfilter, MWCO 3, 5 bzw. 10 kDa	Sartorius (Göttingen)

2.9 Geräte und Zubehör

Neben der Standardlaborausstattung wurden zur Anfertigung der Arbeit die folgenden Geräte verwendet (Tab. 9).

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Zubehör.

Geräte und Zubehör	Hersteller
Absorptions-Spektrophotometer	
UV-Vis Spektrophotometer DU730	Beckman Coulter (Krefeld)
Autoklav	
Systec V75	Systec (Wettenberg)
CD-Spektrophotometer	
Jasco J-810 Spektropolarimeter	Jasco (Groß-Umstadt)
Jasco PTC-423S Peltierelement	Jasco (Groß-Umstadt)
Chromatographieeinheiten	
ÄKTAexplorer	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ÄKTApress	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Chromatographiesäulen	
<i>Affinitätschromatographie</i>	
HisTrap HP 5 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<i>Größenausschlusschromatographie</i>	
HiLoad 16/60 Superdex 75 <i>prep grade</i>	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superose 12 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
PD-10 Desalting	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Elektroporationsgerät	
Elektroporator ECM 630	BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA)
Fluoreszenz-Spektrophotometer	
Fluoromax-3	Jobin Yvon (Grasbrunn)
Peltierelement LFI-3751	Wavelength Electronics (Broadstairs, UK)
Geldokumentationseinheit	
Bio-Vision 3000	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gelelektrophorese-Geräte	
Electrophoresis Power Supply Consort	Camlab (Cambridge, UK)

EV 261

Agarose-Gelelektrophorese

Owl B1A EasyCast Mini Gel Thermo Scientific (Langenselbold)

SDS-PAGE

XCell SureLock Novex Mini-Cell Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Inkubatoren

Heraeus BK 5060 E-S Heraeus (Hanau)

Schüttelinkubator Innova 44R New Brunswick Scientific (Nürtingen)

Kleinschüttelgerät

Vortex Genie 2 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)

pH-Messgerät

inoLab pH720 (Elektrode: SenTix 81) WTW (Weilheim)

Sicherheitswerkbank

HeraSafe (Typ KS 12) Thermo Scientific (Langenselbold)

Plattenlesegeräte

DTX880 Multimode Plattenlesegerät Beckman Coulter (Krefeld)

Multimode Detektor Biomek Paradigm Beckman Coulter (Krefeld)

Fluorescence Intensity Detection Beckman Coulter (Krefeld)

Cartridge

Quarzglasküvetten

Präzisionsküvetten Hellma (Müllheim)

Rollenmischer

Stuart SRT9 Bibby Scientific (Staffordshire, UK)

Thermocycler

Tpersonal Biometra (Göttingen)

LabCycler gradient 96 Sensoquest (Göttingen)

Thermomixer

Thermomixer comfort Eppendorf (Hamburg)

Ultraschallgerät

Vibra Cell VC 750 Sonics & Materials (Newton, CT, USA)

Sonotrode 6 mm Zinsser Analytic (Frankfurt/M.)

Waagen

Feinanalysenwaage SI-234 Denver Instrument (Bohemia, NY, USA)

Waage SI-2002 Denver Instrument (Bohemia, NY, USA)

Zentrifugen und Rotoren

Allegra X-15R Beckman Coulter (Krefeld)

Avanti J-26XP Beckman Coulter (Krefeld)

Biofuge Fresco 21 Thermo Scientific (Langenselbold)

Galaxy Mini Mikrozentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Optima XL-A analytische Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Rotor An60Ti	Beckman Coulter (Krefeld)
FX-6100	Beckman Coulter (Krefeld)
JA-25.50	Beckman Coulter (Krefeld)
JA-8.100	Beckman Coulter (Krefeld)
JS-5.3	Beckman Coulter (Krefeld)
SX-4750A	Beckman Coulter (Krefeld)

2.10 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Programme verwendet (Tab. 10).

Tabelle 10: Verwendete Software.

Programm und Version	Quelle
BIO-1D 5.1.26	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software (Cary, NC, USA)
ImageJ 1.44	National Institute of Health (Bethesda, MD, USA)
Origin 7.0	MicroCal (Northampton, MA, USA)
ProtParam	http://www.expasy.org
PyMOL 0.99rc6	DeLano Scientific (South San Francisco, CA, USA)
SigmaPlot 11.0	Systat Software (Erkrath)
UNICORN 4.11 Control-Software	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Vector NTI Suite 10	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 DNA-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte durch Bindung an eine Silikamatrix mit dem Wizard *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) oder dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung einer Mikrozentrifuge. Zur Elution der DNA von den SV-Minisäulen wurden 30 µl Nuklease-freies Wasser eingesetzt.

2.11.2 Enzymatische Spaltung und Dephosphorylierung von DNA

Die enzymatische Spaltung von DNA erfolgte sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken. Für eine analytische Spaltung von DNA wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit 5 U Restriktionsenzym, 1 µl entsprechendem Puffer (10-fach) und ad 10 µl ddH₂O für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Ansätze zur Herstellung von Restriktionsfragmenten für

2 Material und Methoden

Ligierungsreaktionen enthielten 5 µl Puffer (10-fach), 20 U Restriktionsenzym, 4-8 µg DNA und ad 50 µl ddH₂O. Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug 2 bis 16 h.

Um die Religierung geschnittener Plasmid-DNA bei Ligierungsreaktionen zu minimieren, wurde die enzymatisch gespaltene Plasmid-DNA an den 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurden dem Restriktionsansatz 4 µl Alkalische Phosphatase (aus Shrimps) zugesetzt. Nach mindestens 1 h Inkubation wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Phosphatase für 15 min auf 65 °C erwärmt. Die Analyse und Reinigung der gespaltenen DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Herstellung der Restriktionsfragmente für die Klonierung des TNF-alpha-Gens

Die Insertion der synthetischen, für die Expression in *E. coli* optimierte TNF-alpha-Sequenz in den pET-SUMOadapt-Vektor erfolgte über flankierende *Eco31I*- und *NotI*-Schnittstellen. Eine *Eco31I*-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle des Zielvektors ermöglicht die nahtlose Insertion des Zielgens direkt nach dem SUMO-Leserahmen. Das Typ IIS-Restriktionsenzym *Eco31I* erkennt dabei die DNA-Sequenz 5'-GGTCTC-3' und schneidet sequenzunabhängig innerhalb der nächsten fünf 3'-Nukleotide, wobei ein kohäsiver Überhang von vier Basenpaaren entsteht. Für die erfolgreiche Klonierung waren am 5'-Ende des TNF-alpha-Gens dazu während der Synthese die zum Vektorüberhang komplementären Basen eingebaut worden.

2.11.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente wurden in der vom Hersteller der Ligase empfohlenen Konzentrationen eingesetzt, also in einem Reaktionsansatz von 20 µl eine Gesamtmenge von maximal 400 ng DNA. Es wurde ein molares Verhältnis von 1:1 bis 1:5 zwischen Vektor und Insertionsfragment eingehalten. Weiterhin enthielt ein Ansatz 2 µl 10-fach T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl), 1 µl 100 mM ATP und ad 20 µl ddH₂O. Die Inkubation erfolgte bei 12 °C über Nacht. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ansatz anschließend für 10 min auf 65 °C erhitzt.

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleotidfragmenten mit einer Größe von 400 bis 4000 bp wurden 1,5 %ige Agarosegele hergestellt. Für Fragmente von 80 bis 700 bp wurden 1-3 %ige NuSieve-Agarosegele verwendet. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei 110 V für 45 bis 65 min. Zur Auswertung wurden die Gele 30 min in frisch hergestellter Ethidiumbromid-Lösung (7 µg/ml) geschwenkt und mit dem BioVision 3000 Geldokumentationssystem analysiert.

2.11.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Gewinnung von DNA aus Agarose-Gel erfolgte mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) bzw. für das Ribosomen-*display* (2.12) mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) oder dem MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben. An den SV Minisäulen gebundene DNA wurde mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Wurde eine höhere DNA-Konzentration benötigt, erfolgte die Elution mit einem Volumen von 15 µl und das Eluat wurde für einen zweiten Elutionsschritt benutzt.

2.11.6 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde durch die Firma QIAGEN (Hilden) durchgeführt.

2.11.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Vermehrung kurzer DNA-Fragmente wurden *Taq*-, *Pwo*- oder Phusion-DNA-Polymerase benutzt. Die Reaktionsansätze entsprachen dabei den Angaben des jeweiligen Herstellers. Je nach Polymerase, DNA-*template* und Primern variierten die Reaktionsbedingungen. Nach einem initialen Denaturierungsschritt folgten 20-30 Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese. Dabei richtete sich die Hybridisierungstemperatur hauptsächlich nach den Primer-Sequenzen. Die Dauer des DNA-Syntheseschrittes orientierte sich an der Länge des zu amplifizierenden Produkts, wobei für *Taq*-DNA-Polymerase eine Synthesegeschwindigkeit von 10-30 s/kbp, für *Pwo*-DNA-Polymerase von 60 s/kbp und für Phusion-DNA-Polymerase von 15-30 s/kbp zu Grunde gelegt wurde. Ein Beispielprotokoll für eine PCR mit Phusion-DNA-Polymerase enthielt die folgenden Parameter.

Initiale Denaturierung:	45 s bei 98 °C
Denaturierung:	10 s bei 98 °C
Hybridisierung:	15 s bei 50 bis 68 °C
DNA-Synthese:	7-25 s bei 72 °C

Abschließend erfolgte ein Syntheseschritt von 2 min bei 72°C. Das Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Einzelkolonie-PCR

Um festzustellen, ob in einzelnen bakteriellen Klonen eine DNA mit bestimmter Sequenz vorliegt, wurde ein Einzelkolonie-PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase und zielsequenzspezifischen Primern durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde hierbei auf 10 µl beschränkt, wobei die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen der Reagenzien beibehalten wurden. Die template-DNA wurde durch Zelllysat ersetzt. Hierfür wurde eine *E. coli*-Einzelkolonie in 4 µl

ddH₂O aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.12 Evolutionäre Selektion durch Ribosomen-*display*

Zur Isolierung von Proteinvarianten mit bestimmten Eigenschaften aus großen Bibliotheken werden häufig evolutionäre Selektionssysteme wie z.B. Phagen-*display* oder Ribosomen-*display* (RD) eingesetzt. Dabei wird die phänotypische Information, die zur Selektion genutzt wird, an die genetische Information gekoppelt. Beim Ribosomen-*display* erfolgt dies über die Erzeugung ternärer Komplexe aus naszenter Peptidkette, Ribosom und mRNA. Die Komplexe werden anhand ihrer Affinität zum immobilisierten Zielmolekül selektiert. Durch Elution der mRNA, reverse Transkription und Amplifikation wird die genetische Information der gebundenen Komplexe zurückgewonnen. Die resultierende DNA-Bibliothek kann in einem erneuten RD-Zyklus oder nach Klonierung in einen Expressionsvektor zur Analyse von Einzelklonen eingesetzt werden.

2.12.1 Erstellung einer Ubiquitin-DNA-Bibliothek für das Ribosomen-*display*

Für die Erstellung einer Ubiquitin-Bibliothek wurde zunächst nach Aminosäurepositionen in der beta-Faltblattregion gesucht, deren Beteiligung an natürlichen Interaktionen des Ubiquitins bekannt ist. Die Eignung der ausgewählten Reste für die Randomisierung wurde anhand von *in silico*-Berechnungen der Stabilitätseinflüsse von Aminosäureaustauschen (interner Forschungsbericht Scil Proteins, 2002; Wiederstein und Sippl, 2005) und der visuellen Analyse mit der Software PyMOL (v0.99rc6) beurteilt.

Auf Basis einer für die Expression in *E. coli*-optimierten Ubiquitin-Gensequenz (Geneart, Regensburg) erfolgte anhand der Auswahl der Randomisierungspositionen die Planung der Primer für die PCR-basierte Bibliothekssynthese. Durch die Verwendung NNK-Motiv-enthaltender Primer wurden zufällige Mutationen an den vorher festgelegten Positionen eingeführt. Dabei können an N-Positionen alle vier Nukleotide vorkommen, an K-Positionen hingegen nur Guanin und Thymidin. Der genetische Code wird reduziert (Abb. 8).

Durch Überlappung von Primern erfolgte in einer ersten PCR die Assemblierung der Ubiquitin F45W-Bibliothekskassette (Abb. 9). Zur Konstruktion der zufällig substituierten DNA-Bibliothek wurde *Pwo*-DNA-Polymerase benutzt. Eine Übersicht zum Ansatz der Assemblierungs-PCR gibt Tab. 11 Tabelle 11. Um die Synthese unspezifischer Produkte zu minimieren, wurde eine *hot start*-PCR durchgeführt. Die Zugabe der Polymerase erfolgte hierfür erst nach einem initialen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C.

2 Material und Methoden

		2. Position					
		A	C	G	T		
1. Position	A	Asn (N)	Thr (T)	Ser (S)	Ile (I)	T	3. Position
		Lys (K)	Thr (T)	Arg (R)	Met (M)	G	
	C	His (H)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	T	
		Gln (Q)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	G	
	G	Asp (D)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	T	
		Glu (E)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	G	
	T	Tyr (Y)	Ser (S)	Cys (C)	Phe (F)	T	
		Amber	Ser (S)	Trp (W)	Leu (L)	G	

Abbildung 8: Der reduzierte genetische Code bei Verwendung von NNK-Motiven.

Die 32 Codons verschlüsseln alle 20 Aminosäuren. Damit wird die relative Häufigkeit der Ein-Codon-Aminosäuren erhöht und es entfallen zwei Stopp-Codons.

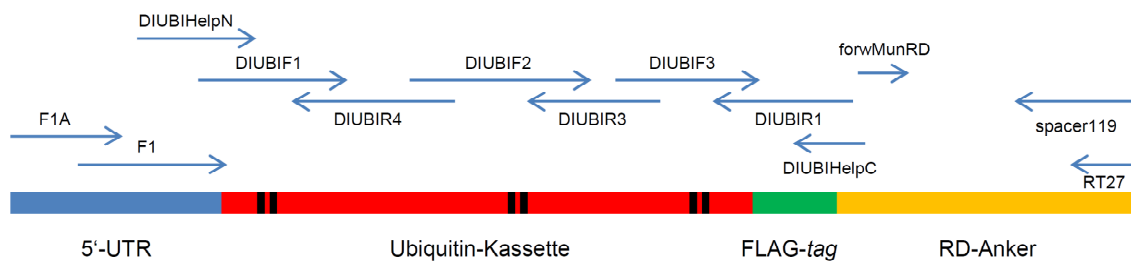


Abbildung 9: Konstruktionsschema der Ubiquitin-Bibliothek für das Ribosomen-*display*.

Durch eine erste PCR mit sieben überlappenden Primern wurde eine Ubiquitin-Kassette (rot) synthetisiert. Drei der sieben Primer enthalten jeweils zwei NNK-Motive, wodurch insgesamt sechs Aminosäurepositionen (schwarz) randomisiert wurden. In einer zweiten PCR erfolgten die Einführung der 5'-nicht translatierten Region (UTR, blau), welche den T7-Promotor und die Ribosomenbindestelle enthält sowie einer FLAG-tag-Sequenz (grün) und einer darauffolgenden *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle. Letztere diente zur Ligierung mit dem RD-Anker-Fragment (gelb), welches eine *MunI*-Schnittstelle enthält. Die Überhänge der beiden Enzymschnittstellen sind kompatibel. Abschließend wurde das Ligierungsprodukt mit den terminalen Primern F1A und RT27 amplifiziert.

Tabelle 11: Reaktionsansatz der Assemblierungs-PCR.

Komponente	Volumen (µl)	Finale Konzentration
10× <i>Pwo</i> SuperYield PCR-Puffer	10	1×
dNTP-Mix (je 10 mM)	2	200 µM (je dNTP)
Primer DIUBIHelpN	1	1000 nM
Primer DIUBIF1	0,75	750 nM
Primer DIUBIR4	0,25	250 nM
Primer DIUBIF2	0,25	250 nM
Primer DIUBIR3	0,25	250 nM
Primer DIUBIF3	0,25	250 nM
Primer DIUBIR1	1	1000 nM
<i>Pwo</i> SuperYield DNA-Polymerase*	1	0,05 U/µl
Nuklease-freies Wasser	ad 100	-

*Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach einem 2-minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C.

2 Material und Methoden

Das PCR-Produkt wurde mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (2.11.4) gereinigt. Zur Gewährleistung der Diversität der Ubiquitin-Bibliothek wurde in den nachfolgenden Konstruktionsschritten genügend Ausgangs-DNA-Menge eingesetzt, um die theoretische Bibliotheksgröße mindestens 100-fach abzudecken. Mittels einer weiteren PCR wurden 5'-regulatorische Sequenzen (Primer F1 und Primer F1A) sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle für die Ligierung mit dem RD-Anker-Fragment (Primer DIUBIHelpC) angehängt. Bei der Amplifikation des RD-Anker Fragments wurde in dieses eine kompatible *MunI*-Schnittstelle eingefügt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend ligiert. Das Ligierungsprodukt wurde gelelektrophoretisch gereinigt und mit den Primern F1A und RT27 re-amplifiziert, um die finale DNA-Bibliothek für das RD zu erzeugen. Die Parameter der einzelnen PCR-Schritte sind in Tab. 12 zusammengefasst. Zur Untersuchung die Funktionalität der Bibliothek wurde das Bibliothekskonstrukt unter Verwendung des GeneJet PCR Cloning Kit (Fermentas) in den Vektor pJET 1 subkloniert. Nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue wurden Einzelklone sequenziert.

Tabelle 12: PCR-Bedingungen für die Konstruktion der RD-DNA-Bibliothek.

Jede PCR wurde zusätzlich mit einem initialen Denaturierungsschritt für 2 min bei 94 °C und einem finalen DNA-Syntheseschritt für 5 min bei 72 °C durchgeführt.

	Konstruktionsschritt			
	Assemblierung	Fusion 5'-Region	RD-Anker-Synthese	Amplifikation Ligierung
Denaturierung	40 s bei 94 °C	40 s bei 94 °C	40 s bei 94 °C	40 s bei 94 °C
Hybridisierung	60 s bei 54 °C	30 s bei 60 °C	30 s bei 60 °C	30 s bei 62 °C
DNA-Synthese	40 s bei 72 °C	40 s bei 72 °C	40 s bei 72 °C	60 s bei 72 °C
Zyklenzahl	30	25	25	23

2.12.2 Gekoppelte Transkription und Translation *in vitro*

Zur Erzeugung der ternären Komplexe wurden Transkription und Translation parallel in einem *in vitro*-Ansatz durchgeführt. Das in dieser Arbeit dafür eingesetzte PureSystem (Wako Chemicals) bietet im Vergleich zu *E. coli* S30-Extrakt den Vorteil minimaler RNase-Kontamination und somit hoher RNA-Stabilität, da alle notwendigen Komponenten einzeln gereinigt wurden. Eine 50 µl-Reaktion wurde entsprechend der Herstellerempfehlungen mit 300 ng DNA (500-fache Abdeckung der theoretischen Bibliotheksgröße) angesetzt und 40 min bei 37 °C und 550 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde zur Stabilisierung der ternären Komplexe durch Zugabe von 250 µl eiskaltem SB gestoppt, 1 min auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt weiterverwendet.

2.12.3 Immobilisierung zielspezifischer ternärer Komplexe

Mit Ausnahme des ersten RD-Zyklus wurde der isolierte Überstand zweimal 15 min bei Raumtemperatur mit gewaschenen, geblockten Magnet-*beads* auf einem Rollenmischer inkubiert. Die *beads* wurden anschließend fokussiert und der Überstand zweigeteilt. Alle weiteren Schritte fanden bei 4 °C statt. Ein Teil der ternären Komplexe wurde mit biotinyliertem TNF-alpha (2.14.5) auf einem Rollenmischer inkubiert, wobei Proteinmenge und Inkubationszeit in jedem RD-Zyklus angepasst wurden (Tab. 13). Der andere Teil wurde als Kontrollreaktion mit PBS versetzt und analog zum ersten Teil weiterbehandelt. Die Immobilisierung des TNF-alpha und der daran gebundenen ternären Komplexe auf Streptavidin-beschichteten Magnet-*beads* erfolgte für 30 min auf einem Rollenmischer. Nach mehreren Waschschritten mit jeweils 500 µl WBT zur Reduktion nicht oder schwach bindender ternärer Komplexe erfolgte die Elution der mRNA.

Tabelle 13: Parameterübersicht für die RD-Zyklen.

Die Übersicht fasst die wichtigsten Parameter der einzelnen Selektionszyklen zusammen. Um eine Anreicherung unspezifischer Moleküle zu verhindern, wurden in Zyklen 5 und 6 die Carboxyl-modifizierten (M-270) Magnet-*beads* durch Tosyl-modifizierte (MyONE T1) ersetzt. Zur Erhöhung der Selektionsstringenz wurde die TNF-alpha-Konzentration sukzessive verringert.

RD-Zyklus	Präinkubation	c _{TNF-alpha final} (nM)*	Inkubation (min)**	Magnet- <i>beads</i>	Waschschrritte	Zyklenzahl 1. PCR***
1	-	400	30	70 µl M-270 SA	4 × 2 min	30
2	-	152	30	50 µl M-270 SA	3 × 2 min	27
3	50 µl M-270 SA	83	55	50 µl M-270 SA	3 × 2 min	23
4	50 µl M-270 SA	56	100	30 µl M-270 SA	4 × 2 min	24
5	40 µl MyONE T1 SA, 15 µl ProteinG, 15 µl ProteinA	39	60	20 µl MyONE T1 SA	3 × 2 min, 2 × 7 min	21
6	30 µl MyONE T1 SA, 15 µl ProteinG, 15 µl ProteinA	28	60	15 µl MyONE T1 SA	3 × 2 min, 1 × 7 min, 1 × 10 min	22

SA = Streptavidin

*Konzentration bezieht sich auf TNF-alpha-Trimer

**bezieht sich auf die Inkubationszeit mit TNF-alpha in Lösung

***bezieht sich auf die erste PCR nach der reversen Transkription

2.12.4 Isolierung und reverse Transkription der mRNA

Zur Elution der mRNA aus den gebundenen ternären Komplexen wurden die fokussierten Magnet-*beads* mit 100 µl EB resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur und 800 rpm geschüttelt. Nach erneuter Fokussierung wurde der Überstand abgenommen und die Elution mit weiteren 100 µl EB wiederholt. Beide Elutionsfraktionen wurden vereinigt und die RNA mit

2 Material und Methoden

Hilfe des RNeasy MinElute Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert. Die Rückgewinnung der mRNA von den RNeasy MinElute Spin-Säulen erfolgte mit 14 µl RNase-freiem Wasser. Um Rückstände der eingesetzten DNA zu entfernen, wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt. 12 µl gereinigte mRNA wurden mit 38 µl Nuklease-freiem, 5,7 µl 10-fach DNaseI-Puffer und 1,3 µl DNaseI (Ambion) versetzt. Nach 30 min bei 37 °C wurden 7 µl Inaktivierungspuffer zugegeben und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein 1-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm. 12 µl des Überstandes wurden für die Reverse Transkription eingesetzt.

Reaktionsansatz	Volumen
5× RT-Puffer (Roche)	4 µl
dNTP-Mix (je 10 mM, Fermentas)	1 µl
Primer RT27 (20 µM)	1 µl
RNase-Inhibitor RNasin plus (Promega)	0,5 µl
Überstand DNaseI-Verdau	12 µl

Nach 2 min bei 65 °C im Thermocycler wurden 0,5 µl Transcriptor Reverse Transkriptase zugesetzt und die Inkubation für 45 min fortgesetzt. Um die cDNA-Bibliothek wieder in ein RD-fähiges Format zu konvertieren, folgten zwei PCRs (1: Primer F1 und RT27, Hybridisierung bei 65 °C; 2: Primer F1A und RT27, Hybridisierung bei 60 °C). Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch gereinigt. Die Anzahl der Syntheszyklen für die 1. PCR wurde mit zunehmender RD-Zyklenzahl verringert (Tab. 13).

2.12.5 Klonierung der DNA-Bibliotheken

Für die Analyse von Einzelklonen erfolgte alternativ zum 2. PCR-Schritt (2.12.4) die Amplifikation mit den Primern F1 und DIUBXhorev (Hybridisierung bei 62 °C). Das gereinigte Produkt wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Xho*I in den Expressionsvektor pET-20b-2xStop kloniert (2.11.2 und 2.11.3). Anschließend erfolgte die Transformation von elektrokompenten *E. coli* NovaBlue(DE3) (2.13.2).

2.13 Kultivierung von *E. coli*

2.13.1 Stammhaltung und Anzucht von *E. coli*

Zur Stammhaltung für bis zu vier Wochen wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten kultiviert. Für eine langfristige Lagerung wurden Kryokulturen angefertigt. Hierfür wurden Übernachtskulturen mit Glycerin bis zu einer finalen Konzentration von 10 % versetzt. Die Kultur wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Nach Inokulation mit Einzelklonen von LB-Agarplatten oder aus Kryokulturen erfolgte die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in

Reagenzgläsern mit 5 ml LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Dabei wurden dem Medium die je nach Bakterienstamm und Plasmid notwendigen Antibiotika zugesetzt.

2.13.2 Herstellung kompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen erfolgte durch Inokulation von 1 l antibiotikahaltigem 2× TBY-Medium mit 10 ml Übernachtskultur. Die Zellen wurden bei 30 °C und 220 rpm bis zu einer A_{600} von 0,5 vermehrt. Nach 30 min Lagerung auf Eis wurde die Kultur für 10 min bei 4000× g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 800 ml sterilem bidestillierten Wasser mit 10 % Glycerin resuspendiert. Es folgten drei weitere Waschschrte, wobei das Resuspensionsvolumen schrittweise bis auf 1200 µl reduziert wurde. Die Zellen wurden anschließend zu je 40 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 25 °C maximal bis zu einer A_{600} von 0,6 angezogen. Nach 30 min Lagerung auf Eis wurde die Kultur in 50 ml-Röhrchen überführt und bei 2500× g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 4 ml TB-Puffer resuspendiert, mit 290 µl DMSO versetzt und 10 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Aliquotierung zu je 100 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.13.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Es wurden zwei Methoden zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA angewandt. Bei der Elektroporationsmethode wurde ein Aliquot von 40 µl kompetenten Zellen mit etwa 1 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µl Ligierungsansatz vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,1 cm) gegeben. Das Elektroporationsgerät erhielt die nachfolgenden Einstellungen.

Spannung:	1,8 kV
Widerstand:	100 Ω
Kapazität:	50 µF

2 Material und Methoden

Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und für 25-45 min bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer geschüttelt. Nach dem Ausplattieren von 10-100 µl Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Bei Transformationen mit DNA aus Ligierungsansätzen wurden jeweils 50 und 950 µl ausplattiert.

Bei der Transformation chemisch kompetenter Zellen wurde ein auf Eis aufgetautes Aliquot dieser Zellen mit 10 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligierungsansatz versetzt und für 5 min auf Eis belassen. Nach einer Inkubation für 60 s im Wasserbad bei 42 °C und 2 min auf Eis wurde die gesamte Suspension in 1 ml SOC-Medium überführt und 25-45 min bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer geschüttelt. 50-1000 µl der Zellsuspension wurden auf Selektionsmedium ausgestrichen und anschließend über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.13.4 Expression im Schüttelkolben

Die Expression für präparative Zwecke erfolgte in 1 l-, 3 l- oder 5 l-Schüttelkolben mit Schikanen. Zur Inokulation von antibiotikahaltigem ZYM-5052-Medium wurden Flüssigkulturen im Verhältnis 1:500 verwendet. Das Volumen des Autoinduktionsmediums betrug stets maximal 10 % des Schüttelkolbenvolumens. Nach Inkubation für 16-24 h bei 37 °C und 240 rpm erfolgten die Bestimmung der A_{600} und die Zellernte durch Zentrifugation für 10 min bei 4000× g. Die Biofeuchtmasse wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Markierung von Proteinen mit ^{15}N -Stickstoff für die NMR wurden die Zellen zunächst an Minimalmediumsbedingungen adaptiert. Dazu erfolgte die Inokulation von 3 ml N-505-Medium mit den entsprechenden Antibiotika. Nach Inkubation für 16-20 h bei 37 °C und 220 rpm wurde eine Kryokultur angefertigt. Ausgehend von dieser schlossen sich zwei weitere Adaptationszyklen an. Die Kryokultur der dritten Adaptation wurde zur Inokulation der Hauptkultur genutzt. Die Expression erfolgte analog zum Vollmedium ZYM-5052 in ^{15}N -markiertem N-5052.

Für die Proteinreinigung erfolgte die Resuspension der aufgetauten Zellen mit 5 ml NPI-20 pro g Biofeuchtmasse. Nach Zugabe von 200 µg/ml Lysozym, 2 mM MgSO_4 und 10 U/ml Benzonase (Novagen, Darmstadt) wurde die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Für den Zellaufschluss wurde die Probe auf Eis 5× für 20 s bei einer Amplitude von 40 % ultraschallbehandelt, wobei zwischen den Pulsen 30 s pausiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Lysatvolumen wurde durch Zugabe von NPI-20 auf 40 ml eingestellt und Zelltrümmer sowie Proteinaggregate durch Zentrifugation für 20 min bei 50000× g entfernt. Der Überstand wurde vor der chromatographischen Proteinreinigung filtriert (Porengröße: 0,45 µm).

2.13.5 Expression in 96-deep well-Platten

Zur Anzucht der Vorkulturen für die parallele Charakterisierung einer hohen Variantenzahl dienten 100 µl LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in 96-well-Mikrotiterplatten. Nach 6-8 h Schütteln bei 37 °C und 220 rpm erfolgte die Inokulation der Hauptkultur mit 0,7 µl Vorkultur. Die Expression wurde in 2 ml-96-deep well-Platten mit 300 µl ZYM-5052-Medium mit den entsprechenden Antibiotika durchgeführt. Die Zellernte erfolgte nach Schütteln für 16-20 h bei 37 °C und 240 rpm durch Zentrifugation für 10 min bei 4000× g. Zur Kontrolle des Zellwachstums wurde für einzelne Kavitäten zuvor die A_{600} bestimmt. Die Biofeuchtmasse wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die anschließenden ELISA- und SDS-PAGE-Analysen wurden die aufgetauten Zellen mit 200 µl Lysispuffer (PBS, 75 µg/ml Lysozym, 2 U/ml Benzonase, 1× BugBuster Protein Extraction Reagent, 0,2 mM PMSF) pro Kavität resuspendiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 4500× g wurde der Überstand mit der löslichen Lysatfraktion in neue 96-deep well-Platten überführt. Das Sediment mit der unlöslichen Lysatfraktion wurde mit 250 µl/Kavität PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl/Kavität 8 M Harnstoff, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA resuspendiert. Für den ELISA wurde die lösliche Fraktion 1:10 mit PBST0,05 (PBS, 0,05 % Tween-20) verdünnt.

2.14 Proteinchemische und analytische Methoden

2.14.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE können denaturierte Proteine elektrophoretisch nach ihrer Molekularmasse getrennt werden. Es wurden NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele mit 10, 12 oder 15 Auftragskammern verwendet. Protein-Standards wurde in einer Menge von 7 µl aufgetragen. Bis zu 15 µg Proteinprobe mit der entsprechenden Menge an SDS-Probenpuffer (5×) wurden 5 min bei 80 °C erhitzt und dann aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 40 min bei 200 V. Nach drei fünfminütigen Waschschritten wurden die SDS-Polyacrylamidgele zur Proteinvisualisierung für mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Ungebundener Coomassie-Farbstoff wurde mit Wasser ausgewaschen. Zum Nachweis kleinster Proteinmengen erfolgte die Detektion mittels Silberfärbung nach Nesterenko *et al.* (1994).

2.14.2 Proteinreinigung

Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Verfahren beruht auf der Wechselwirkung von vor allem Histidin- und Cysteinseitenketten mit komplexierten Schwermetallionen. Durch die Fusion eines Poly-Histidinpeptids (z.B. His₆-tag oder His₁₀-tag) an den N- oder C-Terminus eines Proteins kann dies für dessen Reinigung

genutzt werden. Die Elution eines solchen Fusionsproteins erfolgt z.B. durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle während der Migration durch eine poröse, inerte Matrix entsprechend ihres hydrodynamischen Radius aufgetrennt werden. Dabei können kleinere Moleküle in die Poren diffundieren. Größere Moleküle dringen schlechter in die Poren ein, wodurch sie zuerst eluieren. Das Verfahren kann zur Trennung von Proteinen verschiedener Größe und zur Umpufferung/Entsalzung von Proteinproben genutzt werden. In dieser Arbeit wurden neben der präparativen Anwendung auch analytische SEC-Läufe durchgeführt.

2.14.2.1 Reinigung von Ubiquitin-Varianten

Nach dem Zellaufschluss wurde der filtrierte Überstand der Zentrifugation an einem ÄKTExpress-System mit 4 ml/min auf eine 5 ml-HisTrap HP-Säule aufgetragen. Anschließend wurde unspezifisch gebundenes Protein zunächst mit maximal 23 Säulenvolumen (CV) NPI-20 und anschließend mit 7 CV NPI-40 von der Säule gewaschen. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 5 ml/min mit 8 CV NPI-500 eluiert, wobei proteinhaltige Fraktionen vom Chromatographie-System in Schlauchschleifen (*loops*) gesammelt wurden. Für das automatische Auffangen des eluierten Proteins wurden die nachfolgenden Parameter verwendet.

Anzahl *loops*: 5
maximales Peakvolumen: 7 ml
Peak UV-Startwert: 20 mAU
Peak UV-Endwert: 15 mAU
Peak Minimalbreite: 0,5 min
Peak UV-Anfangssteigung: 5 mAU/min
Peak UV-Endsteigung: 20 mAU/min

Maximal 5 ml des aufgefangenen Eluats wurden auf eine mit dem Laufpuffer PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1,2 ml/min. Mit Hilfe von Molekularmassenstandards (GE Healthcare) wurde die apparente Molekularmasse bestimmt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

2.14.2.2 Reinigung von TNF-alpha mittels SUMO-Fusionsmethode

Um anhangsfreies TNF-alpha mit einem nativen N-Terminus zu erhalten, wurde die SUMO (*small ubiquitin-related modifier*)-Fusionsmethode verwendet. Das Fusionsprotein wurde dabei über einen N-terminalen His₆-tag zunächst affinitätschromatographisch gereinigt. Es folgte die

2 Material und Methoden

Hydrolyse des Fusionsproteins durch die SUMO-spezifische Protease *smt3* aus Hefe. *smt3* spaltet unabhängig von den nachfolgenden Aminosäuren (außer Prolin) direkt nach dem C-terminalen Diglycin-Motiv von SUMO. Das freigesetzte Zielprotein ohne zusätzliche N-terminale Anhänge wird nun den His₆-tag-enthaltenden Proteine durch eine zweite IMAC gereinigt.

Die Reinigung wurde an einem ÄKTAexplorer-System bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde der filtrierte Zentrifugationsüberstand nach dem Zellaufschluss auf eine mit NPI-20 äquilibrierte 5 ml-HisTrap HP-Säule aufgetragen (Flussrate 4 ml/min). Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 6 CV NPI-40 von der Säule gewaschen (Flussrate 5 ml/min). Die Elution des Fusionsproteins erfolgte bei einer Flussrate von 5 ml/min mit 2 CV 80 % NPI-500 in NPI-20. Proteinhaltige Fraktionen wurden zusammengefasst und mit einer HiPrep 26/10 Entsalzungssäule in NPI-20 umgepuffert (Flussrate 10 ml/min). Zur Spaltung des Fusionsproteins wurden 1 µl/ml SUMO-Hydrolase (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eva Bosse-Doenecke, 50-150 µg/ml) zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Probe erneut mit 4 ml/min auf eine 5 ml-HisTrap HP-Säule geladen, wobei die His₆-tag-fusionierte SUMO-Hydrolase, SUMO sowie ungespaltenes Fusionsprotein auf der Säule gebunden wurden. Der Durchfluss, der das anhangsfreie Zielprotein TNF-alpha enthielt, wurde aufgefangen und mit Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 5000 Da, Sartorius, Göttingen) bis auf ein Volumen von maximal 8 ml eingeengt. Als finaler Reinigungsschritt folgte eine Größenausschlusschromatographie mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule mit PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, als Laufpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die apparente Molekularmasse wurde anhand des Elutionsvolumens bestimmt. Als Referenz dienten Molekularmassenstandards von GE Healthcare. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

2.14.2.3 Analytische Größenausschlusschromatographie zur Komplexbestimmung

Zur Untersuchung der Komplexbildung von TNF-alpha und der Ubiquitin-Variante 10F wurden die Proben in Laufpuffer PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, gegebenenfalls versetzt mit 0,05 % Tween-20, für 10 min bis 44 h bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 300 µl-Aliquote aus einer 2 ml-Probenschleife oder einem 10 ml-Superloop auf eine Superose 12 10/300 GL-Säule geladen. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,6 ml/min und wurde spektroskopisch bei 254 und 280 nm verfolgt. Bei Einsatz von Fluorescein-markiertem 10F wurde zusätzlich bei 495 nm detektiert.

2.14.3 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Die Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen (bis 4 ml) erfolgte mit Vivaspin 500-Zentrifugalfiltern (Sartorius, MWCO 3000, 5000 oder 10000 Da) nach Angaben

des Herstellers. Größere Volumina wurden mittels Vivaspin 4 oder Vivaspin 20-Zentrifugalfiltern (Sartorius, MWCO 5000 bzw. 3000 Da) aufkonzentriert.

Die Umpufferung von bis zu 1 ml Proteinlösung durch Dialyse erfolgte in Dialysekapseln (Carl Roth) versehen mit einer Spectra/Por 7-Membran (Spectrum Labs, MWCO 1000 Da). Für einen extensiven Pufferaustausch wurden mindestens vier Dialyseschritte durchgeführt.

2.14.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration für Proteine ohne Tryptophan oder für Proteingemische erfolgte nach Bradford (1976). Dazu wurden 20 µl Proteinlösung und 980 µl Bio-Rad Protein Assay gemischt und nach 15 min die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde BSA-Proteinlösung benutzt, deren Konzentration spektroskopisch bestimmt wurde.

2.14.5 Amin-spezifische Modifikation von Proteinen

Amin-spezifische Reagenzien bieten eine einfache und selektive Möglichkeit der Modifizierung von Proteinen. Reaktionsfähige, primäre Aminogruppen finden sich an den Lysinseitenketten und dem Aminoterminus, wobei aufgrund der unterschiedlichen pK_a -Werte die Selektivität durch den pH-Wert beeinflusst werden kann. Die verwendeten Reagenzien Sulfo-NHS-LC-Biotin (6-(Biotin-amido)-hexansäure-sulfosuccinimidylester), NHS-Fluorescein (5/6-Carboxyfluorescein-succinimidylester) oder 6-(Fluorescein-5-carboxamido)-hexansäure-succinimidylester wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst und im 3- bis 10-fachen molaren Überschuss zu 1-3 mg gereinigtem Protein gegeben. Alle Proteine waren in 50 mM NaH_2PO_4 pH 6,5 gelöst, um vorrangig die N-terminale Aminogruppe zu modifizieren. Nach Inkubation für 16 h bei 4 °C wurde überschüssiges, nicht gekoppeltes Reagenz durch extensive Dialyse oder Entsalzungssäulen entfernt.

Um die erfolgreiche Biotinylierung nachzuweisen wurde ein *pull-down*-Experiment durchgeführt. Biotinyliertes Protein wurde im 2-fachen molaren Unterschuss auf Streptavidin-beschichteten Magnet-*beads* immobilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBS, 0,05 % Tween-20 wurde gebundenes Protein durch Inkubation mit 20 µl 5× SDS-Probenpuffer eluiert und zusammen mit dem Überstand der Immobilisierung mittels SDS-PAGE analysiert.

2.14.6 ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der ELISA diente in dieser Arbeit hauptsächlich zum Nachweis der Interaktion zweier Moleküle oder der Bestimmung der Bindungsstärke. Hierzu wurden zunächst 100-500 ng (je Kavität) Zielmolekül in 50 µl PBS über Nacht bei 4 °C auf Maxisorp-96 *well*-Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl PBS

2 Material und Methoden

wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 300 µl je Kavität PBS, 1 % (w/v) BSA für 2 h bei 37 °C blockiert. Es folgten drei Waschschrte mit 300 µl PBS, 0,05 % Tween-20 (PBST0,05). 50 µl Ligandprotein oder entsprechendes Zelllysate wurden zugegeben und für bis zu 2 h inkubiert. Im Falle eines kompetitiven ELISA wurden die Ligandproteine vor Zugabe für mindestens 1 h auf Eis mit dem Kompetitor inkubiert. Anschließend wurde abermals dreimal mit 300 µl PBST0,05 gewaschen. Die Detektion gebundener Ligandmoleküle erfolgte mittels Immunkonjugaten (Tab. 14). Dazu wurden 50 µl Peroxidase-Konjugat zugesetzt und für 1 h inkubiert. Nach je dreimaligen Waschen mit PBST0,05 und PBS erfolgte die Zugabe des Peroxidase-Substrats (50 µl TMB Plus bzw. TMB One). Die Peroxidase-Reaktion wurde nach 5-30 min mit 50 µl 0,2 M Schwefelsäure gestoppt. Zur Auswertung wurde mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts die Extinktion bei 450 nm und als Referenz 620 nm bestimmt.

Tabelle 14: Für ELISA-Experimente verwendete Antikörper bzw. Immunkonjugate.
Die Verdünnung aller Antikörper bzw. Immunkonjugate erfolgte in PBST0,05.

Immunkonjugat	Antigen	Verwendete Verdünnung
anti-FLAG-M2-Peroxidase-Konjugat	FLAG-Peptid (DYKDDDDK)	1:2000
anti-His ₆ -Peroxidase-Konjugat	Hexahistidin-Peptid	1:70-1:500
Avidin-Peroxidase-Konjugat	Biotin	1:2000

2.14.7 Analytische Ultrazentrifugation

Durch Gleichgewichtssedimentation kann die molekulare Masse von Proteinmolekülen und -komplexen bestimmt werden. Die Proteinkonzentration betrug für die Fluorescein-markierte Ubiquitin-Variante 10F 0,04 mg/ml und für TNF-alpha 0,95 mg/ml in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20. Das Sedimentationsgleichgewicht wurde bei 14000 rpm und 20 °C bei einer Wellenlänge von 280 nm für nicht markierte Proteine bzw. 490 nm für Fluorescein-markierte Proben gemessen. Die Experimente an einer Analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hauke Lilie bei der Abteilung Technische Biochemie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

2.14.8 Isothermale Titrationskalorimetrie

Mit Hilfe der Isothermalen Titrationskalorimetrie können durch Messung der Reaktionswärme die thermodynamischen Parameter einer Protein-Protein-Interaktion bestimmt werden. Die Experimente wurden mit einem MicroCal VP-ITC Titrationsmikrokalorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA) bei 25 °C durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden nach extensiver Dialyse von TNF-alpha und der Ubiquitin-Variante 10F gegen PBS, 0,5 mM EDTA pH 7,4 beide Proben in PBS, 0,5 mM EDTA pH 7,4, 0,1 % Tween-20 zweifach verdünnt. Die Titration von TNF-alpha (19 µM Trimer) mit 10F (349 µM) erfolgte in 10 µl-Schritten. Die Messdaten

wurden mit Hilfe der Software Origin Version 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA) ausgewertet. Die Bindungskurven wurden vor ihrer Auswertung hinsichtlich der Verdünnungswärme korrigiert, die in parallelen Kontrollexperimenten durch Injektion von 10F (349 μ M) in PBS, 0,5 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20 bestimmt wurde.

2.14.9 Massenspektrometrie

Zum Nachweis der Identität oder der erfolgreichen Modifikation der Proteine wurden diese mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei werden die ionisierten Moleküle entsprechend ihres Masse-Ladungsverhältnisses durch elektromagnetische Felder getrennt. Vor der Analyse wurden die Proben extensiv gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Die Untersuchungen mittels *matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight* (MALDI-TOF)- oder *electrospray ionization linear trap quadrupole* (ESI-LTQ) *orbitrap*-Experimenten wurden bei der Abteilung für Pharmazeutische Chemie & Bioanalytik (Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg) von Herrn Dr. Mathias Q. Müller bzw. Herrn Dr. Christian Ihling durchgeführt.

2.14.10 Zellkulturuntersuchung der Zytotoxizität von TNF-alpha

Die biologische Aktivität von gereinigtem TNF-alpha wurde durch einen modifizierten L929-Zellkulturtest bestimmt. Die Analyse wurde freundlicherweise von Manja Gloser bei der Scil Proteins GmbH (Halle) durchgeführt. Mausfibroblasten L929 (DSMZ, ACC 262) wurden in RPMI (Lonza, Walkersville, MD, USA) mit 10 % Fötalem Kälberserum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kultiviert. Für einen Zellproliferationsassay wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen/Kavität in 96-well-Mikrotiterplatten mit RPMI (2 % Fötale Kälberserum, 50 μ g/ml Gentamicin) überführt. Nach 24 h wurden die Zellen für 30 min mit Actinomycin D (4 μ g/ml) stimuliert und dann für weitere 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an TNF-alpha inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität durch Zugabe von WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) und Messung der Extinktion bei 450 nm und 620 nm (Hintergrund) untersucht.

2.15 Spektroskopische Methoden

2.15.1 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektroskopie war die Methode der Wahl zur Bestimmung der Konzentration gereinigter Protein- und DNA-Lösungen. Für alle Messungen wurden Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL der Firma VWR (Darmstadt) verwendet. Die Absorptionskoeffizienten von Proteinen wurden mit dem Programm ProtParam Tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) (Gasteiger *et al.*, 2005) berechnet. Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Spektrum von 250 bis 330 nm. Zur Bestimmung der Konzentration konnten die Messwerte bei 280 nm herangezogen werden (Gl. 1).

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \times c \times d \quad (\text{Gl. 1})$$

A_{280}	Extinktion bei 280 nm
ε_{280}	molarer Extinktionskoeffizient der Proteinlösung bei 280 nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
c	Proteinkonzentration (M)
d	Schichtdicke (cm)

Das Verhältnis der Messwerte bei 280 und 260 nm diene zum Abschätzen der Verunreinigung durch DNA. Bei höheren Wellenlängen als 310 nm ist es möglich aufgrund von Lichtstreuung Aggregate nachzuweisen.

Zur Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurden die Extinktion bei 260 nm und ein Extinktionskoeffizient von $0,02 \mu\text{l}/(\text{ng} \times \text{cm})$ herangezogen.

2.15.2 Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie

Der Zirkulardichroismus beruht auf der unterschiedlichen Absorption links und rechts zirkular polarisierten Lichts durch optisch-aktive Moleküle. Die Absorption der Peptidbindung bei 170-250 nm (Fern-UV) ermöglicht dadurch die Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen, während die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 250-300 nm (Nah-UV) Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur erlaubt.

Fern-UV-CD-Spektren

Fern-UV-CD-Experimente wurden an einem Jasco J-810-Spektropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD, USA) mit Peltierelement durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 20°C in Quarzglasküvetten (Hellma) mit 0,1 mm bzw. 1 mm Schichtdicke über einen spektralen Bereich von 185-260 nm und mit einer Messgeschwindigkeit von 10 nm/min und einer Bandweite von 1 nm. Bei einer Integrationszeit von 4 s wurden 20 Spektren akkumuliert. Die Proteinkonzentrationen und Pufferzusammensetzungen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert und nach Gl. 2 (Schmid, 1997) auf die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest normalisiert.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \times 100 \times MW}{c \times d \times n_{AS}} \quad (\text{Gl. 2})$$

$[\theta]_{MRW}$	mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)
θ	gemessene Elliptizität (deg)
MW	molekulare Masse des Proteins (Da)
c	Proteinkonzentration (mg ml^{-1})
d	Schichtdicke (cm)
n_{AS}	Anzahl der Aminosäuren

Analyse der thermischen Stabilität

Die Fern-UV-CD-Spektroskopie wurde ebenfalls zur Untersuchung der thermischen Ent- und Rückfaltung der Proteine benutzt. Dazu wurden die Proteinlösungen in 1 mm-Quarzglasküvetten im Bereich von 10-95 °C mit 1 K/min erhitzt und wieder abgekühlt. Bei einer Wellenlänge von 200 nm bzw. 222 nm wurde in Inkrementen von 0,5 °C (bzw. 1 °C) ein Datenpunkt aufgenommen. Alle Messungen wurden pufferkorrigiert. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Pace und Scholtz (1997). Zur Überprüfung der Reversibilität wurden Fern-UV-CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 200-265 nm bei 20 °C vor und nach den Temperaturübergängen gemessen.

2.15.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz ist ein Vorgang, bei dem durch Emission von Licht ein per Lichteinstrahlung angeregtes Teilchen wieder in einen energieärmeren Zustand zurückkehrt. Das vom sogenannten Fluorophor emittierte Licht ist dabei stets längerwellig als das absorbierte Licht. Die Sensitivität des Emissionsspektrums von Fluorophoren bezüglich deren unmittelbaren Umgebung ermöglicht in Proteinen z. B. die Untersuchung der Tertiärstruktur. Dazu können sowohl intrinsische Fluorophore wie u. a. Tryptophanreste, als auch extrinsische Fluorophore wie Modifikationen mit Fluorescein genutzt werden.

Analyse der thermischen Stabilität

Die Nutzung der Tryptophanfluoreszenz zur Analyse der thermisch induzierten Ent- und Rückfaltungsvorgänge war in dieser Arbeit möglich, da die verwendeten Varianten des ursprünglich Tryptophan-freien Ubiquitins den Austausch F45W enthielten. Die Messung der Temperaturübergänge erfolgte an einem Fluoreszenzspektrometer FluoroMax-3 (Jobin-Yvon) mit Peltierelement in rührbaren, verschleißfähigen Quarzglasküvetten (Hellma) mit 1 cm Schichtdicke und 3,5 ml Probenvolumen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 4 µM in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4. In einem Temperaturbereich von 20 °C bis 90 °C wurde alle 1 °C (Toleranz: 0,25 °C, Äquilibrierzeit: 1,3 min) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm ein Emissionsspektrum von 330 bis 360 nm aufgenommen. Die Auswertung der Heiz- und Kühlkurven erfolgte, wenn nicht abweichend angegeben, bei 353 nm nach Pace und Scholtz (1997).

Untersuchung der TNF-alpha-Dissoziation durch Selbstauslöschung der Fluorescein-Fluoreszenz

Der Einfluss verschiedener Moleküle auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von TNF-alpha-Trimeren wurde fluoreszenzspektroskopisch nach He *et al.* (2005) untersucht. Aufgrund der räumlichen Nähe der Fluorescein-Moleküle in (dreifach) markierten TNF-alpha-Trimeren

kommt es zur Selbstauslöschung der Fluoreszenz. Der Austausch von Untereinheiten mit nicht markierten TNF-alpha-Trimeren resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Für das Experiment wurden Mikrotiterplatten (Greiner Standard 96F Black Non-binding) mit 30 µl/Kavität 500 nM Fluorescein-markiertem TNF-alpha (2.14.5) befüllt. Nach Zugabe von 120 µl 25 µM unmarkiertem TNF-alpha (200-facher Überschuss) wurde mit einem Paradigm-Plattenlesegerät (Beckman-Coulter) die Fluoreszenzemissionsintensität (Anregungsfilter: 485 nm, Emissionsfilter: 535 nm) zeitabhängig aufgezeichnet. Nach 37 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 5 µl/Kavität PBS oder Proteinlösung (595 µM 10F, 600 µM 10F_{DY} bzw. 160 µM Etanercept). Anschließend wurde 3 s geschüttelt und die Fluoreszenzmessung fortgesetzt. Als Messpuffer diente PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20. Zur Verhinderung von Verdunstungseffekten wurden Deckel verwendet. Die Daten wurden zur Auswertung auf die Werte bei 38 min normiert.

2.15.4 NMR-Spektroskopie

Die Kernmagnetresonanz(NMR)-Spektroskopie beruht auf der Sensitivität der Magnetresonanz bestimmter Atomkerne gegenüber ihrer chemischen Umgebung. Typische Atomkerne, die für die Untersuchung von Proteinen genutzt werden können, sind ¹H, ¹⁵N und ¹³C. Die Methode erlaubt eine aminosäureaufgelöste Analyse der Proteinstruktur und von Proteininteraktionen. Um Resonanzsignale einzelner Aminosäuren unterscheiden zu können, wurden in dieser Arbeit ¹H-¹⁵N F-HSQC-Experimente verwendet. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Michael Kovermann von der Abteilung Biophysik (Institut für Physik, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Alle Spektren wurden in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, versetzt mit 10 % D₂O, bei 25 °C aufgezeichnet.

Die ¹H-¹⁵N F-HSQC-Einzelspektren der Ubiquitin-Varianten WUBI, 10F, 10F_{DY} und WUBIΔDY wurden an einem Bruker 800 Avance III-Spektrometer aufgenommen. Die Titration der ¹⁵N-markierten Ubiquitin-Variante 10F mit TNF-alpha wurde an einem Bruker 600 Avance III-Spektrometer durchgeführt. Für jeden Titrationsschritt wurde nach kurzer Inkubation ein ¹H-¹⁵N F-HSQC-Spektrum aufgenommen. Die Stöchiometriebestimmung erfolgte durch Verfolgung der Intensität der 10F-Resonanzsignale in den Spektrenserien in An- bzw. Abwesenheit von 0,05 % Tween-20.

3 Ergebnisse

Fiedler *et al.* (2004) zeigten bereits die Eignung des Ubiquitins zur Herstellung künstlicher Bindeproteine. Dabei wurden als Kriterien für die Auswahl von geeigneten oberflächenexponierten Aminosäurepositionen zur Generierung der Bindefläche vorrangig die Toleranz gegenüber Substitutionen und die Lokalisierung im strukturell rigiden beta-Faltblatt verwendet.

In der vorliegenden Arbeit sollte sich die Auswahl der Austauschpositionen zusätzlich an der Beteiligung der Reste an natürlichen Interaktionen des Ubiquitins orientieren (siehe 3.2). Um diese neue Strategie zur Herstellung von Ubiquitin-basierten Bindeproteinen zu evaluieren, wurden eine Ribosomen-*display*-Selektion durchgeführt und selektierte Varianten analysiert. Das als Zielmolekül ausgewählte TNF-alpha wurde durch rekombinante Expression in *E. coli* als SUMO-Fusion hergestellt. Das SUMO-System ermöglichte die Reinigung größerer Mengen anhangsfreien Proteins. Aus einer mittels PCR synthetisierten Ubiquitin-Bibliothek mit sechs randomisierten Aminosäurepositionen wurden TNF-alpha-bindende Varianten isoliert. Die Variante 10F wurde anschließend hinsichtlich der Interaktion mit TNF-alpha eingehend charakterisiert. Zudem wurde die Auswirkung der Sequenzmodifikationen der isolierten Variante auf die Struktur und Stabilität im Vergleich zum Gerüstprotein Ubiquitin F45W untersucht.

3.1 Herstellung des Zielproteins TNF-alpha

Als modellhaftes Zielprotein für die Selektion und Charakterisierung künstlicher Bindeproteine auf Grundlage einer neuen Ubiquitin-Bibliothek sollte das humane TNF-alpha dienen. Im menschlichen Körper wird das Protein in membrangebundener Form als Trimer hergestellt. Durch Abspaltung vom membranständigen Teil wird der systemisch wirksame, lösliche Teil aktiviert. Bereits ohne Fusionsanhänge wird reifes, lösliches TNF-alpha in *E. coli* mit guten Ausbeuten zytoplasmatisch gewonnen (Curnis und Corti, 2004). Jedoch wird dieses nicht vollständig von der Methioninaminopeptidase prozessiert und es verbleibt eine Spezies mit einem Methionin vor dem N-terminalen Valin. Um ein möglichst authentisches Zielprotein bereitzustellen, wurde lösliches TNF-alpha mit Hilfe des SUMO-Fusionssystems hergestellt. Die Fusion mit His₆-SUMO ermöglicht die einfache Herstellung und Reinigung eines rekombinanten Proteins ohne zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus. Zudem wurde gezeigt, dass der SUMO-Anhang die Proteinfaltung und -löslichkeit, und somit die Ausbeute verbessern kann.

3.1.1 Herstellung und Reinigung von TNF-alpha als SUMO-Fusion

Das für die Expression in *E. coli* optimierte, humane TNF-alpha-Gen wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Eco31I* und *NotI* (2.11.2) in den pET-SUMOadapt-Vektor kloniert (Abb. 10). In der Aminosäuresequenz des SUMO-TNF-Fusionsproteins entsprach die +1-Position der SUMO-Hydrolase-Spaltstelle somit dem N-Terminus des löslichen TNF-alpha – Val77.

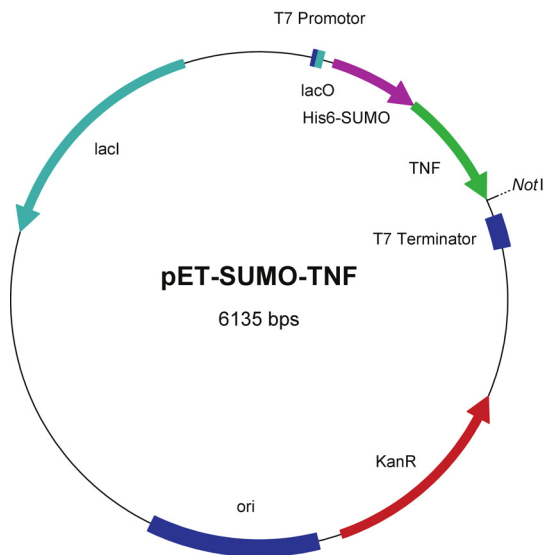


Abbildung 10: Expressionsplasmid pET-SUMO-TNF zur Herstellung von SUMO-TNF-alpha in *E. coli*.

Grundlage für diesen Vektor war pET-SUMOadapt (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008). Die codierende Sequenz für TNF-alpha wurde über flankierende *Eco31I* und *NotI*-Schnittstellen direkt an das 3'-Ende des SUMO-Gens eingefügt. Dadurch enthält das reife TNF-alpha nach der SUMO-Proteasespaltung keine zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren. Das Plasmid enthält außerdem einen T7lac-Promotor zur Kontrolle der Genexpression, ein Kanamycin-Resistenzgen (KanR) sowie einen zur Plasmidvervielfältigung notwendigen pBR322-Replikationsursprung (ori).

Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3) wurde die Expression über Nacht in Schüttelkulturen mit Autoinduktionsmedium ZYM-5052 bei 37 °C durchgeführt (2.13.4). Typischerweise wurde eine optische Dichte bei 600 nm A_{600} von 12 bis 14 erreicht, was einer Biofeuchtmasse von etwa 17 g/l Kulturvolumen entsprach. Nach Zellaufschluss und Fraktionierung der Zellbestandteile mittels Zentrifugation und ließ sich das Fusionsprotein mittels SDS-PAGE nahezu ausschließlich im löslichen Überstand nachweisen (Abb. 11A). Das N-terminale Hexahistidinpeptid des Fusionsproteins ermöglichte zunächst die Reinigung mittels Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), wie unter 2.14.2.2 beschrieben. Nach Umpufferung des Eluats in NPI-20 und Inkubation mit SUMO-Hydrolase wurden SUMO, SUMO-Hydrolase und nicht gespaltenes Protein vom anhangsfreien Zielprotein in einem weiteren IMAC-Schritt abgetrennt. Der aufkonzentrierte Durchfluss, der das reife TNF-alpha enthält, wurde mittels Gelfiltration gereinigt. Das Chromatogramm zeigte bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm einen einzelnen Peak, dessen Elutionsvolumen einer apparenten Molekularmasse von 51,9 kDa entspricht (Abb. 11A). Dies korrespondiert mit der theoretischen Molekularmasse des TNF-alpha-Trimers von 52 kDa. Ein kleiner Peak im Ausschlussvolumen zeigte das Vorhandensein von höheren Oligomeren oder Aggregaten. Die SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Proteins zeigte eine Reinheit von mindestens 96 % (Abb. 11B). Die erzielte Ausbeute betrug 97 mg/l Kulturvolumen (5,8 mg/g Biofeuchtmasse).

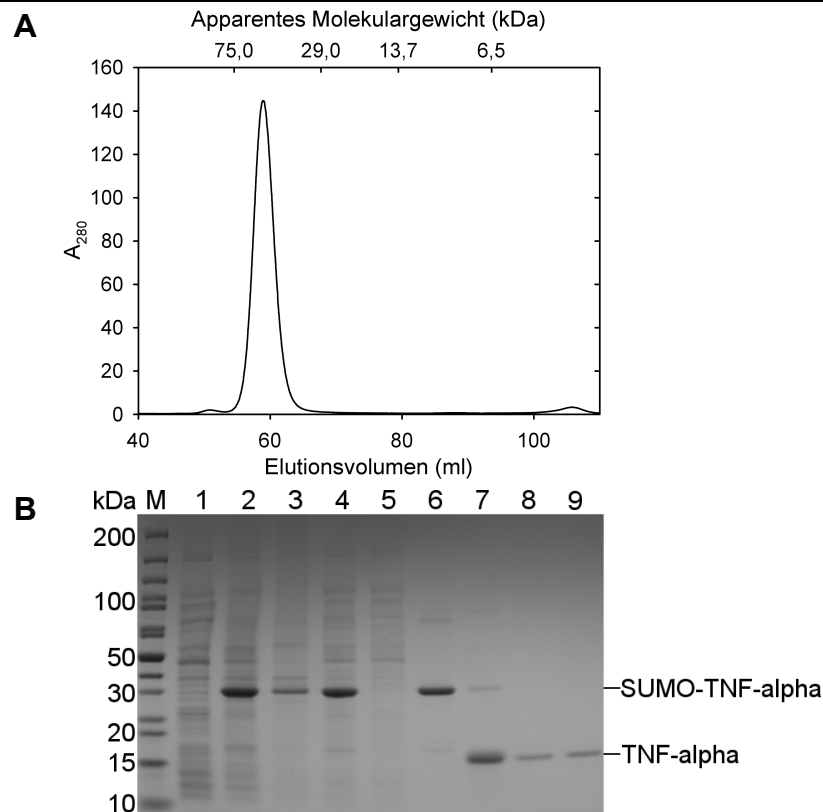


Abbildung 11: Reinigung von TNF-alpha mittels SUMO-Fusion.

(A) Größenausschlusschromatographie des abgespaltenen TNF-alpha. Im letzten Reinigungsschritt wurde der aufkonzentrierte Durchfluss der zweiten IMAC auf eine Superdex 75 *prep grade*-Säule aufgetragen. Als Laufpuffer diente PBS, 1 mM EDTA pH 7,4. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen (GE Healthcare, Uppsala, S) kalibriert. (B) SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsschritte. Proben der verschiedenen Reinigungsschritte wurden mittels 4-12 % Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Zur Probenvorbereitung wurde das Sediment nach Zentrifugation der lysierten Zellen (unlösliche Fraktion) in 8 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 bei Raumtemperatur solubilisiert. Das Probenvolumen wurde auf das Gesamtvolumen des jeweiligen Reinigungsschritts normiert. Aufgrund einer ähnlichen Molekularmasse von 17 kDa für monomeres TNF-alpha und 13 kDa für SUMO, werden in Spur 7 beide Proteine schlecht getrennt. Die exakte Lauflänge des TNF-alpha ist in Spur 8 und 9 zu erkennen. M: PageRuler Unstained Protein Ladder, 1: Zelllysate vor Induktion, 2: Zelllysate nach Induktion, 3: Zelllysate unlösliche Fraktion, 4: Zelllysate lösliche Fraktion, 5: Durchfluss erste IMAC, 6: Eluat erste IMAC, vor SUMO-Protease-Spaltung, 7: Eluat erste IMAC, nach SUMO-Protease-Spaltung (SUMO-Proteasemenge unterhalb der Detektionsgrenze), 8: Durchfluss zweite IMAC, 9: Elutionsfraktion Größenausschlusschromatographie bei 60 ml.

3.1.2 Charakterisierung des rekombinanten TNF-alpha

Die funktionelle Spezies des TNF-alpha ist ein Homotrimer. Die Untereinheiten sind dabei nicht kovalent verknüpft. Um sicherzustellen, dass das mittels SUMO-Fusion hergestellte Protein eine native Struktur und biologische Aktivität aufweist, wurde es eingehend charakterisiert. Das für die späteren Experimente verwendete, chemisch biotinylierte TNF-alpha wurde ebenfalls hinsichtlich seiner Funktionalität untersucht.

3.1.2.1 Zirkulardichroismus(CD)-spektroskopische Untersuchung des TNF-alpha

CD-Messungen im Fern-UV-Bereich erlauben Aussagen zur Sekundärstruktur von Proteinen und ermöglichen somit die Untersuchung der korrekten Faltung. Das Fern-UV-CD-Spektrum (2.15.2) des mittels SUMO-Fusion gereinigten TNF-alpha zeigte eine negative Bande bei 220 nm und eine positive Bande bei 200 nm mit einer Schulter bei 193 nm (Abb. Abbildung 12). Es entsprach publizierten CD-Spektren von löslichem, rekombinantem TNF-alpha (Riazance-Lawrence *et al.*, 1991b).

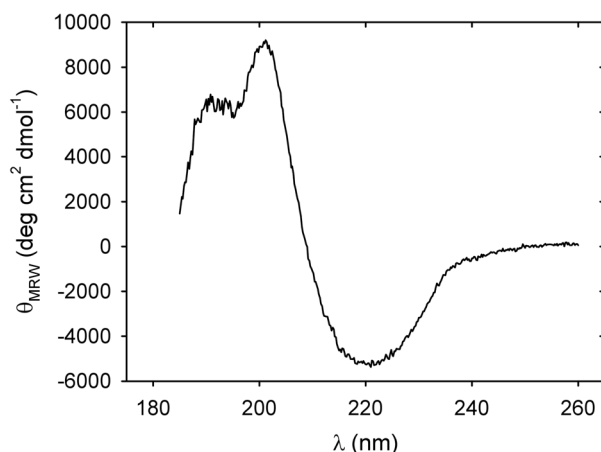


Abbildung 12: Fern-UV-CD-Spektrum des rekombinanten TNF-alpha.

Das Spektrum wurde in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,0 in einer 1 mm-Quarzglas-Küvette bei 20 °C aufgenommen und pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentration betrug 0,113 mg/ml. Bei einer Integrationszeit von 8 s wurden 15 Spektren akkumuliert.

3.1.2.2 Massenspektrometrische Untersuchung des TNF-alpha

Die Molekularmasse des monomeren TNF-alpha wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS) bestimmt (2.14.9). Die beobachtete Masse m/z von 17351 entspricht der theoretischen Masse des reifen Proteins und bestätigt das Vorhandensein der Disulfidbrücke zwischen Cys69 und Cys101 (Daten nicht gezeigt). Die Identität wurde zudem durch Peptidmassen-*fingerprinting*- und Peptidfragment-*fingerprint*-Analysen mittels nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestätigung des trimeren Zustandes des TNF-alpha in Lösung wurde die analytische Ultrazentrifugation verwendet (2.14.7). In entsprechenden Sedimentationsgleichgewichtsläufen konnte eine apparente Molekularmasse von 48 kDa bestimmt werden (Abb. 13). Dies stimmt gut mit der theoretischen Molekularmasse des TNF-alpha-Trimers von 52 kDa überein.

3.1.2.4 Biologische Aktivität mittels L929-Zellassay

Zur weiteren Überprüfung der Funktionalität des rekombinanten TNF-alpha wurde die biologische Aktivität mit kommerziell erhältlichem, humanem TNF-alpha verglichen (Abb. 14). Dazu wurde ein Zytotoxizitätstest mit murinen L929-Zellen durchgeführt (2.14.10). Die

3 Ergebnisse

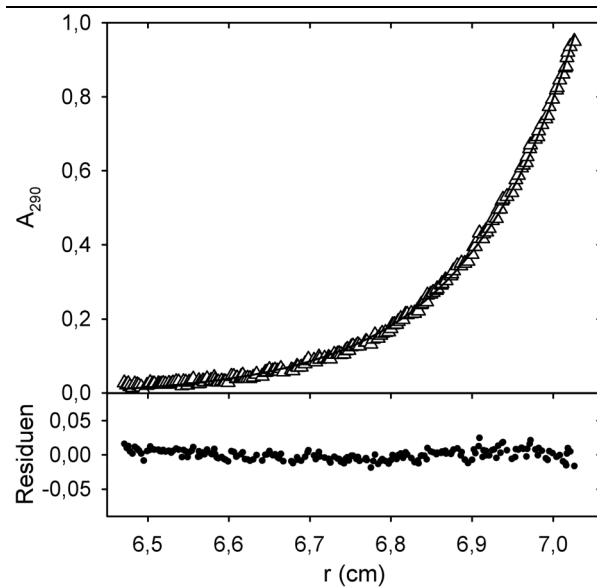


Abbildung 13: Gleichgewichtssedimentation des rekombinanten TNF-alpha.

Für die Messung wurde 10 μ M TNF-alpha (Trimer) in PBS, 0,05 % Tween-20, 0,5 mM EDTA pH 7,4 verwendet. Die Sedimentation erfolgte bei 14000 rpm und 20 °C. Oben: Die Regression (Linie) der experimentellen Daten zeigte eine Spezies von 48 kDa. Unten: Abweichung der Regression von den experimentellen Werten.

biologische Aktivität des mittels SUMO-Fusion hergestellten Proteins lag mit einem EC_{50} -Wert von $107,1 \pm 5,5$ pg/ml im Bereich der beiden Positivkontrollen (Peprotech: $165,3 \pm 25,0$ pg/ml, NEB: $194,7 \pm 11,5$ pg/ml).

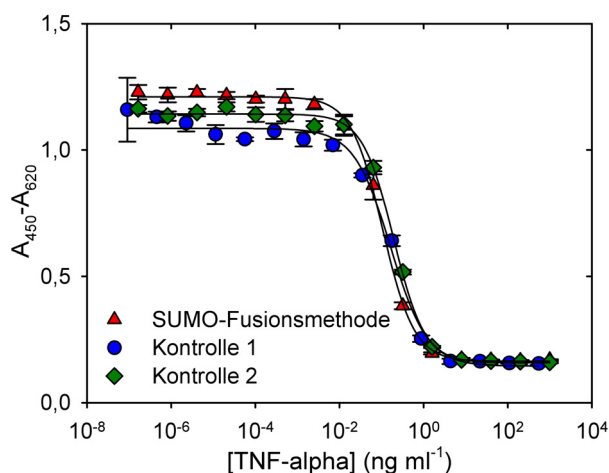


Abbildung 14: Zytotoxizität des rekombinanten TNF-alpha gegenüber L929-Zellen.

Mit Actinomycin D behandelte murine L929-Zellen wurden mit 0,2 fg/ml-1000 ng/ml TNF-alpha inkubiert. Nach 24 h wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Zugabe des Farbreagens WST-1 bestimmt. Als Kontrollen wurde rekombinantes TNF-alpha von Peprotech (Kontrolle 1) und NEB (Kontrolle 2) verwendet.

3.1.2.5 Funktionale Charakterisierung von biotinyliertem TNF-alpha

Zur Immobilisierung in Selektionsexperimenten und die anschließende Charakterisierung der isolierten Bindeproteine wurde TNF-alpha chemisch biotinyliert (2.14.5). Mittels ESI-Massenspektrometrie (2.14.9) ließ sich folgende Verteilung der modifizierten TNF-alpha-Monomere abschätzen: 60 % einfach biotinyliert, 30 % mehrfach biotinyliert, 10 % unmodifiziert (Daten nicht gezeigt). Ein *pull-down*-Experiment von biotinyliertem TNF-alpha mit einer Streptavidin-Matrix bestätigte die vorhandene Modifizierung. 95 % des TNF-alpha konnten dabei immobilisiert werden (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der biologischen Funktionalität des biotinylierten Proteins diente ein ELISA (siehe Abb. 25B, S. 63). Das modifizierte TNF-alpha wurde erfolgreich vom TNF-Rezeptor in Form von Etanercept erkannt.

Wie sich zeigte, konnte TNF-alpha als SUMO-Fusion in großen Mengen in der Schüttelkultur hergestellt werden. Das rekombinante Protein war nativ gefaltet und zeigte volle biologische Aktivität. Die Ausbildung der Disulfidbrücke erfolgte vermutlich durch Luftsauerstoff nach dem Zellaufschluss während der Reinigung. Explizite Aussagen zum Anteil unverbrückter Cysteine können aufgrund des nur bedingt quantitativen Charakters der MS-Daten nicht erfolgen. Für die Ribosomen-*display*-Selektion biotinyliertes TNF-alpha war ebenfalls funktional.

3.2 Selektion einer Ubiquitin-Bibliothek gegen TNF-alpha

Zur Herstellung künstlicher Bindeproteine werden häufig evolutionäre Selektionsmethoden benutzt. Diese ermöglichen die Isolierung von Molekülen mit den gewünschten Bindungseigenschaften aus großen Bibliotheken, ohne eine hohe Anzahl von Bibliotheksmitgliedern einzeln durchmustern zu müssen. Im Ribosomen-*display* können so - begrenzt durch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Ribosomen - bis zu 10^{12} unterschiedliche Moleküle gleichzeitig der Selektion zugeführt werden. Diese Methode sollte benutzt werden, um aus einer neu konstruierten Ubiquitin-Bibliothek TNF-alpha-spezifische Bindemoleküle zu isolieren.

3.2.1 Konstruktion und Analyse der Ubiquitin-Bibliothek

Im Unterschied zu vorherigen Ubiquitin-basierten Bibliotheken sollten in dieser Arbeit möglichst Aminosäurepositionen zur Generierung der Bindefläche benutzt werden, die bereits in natürlichen Interaktionen des Ubiquitins involviert sind. Zusätzlich bestand die Vorgabe, dass sich die entsprechenden Reste im beta-Faltblatt befinden sollten, um eine rigide Grundstruktur für das Paratop zu gewährleisten. Nach intensiver Literaturanalyse wurden die Aminosäuren des hydrophoben Oberflächenbereichs um L8, I44 und V70 ausgewählt (Tab. 15). Anhand von Daten aus *in silico*-Studien zum Einfluss von Aminosäureaustauschen in diesem Bereich des Ubiquitins auf dessen Gesamtstabilität (Wiederstein und Sippl, 2005, interner Forschungsbericht Scil Proteins, 2002; Fiedler *et al.*, 2004) und einer visuellen Analyse mittels der Software PyMOL Version 0.99rc6, wurden die sechs Positionen K6, L8, R42, I44, H68 und V70 für die Randomisierung festgelegt.

3.2.1.1 PCR-basierte Erstellung der Ubiquitin-Bibliothek

Auf Grundlage der ausgewählten Randomisierungspositionen und einer für die Expression in *E. coli* optimierten DNA-Sequenz (Geneart, Regensburg) erfolgte die Planung und Synthese von überlappenden Oligonukleotiden zur Bibliotheks-konstruktion (siehe Tab. 2, S. 20). An die mittels PCR synthetisierte Ubiquitin-Kassette wurden mit Hilfe entsprechender Primer eine

3 Ergebnisse

Tabelle 15: An natürlichen Interaktionen beteiligte Aminosäurereste im Ubiquitin.

Die Hauptinteraktionsfläche im Ubiquitin befindet sich um I44. Die in die Analyse einbezogenen, natürlichen Liganden des Ubiquitins weisen strukturell ein breites Spektrum auf, das von helixartigen Formen über Zinkfinger-Motive bis hin zu alpha/beta-Strukturen reicht.

Quelle	Ligand	Methode zur Analyse der Komplexinteraktionen	An Interaktionen beteiligte Aminosäurereste*
Alam <i>et al.</i> (2004)	NZF-Domäne	NMR	L8, I44, A46, G47, K48, H68, V70, R72, L73
Fisher <i>et al.</i> (2003)	UIM-Peptide	NMR	L8, R42, I44, K48, V70, R72
Kang <i>et al.</i> (2003)	CUE-Domäne	NMR	K6, L8, I44, A46, R42, K48, Q49, H68, V70
Penengo <i>et al.</i> (2006)	UIM-Peptid, UBD-Peptide	Röntgenkristallographie	L8, R42, I44, A46, K63, H68, V70, L73, E51 [#] , R54 [#] , S57 [#] , D58 [#]
Prag <i>et al.</i> (2003)	CUE-Domäne	Röntgenkristallographie	L8, I36, R42, I44, A46, K48, H68, V70, L73
Sundquist <i>et al.</i> (2004)	UEV-Domäne	Röntgenkristallographie	L8, R42, I44, A46, G47, N60, Q62, K63, E64, S65, T66, H68, V70
Swanson <i>et al.</i> (2003)	UIM-Peptide	NMR	L8, R42, I44, A46, K48, H68, V70, R72
Yuan <i>et al.</i> (2004)	UBA-Domäne	NMR	L8, R42, I44, G47, H68, V70

*Nicht oder nur geringfügig oberflächenexponierte Reste wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

[#]Diese Reste gehören zu einer unabhängigen Bindestelle um D58.

CUE: *coupling of ubiquitin to ER degradation*, NZF: *Npl4 zinc finger*, UBA: *ubiquitin-associated*, UBD: *ubiquitin-binding domain*, UEV: *ubiquitin E2 variant*, UIM: *ubiquitin-interacting motif*, NMR Kernmagnetresonanzspektroskopie

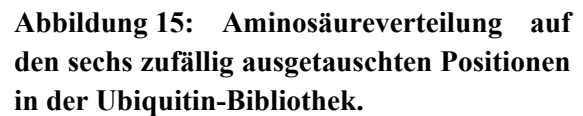
5'-Nicht translatierte Region mit T7-Promotor und Ribosomenbindestelle und am 3'-Ende eine FLAG-Peptidsequenz fusioniert (2.12.1). Nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde an das 3'-Ende zusätzlich ein mit *MunI*-geschnittenes Ribosomen-*display*-Anker-Fragment ligiert. Durch die Randomisierung mittels NNK-Motiven ergibt sich für jede der randomisierten Positionen der Einbau von 32 möglichen Codons (siehe Abb. 8, S. 32). Damit ergibt sich auf DNA-Ebene eine theoretische Bibliotheksgröße von $32^6 = 1,07 \times 10^9$ (= 1,78 fmol bzw. 265 pg). Zur Wahrung größtmöglicher Diversität wurden während der Bibliothekssynthese alle DNA-Fragmente immer in Mengen zur mindestens 75-fachen Abdeckung der theoretischen Bibliotheksgröße verwendet.

Zur Untersuchung der Bibliotheksqualität erfolgte die Klonierung in den Vektor pJET 1. Von 30 zufällig ausgewählten Klonen konnte bei 25 eine auswertbare Sequenz erhalten werden. An den N-Positionen der zur Randomisierung verwendeten NNK-Motive war der Anteil von Cytosin etwa 50 % geringer als erwartet, während Guanin entsprechend häufiger auftrat (Tab. 16). Auch an der K-Position wurde ein Guanin-Überschuss, im Verhältnis von 2:1 zum

Thymin, gefunden. In einem G-Test auf Anpassung genügten die gefundenen Häufigkeiten an der 1. N- und der K-Position nicht den erwarteten äquimolaren Verteilungen (1. N: $G = 13,03$, $p < 0,05$, $f = 3$; 2. N: $G = 7,16$, $p > 0,05$, $f = 3$; P: $G = 7,06$, $p < 0,05$, $f = 1$).

Tabelle 16: Reale Nukleotidhäufigkeit in den NNK-Motiven von zufällig ausgewählten Einzelklonen der Ubiquitin-Bibliothek mit 6 randomisierten Positionen.

Position	Häufigkeit in %			
	A	C	G	T
1. N	28	12	36	24
2. N	27	14	33	25
K	1	0	64	35



In 17 funktionellen Sequenzen wurden 102 Aminosäuren untersucht. Die gefundene Anzahl wurde auf die erwartete Anzahl normiert. Rote Linie: gefundene = erwartete Häufigkeit.

Durch den Austausch von sechs Aminosäuren im Gerüstprotein Ubiquitin F45W bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit der Destabilisierung der Varianten. Als Folge davon kann die lösliche Herstellung in *E. coli* beeinträchtigt werden. Um dies zu untersuchen, erfolgte die Klonierung der naiven Bibliothek in den Expressionsvektor pET-20b-2xStop (Abb. 16). 96 zufällig ausgewählte Bibliotheksklone wurden im 300 µl-Maßstab in Autoinduktionsmedium ZYM-5052 kultiviert (2.13.5). Nach dem Zellaufschluss wurden lösliche und unlösliche Zelllysatzfraktion durch Zentrifugation getrennt und mittels SDS-PAGE analysiert. Für 74 der Klone war eine Bande zu beobachten, die dem Zielprotein entsprach. 22 Klone zeigten keine entsprechende Proteinbande. Die Ursache kann im Abbau der Proteine durch Proteasen oder

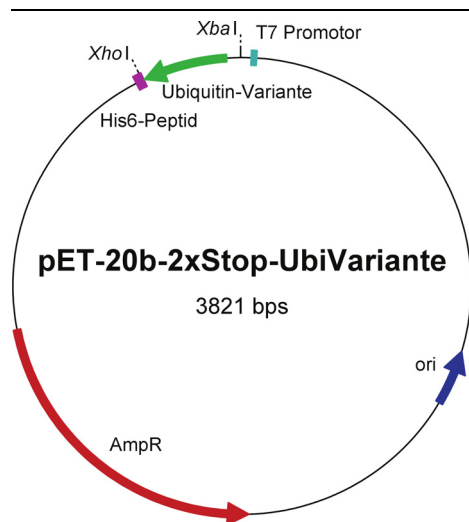


Abbildung 16: Expressionsvektor für Ubiquitin-Varianten.

Zur Herstellung der Expressionsplasmide wurden die Gene der Ubiquitin-Varianten mittels der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Xho*I in den Vektor pET-20b-2xStop kloniert. Ein T7-Promotor kontrolliert die Expression des Gens für die Ubiquitin-Variante mit C-terminalem Hexahistidinpeptid. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid ein Ampicillinresistenz-Gen (AmpR) und ein pBR322-Replikationsursprung (ori).

Verlust des Plasmids während der Kultivierung liegen. Von den erfolgreich produzierten Varianten zeigten 84 % eine sehr hohe (80-100 % Protein im löslichen Überstand), 5 % eine mittlere (50-80 % im Überstand) und 11 % eine schlechte Löslichkeit (weniger als 50 % im Überstand). Anhand der apparenten Molekularmasse konnten zwölf intermolekular disulfidverbrückte Varianten identifiziert werden. Durch die Verwendung von nicht reduzierendem Probenpuffer und die hohe Proteinkonzentration, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Disulfidbildung erst nach dem Zellaufschluss während der Probenvorbereitung auftrat. In Abb. 17 sind exemplarisch zwei SDS-Gele gezeigt. Für die untersuchten Varianten liegen keine Sequenzdaten vor.

Wie sich zeigte, wichen die gefundenen Nukleotid- und Aminosäureverteilungen in der naiven Bibliothek stark von den erwarteten Häufigkeiten ab. Trotz dessen konnten an den NNK-Positionen alle Aminosäuren beobachtet werden. Zur möglichst kompletten Abdeckung der Sequenzvielfalt wurden in den Folgeexperimenten möglichst hohe DNA-Mengen eingesetzt. Die Randomisierung an den sechs Aminosäurepositionen zeigte nur einen geringen Einfluss auf die lösliche Expression.

3.2.2 Isolierung TNF-alpha-bindender Ubiquitin-Varianten

3.2.2.1 Selektion der synthetisierten Ubiquitin-Bibliothek gegen TNF-alpha

Aus der synthetisierten Ubiquitin-Bibliothek sollten nun mittels Ribosomen-*display* spezifische Binder gegen TNF-alpha selektiert werden. Es erfolgten sechs Ribosomen-*display*-Zyklen nach den unter 2.12.2 bis 2.12.4 beschriebenen Bedingungen. Als Kontrolle wurde PBS anstatt von biotinyliertem TNF-alpha verwendet. Am Ende jedes Zyklus erfolgten zwei PCRs zur Rekonstruktion der Ribosomen-*display*-Konstrukte. Zur vergleichenden Quantifizierung wurde die Produktamplifikation in der ersten PCR mittels analytischer Gelelektrophorese von nach

3 Ergebnisse

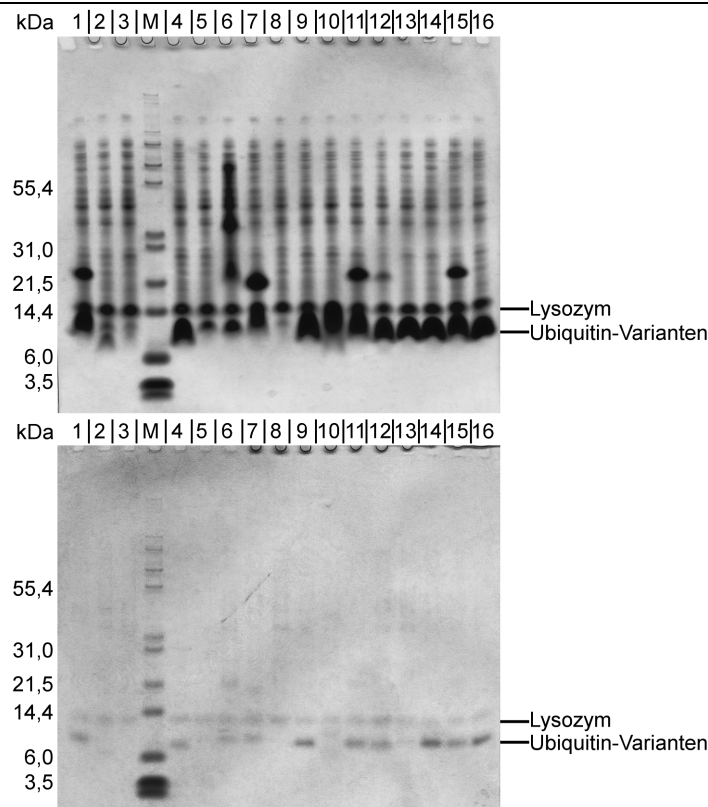


Abbildung 17: Analyse von Varianten der naiven Ubiquitin-Bibliothek mittels SDS-PAGE.

Zur Probenvorbereitung erfolgte die Lyse der Zellen mit 250 µl BugBuster-enthaltendem Aufschlusspuffer. Nach 45 min Zentrifugation bei 4500 rpm wurde der Überstand (lösliche Fraktion) abgenommen. Das Sediment wurde mit 250 µl PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl 8 M Harnstoff, 0,05 M Tris, 1 mM EDTA pH 7,0 bei Raumtemperatur solubilisiert (unlösliche Fraktion). Für die Analyse wurden zu 15 µl Probe je 4 µl 5x SDS-Probenpuffer zugesetzt und davon je 6 µl auf ein 4-12 % Gradientengel aufgetragen. Zum Proteinnachweis erfolgte eine Coomassiefärbung. Die Vermeidung von Reduktionsmittel im Probenpuffer ermöglicht den Nachweis disulfidverbrückter Multimere (Spuren 1, 7, 8, 12, 13, 16). Die Lysozymbande in der unlöslichen Fraktion weist auf geringe Rückstände der löslichen Fraktion hin. Die Nummern der Spuren entsprechen den Probennummern. M: NuPAGE Mark 12 MW Standard. Oben: lösliche Fraktion. Unten: unlösliche Fraktion.

bestimmten Zeitintervallen entnommenen Aliquoten untersucht. Ab dem vierten Selektionszyklus zeigte sich jeweils eine reduzierte Menge der gegen PBS selektierten Moleküle (Abb. 18).

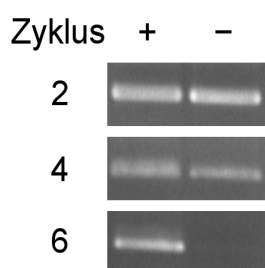


Abbildung 18: Nachweis der Anreicherung von TNF-alpha-Bindern im Ribosomen-*display* durch analytische Gelelektrophorese.

Die in den Ribosomen-*display*-Zyklen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Während der exponentiellen Phase der anschließenden Amplifikation der cDNA aus der Selektion gegen TNF-alpha (+) und gegen PBS (-) wurden Proben entnommen (2: 30. PCR-Zyklus; 4: 24. PCR-Zyklus; 6: 22. PCR-Zyklus) und mit 2 % NuSieve-Agarosegelen analysiert.

3.2.2.2 Identifikation TNF-alpha-bindender Ubiquitin-Varianten

Nach der Selektion wurde die resultierende Bibliothek der sechsten Runde amplifiziert. Nach Klonierung der Bibliothek in den Expressionsvektor pET-20b-2xStop (siehe Abb. 16, S. 54) erfolgte die Herstellung von 192 Einzelvarianten in *E. coli* NovaBlue(DE3) im 300 µl-Maßstab (2.13.5). Nach dem Zellaufschluss wurde die lösliche Fraktion für einen Hit-ELISA (2.14.6) verwendet, mit dem TNF-alpha-bindende Varianten detektiert werden sollten. Als Kontrolle wurde parallel die Bindung an Lysozym getestet. Das relative Signalverhältnis TNF-alpha/Lysozym und die absolute Signaldifferenz TNF-alpha-Lysozym wurden als Kriterien zur Auswahl von Varianten für die weitere Charakterisierung genutzt (Abb. 19).

Bei der Sequenzierung ausgewählter Varianten zeigten insbesondere solche mit geringem bzw. mittlerem relativen Signalverhältnis - wie z. B. Variante 11C mit 5,8 - häufig Deletionen größerer Sequenzbereiche (Abb. 20A). Dies führt wahrscheinlich zur Zerstörung der nativen Struktur des Gerüstproteins und somit zu einer Exposition von Aminosäuren des hydrophoben Kerns, was wiederum die unspezifischen Interaktionen bedingt. Vier Varianten, welche im Hit-ELISA hohe absolute Signaldifferenzen bei gleichzeitig hoher Spezifität (relatives Signalverhältnis > 7) aufwiesen, besaßen eine identische Aminosäuresequenz (Abb. 20A). In diesen vier Varianten 2E, 10B, 10F und 11H zeigten sich außer den Austauschen an den erwarteten Positionen (K6F, L8Y, R42A, I44E, H68P, V70F) ein weiterer Austausch in der alpha-Helix (K29R) sowie zwei Deletionen in der 3_{10} -Helix des Ubiquitin F45W (Δ D58, Δ Y59) (Abb. 20B). Auf DNA-Ebene wurden in zwei der vier Varianten stille Mutationen beobachtet. Die Untersuchung der Lysatfraktionen der vier Varianten mittels SDS-PAGE zeigte eine gute lösliche Herstellbarkeit in *E. coli* (Abb. 21).

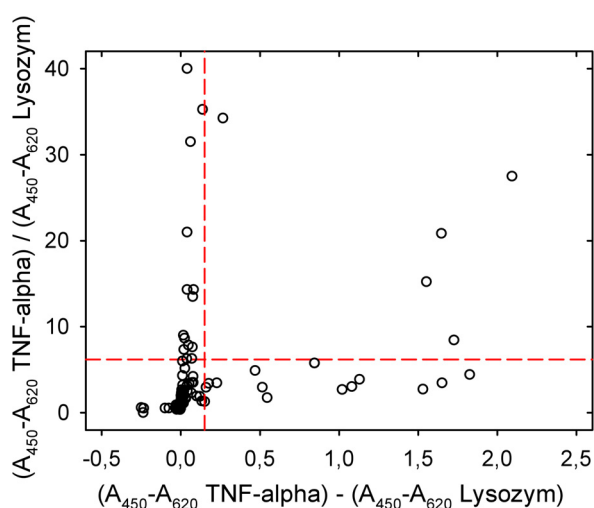


Abbildung 19: Identifizierung von TNF-alpha-bindenden Ubiquitin-Varianten mittels Hit-ELISA.

Nach Kultivierung im 300 µl-Maßstab und Zellaufschluss erfolgte die Sedimentation unlöslicher Zellbestandteile für 30 min bei 4500 rpm. Die lösliche Lysatfraktion wurde 10-fach mit PBST0,05 verdünnt und zu 500 ng/Kavität immobilisiertem TNF-alpha bzw. Lysozym gegeben. Die Detektion gebundener Ubiquitin-Varianten erfolgte mittels anti-FLAG-M2-Peroxidasekonjugat. Zur Auswertung wurden die Signaldifferenz und das Signalverhältnis zwischen TNF-alpha und Lysozym herangezogen. Die roten Linien markieren den jeweiligen Schwellenwert der beiden Kriterien für die besten 10 % aller Varianten.

3 Ergebnisse

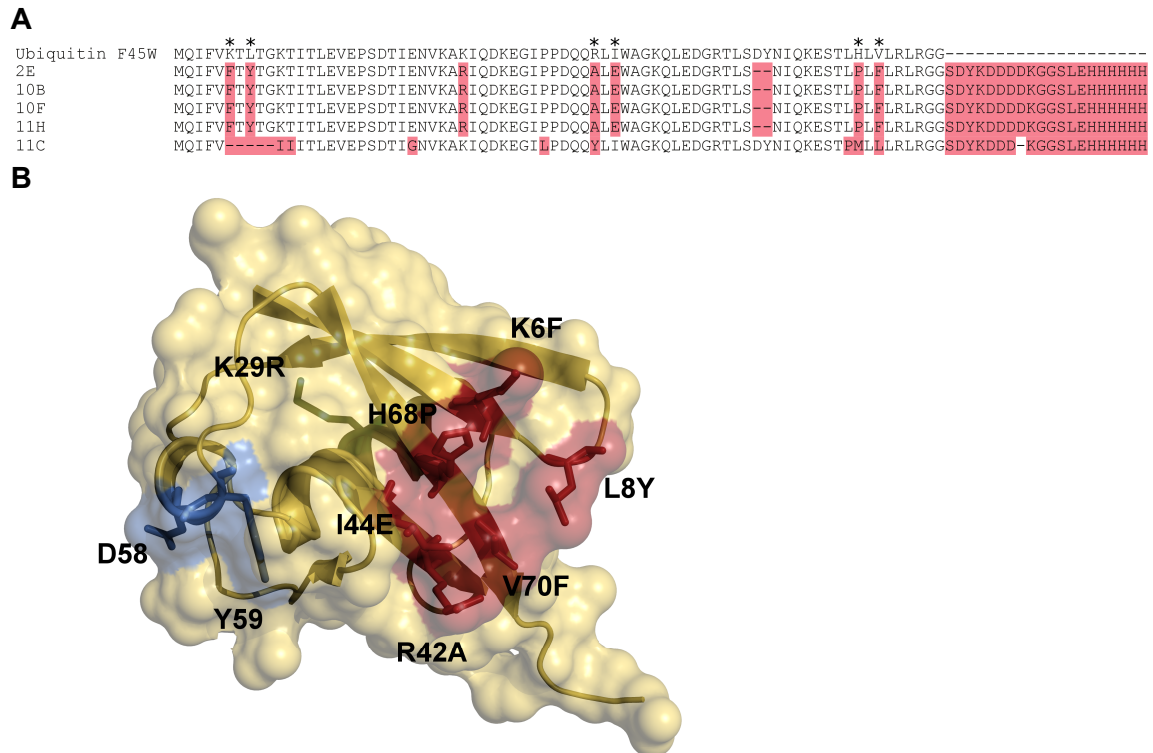


Abbildung 20: Sequenzanalyse von ausgewählten TNF-alpha-bindenden Ubiquitin-Varianten.

(A) Sequenzvergleich der vier identischen Ubiquitin-Varianten mit Ubiquitin F45W und einer weiteren selektierten Variante, die ein hohes absolutes Signal im Hit-ELISA zeigte. (*: Randomisierungspositionen). (B) Positionen der Austausche in den vier identischen Ubiquitin-Varianten. Sechs Austausche K6F, L8Y, R42A, I44E, H68P und V70F (rot) finden sich wie erwartet an den randomisierten Positionen des beta-Faltblatts. Ein weiterer, zufälliger Austausch K29R (grün) befindet sich in der alpha-Helix. In der 3_{10} -Helix traten zwei zufällige Deletionen Δ D58 und Δ Y59 (blau) auf. Die Seitenketten der entsprechenden Wildtypreste sind hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit der Software PyMOL erstellt (PDB-Code: 1ubi).

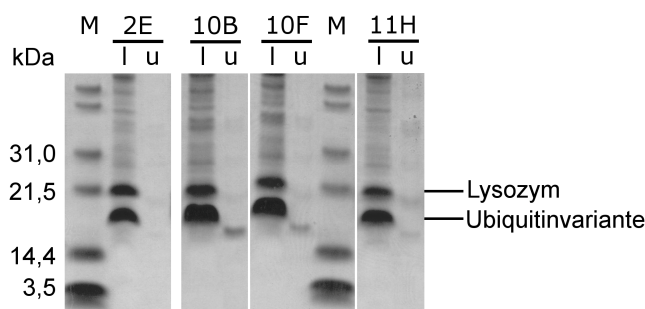


Abbildung 21: SDS-PAGE-Analyse der löslichen Produktion der vier identischen Ubiquitin-Varianten in *E. coli*.

Die Lysatfraktionen wurden mit 4-12 %-Gradientengelen und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. l: lösliche Fraktion, u: unlösliche Fraktion, M: NuPAGE Mark 12 MW Standard.

Nach sechs Ribosomen-*display*-Runden zeigte die Untersuchung von 192 Ubiquitin-Varianten die erfolgreiche Isolierung von spezifisch an TNF-alpha bindenden Molekülen. Die vier Varianten mit dem höchsten Bindungssignal im Hit-ELISA bei gleichzeitig hoher Spezifität besaßen eine identische Aminosäuresequenz und zeigten ein identisches Expressionsverhalten.

3.3 Charakterisierung eines Ubiquitin-basierten TNF-alpha-Binders

Um die Eignung der neuen Ubiquitin-Bibliothek zur Selektion künstlicher Bindeproteine zu untersuchen, sollte die Interaktion zwischen einer isolierten Variante und TNF-alpha untersucht werden. Von den erhaltenen vier auf Aminosäureebene identischen Klonen wurde willkürlich der Klon 10F für eine intensive Charakterisierung ausgewählt. Neben der Analyse der Interaktion mit dem Zielprotein TNF-alpha sollte die Struktur und Stabilität der Ubiquitin-Variante untersucht werden.

3.3.1 Untersuchung der Interaktion von TNF-alpha mit der Ubiquitin-Variante 10F

Da TNF-alpha als therapeutisch relevantes Zielmolekül validiert ist, wurden viele Ansätze verfolgt um spezifische Bindemoleküle gegen dieses Protein zu entwickeln. Dabei wurde gezeigt, dass aufgrund des Aufbaus von TNF-alpha als nicht kovalent verknüpftes Homotrimer verschiedene Bindungsmodi, z. B. hinsichtlich der Stöchiometrie, möglich sind. Neben der thermodynamischen Charakterisierung der Interaktion mit der Ubiquitin-Variante 10F, sollte vor allem dieser Aspekt im Mittelpunkt stehen. Zudem sollte der Einfluss der Austausche und Deletionen in 10F auf die Bindungsfähigkeit der Ubiquitin-Variante analysiert werden. Dazu war die Herstellung der zwei Varianten 10F_{DY} (10F ohne Deletionen) und Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 (10F ohne Austausche) notwendig.

3.3.1.1 Herstellung und Reinigung von 10F und verwandten Ubiquitin-Varianten im Schüttelkolben-Maßstab

Für die eingehende Charakterisierung der Ubiquitin-Varianten war die Herstellung von Proteinmengen im Milligrammbereich notwendig. Das Gen der gegen TNF-alpha selektierten Variante 10F wurde dafür amplifiziert, wobei die FLAG-Peptidsequenz entfernt wurde. Anschließend erfolgte die Klonierung in den Vektor pET-20b-2xStop mithilfe der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Xho*I (siehe Abb. 16, S. 54). Zur Konstruktion des Gens für Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 wurde zwei überlappende Fragmente des Ubiquitin F45W-Gen amplifiziert. Durch eine entsprechende Primersequenz wurde dabei an der Überlappungsstelle der beiden Fragmente die Deletion eingefügt. In einer weiteren PCR wurden beide Fragmente vereinigt. Die Klonierung erfolgte analog zu 10F. Das Gen der Variante 10F_{DY} wurde wie für Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 beschrieben erstellt, jedoch wurde das 10F-Gen als DNA-*template* verwendet und die Klonierung erfolgte in pET-41b(+) (Abb. 22).

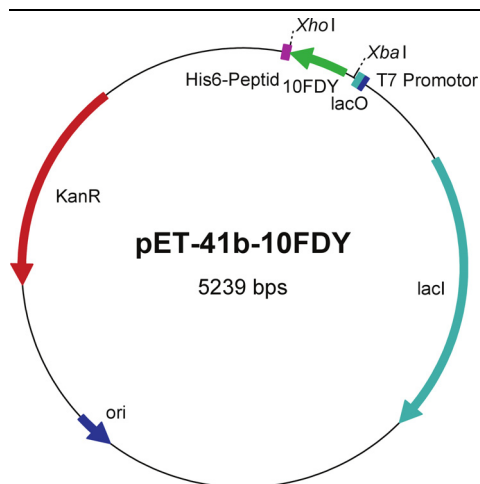


Abbildung 22: Expressionsplasmid zur rekombinanten Herstellung der Ubiquitin-Variante 10F_{DY}.

Das Gen der Ubiquitin-Variante wurde mittels der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Xho*I in den Zielvektor pET-41b(+) kloniert. Ein T7lac-Promotor kontrolliert die Fremdgenexpression. Das Plasmid enthält außerdem ein Kanamycinresistenz-Gen (KanR) und einen pBR322-Replikationsursprung (ori).

Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden wurde die Expression der Ubiquitin-Varianten über Nacht in Schüttelkulturen mit Autoinduktionsmedium ZYM-5052 bzw. zur ¹⁵N-Markierung mit Autoinduktions-Minimalmedium N-5052 bei 37 °C durchgeführt (2.13.4). Typischerweise wurden optischen Dichten A₆₀₀ von 6-9, im Minimalmedium von 3-5, erreicht. Dies entsprach einer Biofeuchtmasse von etwa 12-14 bzw. 6-9 g/l Kulturvolumen. Das C-terminale Hexahistidinpeptid der Proteine ermöglichte die Reinigung mittels IMAC (2.14.2.1). Der Rohextrakt des Zellaufschlusses wurde unter Verwendung einer 1 ml- oder 5 ml-HisTrap HP-Säule an einem ÄKTexpress-System gereinigt. Proteinhaltige Eluatfraktionen wurden automatisch gesammelt und für eine Größenausschlusschromatographie auf eine HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule geladen. Die Chromatogramme der SEC zeigten bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm einen einzelnen Peak, dessen Elutionsvolumen je nach Ubiquitin-Variante einer apparenten Molekularmasse von 6,3 bis 7,5 kDa entspricht. Diese Werte weichen nur geringfügig von der theoretischen Molekularmasse der monomeren Proteine von 9,4-9,7 kDa ab. Exemplarisch ist in Abb. 23A das Gelfiltrationschromatogramm für 10F gezeigt. Insbesondere für 10F und 10F_{DY} wurden bei hohen Proteinkonzentrationen zusätzliche Peaks beobachtet, die Multimeren oder Aggregaten entsprechen, wobei deren Fläche maximal 10 % der Gesamtpeakfläche betrug. Die SDS-PAGE-Analyse des gereinigten 10F zeigte eine Reinheit von mindestens 95 % (Abb. 23B). Die erzielten Ausbeuten variierten je nach Protein und Kulturmedium in einem Bereich von 15-100 mg/l Kulturvolumen (2-7 mg/g Biofeuchtmasse). Die Identität der gereinigten Proteine wurde mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt.

3.3.1.2 TNF-alpha-Bindung von 10F und verwandten Ubiquitin-Varianten

Der Einfluss der Austausche und Deletionen auf die Bindung der selektierten Ubiquitin-Variante 10F an TNF-alpha wurde durch einen ELISA untersucht (2.14.6). Dazu wurden 10F, die Variante 10F_{DY}, welche nur die Austausche enthält, Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59, welches

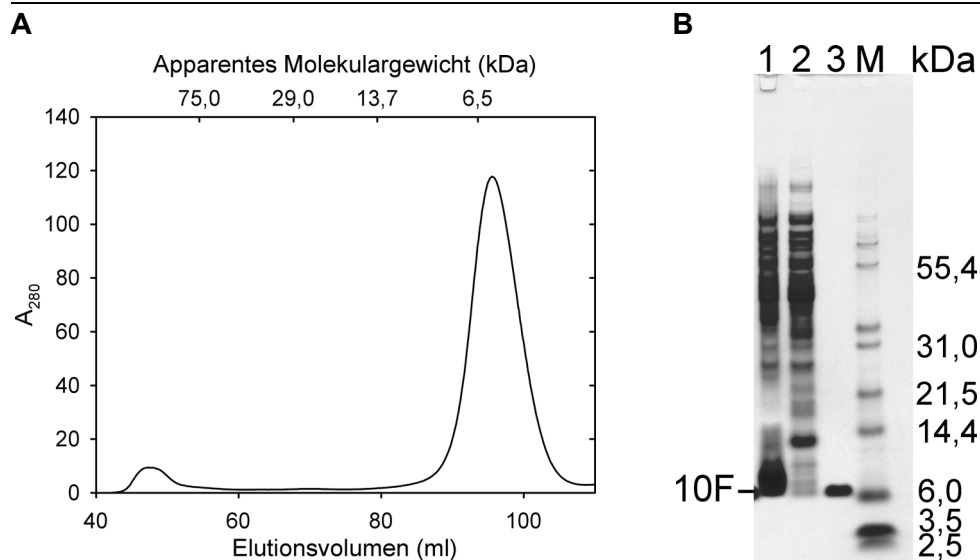


Abbildung 23: Chromatographische Reinigung der Ubiquitin-Variante 10F.

Nach dem Zellaufschluss erfolgte die Reinigung des C-terminal mit Hexahistidinpeptid versehenen 10F mittels IMAC und anschließender Größenausschlusschromatographie. (A) Größenausschlusschromatographie von 10F. Das Protein wurde bei Raumtemperatur auf eine HiLoad 16/60 Superdex 75 *prep grade*-Säule aufgetragen. Als Laufpuffer diente PBS, 1 mM EDTA pH 7,4. Zur Bestimmung der apparenten Molekularmasse wurde die Säule mit Standardproteinen (GE Healthcare) kalibriert. (B) SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsschritte. Proben der verschiedenen Reinigungsschritte wurden mittels 4-12 % Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. 1: Zelllysat lösliche Fraktion, 2: Durchfluss IMAC, 3: Elutionsfraktion Größenausschlusschromatographie bei 91 ml, M: NuPAGE Mark 12 MW Standard.

nur die Deletionen enthält und das Gerüstprotein Ubiquitin F45W auf ihre Bindungsfähigkeit getestet. Nur die selektierte Variante 10F zeigte Bindung (Abb. 24). Für die anderen Varianten konnte unter den Versuchsbedingungen keine Bindung nachgewiesen werden.

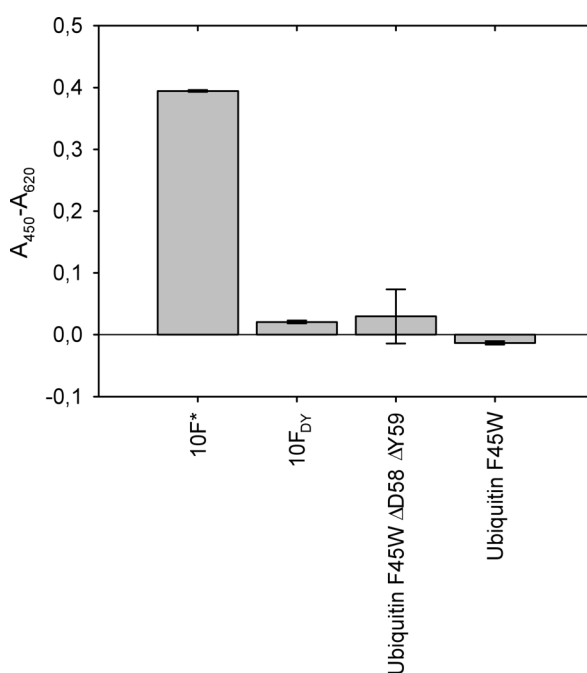


Abbildung 24: ELISA zum Bindungsverhalten ausgesuchter Ubiquitin-Varianten gegenüber TNF-alpha.

Es wurden 100 ng/Kavität TNF-alpha auf ELISA-Platten immobilisiert. Die Inkubation mit 20 μ M Ubiquitin-Variante (*: 1 μ M für 10F) in Bindungspuffer PBST0,05 erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Die Bindung wurde mit anti-His₆-Peroxidase-Konjugat detektiert.

3.3.1.3 Spezifität der Ubiquitin-Variante 10F

Der Nachweis der spezifischen Erkennung des TNF-alpha durch die Ubiquitin-Variante 10F erfolgte ebenfalls mittels ELISA (2.14.6). Dazu wurden zunächst die Bindung an TNF-alpha und verschiedene Kontrollproteine untersucht. Lediglich für humanes TNF-alpha konnte ein spezifisches Bindungssignal erhalten werden (Abb. 25A). Sowohl TNF-alpha aus Maus und Ratte mit 78 % Sequenzidentität zum humanen Protein als auch die humanen Varianten von Lymphotoxin-alpha und BAFF (TNFSF13B), beides Mitglieder der TNF-Superfamilie mit 33 bzw. 19 % Sequenzidentität zu humanem TNF-alpha, wurden nicht erkannt. Gegen den Nervenwachstumsfaktor (NGF), Lysozym, die N-terminale Domäne des Hypophysäre Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid (PACAP)-Rezeptors und humanes Serum zeigt 10F ebenfalls keine Bindung.

Einen weiteren Nachweis der Spezifität stellt eine gezielt blockierbare Bindung dar. Eine erfolgreiche Kompetition mit einem Molekül, dessen Epitop bekannt ist, lässt gleichzeitig Rückschlüsse auf das ortsspezifische Bindungsverhalten zu. Hierfür wurde mittels ELISA die Bindung von TNF-alpha an die immobilisierte Ubiquitin-Variante 10F in An- und Abwesenheit von löslichen Kompetitoren untersucht (Abb. 25B). Sowohl Etanercept, die Fusion des TNF-Rezeptor 2 mit dem IgG-Fc-Teil, als auch 10F selbst waren in der Lage die Bindung zu verringern.

3.3.1.4 Charakterisierung der Affinität von 10F an TNF-alpha mittels ELISA

Zur quantitativen Bindungsanalyse wurde ein Kompetitions-ELISA durchgeführt (2.14.6). In Abhängigkeit der TNF-alpha-Konzentration in Lösung wird die Bindung von 10F an immobilisiertes TNF-alpha verhindert. Durch Bestimmung der Menge an gebundener Ubiquitin-Variante in Abhängigkeit der löslichen TNF-alpha-Konzentration wurde ein IC_{50} -Wert von 96 ± 16 nM (trimerbezogen) ermittelt (Abb. 26).

3.3.1.5 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die weitere quantitative Charakterisierung der Interaktion zwischen 10F und TNF-alpha in Lösung erfolgte mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (2.14.8). Durch die Zugabe von 10F zu TNF-alpha kam es zu einer Freisetzung von Wärme (Abb. 27). Eine Auswertung der erhaltenen Daten zeigte die Bindung eines 10F-Moleküls pro TNF-alpha-Trimer ($N = 0,644 \pm 0,002$). Die Abweichung vom Wert $N = 1$ ist möglicherweise auf eine Dissoziation einer Fraktion der TNF-alpha-Trimere während des Experimentes zurückzuführen. Die ermittelte Dissoziationskonstante von 394 ± 14 nM liegt im Bereich des mittels ELISA bestimmten IC_{50} -Werts (3.3.1.4). Die Bindung ist exotherm und wird enthalpisch getrieben ($\Delta H = -48,87 \pm 0,21$ kJ/mol, $T\Delta S = -12,32 \pm 0,30$ kJ/mol). Im Verlauf der Titration ist eine Verlangsamung der Bindungskinetik erkennbar.

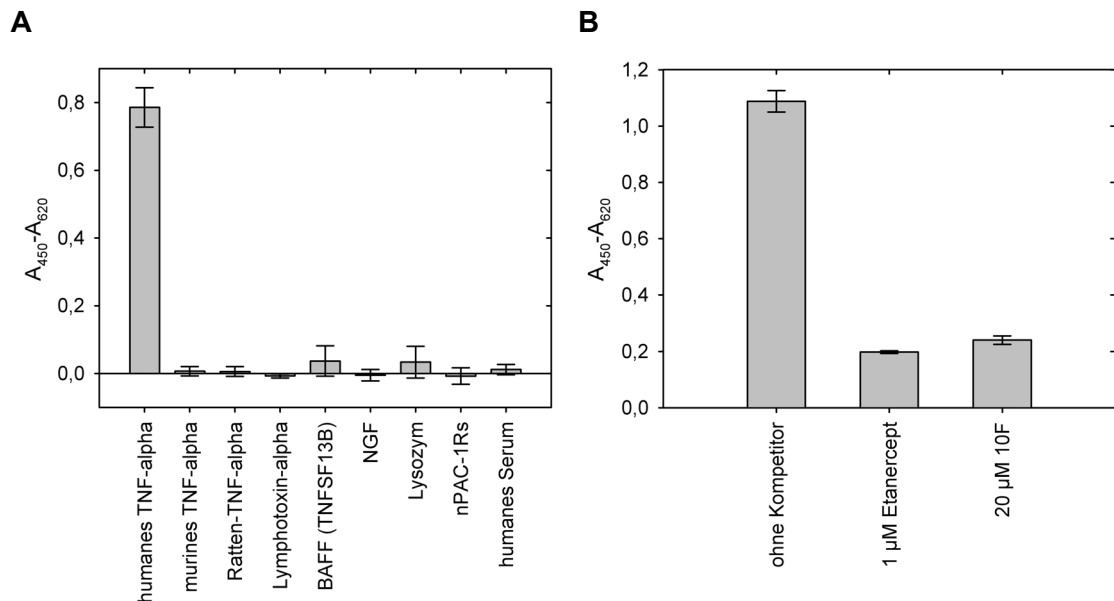


Abbildung 25: ELISA-Untersuchungen zur Bindungsspezifität der Ubiquitin-Variante 10F.

(A) Erkennung verschiedener Zielproteine durch 10F. Jeweils 500 ng/Kavität humanes TNF-alpha, verschiedene TNF-Superfamilie-Mitglieder und nicht verwandte Proteine (NGF: Nervenwachstumsfaktor, nPAC-1Rs: N-terminale Domäne des PACAP-Rezeptors) sowie unverdünntes humanes Serum wurden immobilisiert. Alle Daten wurden um die Hintergrundbindung des verwendeten Nachweisantikörpers bereinigt.

(B) Konkurrenz der Bindung von TNF-alpha und 10F. 0,33 μM biotinyliertes TNF-alpha (trimerbezogen) wurde 1 h mit bzw. ohne Kompetitor in PBS, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween-20 vorinkubiert und anschließend zu 100 ng/Kavität immobilisiertem 10F gegeben. Die Detektion erfolgte mittels Avidin-Peroxidase-Konjugat.

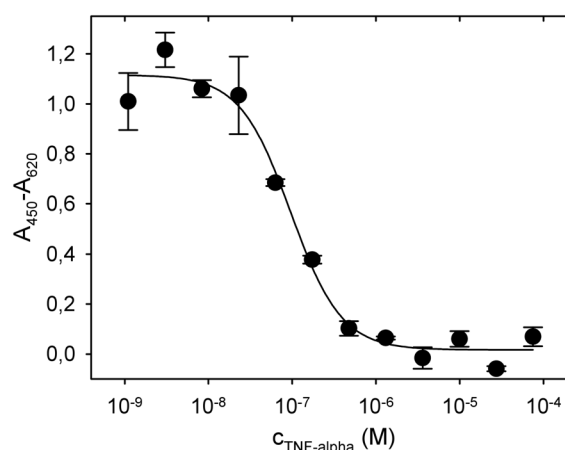


Abbildung 26: Kompetitions-ELISA zur Bestimmung der Affinität zwischen 10F und TNF-alpha

0,1 μM Ubiquitin-Variante 10F wurden in PBS, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween-20 mit verschiedenen Konzentrationen an TNF-alpha über 24 h bei 4 °C vorinkubiert und anschließend zu 150 ng immobilisiertem TNF-alpha gegeben.

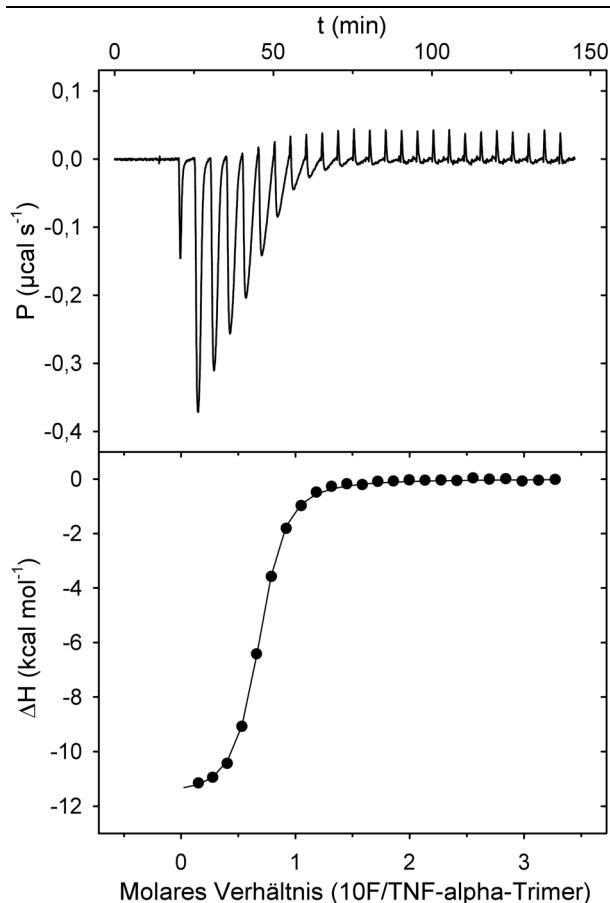


Abbildung 27: Isothermale Titrationskalorimetrie von TNF-alpha mit der Ubiquitin-Variante 10F.

19 μM TNF-alpha (trimerbezogen) in PBS, 0,5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20 wurden bei 25 °C mit 10 μl -Aliquoten 349 μM 10F im gleichen Puffer titriert. Oben: Heizleistungsrohdaten. Unten: Die Interpolation (Linie) der verdünnungswärme-korrigierten, integrierten Enthalpiewerte (Kreis) wurden nach einem Einzelbindungsstellen-Modell durchgeführt.

3.3.1.6 NMR-spektroskopische Untersuchung des Komplexes

Um die Interaktion zwischen der Ubiquitin-Variante 10F und dem Zielprotein TNF-alpha mit aminosäurerestgenauer Auflösung zu verfolgen, wurde die NMR-Spektroskopie verwendet (2.15.4). Zunächst wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der ^{15}N -markierten Ubiquitin-Variante ohne TNF-alpha bzw. mit einem vierfachen Überschuss an TNF-alpha aufgenommen. Dabei liefern nur Amidprotonen, die an ein ^{15}N -Stickstoffatom gebunden sind, ein Signal. Die Korrelation der chemischen Verschiebung eines ^1H -Kerns mit der chemischen Verschiebung des ^{15}N -Kerns ermöglicht die Zuordnung zu einem einzelnen Aminosäurerest. Die ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von 10F mit und ohne Ligand zeigen beide gut verteilte Kreuzsignale (Abb. 28A) und deuten auf ein Protein mit ausgeprägter Sekundärstruktur hin (siehe auch 3.3.2.2, S. 69).

Der Vergleich beider Spektren zeigte die Veränderung nahezu aller Kreuzsignalpositionen durch die Ligandenbindung. Zur Bestätigung der Stöchiometriedaten aus den ITC-Experimenten wurde auf dieser Grundlage eine Titration von ^{15}N -markiertem 10F mit TNF-alpha durchgeführt, wobei direkt nach jedem Titrationsschritt ein ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum aufgezeichnet wurde. Es konnte eine Veränderung praktisch aller Signale, die dem ungebundenen Zustand entsprechen, festgestellt werden. Die Auftragung des relativen Intensitätsverlustes der Signale des freien 10F gegen das molare Verhältnis der beiden Proteine zeigte einen linearen Anfangsabschnitt und einen Plateauabschnitt (Abb. 28B). Der

3 Ergebnisse

Schnittpunkt der beiden Abschnitte findet sich bei einer Stöchiometrie von einem TNF-alpha-Trimer zu einem 10F-Molekül. Um einen möglichen Einfluss des Detergens Tween-20 auf die Bindung zu untersuchen, wurden die Experimente in Abwesenheit von Tween-20 wiederholt. Die direkt nach der TNF-alpha-Zugabe aufgezeichneten HSQC-Spektren zeigten im Vergleich zum Spektrum von 10F allein keine Veränderung, ein Hinweis darauf, dass sich der Komplex noch nicht angereichert hat. Erst eine zwölfstündige Inkubation der detergensfreien Probe führte zur vollständigen Population des gebundenen Zustandes. Beide Spektren des Komplexzustandes, mit und ohne Tween-20, sind vollständig identisch (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtungen während der NMR-Spektroskopie zum Einfluss des Detergens Tween-20 auf die Bindungskinetik von 10F und TNF-alpha sollten mittels Analytischer Größenausschlusschromatographie (SEC) überprüft werden. Dafür wurden TNF-alpha, 10F oder ein Gemisch beider Proteine auf eine Superose 12 10/300 GL-Säule geladen (2.14.2.3). In Anwesenheit des Detergens Tween-20 wurde für das Gemisch bereits nach 10 min Inkubationszeit eine vollständige Koelution von 10F mit TNF-alpha beobachtet (Abb. 29). Vergleichbar mit den NMR-Experimenten war der Komplex in Abwesenheit von Tween-20 nicht zu detektieren, wenn das Gemisch nur 10 min vor der SEC inkubiert wurde. Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte die Peakfläche der Ubiquitin-Variante jedoch eine signifikante Abnahme. Die Untersuchung der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE bestätigte

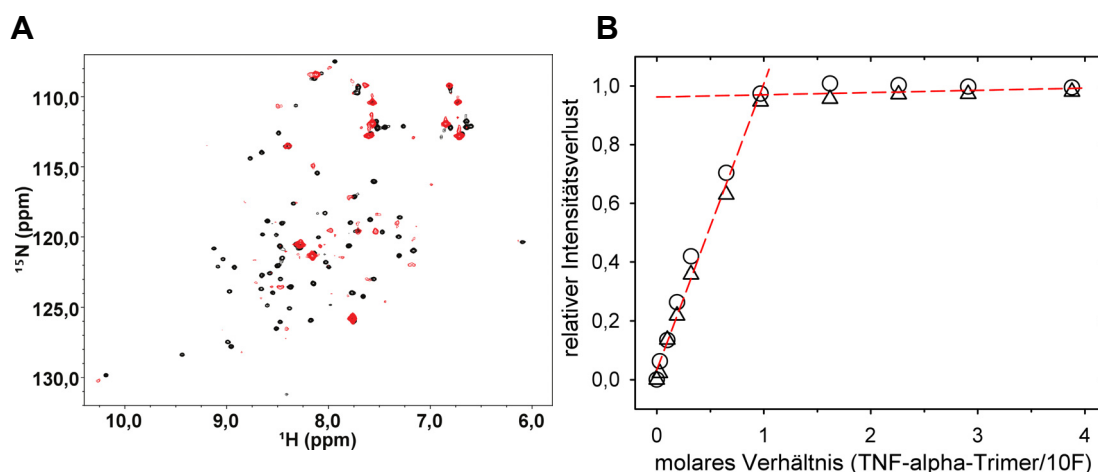


Abbildung 28: NMR-spektroskopische Untersuchung der Bindung von TNF-alpha und der Ubiquitin-Variante 10F.

^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des ^{15}N -markierten 10F wurden in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20 bei 25 °C aufgenommen. (A): Freier und gebundener Zustand von 10F. Die Messungen wurden mit 160 μM 10F durchgeführt. Die Spektren ohne TNF-alpha (schwarz) und mit einem vierfachen Überschuss an TNF-alpha-Trimer (rot) wurden übereinander gelegt. (B) Titration von 160 μM 10F mit TNF-alpha. Direkt nach jedem Titrationsschritt wurden HSQC-Spektren aufgezeichnet. Der relative Intensitätsverlust von zwei Amidresonanzen wurde gegen das molare Verhältnis der beiden Proteine aufgetragen. Die rot gestrichelten Linien zeigen die lineare Anpassung der beiden Datenbereiche vor und nach Sättigung.

3 Ergebnisse

zudem die zunehmende Koelution von 10F im TNF-alpha-Peak. Durch densitometrische Analyse wurde eine Halbwertszeit $t_{1/2} = 16,5$ h für die Komplexbildung bestimmt.

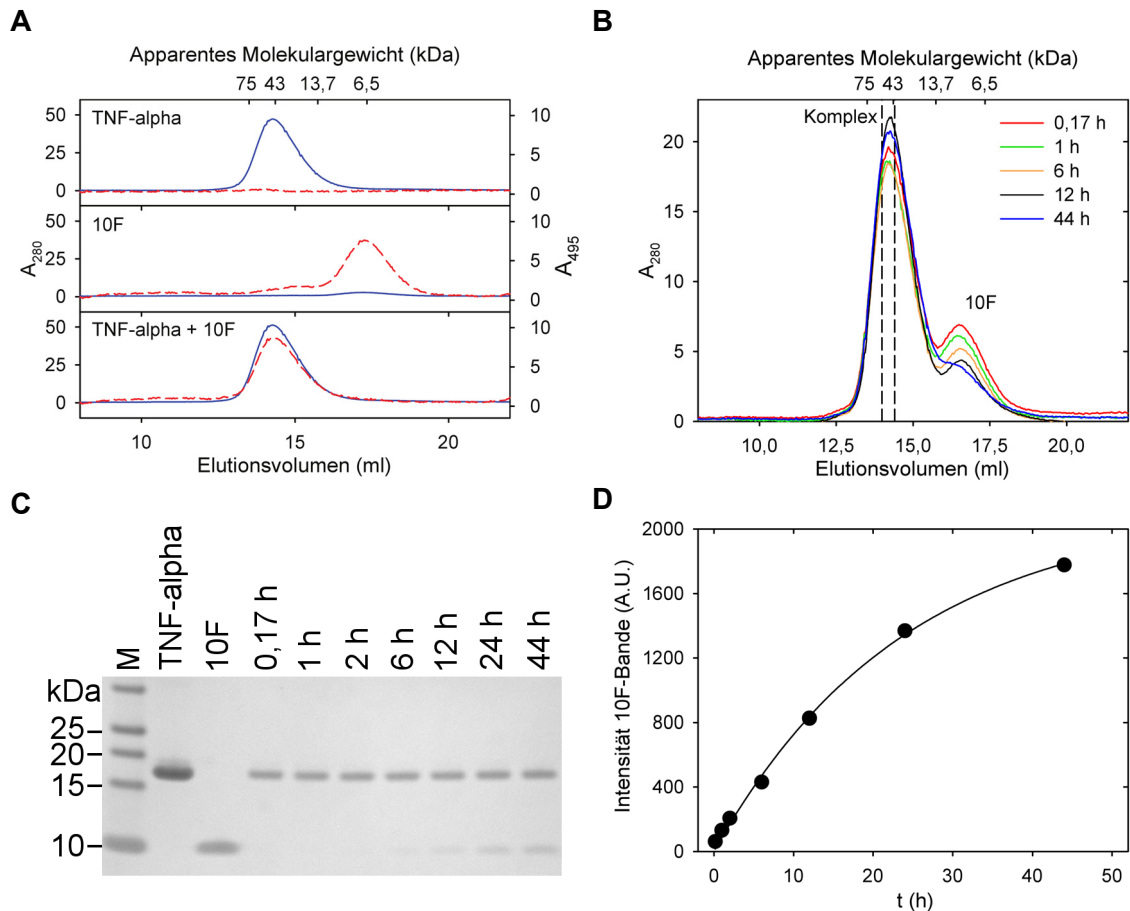


Abbildung 29: Untersuchung der Komplexbildung von TNF-alpha und der Ubiquitin-Variante 10F mittels SEC.

Für die Analytische SEC wurde eine Superose 12 10/300 GL-Säule mit einer Flussrate von 0,6 ml/min verwendet. Als Proben- bzw. Laufpuffer diente PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 mit bzw. ohne 0,05 % Tween-20. (A) SEC in Gegenwart des Detergens Tween-20. 10 μ M Fluorescein-markiertes 10F, 20 μ M TNF-alpha (bezogen auf Trimer) oder ein Gemisch beider wurden vor der chromatographischen Analyse 0,17 h bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm (blaue Linie) und 495 nm (rote, gestrichelte Linie). Die Elutionsvolumina des freien und des gebundenen TNF-alpha unterscheiden sich nicht signifikant. Freies Fluorescein bindet nicht an TNF-alpha (siehe Anhang Abb. A1). (B) SEC ohne Detergens. Aliquote eines Gemischs von 13 μ M 10F und 13 μ M TNF-alpha (bezogen auf Trimer) wurden bei 4 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeitintervallen analysiert. Bei verlängerter Inkubation erfolgt die Abnahme der 10F-Peakfläche. Die mit gestrichelten Linien markierte Elutionsfraktion des Komplexes wurde in einer SDS-PAGE-untersucht. (C) SDS-PAGE der SEC-Elutionsfraktionen ohne Detergens. Die entsprechenden SEC-Fraktionen wurden mittels 4-12 % Gradientengel und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. M: Fermentas PageRuler Unstained. (D) Densitometrische Analyse der SDS-PAGE. Die Intensitäten der 10F-Bande zu den verschiedenen Inkubationszeiten wurden mit der Software ImageJ ermittelt. Durch exponentielle Anpassung der Daten (Linie) wurde für die Komplexbildung eine Halbwertszeit von $16,5 \pm 1,6$ h bestimmt.

3.3.1.7 Analytische Ultrazentrifugation

Zur Bestätigung der durch NMR-Spektroskopie und ITC ermittelten Stöchiometrie der Bindung von 10F an TNF-alpha wurde die apparente Molekularmasse des TNF-alpha-10F-Komplexes mit Hilfe der Analytischen Ultrazentrifugation (2.14.7) bestimmt. Dazu wurde die Ubiquitin-Variante am N-Terminus chemisch mit Fluorescein modifiziert (2.14.5). In Gegenwart eines Überschusses an TNF-alpha wurden Gleichgewichtssedimentationsläufe durchgeführt. Das Absorptionsmaximum des Fluoresceins bei 490 nm erlaubte die Detektion des im Komplex gebundenen 10F, während das überschüssige TNF-alpha bei dieser Wellenlänge nicht absorbierte. In Abwesenheit von TNF-alpha konnte anhand der Messdaten eine Molekularmasse von 11 kDa berechnet werden. Nach Zugabe des Überschusses von TNF-alpha wurde ein Wert von 65 kDa ermittelt (Abb. 30). Die theoretischen Molekularmassen betragen 10 kDa für die ungebundene Fluorescein-markierte Variante 10F und 62 kDa für einen 1:1-Komplex in Bezug auf das TNF-alpha-Trimer. Die Abweichungen entsprechen der Messgenauigkeit der Methode. Das vorangehend bestimmte Stöchiometrieverhältnis wurde somit bestätigt.

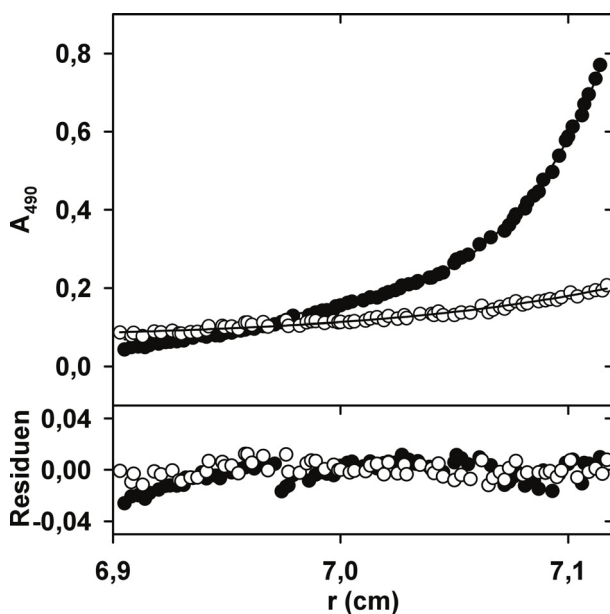


Abbildung 30: Bestimmung der Molekularmasse des Komplexes aus TNF-alpha und Fluorescein-10F durch Gleichgewichtssedimentation.

Das Sedimentationsgleichgewicht wurde nach 70 h bei 9000 rpm und 20 °C in Anwesenheit (geschlossene Symbole) bzw. Abwesenheit (offene Symbole) von 18 µM TNF-alpha (bezogen auf Trimer) bestimmt. Die Konzentration der Fluorescein-markierten Ubiquitin-Variante 10F betrug 4 µM in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20. Oben: Extinktionswerte bei 490 nm. Die Daten wurden nach einem Einzelspezies-Modell analysiert (Linie). Unten: Abweichung der Modelldaten von den gemessenen Werten.

3.3.1.8 Fluoreszenzkinetische Analyse der TNF-alpha-Trimerdissoziation

He *et al.* (2005) konnten ein kleines, TNF-alpha-inhibierendes Molekül identifizieren, das an den Kontaktflächen zwischen den monomeren Untereinheiten bindet. Die inhibitorische Wirkung beruht auf der aktiven Dissoziation des TNF-alpha-Trimers durch Verdrängung eines Monomers. Bei hohen TNF-alpha-Konzentrationen bleibt die trimere Form jedoch intakt. Um die Ubiquitin-Variante hinsichtlich einer dissoziationsfördernden Wirkung zu untersuchen, wurde ein Fluoreszenz-Homoquenchingexperiment nach He *et al.* durchgeführt (2.15.3). Dieser beruht auf der Selbstauslöschung der Fluoreszenz durch den geringen Abstand der N-terminal

3 Ergebnisse

mit Fluorescein modifizierten Untereinheiten im TNF-alpha-Trimer (2.14.5). Nach Zugabe von unmarkiertem TNF-alpha im Überschuss kommt es zum Austausch der Untereinheiten, wobei der Abstand der Fluorophore zueinander erhöht wird. Dies kann durch die Erhöhung der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Die Bindung eines trimererkennenden Moleküls sollte einen stabilisierenden Effekt haben und somit die Geschwindigkeit des Monomeraustausches verringern. Etanercept, welches alle drei TNF-alpha-Untereinheiten simultan binden kann, zeigte diesen Effekt und führte zu einer fast vollständigen Inhibierung des Monomeraustausches (Abb. 31). Bei Zugabe der Ubiquitin-Variante 10F wurde ebenfalls eine Verringerung der Austauschgeschwindigkeit beobachtet, jedoch weniger ausgeprägt als bei Etanercept. 10F besitzt also, im Unterschied zu dem kleinen, inhibitorischen Molekül von He *et al.*, eine dissoziationshemmende Wirkung. Die als Kontrolle eingesetzte, nicht bindende Variante 10F_{DY} hatte keinen Effekt auf den Monomeraustausch.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass zur Bindung von 10F an TNF-alpha sowohl die Austausche als auch die Deletionen in der selektierten Variante 10F notwendig sind. Es konnte eine spezifische Interaktion von 10F und TNF-alpha nachgewiesen werden. Die Experimente zeigten eine enthalpisch getriebene, exotherme Bindung mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante. Die Ursache für die unerwartete Komplexstöchiometrie von einem Molekül 10F zu einem TNF-alpha-Trimer konnte anhand der Daten nicht ermittelt werden. Die Assoziationsgeschwindigkeit des Komplexes wird durch das Detergens Tween-20 erhöht.

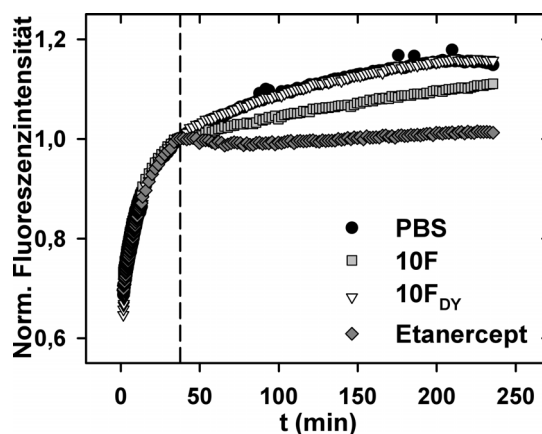


Abbildung 31: Analyse des Einflusses von Interaktionspartnern auf den TNF-alpha-Monomeraustausch mittels Fluoreszenzselbstauslöschung.

Zur Untersuchung des Untereinheitenaustausches von TNF-alpha-Trimeren wurde der Anstieg der Fluoreszenzintensität von 100 nM Fluorescein-markiertem TNF-alpha bei Inkubation mit einem 200-fachen Überschuss an unmarkiertem TNF-alpha verfolgt. Nach 38 min (gestrichelte Linie) erfolgte zu 150 µl Probenvolumen die Zugabe von 5 µl 10F (595 µM) oder einer der Kontrollen PBS, 10F_{DY} (600 µM) und Etanercept (160 µM). Die Messungen wurden in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4, 0,05 % Tween-20 durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wurde auf den Wert bei 38 min normiert.

3.3.2 Strukturelle Untersuchung von 10F und verwandter Ubiquitin-Varianten

Die Auswahl des Ubiquitins als Gerüstprotein zur Herstellung künstlicher Bindemoleküle erfolgte unter anderem aufgrund seiner hohen Stabilität. Diese sollte gewährleisten, dass bei destabilisierenden Aminosäureaustauschen Varianten mit immer noch hoher Reststabilität entstehen. Das beta-Faltblatt im Protein erschien geeignet zur Generierung eines Paratops durch den Austausch von oberflächenexponierten Aminosäuren, wobei das rigide Sekundärstrukturelement negative entropische Effekte bei der Ligandenbindung verhindern sollte. Um zu überprüfen welche Auswirkungen die Sequenzmodifikationen auf die Struktur und die thermische Stabilität des Gerüstproteins haben, wurden 10F, 10F_{DY} und Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 entsprechend analysiert.

3.3.2.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann der Einfluss der Aminosäureaustausche und Deletionen auf die Sekundärstruktur des Gerüstproteins untersucht werden. Die Fern-UV-CD-Spektren (2.15.2) der gegen TNF-alpha selektierten Ubiquitin-Variante 10F im nativen und im entfalteten Zustand weisen auf eine ausgeprägte Sekundärstruktur hin (Abb. 32A). Der Vergleich mit dem Gerüstprotein Ubiquitin F45W zeigte eine Übereinstimmung in der Form der Spektren, jedoch starke Abweichungen bei der Intensität. Das Differenzspektrum (10F-Ubiquitin F45W) weist mit ausgeprägten Minima bei 207 nm und 222 nm und einem Maximum bei 187 nm auf die Zunahme des Anteils alpha-helikaler Strukturen bei 10F hin (siehe Anhang Abb. A2). Für Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 wurde ein Spektrum ähnlich der Variante 10F erhalten (Abb. 32B). Das Spektrum der Variante 10F_{DY}, welche die sieben Austausche der 10F, nicht jedoch die zwei Deletionen enthält, war bis auf geringe Abweichungen um 220 nm nahezu identisch zu dem des Gerüstproteins. Eine genaue Interpretation der spektralen Unterschiede war nicht möglich, da die Veränderung der Anzahl bzw. Umgebung der aromatischen Aminosäuren eventuell einen signifikanten Einfluss auf die Fern-UV-CD-Spektren ausüben. Die Analyse mittels Software genügte den statistischen Anforderungen nicht.

3.3.2.2 Strukturelle Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie

Die Auswirkungen der Austausche und Deletionen auf die Tertiärstruktur der Ubiquitin-Varianten wurden NMR-spektroskopisch untersucht (2.15.4). Es wurden ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren der ¹⁵N-markierten Varianten aufgenommen. Alle Spektren weisen gut verteilte Kreuzsignale mit engen Linienbreiten auf (Abb. 33). Dies deutet auf vollständig gefaltete Proteine mit ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstruktur hin. Für Ubiquitin F45W, welches ein dem Wildtyp-Ubiquitin (Lu *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1992) ähnliches

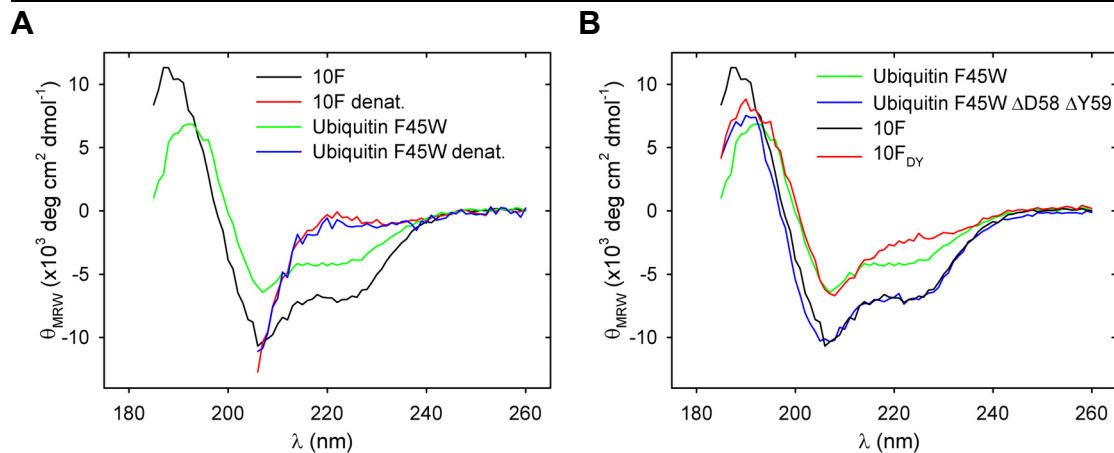


Abbildung 32: Fern-UV-CD-Spektren der Ubiquitin-Varianten.

Die Messungen wurden in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,4 (nativ) bzw. 6 M Guanidiniumhydrochlorid (denaturiert) durchgeführt. Die Spektren wurden in 1 mm-Quarzglasküvetten bei 20 °C aufgenommen. (A) CD-Spektren des Gerüstproteins Ubiquitin F45W und der TNF-alpha bindenden Variante 10F im nativen und denaturierten Zustand (denat.). (B) CD-Spektren der nativen Ubiquitin-Varianten. Die Variante 10F_{DY} enthält die sieben Austausche der Variante 10F, jedoch sind D58 und Y59 nicht deletiert.

¹H-¹⁵N-Korrelationsspektrum aufwies, erfolgte eine Zuordnung der Kreuzsignale zu den entsprechenden Aminosäuren (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum Gerüstprotein zeigten die Spektren der Varianten für nahezu alle Signale deutliche Unterschiede bezüglich der chemischen Verschiebung. Eine Übernahme der Zuordnung von Ubiquitin F45W war aufgrund dessen nicht möglich. Die spektralen Differenzen deuten jedoch auf Unterschiede in der Tertiärstruktur zwischen dem Gerüstprotein und den Varianten 10F, 10F_{DY} und Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 hin.

3.3.2.3 Thermische Stabilität

Ein Kriterium zur Auswahl von Gerüstproteinen als Grundlage von Proteinbibliotheken ist die hohe Ausgangsstabilität. Dadurch soll nach der Einführung von Aminosäureaustauschen eine ausreichende Stabilität der Varianten gewährleistet werden. Die Effekte der Austausche und Deletionen in den Ubiquitin-Varianten auf deren thermische Stabilität sollte mit zwei unabhängigen spektroskopischen Methoden untersucht werden. Der Austausch von Phenylalanin 45 gegen Tryptophan verbessert die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften des Ubiquitins bei gleichzeitig nur geringer Destabilisierung (Khorasanizadeh *et al.*, 1993). So konnte zur Bestimmung der thermischen Stabilität zunächst die Tryptophanfluoreszenz genutzt werden (2.15.3). Die untersuchten Ubiquitin-Varianten 10F, 10F_{DY} und Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 zeigten unter physiologischen Pufferbedingungen im Verlauf der thermischen Denaturierung eine bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 335-340 nm nach 353-354 nm (Daten nicht gezeigt). Während der Entfaltung erfolgte eine relative Zunahme

3 Ergebnisse

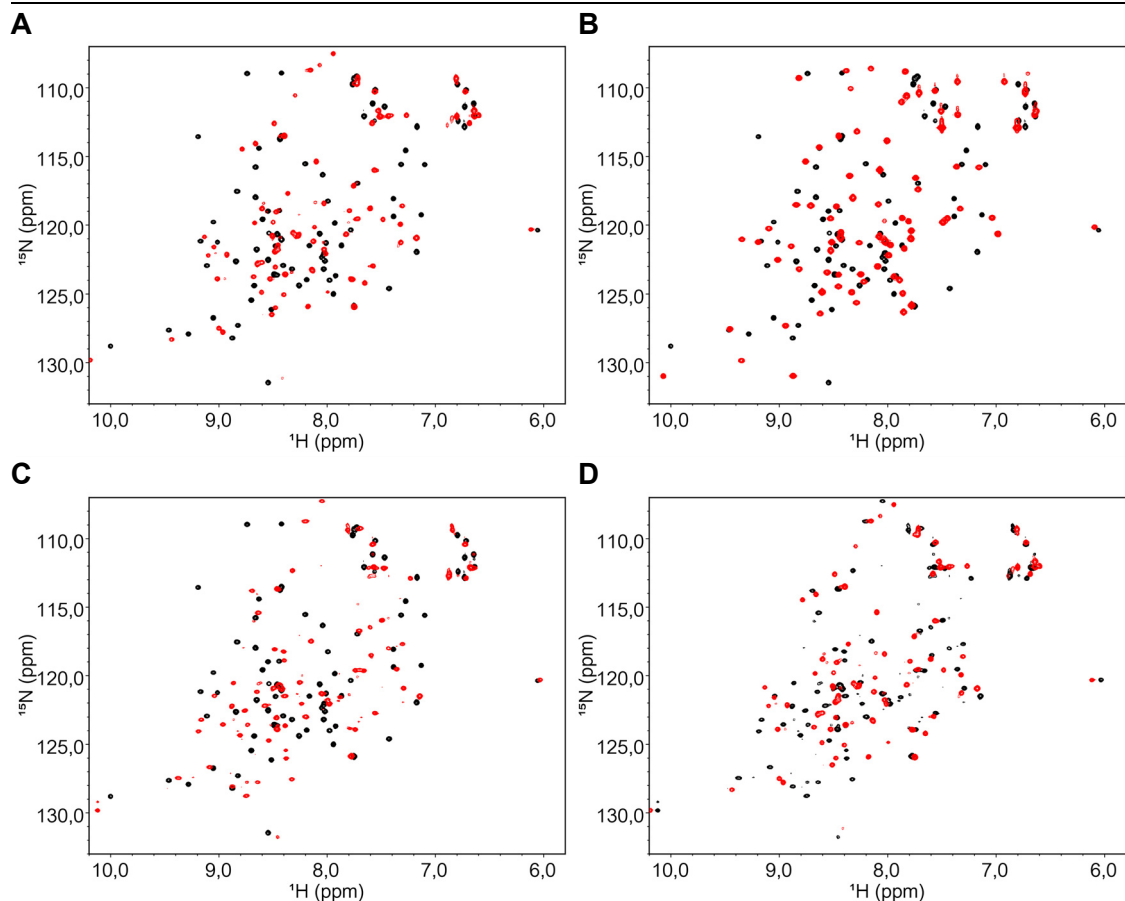


Abbildung 33: Strukturelle Untersuchung der Ubiquitin-Varianten mittels NMR-Spektroskopie.

^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des Gerüstproteins Ubiquitin F45W (900 μM) und der Varianten 10F (400 μM), 10F_{DY} (600 μM) und Ubiquitin F45W $\Delta\text{D58 } \Delta\text{Y59}$ (100 μM) wurden an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei 25 °C gemessen. Die Proteine lagen in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 vor. Die Überlagerung der Spektren zeigt deutlich die Abweichung der chemischen Verschiebung für nahezu alle Aminosäurepositionen, einschließlich der konservierten. (A) Ubiquitin F45W (schwarz) und 10F (rot). (B) Ubiquitin F45W (schwarz) und 10F_{DY} (rot). (C) Ubiquitin F45W (schwarz) und Ubiquitin F45W $\Delta\text{D58 } \Delta\text{Y59}$ (rot). (D) Ubiquitin F45W $\Delta\text{D58 } \Delta\text{Y59}$ (schwarz) und 10F (rot).

der Fluoreszenzintensität bei der Messwellenlänge von 353 nm. Die Normierung der Daten nach Pace und Scholtz (1997) ergab Übergangsmittelpunkte von $69,0 \pm 0,1$ °C (10F), $75,5 \pm 0,1$ °C (Ubiquitin F45W $\Delta\text{D58 } \Delta\text{Y59}$) und $81,1 \pm 0,2$ °C (10F_{DY}) (Abb. 34). Die Entfaltung der Variante 10F zeigt eine geringere Kooperativität als die Übergänge der anderen beiden Varianten. Ubiquitin F45W wurde aufgrund seiner hohen Stabilität nicht untersucht. Es zeigt selbst unter destabilisierenden Bedingungen in 20 mM Citrat pH 4,0 bis 90 °C keine vollständige Entfaltung (Hoffmann, 2006).

Zur Verifizierung der fluoreszenzspektroskopischen Daten wurden die thermischen Übergänge auch CD-spektroskopisch verfolgt (2.15.2). Die Auswertung der Daten (Pace und Scholtz, 1997) bei einer Messwellenlänge von 200 nm zeigte für 10F eine Übergangstemperatur

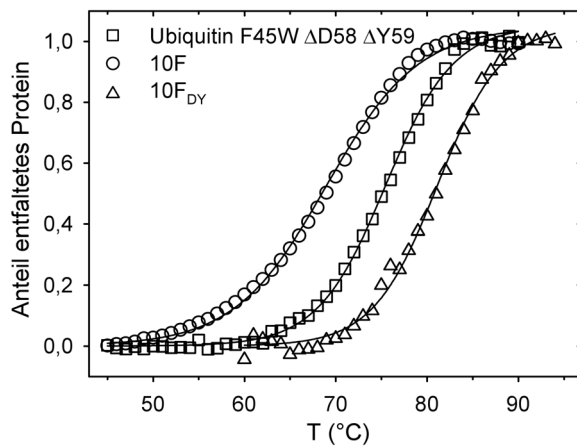


Abbildung 34: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der thermischen Stabilität der Ubiquitin-Varianten.

Die Entfaltung der Proteine wurden in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 in einem Temperaturbereich von 45-95 °C untersucht. Die Proteinkonzentration betrug 1,25 μ M für Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59, 5 μ M für 10F bzw. 2 μ M für 10F_{DY}. Bei einer Anregungswellenlänge von 285 nm (295 nm für Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59) wurden in Inkrementen von 1 °C Emissionsspektren aufgenommen. Die Auswertung (Pace und Scholtz, 1997) der pufferkorrigierten Spektren erfolgte bei einer Wellenlänge von 353 nm.

T_m von $75,9 \pm 0,2$ °C für die Entfaltung und $72,4 \pm 0,2$ °C für die Rückfaltung (Abb. 35). Die Kooperativität unterscheidet sich im Vergleich zu den fluoreszenzspektroskopischen Daten nicht. Für Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59 bzw. 10F_{DY} wurde eine unvollständige Entfaltung beobachtet, wobei die Übergangstemperaturen mindestens 80 °C bzw. 87 °C betragen (Daten nicht gezeigt). Die CD-spektroskopisch ermittelten T_m -Werte liegen geringfügig über den fluoreszenzspektroskopisch beobachteten Werten. Die Ursache liegt möglicherweise im unterschiedlichen Messpuffer. Alle untersuchten Ubiquitin-Varianten wiesen eine vollständige Reversibilität der Entfaltung auf, wie durch Übereinstimmung der Fluoreszenz- bzw. CD-Spektren bei 20 °C vor und nach kompletter Entfaltung gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt).

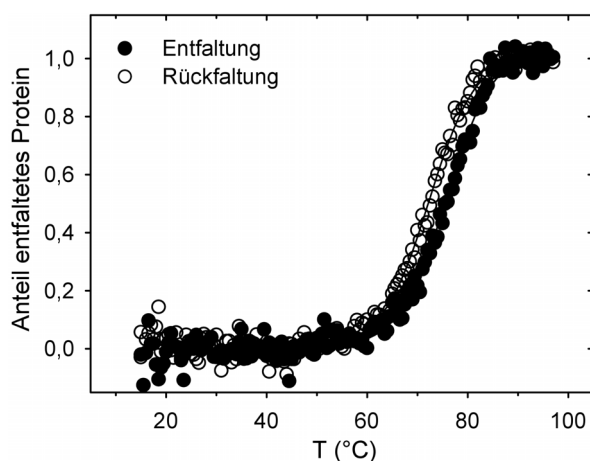


Abbildung 35: CD-spektroskopische Untersuchung der thermischen Stabilität der Ubiquitin-Variante 10F.

Die Messungen erfolgten in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,0 mit einer Heizrate von 1 K/min in einem Temperaturbereich von 15-97 °C. Die Proteinkonzentration betrug 11,87 μ M, die Messwellenlänge 200 nm. Alle Daten wurden pufferkorrigiert. Die Auswertung erfolgte nach Pace und Scholtz (1997).

Alle strukturell untersuchten Proteinvarianten zeigen die Eigenschaften eines gefalteten Proteins mit ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstruktur. Während die sieben Aminosäureaustausche keinen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur des Gerüstproteins haben, wurde in den Deletionsvarianten eine Erhöhung des alpha-helikalen Anteils im Vergleich zum Gerüstprotein beobachtet. Zu Unterschieden in der

3 Ergebnisse

Tertiärstruktur konnten anhand der Daten keine Aussagen getroffen werden. Die thermische Stabilität zeigte analog zur Sekundärstruktur einen größeren Einfluss der Deletionen. So führten die sieben Austausche zu einer geringeren Destabilisierung des Gerüstproteins als das Entfernen von D58 und Y59. 10F besitzt gegenüber Ubiquitin F45W eine etwa 30 K geringere Übergangstemperatur.

4 Diskussion

Über lange Zeit galten Antikörper als das Paradigma für Proteine mit hoher und spezifischer Affinität zu diversen Zielmolekülen. Aus diesem Grund haben sie eine breite Anwendung in Forschung und Diagnostik gefunden. Auch im therapeutischen Bereich gewinnen Antikörper immer mehr an Bedeutung (Reichert, 2010). Beschränkungen in der Nutzbarkeit der Antikörper bedingt durch die Größe und Effektorfunktionen führten zum Einsatz von Antikörperfragmenten (Beckman *et al.*, 2007; Hudson und Souriau, 2003). Diese zeigen jedoch eine verringerte Stabilität (Glockshuber *et al.*, 1990; Holliger und Hudson, 2005). In der Folge haben sich künstliche Bindeproteine auf Basis diverser Gerüstproteine als Alternative etabliert. Sie weisen ähnlich hohe Affinitäten und Spezifitäten wie Antikörper auf, bieten jedoch mit einer geringen Größe, dem Aufbau aus einer einzelnen Aminosäurekette und einer hohen Stabilität entscheidende Vorteile für bestimmte Anwendungen (Binz *et al.*, 2005; Hey *et al.*, 2005). Das in Eukaryoten hochkonservierte Ubiquitin wird von der Scil Proteins GmbH (Halle) als Gerüstprotein verwendet. Durch Substitution von acht oberflächenexponierten Resten werden dabei neue Bindeeigenschaften erzeugt (Fiedler *et al.*, 2004). Die Auswahl der Reste kann signifikant die Stabilität und Löslichkeit der resultierenden Varianten beeinflussen. Zur Optimierung dieser Parameter sollte in dieser Arbeit auf der Oberfläche des Ubiquitins eine alternative Bindestelle im Vergleich zu früheren Arbeiten etabliert und analysiert werden. Als Ausgangspunkt dienten in natürlichen Interaktionen involvierte Reste, welche zur Generierung einer Bibliothek von Proteinvarianten randomisiert wurden. Zur Evaluierung der neuen Strategie und Identifizierung spezifischer Bindeproteine erfolgte eine Selektion dieser Proteinbibliothek gegen das Protein TNF-alpha, welches aufgrund seiner pharmakologischen Relevanz für Entzündungskrankheiten wie Rheumatoide Arthritis biochemisch sehr gut charakterisiert ist. Zudem existieren eine Reihe von TNF-alpha-Bindern auf der Basis sowohl von Antikörpern als auch Rezeptoren und künstlichen Bindeproteinen (Byla *et al.*, 2010; Jonsson *et al.*, 2009; Kaymakcalan *et al.*, 2009), deren Bindungseigenschaften mit einer selektierten Ubiquitin-Variante verglichen werden sollten.

4.1 Herstellung von funktionellem humanen TNF-alpha in *E. coli* mittels SUMO-Fusionsmethode

Um ausreichende Mengen an TNF-alpha für die Selektion und Charakterisierung der künstlichen Bindeproteine herzustellen, wurde zur rekombinanten Produktion und Reinigung die SUMO-Fusionsmethode eingesetzt. Das Fusionsprotein His₆-SUMO verbessert die Produktion des Zielproteins durch Unterstützung der Proteinfaltung und eine erhöhte Löslichkeit (Butt *et al.*, 2005). Die Abspaltung des Zielproteins erfolgt durch die SUMO-

Protease direkt am SUMO-C-Terminus. Die Eigenschaften des SUMO-Fusionssystems ermöglichen die generische Herstellung und Reinigung unterschiedlicher Proteine in großen Mengen ohne eine aufwendige Methodenentwicklung. Wie am Beispiel des TNF-alpha gezeigt, gelingt dies nicht nur mit monomeren, sondern auch mit multimeren Proteinen. In Kombination mit der Verwendung des Autoinduktionsmediums ZYM-5052 (Studier, 2005), welches hohe Zelldichten und langsame Induktion zur maximalen Produktbildung bietet, wurde eine TNF-alpha-Herstellung in Schüttelkolben mit hohen Ausbeuten und geringem Zeitaufwand möglich. Publierte Standardprotokolle zur TNF-alpha-Herstellung benötigen für die Proteinreinigung ausgehend von der sedimentierten Zellmasse sieben Tage (Curnis und Corti, 2004). Die Anwendung des optimierten SUMO-Fusionsprotokolls reduzierte die Reinigungszeit auf zwei bis drei Tage bei einer gleichzeitig zweifach höheren Ausbeute von 97 mg/l Kulturvolumen (5,8 mg/g Biofeuchtmasse) im Vergleich zu 52 mg/l Kulturvolumen für das publizierte Standardprotokoll.

Im engeren Sinne handelt es sich bei dem hergestellten Zielprotein um die lösliche Form des TNF-alpha, welche durch proteolytische Abspaltung von einer membrangebundenen Pro-Form entsteht. Antikörper mit TNF-alpha-inhibierender Wirkung interagieren unter anderem mit dem N-Terminus der reifen Form (Jespersen *et al.*, 1994). Die Anwesenheit zusätzlicher Aminosäuren am N-Terminus, wie z. B. ein His₇-Peptid, reduziert zudem die zytotoxische Aktivität des Zytokins signifikant (Fonda *et al.*, 2002). Ein möglichst authentischer N-Terminus wurde deshalb als kritisch für die Selektion und Charakterisierung der künstlichen Bindeproteine erachtet. Für die Bereitstellung der löslichen Form des humanen TNF-alpha ohne zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, bietet die verwendete SUMO-Fusionsmethode noch einen weiteren Vorteil. Nach den herkömmlichen Standardprotokollen rekombinant hergestelltes, anhangsfreies TNF-alpha enthält ein Startmethionin vor dem nativen N-Terminus Val77. Ein Methionin am N-Terminus kann in *E. coli* durch die Methioninaminopeptidase entfernt werden, jedoch geschieht dies mit unterschiedlicher Effizienz (Sherman *et al.*, 1985). Die hocheffiziente Spaltung des SUMO-Fusionsproteins zwischen SUMO-C-Terminus und TNF-alpha-N-Terminus erzeugt hingegen den authentischen N-Terminus Val77. Das Produkt entspricht in der Aminosäuresequenz somit dem TNF-alpha, welches durch Spaltung des membrangebundenen Vorläufers im menschlichen Körper freigesetzt wird. Ungespaltenes Protein kann leicht durch einen IMAC-Schritt entfernt werden. Die Identität und Reinheit des rekombinanten TNF-alpha wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. Im Gegensatz zu Strategien für die anhangsfreie, rekombinante Herstellung von TNF-alpha bei denen das Startmethionin durch MAP entfernt wird (Curnis und Corti, 2004; He *et al.*, 2005), konnten in den gereinigten Proteinproben keine TNF-alpha-Spezies mit zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren detektiert werden. Dies zeigte die effiziente Trennung von gespaltenem und ungespaltenem SUMO-Fusionsprotein durch den Reinigungsprozess.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte ebenfalls das Vorhandensein der intrachainaren Disulfidbrücke, welche für die volle biologische Aktivität notwendig ist (Narachi *et al.*, 1987). Da das Protein in dem Standard-*E. coli*-Stamm BL21(DE3) unter den reduzierenden Bedingungen des Zytosols hergestellt wurde, erfolgte die Cysteinoxidation vermutlich nach dem Zellaufschluss.

Wie von Kenig *et al.* (2006) schon für TNF-alpha-Derivate mit N-terminalem Polyhistidinpeptid gezeigt, war auch im Fall des SUMO-Fusionsproteins die biologische, membrangebundene Vorläuferform des TNF-alpha nicht zur Trimerisierung notwendig (siehe Abb. 11, S. 49 und Abb. 13, S. 51). Chemisch denaturiertes, lösliches TNF-alpha bildet bei der Rückfaltung ebenfalls wieder eine trimere Struktur aus (Wingfield *et al.*, 1987). Durch Größenausschlusschromatographie konnte der trimere Charakter sogar für die ungespaltene SUMO-Fusion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das im Fern-UV-CD-Spektrum des gereinigten, reifen Proteins (siehe Abb. Abbildung 12, S. 50) beobachtete Minimum bei 220 nm sowie das Maximum bei 200 nm sind charakteristisch für beta-Faltblattstrukturen, welche TNF-alpha hauptsächlich aufweist (Eck und Sprang, 1989). Das aufgenommene Spektrum entspricht bereits publizierten Spektren (Riazance-Lawrence *et al.*, 1991a; Wingfield *et al.*, 1987), wodurch die korrekte Sekundärstruktur des hergestellten Proteins bestätigt wird. Zusammen mit dem beobachteten Multimerisierungsverhalten lässt dieses Resultat auch auf eine korrekte Tertiärstruktur der monomeren Untereinheiten schließen.

Trotz korrekter Faltung zeigen einige eukaryotische Proteine nach rekombinanter Produktion in *E. coli* verringerte oder keine biologische Aktivität (Kamionka, 2011). Dies ist meist auf das Fehlen von Modifikationen, welche in eukaryotischen Zellen häufig auftreten, zurückzuführen. Im Unterschied zu vielen anderen Signalproteinen in Säugern weist die reife, lösliche Form des humanen TNF-alpha keine Glykosylierung auf (Idriss und Naismith, 2000). In der Tat zeigen natives, aus humanen Zellen gereinigtes TNF-alpha und rekombinantes Protein aus *E. coli* keine signifikanten Aktivitätsunterschiede (Creasey *et al.*, 1987). Das mittels SUMO-Fusionsmethode hergestellte Protein zeigte eine vergleichbar hohe biologische Aktivität wie kommerziell erhältliches, rekombinantes TNF-alpha (siehe Abb. 14, S. 51).

4.2 Design einer Ubiquitin-basierten Proteinbibliothek

Trotz großer Fortschritte bei der computergestützten Berechnung und Modellierung von sowohl Protein-Ligand-Interaktionen als auch Proteinfaltung und -stabilität beruht die Konstruktion von Proteinbibliotheken zur Herstellung künstlicher Bindeproteine zu einem großen Teil auf empirischen Ansätzen. Vergleicht man die verschiedenen künstlichen Bindeproteine findet man verschiedene Strategien zur Generierung der gewünschten Bindeeigenschaften. Dabei können unterschiedliche Aspekte, wie die Lokalisation der Substitutionen, die Toleranz gegen

Austausche oder die Randomisierungsmethode, eine Rolle spielen. In dieser Arbeit sollte eine natürliche Bindefläche im Ubiquitin umprogrammiert werden. Diese Strategie führte auch bei Tetranectinen, Anticalinen und Affibodies zur erfolgreichen Herstellung hochaffiner, künstlicher Bindeproteine (Kim *et al.*, 2009; Nord *et al.*, 1997; Byla *et al.*, 2010). Nach umfangreichen Literaturstudien wurden die Aminosäuren L8, I44 und V70 im Ubiquitin als Leitpositionen für die Paratopgenerierung ausgewählt (siehe Tab. 15, S. 53). Die drei Reste bilden eine hydrophobe Fläche, die das Ziel von Ubiquitin-Bindedomänen darstellt (Fisher *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). Vorangehende Substitutionsstrategien im Ubiquitin wurden teilweise nicht ohne signifikante Stabilitätsverluste toleriert (Hoffmann, 2006). Durch die Auswahl der Randomisierungspositionen in der konstruierten Ubiquitin-Bibliothek sollte der Einfluss der Austausche auf die Struktur und Stabilität der Varianten im Vergleich zum Gerüstprotein minimiert werden. Eine hohe Anzahl von Änderungen in der Aminosäuresequenz kann einen wesentlichen Einfluss auf die Struktur und die Stabilität eines Proteins haben (Soskine und Tawfik, 2010). Somit kann durch Verringerung der Zahl der Substitutionen der relative Anteil funktionaler Varianten einer Bibliothek erhöht werden. Die einhergehende Reduktion der Vielfalt vermindert jedoch auch die Wahrscheinlichkeit der Selektion hochaffiner Binder (Griffiths *et al.*, 1994).

Eine weitere Strategie, um bei der Erzeugung künstlicher Bindeproteine negative Effekte durch Aminosäureaustausche zu minimieren, beruht auf dem Konsensusdesign (Binz *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2005). Durch den Vergleich einer großen Anzahl an Varianten eines Gerüstproteins wird dabei die Konservierung der Aminosäuren an den einzelnen Positionen untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass hauptsächlich die konservierten Reste essentiell für Proteinstruktur und -stabilität sind, erfolgt die Randomisierung an den variablen Positionen. Ubiquitin ist jedoch bis auf vier Reste in allen Eukaryoten hochkonserviert. Aus diesem Grund wurde bereits zur Erstellung früherer Bibliotheken mit Hilfe von *in silico*-Algorithmen untersucht, welche Reste einen Austausch tolerieren (interner Forschungsbericht Scil Proteins, 2002; Fiedler *et al.*, 2004; Wiederstein und Sippl, 2005). Die Daten wurden zur Positionsauswahl in der vorliegenden Arbeit verwendet. Nach einer finalen visuellen Beurteilung mit der Software PyMOL, wurde eine Bibliothek mit den sechs randomisierten Positionen K6, L8, R42, I44, H68 und V70 mit Hilfe von NNK-Motiv enthaltenden Oligonukleotiden konstruiert. Die Sequenzfunktionalität von 68 % auf Aminosäureebene (siehe 3.2.1.1, S. 52) ist gut im Vergleich mit DNA-Bibliotheken auf Basis Trinukleotid-randomisierter Oligonukleotide (Garcia-Ibáñez *et al.*, 2008; Lipovsek *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2008). Die Funktionalität spiegelte sich auch in Expressionsanalysen wieder. In 77 % von 96 zufällig ausgewählten Bakterienklonen wurden Ubiquitin-Varianten hergestellt (siehe 3.2.1.2, S. 54). Nicht funktionale Varianten verringern die Effizienz der nachfolgenden Selektionsverfahren, da der relative Anteil erwünschter, das heißt gefalteter, stabiler Varianten

verringert wird. Um die Funktionalität zukünftiger Bibliotheken zu steigern, kann zum Beispiel vorab eine Selektion zur Beseitigung von Sequenzen mit Leserahmenverschiebungen (Gerth *et al.*, 2004) durchgeführt werden. Alternativ kann die Bibliothekskonstruktion anstatt durch PCR-basierte Synthese auch mittels der Ligierung kleiner DNA-Fragmente (Van den Brulle *et al.*, 2008) erfolgen. Bei 84 % der erfolgreich produzierten Ubiquitin-Varianten war das Protein, analog zum gut herstellbaren Wildtyp (Ecker *et al.*, 1987), hauptsächlich in der löslichen Lysatfraktion (> 80 %) zu finden. Somit konnte von einem geringen Einfluss der Randomisierung auf Stabilität und Faltung der Varianten ausgegangen werden.

4.3 Selektion eines künstlichen Bindeproteins gegen TNF-alpha

Zur Selektion gegen das Zielmolekül TNF-alpha wurde das Ribosomen-*display* verwendet. Im Vergleich zu anderen üblichen Selektionsmethoden, wie unter anderem dem Phagen-*display*, besteht hier die Möglichkeit, aufgrund der Unabhängigkeit von der Transformationseffizienz von lebenden Zellen, größere Bibliotheken in der Selektion einzusetzen. Zudem verhindert die schnelle Faltung des Ubiquitins den in einigen anderen Methoden zur Präsentation notwendigen Transport durch eine Membran. Ein Nachteil des Ribosomen-*display* ist das Fehlen einer Faltungskontrolle, was aber in Anbetracht der löslichen Herstellung der Ubiquitin-Varianten nur einen geringen Einfluss auf die Selektionsergebnisse ausüben sollte. Aktuell wird alternativ zum Ribosomen-*display* eine neue Phagen-*display*-Methode zur Selektion von Ubiquitin-Varianten eingesetzt, die auf dem *twin arginine translocation* (TAT)-System beruht (Paschke und Höhne, 2005). Diese Methode erlaubt die schnelle Faltung der zu präsentierenden Proteine im Zytosol und transportiert diese unter Kontrolle der erfolgreichen Faltung zur Phagenassemblierung anschließend ins Periplasma.

Unter Verwendung des Ribosomen-*display* zur Selektion gegen TNF-alpha zeigte sich nach vier Zyklen eine erfolgreiche Anreicherung von Ubiquitin-Varianten (siehe 3.2.2.1, S. 55). Mittels Hit-ELISA konnten in 192 zufällig ausgewählten Varianten nach dem sechsten Zyklus TNF-alpha-Binder nachgewiesen werden (siehe Abb. 19, S. 57). Die vier besten Klone des Hit-ELISA bezüglich Signalstärke und -spezifität zeigten eine identische Aminosäuresequenz und wurden für eine weitere Charakterisierung isoliert (siehe Abb. 20, S. 58). Als Bezeichnung wurde eine 96-*well*-Kavität verwendet, in der die Variante gefunden wurde – 10F. Zusätzlich zu den sechs erwarteten Austauschen K6F, L8Y, R42A, I44E, H68P, V70F wurden die zwei Deletionen D58 und Y59 sowie der zusätzliche Austausch K29R gefunden. Solche zusätzlichen Mutationen im Gerüstbereich sind bei der Anwendung des Ribosomen-*display* nicht unüblich. Aufgrund der vielen PCR-Zyklen ist das Auftreten von Sequenzveränderungen sehr wahrscheinlich. Dies kann auch von Vorteil sein. Es können in der ursprünglichen Bibliothek

nicht vorhandene Varianten entstehen, die eine höhere Affinität gegenüber dem Zielmolekül zeigen (Hanes und Plückthun, 1997; Zahnd *et al.*, 2007). Um den Vorteil solcher Mutationen auch im Phagen-*display* oder *yeast surface-display* zu nutzen, können diese dort gezielt durch *error prone*-PCR und ähnliche Methoden in die DNA-Bibliothek eingeführt werden, jedoch ist anschließend wieder die aufwändige Rekonstruktion der Plasmidbibliotheken notwendig.

4.4 Untersuchung der Interaktion zwischen der selektierten Ubiquitin-Variante und TNF-alpha

Während Antikörper mit ihrem Zielmolekül über Schleifenstrukturen interagieren, sollte das Paratop der Ubiquitin-basierten Bindeproteine in einem beta-Faltblatt positioniert werden. Wie von Lange *et al.* (2008) auch für natürliche Interaktionen des Ubiquitins beschrieben, soll die Bindung über die rigide Sekundärstruktur entropische Vorteile vermitteln (Abb. 36). Die geringe Größe des Ubiquitins kann zudem die Interaktion mit für Antikörper unzugänglichen Epitopen ermöglichen.

Um die Bindung der selektierten Ubiquitin-Variante 10F an TNF-alpha biophysikalisch näher zu charakterisieren, wurden die beiden Proteine rekombinant hergestellt und gereinigt (siehe 3.1.1, S. 48 und 3.3.1.1, S. 59). Um die Beiträge der Sequenzveränderungen in 10F im Vergleich zum *scaffold* Ubiquitin F45W zur Interaktionsfähigkeit zu untersuchen, wurden ebenfalls die beiden Ubiquitin-Varianten 10F_{DY} (Ubiquitin F45W mit K6F, L8Y, K29R, R42A, I44E, H68P, V70F) und Ubiquitin F45W ΔD58 ΔY59 hergestellt. Sowohl die Summe der Austausche als auch die Deletionen erwiesen sich als essentiell für die Bindungsfähigkeit von 10F an TNF-alpha (siehe Abb. 24, S. 61). Der konservative Charakter des Austausches K29R und seine Position auf der dem randomisierten beta-Faltblatt abgewandten Seite im Ubiquitinmolekül legen nahe, dass dieser Austausch keinen signifikanten Beitrag zur Bindung leistet. Untersuchungen dazu wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Die selektierte Ubiquitin-Variante bindet an TNF-alpha mit einer Dissoziationskonstante K_D von 394 nM (siehe 3.3.1.5, S. 62). Aviditätseffekte können aufgrund der Dreifachsymmetrie des Zielproteins nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz ist die beobachtete Dissoziationskonstante signifikant kleiner als die üblicherweise beobachteten Werte für natürliche Interaktionen des Ubiquitins mit Ubiquitin-bindenden Domänen, die mit wenigen Ausnahmen im mikro- bis millimolaren Bereich liegen (Chen und Sun, 2009; Hurley *et al.*, 2006). Im ELISA zeigte die Variante 10F keine Interaktionen mit nahe verwandten und unverwandten Proteinen und die Bindung an TNF-alpha konnte zudem mit Etanercept, dem mittels Fusion an IgG-Fc dimerisierten TNF-Rezeptor 2, kompetiert werden (siehe Abb. 25, S. 63).

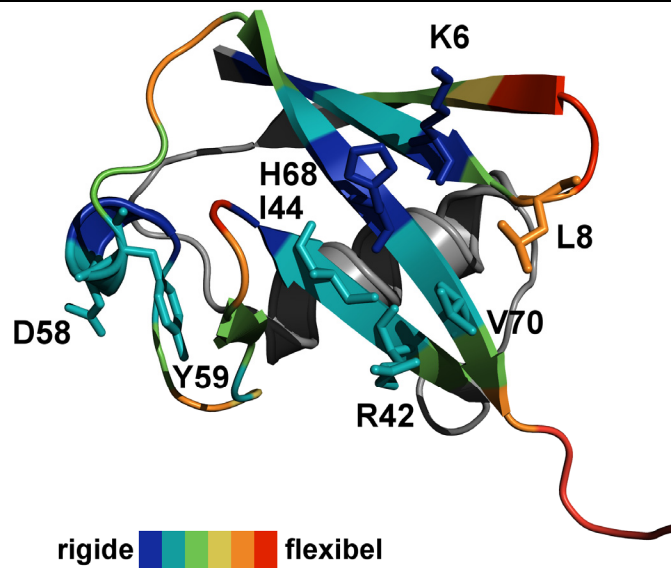


Abbildung 36: Vergleich der strukturellen Flexibilität des Ubiquitins mit der Position der Randomisierungen und der erhaltenen Deletionen.

Die einzelnen Aminosäurepositionen des Ubiquitins wurden entsprechend ihrer strukturellen Flexibilität (Lange *et al.*, 2008) eingefärbt. Die Aminosäurereste an den Randomisierungs- sowie den durch die Selektion erhaltenen Deletionspositionen sind als Stabmodell dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Aminosäuren 1 und 15 bis 40 nicht eingefärbt. Die Abbildung wurde mit der Software PyMOL erstellt (PDB-Code 1ubi).

Die Isothermale Titrationskalorimetrie zeigte ein exothermes Bindungsverhalten mit einer 1:1-Stöchiometrie von 10F zum TNF-alpha-Trimer (siehe Abb. 27, S. 64), welches die biologisch aktive Spezies darstellt (Smith und Baglioni, 1987). Diese Bindungsstöchiometrie wurde mittels Analytischer Ultrazentrifugation (siehe Abb. 30, S. 67) sowie NMR-Spektroskopie (siehe Abb. 28, S. 65) bestätigt. Die gleichzeitige Bindung mehrerer 10F-Moleküle an ein TNF-Trimer wurde nicht beobachtet. Dies unterscheidet die Ubiquitin-Variante deutlich vom klinisch zugelassenen anti-TNF-alpha-Antikörper Infliximab und anderen monoklonalen Antikörpern (Saijo *et al.*, 1995; Scallan *et al.*, 2002; Petyovka *et al.*, 1995). Diese sind meist in der Lage, sowohl die trimere als auch die monomere TNF-alpha-Spezies zu erkennen. Neben Antikörpern wurden auch künstliche Bindeproteine auf der Grundlage verschiedener Gerüstproteine gegen TNF-alpha erzeugt. Affibodies (Jonsson *et al.*, 2009) und Tetranectine (Byla *et al.*, 2010), die das trimere TNF-alpha erkennen können, zeigen eine 3:1-Stöchiometrie bezüglich des TNF-alpha-Trimers. Auch die ausschließlich trimerspezifischen TNF-alpha-Rezeptoren weisen eine 3:1-Stöchiometrie bezüglich des Trimers auf (Banner *et al.*, 1993). Das auf jeweils zwei benachbarten Monomeren befindliche Epitop ist im Trimer dreimal vorhanden. Somit ist für das Ubiquitin-basierte künstliche Bindeprotein die Erkennung eines bisher nicht beschriebenen, trimerspezifischen Epitops anzunehmen. Die Beobachtungen legen eine Position nahe der Dreifachsymmetrieachse des TNF-alpha nahe, was die Bindung weiterer 10F-Moleküle an ein Trimer sterisch behindert. Fluoreszenz-Homoquenchingexperimente wiesen darauf hin, dass das

TNF-Trimer durch die Bindung stabilisiert wird (siehe Abb. 31, S. 68), also eventuell auch mehrere Untereinheiten des TNF-alpha gleichzeitig gebunden werden. Ein solches Verhalten zeigt z. B. ein DARPin gegen das homotrimere Rezeptorbindeprotein des *Lactococcus*-spezifischen Phagen TP901-1 (Veesler *et al.*, 2009). Ausgehend von den Daten kann als Ursache der Bindungsstöchiometrie auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung eines 10F-Moleküls durch Ausbildung einer Asymmetrie im TNF-alpha-Trimer die Anlagerung weiterer 10F-Moleküle verhindert. Weiterhin besteht die Möglichkeit dass im TNF-alpha drei identische, sterisch voneinander unbeeinflusste Bindungsstellen existieren und eine hohe Avidität hervorrufen. Die Bindung eines 10F-Moleküls könnte die Aviditätseffekte stark verringern.

Bei der NMR-Titration und in SEC-Experimenten wurde ein Effekt des während der Selektion verwendeten Detergens Tween-20 auf die Interaktion von 10F und TNF-alpha festgestellt (siehe 3.3.1.6, S. 64). Ähnliches wurde für ein gegen TNF-alpha selektiertes DARPin beschrieben (Steiner *et al.*, 2008). Eine nähere Untersuchung zeigte, dass die Bindung der Ubiquitin-Variante an TNF-alpha unabhängig von der Ab- oder Anwesenheit des Detergens stattfindet, allerdings durch das Detergens die Assoziation der Bindungspartner deutlich beschleunigt wird. Mit Hilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie konnten unter Zugabe von 0,1 % Tween-20 lokale Strukturänderungen in TNF-alpha beobachtet werden (siehe Anhang Abb. A3), ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren von 10F zeigen hingegen keinen Einfluss von Tween-20 (Daten nicht gezeigt). So kann ein Bindungsmodell postuliert werden, bei dem die Ubiquitin-Variante 10F einen bestimmten konformationellen Zustand des TNF-alpha-Trimers bindet, der durch die Anwesenheit von Tween-20 begünstigt wird. Diese Hypothese kann durch weitere Beobachtungen gestützt werden. So besteht eine Sensitivität des hauptsächlich durch hydrophobe Wirkungen stabilisierten Trimerzustandes gegenüber Detergenzien (Smith und Baglioni, 1987). Zusätzlich gehen der Dissoziation des Trimers konformationelle Umlagerungen voraus. Das kleine, TNF-inhibierende Molekül Suramin bindet vorrangig an einen entsprechenden Übergangszustand und fördert dadurch die Trimerdissoziation (Alzani *et al.*, 1995). Tween-20 und andere Detergenzien stabilisieren möglicherweise ebenfalls einen zur Dissoziation neigenden konformationellen Zustand, analog zum Suramin. Während der Inkubation von TNF-alpha mit 0,05 % Tween-20 wurde durch Fluoreszenz-Homoquenchingexperimente nach He *et al.* (2005) eine erhöhte Monomeraustauschrate zwischen den Trimeren gemessen, die bei hohen Proteinkonzentrationen hauptsächlich von der Dissoziationsrate abhängig ist (Daten nicht gezeigt). Als Halbwertszeit für die Trimerdissoziation in Abwesenheit von Detergens werden 4 bis 20 h angegeben (Alzani *et al.*, 1995; Poesi *et al.*, 1993). Dies stimmt bemerkenswerterweise gut mit dem Zeitrahmen zur Komplexbildung von 10F und TNF-alpha während der NMR-Titration bzw. SEC-Experimente in Abwesenheit von Tween-20 überein, wodurch das Modell einer der Bindung vorausgehenden

Konformationsänderung unterstützt wird (siehe 3.3.1.6, S. 64). Die Hypothese steht auch nicht im Gegensatz zur erfolgreichen Kompetition der Komplexbildung mit Etanercept (siehe Abb. 25, S. 63). Möglicherweise erkennt und stabilisiert der TNF-Rezeptor 2 eine andere Konformation, wodurch die Bindung von 10F blockiert wird.

Die Sensitivität gegenüber Detergens ist nicht nur auf TNF-alpha-Interaktionen mit künstlichen Bindeproteinen beschränkt, sondern auch bei Antikörpern beschrieben worden (Petyovka *et al.*, 1995). Für eine große Zahl an Antikörpern und künstlichen Bindeproteinen, die nano- bis picomolare Dissoziationskonstanten und biologische Aktivität aufweisen, wurden jedoch bisher keine Detergenseffekte beobachtet (Byla *et al.*, 2010; Jonsson *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit wurde dort bei der Anwendung evolutionärer Selektionsmethoden zur Generierung der Binder das Detergens Tween-20 teilweise beziehungsweise vollständig vermieden. Ob dies, wie von Steiner *et al.* (2008) vermutet, tatsächlich die Selektion Tween-20-sensitiver Bindemoleküle verhindert, bleibt unklar, denn zumindest die Ubiquitin-Variante 10F bindet TNF-alpha auch in Abwesenheit von Detergens. Theoretisch besteht dementsprechend die Möglichkeit, in einer Selektion ohne Tween-20 Binder gegen das gleiche Epitop zu isolieren.

Neben dem durchgehenden Einsatz von Tween-20 während der Selektion könnte das ungewöhnliche Bindeverhalten der Ubiquitin-Variante und den von Steiner *et al.* (2008) selektierten DARPins auch auf der geringen Molekülgröße basieren. Im Gegensatz zu Antikörpern mit einer Molekularmasse von mindestens 120 kDa, sind für die künstlichen Bindeproteinen mit 9 bzw. 21 kDa eventuell sonst unzugängliche Epitope wie z.B. Furchen erreichbar. So binden kleinere Kamelantikörper im Vergleich zu humanen Antikörpern untypischerweise auch in Vertiefungen an Proteinoberflächen (De Genst *et al.*, 2006). Ermöglicht wird dies durch den besonderen Aufbau. Sie bestehen nur aus zwei schweren Ketten, was zu einem geringeren Molekylvolumen und einer konvexen Form des Paratops führt.

4.5 Strukturelle Auswirkungen der Austausche in der TNF-alpha-bindenden Ubiquitin-Variante

Aufgrund der Anzahl an Austauschen und Deletionen in dem Gerüstprotein Ubiquitin F45W zur Erzeugung der Affinität zu TNF-alpha konnte in der selektierten Variante ein Einfluss auf Struktur und Stabilität im Vergleich zum Gerüstprotein erwartet werden. 10F weist einen Sequenzunterschied von 12 % zu Ubiquitin F45W auf. Obwohl eine solche Anzahl an Austauschen zum Strukturverlust eines Proteins führen kann, zeigen sowohl die Ubiquitin-Variante 10F als auch die jeweiligen Varianten ohne Deletionen bzw. ohne Austausche in der strukturellen Untersuchung mittels CD- und NMR-Spektroskopie die typischen Eigenschaften eines nativ gefalteten Proteins mit ausgeprägter Sekundär- und Tertiärstruktur (siehe Abb. 32,

S. 70 und Abb. 33, S. 71). Die Differenzen der spektralen Merkmale der Varianten waren jedoch offensichtlich, wobei Austausche und Deletionen unterschiedliche Effekte besaßen. Die geringen Abweichungen im Fern-UV-CD-Spektrum bei 224 nm zwischen der deletionsfreien Variante 10F_{DY} und Ubiquitin F45W können einerseits aus dem Austausch H68P im beta-Faltblatt resultieren. Prolin wirkt sich aufgrund sterischer Restriktionen und fehlender Wasserstoffbrückenbindungen negativ auf die Ausbildung von beta-Faltblättern aus (Richardson und Richardson, 1989). Andererseits kann auch ein positives CD-Signal des zusätzlichen Tyrosinrests Y8 Ursache für die spektrale Differenz sein. Die Beobachtung solcher Effekte in Proteinen mit niedrigem helikalen Anteil ist nicht unüblich (Freskgaard *et al.*, 1994; Vuilleumier *et al.*, 1993). 10F und Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59 zeigten deutliche spektrale Abweichungen zum Gerüstprotein, die wahrscheinlich nicht mehr nur auf Beiträge von aromatischen Aminosäuren zurückgeführt werden können. Vielmehr ergibt sich der Hinweis auf eine Erhöhung des alpha-helikalen Anteils. In den NMR-Spektren zeigten die drei Proteine 10F, 10F_{DY} und Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59 signifikante Unterschiede bezüglich der Resonanzpositionen im Vergleich zum Gerüstprotein Ubiquitin F45W. Auch ein Vergleich der HSQC-Spektren von Ubiquitin L8A I44A V70A D77 und dem Ubiquitin-Wildtyp (Sakai *et al.*, 2006) weist für einen großen Teil der Resonanzen deutliche Verschiebungen auf. Anhand der bisherigen Daten allein ist es daher nicht möglich Aussagen über den Umfang von strukturellen Änderungen durch die Deletionen und Austausche zu treffen. Hierzu wären weitere Experimente zur hochauflösenden Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie notwendig. In bereits durchgeführten Versuchen konnten jedoch noch keine erfolgreichen Kristallisationsbedingungen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Eine der vorteilhaften Eigenschaften, welche Ubiquitin zu einem interessanten Gerüstprotein macht, ist seine hohe thermische Stabilität. Es entfaltet bei neutralem pH-Wert erst bei Temperaturen von über 100 °C (Makhatadze *et al.*, 1998). Bei temperaturinduzierten Faltungsübergängen der TNF-alpha-bindenden Variante 10F konnten mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie (siehe Abb. 35, S. 72) bzw. Fluoreszenzspektroskopie (siehe Abb. 34, S. 72) je nach Pufferbedingungen Übergangsmittelpunkte von 74 °C bzw. 68 °C beobachtet werden. Die Übergänge waren vollständig reversibel (Daten nicht gezeigt). Trotz der signifikant verringerten Übergangstemperatur im Vergleich zum Ubiquitin-Wildtyp bleibt die Variante 10F ein thermostabiles Protein. So entfalten andere künstliche Bindeproteine auf Basis des humanen gammaB-Kristallins bei 56 bis 72 °C, Anticalin-Varianten bei 62 bis 73 °C oder eine DARPin-Variante bei 69 °C (Ebersbach *et al.*, 2007; Schlehuber und Skerra, 2002; Zahnd *et al.*, 2007). Für Antikörper bzw. Antikörperfragmente wurden mittlere Übergangstemperaturen von 60 bis 92 °C gefunden (Demarest *et al.*, 2006; Dumoulin *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005). Analog zur Sekundärstruktur weisen die Deletionen in der Ubiquitin-Variante 10F auch stärkere Effekte auf die thermische Stabilität auf als die Austausche. Ubiquitin F45W Δ D58 Δ Y59 zeigt eine um 6 K

4 Diskussion

geringere Übergangstemperatur als 10F_{DY} (siehe Abb. 34, S. 72). Während im Wildtypprotein die Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren, insbesondere an den Randomisierungspositionen, keine zusätzlichen, proteinstabilisierenden Interaktionen aufweisen, bilden die Seitenketten der deletierten Reste D58 und Y59 zusätzlich zu den Kontakten des Rückgrats der 3_{10} -Helix zwei Wasserstoffbrückenbindungen, D58 mit dem Amidstickstoff von T55 und Y59 mit dem Amidstickstoff von E51 (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Die Deletion dieser beiden Reste, die als Verankerung und Stabilisierung für die umgebenden Reste dienen (siehe Abb. 36, S. 80), hat möglicherweise auch einen Einfluss auf das ursprüngliche Konzept der Bindung mittels rigider Sekundärstrukturen. Lange *et al.* (2008) vermuten, dass die rigide Sekundärstruktur der Bindungsstelle einen Mechanismus darstellt, der unspezifische Interaktionen mit nicht oberflächenkomplementären Proteinen verhindern soll. Möglicherweise wurde im Fall der Ubiquitin-Variante 10F zugunsten der Bindung an eine strukturell verschiedene Oberfläche die Rigidität verringert. Aufschluss darüber können NMR-Untersuchungen zur strukturellen Flexibilität der Ubiquitin-Variante 10F bringen. Ziel der Selektion mit der Ubiquitin-Bibliothek war es ursprünglich, unter Beibehaltung der Rigidität eine Oberflächenanpassung durch entsprechende Aminosäureaustausche im Bindungsbereich zu erhalten. Dies ist experimentell jedoch nur schwer zu beeinflussen. Eine Möglichkeit um die Flexibilität von Varianten gering zu halten, ist der Einsatz von Proteasen während der Selektion. Während kompakt gefaltete Proteine relativ unempfindlich gegen proteolytischen Abbau sind, werden ungefaltete und destabilisierte Varianten dem Selektionsprozess entzogen. Durch Einsatz dieser Methode im Phagen-*display* gelang (Martin *et al.*, 2001) die Isolierung thermodynamisch stabiler Varianten des Kälteschockproteins CspB.

5 Ausblick

Die bereits bei der Herstellung anderer künstlicher Bindeproteine mit positiven Ergebnissen angewendete Strategie der Umprogrammierung einer natürlich vorhandenen Bindungsstelle im Gerüstprotein, war auch beim Ubiquitin erfolgreich. Das neue Bibliotheksformat zeigte eine hohe Anzahl löslicher Varianten in der naiven Bibliothek, was auf eine gute Stabilität der Varianten hindeutet. Dazu trug wahrscheinlich die Beschränkung der Bindefläche auf sechs Aminosäurereste bei. Bei der Charakterisierung der gegen TNF-alpha selektierten Ubiquitin-Variante, die noch drei weitere Substitutionen bzw. Deletionen enthält, zeigten die sechs Randomisierungspositionen nur geringe Einflüsse auf die Proteinstabilität. Mit einer dreistellig nanomolaren Affinität der Variante ist die Bindungsstärke im Vergleich zu den meisten natürlichen Interaktionen des Ubiquitins wesentlich höher, im Vergleich zu Antikörpern mit niedrig nanomolaren oder sogar picomolaren Affinitäten aber immer noch recht gering. Um eine Verbesserung der Bindungsstärke zu erzielen, kann die Bindefläche vergrößert werden. Dies könnte jedoch zu einer Destabilisierung der entsprechenden Bindemoleküle führen. Zur Identifizierung weiterer, nicht oder wenig destabilisierender Substitutionspositionen könnte das iterative Austauschen verschiedener zum Paratop benachbarter Reste dienen. Durch die Analyse der Stabilität einzelner Varianten können so Hinweise für ein neues Bibliotheksdesign gewonnen werden.

Da der TNF-Rezeptor oder besser Etanercept *in vitro* mit der Bindung der Ubiquitin-Variante konkurriert, wäre diesbezüglich eine Untersuchung der *in vivo*-Aktivität der Ubiquitin-Variante mittels eines L929-Zellassays interessant. Ähnlich affine Tetranectine zeigten jedoch keine messbaren Effekte (Byla *et al.*, 2010), weshalb im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden Experimente als nicht sinnvoll erachtet wurden. Für erfolgversprechende Experimente wäre eine Affinitätsmaturierung der Ubiquitin-Variante nach gezielter oder zufälliger Substitution im Protein notwendig. Alternativ könnte eventuell eine Dimerisierung zur Erhöhung der apparenten Bindungsstärke durch Aviditätseffekte dienen.

Die detaillierte Analyse des Bindungsmodus zeigte ein abweichendes Bindungsverhalten von bisher untersuchten Antikörpern, künstlichen Bindeproteinen und kleinen Effektormolekülen. Die Ursache hierfür konnte anhand der Daten nicht geklärt werden, liegt aber vermutlich im Epitop. Um den molekularen Bindungsmechanismus im Detail zu ergründen, ist die Aufklärung einer hochaufgelösten Komplexstruktur mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie notwendig. Erste Experimente diesbezüglich wurden bereits durchgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlgren, S., Wällberg, H., Tran, T. A., Widström, C., Hjertman, M., Abrahmsén, L., Berndorff, D., Dinkelborg, L. M., Cyr, J. E., Feldwisch, J., Orlova, A. und Tolmachev, V. (2009). Targeting of HER2-Expressing Tumors with a Site-Specifically ^{99m}Tc-Labeled Recombinant Affibody Molecule, ZHER2:2395, with C-Terminally Engineered Cysteine. *J Nucl Med* 50, 781-789.
- Alam, S. L., Sun, J., Payne, M., Welch, B. D., Blake, B. K., Davis, D. R., Meyer, H. H., Emr, S. D. und Sundquist, W. I. (2004). Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J* 23, 1411-1421.
- Alzani, R., Cozzi, E., Corti, A., Temponi, M., Trizio, D., Gigli, M. und Rizzo, V. (1995). Mechanism of suramin-induced deoligomerization of tumor necrosis factor. *alpha. Biochemistry* 34, 6344-6350.
- Amstutz, P., Binz, H. K., Parizek, P., Stumpp, M. T., Kohl, A., Grütter, M. G., Forrer, P. und Plückthun, A. (2005). Intracellular Kinase Inhibitors Selected from Combinatorial Libraries of Designed Ankyrin Repeat Proteins. *J Biol Chem* 280, 24715-24722.
- Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. und Plückthun, A. (2001). In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* 12, 400-405.
- Arakawa, T., Visger, J. V., McGinley, M., Rohde, M. F., Fox, G. M. und Narhi, L. O. (1990). Alteration in folding efficiency and conformation of recombinant human tumor necrosis factor- α by replacing cysteines 69 and 101 with aspartic acid 69 and arginine 101. *Protein Eng, Des Sel* 3, 721-724.
- Balkwill, F. (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 409-416.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.-J., Broger, C., Loetscher, H. und Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF[β] complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-445.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. und Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 10, 345-352.
- Beckman, R. A., Weiner, L. M. und Davis, H. M. (2007). Antibody constructs in cancer therapy. *Cancer* 109, 170-179.
- Beutler, B. und Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 320, 584-588.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. und Pluckthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol* 22, 575-582.
- Binz, H. K., Amstutz, P. und Pluckthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol* 23, 1257-1268.
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P. und Plückthun, A. (2003). Designing Repeat Proteins: Well-expressed, Soluble and Stable Proteins from Combinatorial Libraries of Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *J Mol Biol* 332, 489-503.

- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J. und Cerretti, D. P.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-[alpha] from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Boder, E. T. und Wittrup, K. D.** (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15, 553-557.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M. und Rudolph, R.** (2008). High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expression Purif* 58, 114-121.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M.** (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R.** (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression Purif* 43, 1-9.
- Byla, P., Andersen, M. H., Holtet, T. L., Jacobsen, H., Munch, M., Gad, H. H., Thøgersen, H. C. und Hartmann, R.** (2010). Selection of a Novel and Highly Specific Tumor Necrosis Factor [alpha] (TNF [alpha]) Antagonist. *J Biol Chem* 285, 12096.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. und Williamson, B.** (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.
- Chan, D. S.-H., Lee, H.-M., Yang, F., Che, C.-M., Wong, C. C. L., Abagyan, R., Leung, C.-H. und Ma, D.-L.** (2010). Structure-Based Discovery of Natural-Product-like TNF- α Inhibitors. *Angew Chem, Int Ed* 49, 2860-2864.
- Chen, Z. J. und Sun, L. J.** (2009). Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Mol Cell* 33, 275-286.
- Chernomordik, V., Hassan, M., Lee, S. B., Zielinski, R., Gandjbakhche, A. und Capala, J.** (2010). Quantitative Analysis Of Her2 Receptor Expression In Vivo By Near-infrared Optical Imaging. *Mol Imaging* 9, 192.
- Chester, K. A. und Hawkins, R. E.** (1995). Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol* 13, 294-300.
- Corti, A., Fassina, G., Marcucci, F., Barbanti, E. und Cassani, G.** (1992a). Oligomeric tumour necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. *Biochem J* 284, 905-910.
- Corti, A., Fassina, G., Marcucci, F. und Cassani, G.** (1992b). Antigenic regions of tumor necrosis factor alpha and their topographic relationships with structural/functional domains. *Mol Immunol* 29, 471-479.
- Creasey, A. A., Doyle, L. V., Reynolds, M. T., Jung, T., Lin, L. S. und Vitt, C. R.** (1987). Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel muteins on tumor and normal cell lines. *Cancer Res* 47, 145-149.

-
- Curnis, F. und Corti, A.** (2004). Production and characterization of recombinant human and murine TNF. *Methods Mol Med* 98, 9-22.
- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S. und Wyns, L.** (2006). Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4586.
- Demarest, S. J., Chen, G., Kimmel, B. E., Gustafson, D., Wu, J., Salbato, J., Poland, J., Elia, M., Tan, X., Wong, K., Short, J. und Hansen, G.** (2006). Engineering stability into *Escherichia coli* secreted Fabs leads to increased functional expression. *Protein Eng, Des Sel* 19, 325-336.
- Dimitrov, D. S. und Marks, J. D.** (2009). Therapeutic antibodies: Current state and future trends - is a paradigm change coming soon. *Methods Mol Biol* 525, 1-27.
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G. J., Muyldermans, S., Wyns, L. und Matagne, A.** (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11, 500-515.
- Ebersbach, H., Fiedler, E., Scheuermann, T., Fiedler, M., Stubbs, M. T., Reimann, C., Proetzel, G., Rudolph, R. und Fiedler, U.** (2007). Affilin-Novel Binding Molecules Based on Human $[\gamma]$ -B-Crystallin, an All $[\beta]$ -Sheet Protein. *J Mol Biol* 372, 172-185.
- Eck, M. J. und Sprang, S. R.** (1989). The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264, 17595-17605.
- Ecker, D. J., Butt, T. R., Marsh, J., Sternberg, E. J., Margolis, N., Monia, B. P., Jonnalagadda, S., Khan, M. I., Weber, P. L. und Mueller, L.** (1987). Gene synthesis, expression, structures, and functional activities of site-specific mutants of ubiquitin. *J Biol Chem* 262, 14213-14221.
- Engvall, E. und Perlmann, P.** (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 8, 871-874.
- Faustman, D. und Davis, M.** (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discovery* 9, 482-493.
- Fiedler, E., Fiedler, M., Proetzel, G., Scheuermann, T., Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2006). Affilin(TM) Molecules: Novel Ligands for Bioseparation. *Food Bioprod Process* 84, 3-8.
- Fiedler, M., Fiedler, U. und Rudolph, R.** (2004). Generation of artificial binding proteins on the basis of ubiquitin proteins. International Patent Application WO/2004/106368.
- Fisher, R. D., Wang, B., Alam, S. L., Higginson, D. S., Robinson, H., Sundquist, W. I. und Hill, C. P.** (2003). Structure and Ubiquitin Binding of the Ubiquitin-interacting Motif. *J Biol Chem* 278, 28976-28984.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P. und Menart, V.** (2002). Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor- α drastically changes its properties. *TheScientificWorld J* 2, 1312-1325.
- Francisco, J. A., Campbell, R., Iverson, B. L. und Georgiou, G.** (1993). Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10444-10448.
-

- Freskgaard, P.-O., Maartensson, L.-G., Jonasson, P., Jonsson, B.-H. und Carlsson, U.** (1994). Assignment of the Contribution of the Tryptophan Residues to the Circular Dichroism Spectrum of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* 33, 14281-14288.
- Garcia-Ibancieta, D., Bokov, M., Cherkasov, V., Sveshnikov, P. und Hanson, S. F.** (2008). Simple method for production of randomized human tenth fibronectin domain III libraries for use in combinatorial screening procedures. *BioTechniques* 44, 559-563.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook. J. M. Walker, Humana Press, 571-607
- Gebauer, M. und Skerra, A.** (2009). Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13, 245-255.
- Gerth, M. L., Patrick, W. M. und Lutz, S.** (2004). A second-generation system for unbiased reading frame selection. *Protein Eng, Des Sel* 17, 595-602.
- Ghezzi, P. und Cerami, A.** (2005). Tumor necrosis factor as a pharmacological target. *Mol Biotechnol* 31, 239-244.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. und Plueckthun, A.** (1990). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29, 1362-1367.
- Goldberg, M., Knudsen, K. L., Platt, D., Kohen, F., Bayer, E. A. und Wilchek, M.** (1991). Specific interchain crosslinking of antibodies using bismaleimides. Repression of ligand leakage in immunoaffinity chromatography. *Bioconjugate Chem* 2, 275-280.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G. und Scheurich, P.** (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 570-575.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M. und Allison, T. J.** (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 13, 3245.
- Hanes, J. und Plückthun, A.** (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-4942.
- Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. und Plückthun, A.** (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat Biotechnol* 18, 1287-1292.
- He, M. M., Smith, A. S., Oslob, J. D., Flanagan, W. M., Braisted, A. C., Whitty, A., Cancilla, M. T., Wang, J., Lugovskoy, A. A. und Yoburn, J. C.** (2005). Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science* 310, 1022-1025.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Ann Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. und Fiedler, M.** (2005). Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol* 23, 514-522.
- Hilvert, D.** (2000). CRITICAL ANALYSIS OF ANTIBODY CATALYSIS. *Ann Rev Biochem* 69, 751-793.

-
- Hoffmann, A.** (2006). Künstliche Bindeproteine auf der Grundlage von SUMO-2 (Diplomarbeit). Halle/S., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Holliger, P. und Hudson, P. J.** (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- Hudson, P. J. und Souriau, C.** (2003). Engineered antibodies. *Nat Med* 9, 129-134.
- Hurley, J. H., Lee, S. und Prag, G.** (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-372.
- Idriss, H. T. und Naismith, J. H.** (2000). TNF-alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184-195.
- Janeway, C. A., Travers, P. und Walport, M.** (2001). Immunobiology: the immune system in health and disease, 5. Auflage. New York, Garland Science.
- Jespers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G. und Hoogenboom, H. R.** (1994). Guiding the Selection of Human Antibodies from Phage Display Repertoires to a Single Epitope of an Antigen. *Nat Biotechnol* 12, 899-903.
- Jonsson, A., Wallberg, H., Herne, N., Stahl, S. und Frejd, F. Y.** (2009). Generation of tumour necrosis factor alpha-specific affibody molecules capable of blocking receptor binding in vitro. *Biotechnol Appl Biochem* 54, 93-103.
- Kamionka, M.** (2011). Engineering of Therapeutic Proteins Production in Escherichia coli. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 268-274.
- Kang, R. S., Daniels, C. M., Francis, S. A., Shih, S. C., Salerno, W. J., Hicke, L. und Radhakrishnan, I.** (2003). Solution Structure of a CUE-Ubiquitin Complex Reveals a Conserved Mode of Ubiquitin Binding. *Cell* 113, 621-630.
- Kaymakcalan, Z., Sakorafas, P., Bose, S., Scesney, S., Xiong, L., Hanzatian, D. K., Salfeld, J. und Sasso, E. H.** (2009). Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* 131, 308-316.
- Kelley, B.** (2009). Industrialization of mAb production technology The bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs* 1, 443-452.
- Kenig, M., Peternel, S., Gaberc-Porekar, V. und Menart, V.** (2006). Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag removal in purification of recombinant proteins. *J. Chromatogr., A* 1101, 293-306.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., Butt, T. R. und Roder, H.** (1993). Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin. *Biochemistry* 32, 7054-7063.
- Kim, H. J., Eichinger, A. und Skerra, A.** (2009). High-Affinity Recognition of Lanthanide(III) Chelate Complexes by a Reprogrammed Human Lipocalin 2. *J Am Chem Soc* 131, 3565-3576.
- Köhler, G. und Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kohno, T., Tam, L.-T. T., Stevens, S. R. und Louie, J. S.** (2006). Binding Characteristics of Tumor Necrosis Factor Receptor-Fc Fusion Proteins vs Anti-Tumor Necrosis Factor mAbs. *J Invest Derm Symp* P 12, 5-8.
-

-
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. und Koide, S.** (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* 284, 1141-1151.
- Kronqvist, N., Löfblom, J., Jonsson, A., Wernérus, H. und Ståhl, S.** (2008). A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. *Protein Eng, Des Sel* 21, 247-255.
- Lange, O. F., Lakomek, N.-A., Farès, C., Schröder, G. F., Walter, K. F. A., Becker, S., Meiler, J., Grubmüller, H., Griesinger, C. und de Groot, B. L.** (2008). Recognition Dynamics Up to Microseconds Revealed from an RDC-Derived Ubiquitin Ensemble in Solution. *Science* 320, 1471-1475.
- Lee, S., Tsai, Y. C., Mattera, R., Smith, W. J., Kostelansky, M. S., Weissman, A. M., Bonifacino, J. S. und Hurley, J. H.** (2006). Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol Biol* 13, 264-271.
- Lehmann, A.** (2008). Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery. *Expert Opin Biol Ther* 8, 1187-1199.
- Lejeune, F. J., Liénard, D., Matter, M. und Ruegg, C.** (2006). Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 6, 186–191.
- Ley, A. C., Markland, W. und Ladner, R. C.** (1996). Obtaining a family of high-affinity, high-specificity protein inhibitors of plasmin and plasma kallikrein. *Mol Diversity* 2, 119-124.
- Lipovsek, D., Lippow, S. M., Hackel, B. J., Gregson, M. W., Cheng, P., Kapila, A. und Wittrup, K. D.** (2007). Evolution of an interloop disulfide bond in high-affinity antibody mimics based on fibronectin type III domain and selected by yeast surface display: molecular convergence with single-domain camelid and shark antibodies. *J Mol Biol* 368, 1024-1041.
- Lu, R. C., Guo, X. R., Jin, C. und Xiao, J. X.** (2009). NMR studies on binding sites and aggregation-disassociation of fluorinated surfactant sodium perfluorooctanoate on protein ubiquitin. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 1790, 134-140.
- Majetschak, M.** (2011). Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukocyte Biol* 89, 205-219.
- Makhatadze, G. I., Lopez, M. M., Richardson, J. M. und Thomas, S. T.** (1998). Anion binding to the ubiquitin molecule. *Protein Sci* 7, 689-697.
- Markland, W., Ley, A. C. und Ladner, R. C.** (1996). Iterative Optimization of High-Affinity Protease Inhibitors Using Phage Display. 2. Plasma Kallikrein and Thrombin. *Biochemistry* 35, 8058-8067.
- Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van Der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M.-J., Semon, D., MÜLLER, R., Ruyschaert, M.-R., Van Vliet, A. und Fiers, W.** (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. *Eur J Biochem* 152, 515-522.
- Martin, A., Sieber, V. und Schmid, F. X.** (2001). In-vitro Selection of Highly Stabilized Protein Variants with Optimized Surface. *J Mol Biol* 309, 717-726.
- Matsuura, T. und Plückthun, A.** (2003). Selection based on the folding properties of proteins with ribosome display. *FEBS Lett* 539, 24-28.
- Melchior, F.** (2000). SUMO-nonclassical ubiquitin. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
-

- Metz, S., Haas, A. K., Daub, K., Croasdale, R., Stracke, J., Lau, W., Georges, G., Josel, H.-P., Dziadek, S., Hopfner, K.-P., Lammens, A., Scheuer, W., Hoffmann, E., Mundigl, O. und Brinkmann, U.** (2011). Bispecific digoxigenin-binding antibodies for targeted payload delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, DOI: 10.1073/pnas.1018565108.
- Miura, T., Klaus, W., Gsell, B., Miyamoto, C. und Senn, H.** (1999). Characterization of the binding interface between ubiquitin and class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J Mol Biol* 290, 213-228.
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T. und Chothia, C.** (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* 247, 536-540.
- Naguwa, S. M.** (2005). Tumor necrosis factor inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1051, 709-715.
- Narachi, M. A., Davis, J. M., Hsu, Y. R. und Arakawa, T.** (1987). Role of single disulfide in recombinant human tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 262, 13107-13110.
- Nesterenko, M. V., Tilley, M. und Upton, S. J.** (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 28, 239-242.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. und Nygren, P.-A.** (1997). Binding proteins selected from combinatorial libraries of an $[\alpha]$ -helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* 15, 772-777.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhlén, M. und Nygren, P.-Å.** (2000). Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and Taq DNA polymerase. *J Biotechnol* 80, 45-54.
- Odegrip, R., Coomber, D., Eldridge, B., Hederer, R., Kuhlman, P. A., Ullman, C., FitzGerald, K. und McGregor, D.** (2004). CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2806-2810.
- Pace, C. N. und Scholtz, J. M.** (1997). Measuring the conformational stability of a protein. *Protein Structure: A practical approach*. T. E. Creighton. Oxford, UK, Oxford University Press, 299-321.
- Paquet, A., Lévesque, A. und Pagé, M.** (1994). Rapid purification method for human recombinant tumor necrosis factor α . *J Chromatogr, A* 667, 125-130.
- Paschke, M. und Höhne, W.** (2005). A twin-arginine translocation (Tat)-mediated phage display system. *Gene* 350, 79-88.
- Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A. G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P. P., Polo, S. und Schneider, T. R.** (2006). Crystal Structure of the Ubiquitin Binding Domains of Rabex-5 Reveals Two Modes of Interaction with Ubiquitin. *Cell* 124, 1183-1195.
- Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B. und Goeddel, D. V.** (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.
- Petyovka, N., Lyach, L. und Voitenok, N. N.** (1995). Homologous ELISA for detection of oligomeric human TNF: properties of the assay. *J Immunol Methods* 186, 161-170.

- Poesi, C., Albertini, A., Ghielmi, S., Cassani, G. und Corti, A.** (1993). Kinetic analysis of TNF-[alpha] oligomer-monomer transition by surface plasmon resonance and immunochemical methods. *Cytokine* 5, 539-545.
- Prag, G., Misra, S., Jones, E. A., Ghirlando, R., Davies, B. A., Horazdovsky, B. F. und Hurley, J. H.** (2003). Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p. *Cell* 113, 609-620.
- Reichert, J. M.** (2010). Antibodies to watch in 2010. *mAbs* 2, 84-100.
- Riazance-Lawrence, J. H., Toumadje, A. und Johnson Jr, W. C.** (1991a). The circular dichroism of tumor necrosis factor-alpha : Measurement into the vacuum UV and analysis for secondary structure. *Chirality* 3.
- Riazance-Lawrence, J. H., Toumadje, A. und Johnson, W. C.** (1991b). The circular dichroism of tumor necrosis factor- α : Measurement into the vacuum UV and analysis for secondary structure. *Chirality* 3, 254-256.
- Richardson, J. S. und Richardson, D. C.** (1989). Principles and patterns of protein conformation. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation. G. D. Fasman. New York, Plenum Press, 1-98.
- Roberts, R. W. und Szostak, J. W.** (1997). RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12297-12302.
- Rönmark, J., Kampf, C., Asplund, A., Höidén-Guthenberg, I., Wester, K., Pontén, F., Uhlén, M. und Nygren, P.-Å.** (2003). Affibody-[beta]-galactosidase immunoconjugates produced as soluble fusion proteins in the Escherichia coli cytosol. *J Immunol Methods* 281, 149-160.
- Rutgeerts, P., Vermeire, S. und Van Assche, G.** (2009). Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol* 136, 1182-1197.
- Saijo, S., Watanabe, N. und Kobayashi, Y.** (1995). Comparison of Reactivity of Monoclonal Antibody (3F2) to Trimeric Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha) with That to Monomeric TNF-alpha. *J Biochem* 118, 28-32.
- Sakai, T., Tochio, H., Tenno, T., Ito, Y., Kokubo, T., Hiroaki, H. und Shirakawa, M.** (2006). In-cell NMR spectroscopy of proteins inside Xenopus laevis oocytes. *J Biomol NMR* 36, 179-188.
- Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X. Y., Shealy, D. und Wagner, C.** (2002). Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 418-426.
- Schlehuber, S. und Skerra, A.** (2002). Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant - a so-called 'anticalin' - using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.
- Schmid, F. X.** (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. Protein Structure: A practical approach. T. E. Creighton. Oxford, UK, Oxford University Press, 261-297.
- Schneider, D. M., Dellwo, M. J. und Wand, A. J.** (1992). Fast internal main-chain dynamics of human ubiquitin. *Biochemistry* 31, 3645-3652.

-
- Schraeml, M. und Fiedler, E.** (2008). Artificial binding proteins based on a modified alpha-helical region of ubiquitin. International Patent Application WO/2008/059011.
- Sherman, F., Stewart, J. W. und Tsunasawa, S.** (1985). Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* 3, 27-31.
- Shirai, T., Yamaguchi, H., Ito, H., Todd, C. W. und Wallace, R. B.** (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumour necrosis factor. *Nature* 313, 803-806.
- Silverman, J., Lu, Q., Bakker, A., To, W., Duguay, A., Alba, B. M., Smith, R., Rivas, A., Li, P., Le, H., Whitehorn, E., Moore, K. W., Swimmer, C., Perlroth, V., Vogt, M., Kolkman, J. und Stemmer, W. P. C.** (2005). Multivalent avimer proteins evolved by exon shuffling of a family of human receptor domains. *Nat Biotechnol* 23, 1556-1561.
- Skerra, A. und Plückthun, A.** (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038.
- Smith, G. P.** (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, R. A. und Baglioni, C.** (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 262, 6951.
- Soskine, M. und Tawfik, D. S.** (2010). Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat Rev Genet* 11, 572-582.
- Souriau, C., Chiche, L., Irving, R. und Hudson, P.** (2005). New Binding Specificities Derived from Min-23, a Small Cystine-Stabilized Peptidic Scaffold. *Biochemistry* 44, 7143-7155.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K. und Phelps, D.** (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28, 4117-4125.
- Steiner, D., Forrer, P. und Plückthun, A.** (2008). Efficient selection of DARPin s with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J Mol Biol* 382, 1211-1227.
- Studier, F. W.** (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression Purif* 41, 207-234.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Sundberg, E. J. und Mariuzza, R. A.** (2002). Molecular recognition in antibody-antigen complexes. *Adv Protein Chem* 61, 119-160.
- Sundquist, W. I., Schubert, H. L., Kelly, B. N., Hill, G. C., Holton, J. M. und Hill, C. P.** (2004). Ubiquitin Recognition by the Human TSG101 Protein. *Mol Cell* 13, 783-789.
- Swanson, K. A., Kang, R. S., Stamenova, S. D., Hicke, L. und Radhakrishnan, I.** (2003). Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J* 22, 4597-4606.
-

- Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'Connell, T. und O'Connell, D.** (2008). A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *BioTechniques* 45, 340-3.
- Van Ostade, X., Tavernier, J. und Fiers, W.** (1994). Structure-activity studies of human tumour necrosis factors. *Protein Eng* 7, 5-12.
- Veesler, D., Dreier, B., Blangy, S., Lichi re, J., Tremblay, D., Moineau, S., Spinelli, S., Tegoni, M., Plückthun, A., Campanacci, V. und Cambillau, C.** (2009). Crystal Structure and Function of a DARPin Neutralizing Inhibitor of Lactococcal Phage TP901-1. *J Biol Chem* 284, 30718-30726.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. und Cook, W. J.** (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-544.
- Virnek s, B., Ge, L., Plückthun, A., Schneider, K. C., Wellnhofer, G. und Moroney, S. E.** (1994). Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 22, 5600-5607.
- Voshol, H., Ehrat, M., Traenkle, J., Bertrand, E. und van Oostrum, J.** (2009). Antibody-based proteomics. *FEBS J* 276, 6871-6879.
- Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R. und Fersht, A. R.** (1993). Circular dichroism studies of barnase and its mutants: Characterization of the contribution of aromatic side chains. *Biochemistry* 32, 10303-10313.
- Weber, W. A., Czernin, J., Phelps, M. E. und Herschman, H. R.** (2008). Technology Insight: novel imaging of molecular targets is an emerging area crucial to the development of targeted drugs. *Nat Clin Prac Oncol* 5, 44-54.
- Weiner, L. M.** (2006). Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J Immunother* 29, 1-9.
- Wiederstein, M. und Sippl, M. J.** (2005). Protein Sequence Randomization: Efficient Estimation of Protein Stability Using Knowledge-based Potentials. *J Mol Biol* 345, 1199-1212.
- Wingfield, P., Pain, R. H. und Craig, S.** (1987). Tumour necrosis factor is a compact trimer. *FEBS Lett* 211, 179-184.
- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R. G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A. C., Liu, H., Lohse, P. A. und Sun, L.** (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol* 9, 933-942.
- Yeh, E. T. H., Gong, L. und Kamitani, T.** (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.
- Yin, C. C., Ren, L. L., Zhu, L. L., Wang, X. B., Zhang, Z., Huang, H. L. und Yan, X. Y.** (2008). Construction of a Fully Synthetic Human scFv Antibody Library with CDR3 Regions Randomized by a Split-Mix-Split Method and Its Application. *J Biochem* 144, 591.
- Yuan, X., Simpson, P., McKeown, C., Kondo, H., Uchiyama, K., Wallis, R., Dreveny, I., Keetch, C., Zhang, X., Robinson, C., Freemont, P. und Matthews, S.** (2004). Structure, dynamics and interactions of p47, a major adaptor of the AAA ATPase, p97. *EMBO J* 23, 1463-1473.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M. T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H. K., Waibel, R. und Plückthun, A.** (2010). Efficient

Tumor Targeting with High-Affinity Designed Ankyrin Repeat Proteins: Effects of Affinity and Molecular Size. *Cancer Res* 70, 1595-1605.

Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J. M., Steiner, D., Lawrence, M. C., McKern, N. M., Pecorari, F., Ward, C. W., Joos, T. O. und Plückthun, A. (2007). A Designed Ankyrin Repeat Protein Evolved to Picomolar Affinity to Her2. *J Mol Biol* 369, 1015-1028.

Zhu, L., van de Lavoie, M.-C., Albanese, J., Beenhouwer, D. O., Cardarelli, P. M., Cuison, S., Deng, D. F., Deshpande, S., Diamond, J. H., Green, L., Halk, E. L., Heyer, B. S., Kay, R. M., Kerchner, A., Leighton, P. A., Mather, C. M., Morrison, S. L., Nikolov, Z. L., Passmore, D. B., Pradas-Monne, A., Preston, B. T., Rangan, V. S., Shi, M., Srinivasan, M., White, S. G., Winters-Digiacinto, P., Wong, S., Zhou, W. und Etches, R. J. (2005). Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat Biotechnol* 23, 1159-1169.

Anhang

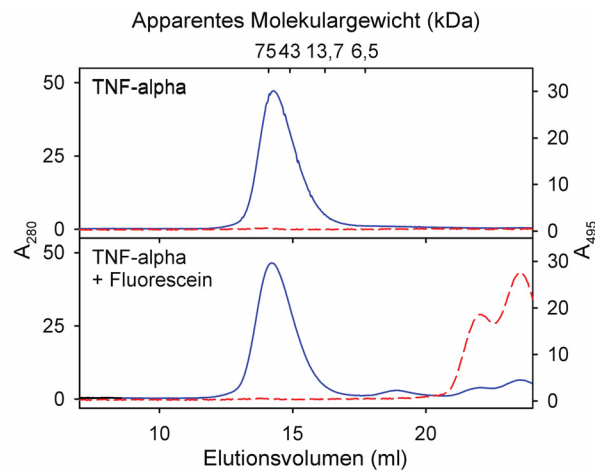


Abbildung A1: Analytische Größenausschlusschromatographie von Fluorescein mit TNF-alpha.

NHS-Fluorescein wurde in Wasser gelöst und zur Inaktivierung mit 1 M Tris versetzt. 20 μ M TNF-alpha mit bzw. ohne 9 μ M inaktiviertem NHS-Fluorescein wurden mit einer Flussrate von 0,6 ml/min auf eine Superose 12 10/300 GL-Säule aufgetragen. Als Laufpuffer diente PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 mit 0,05 % Tween-20. Die Detektion erfolgte bei 280 nm für TNF-alpha (blaue Linie) und 495 nm für Fluorescein (rote, gestrichelte Linie).

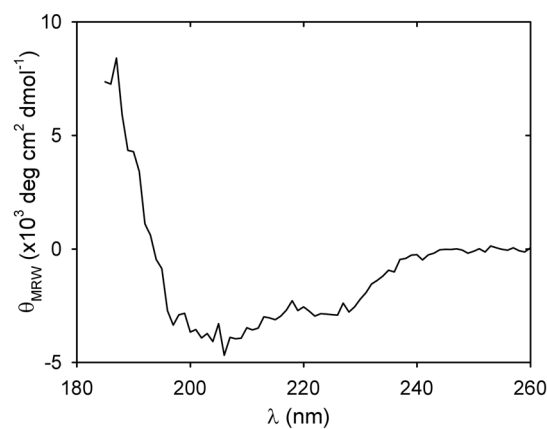


Abbildung A2: Differenz-CD-Spektrum von der Ubiquitin-Variante 10F und Ubiquitin F45W.

Das CD-Spektrum von Ubiquitin F45W wurde von dem der Ubiquitin-Variante 10F abgezogen.

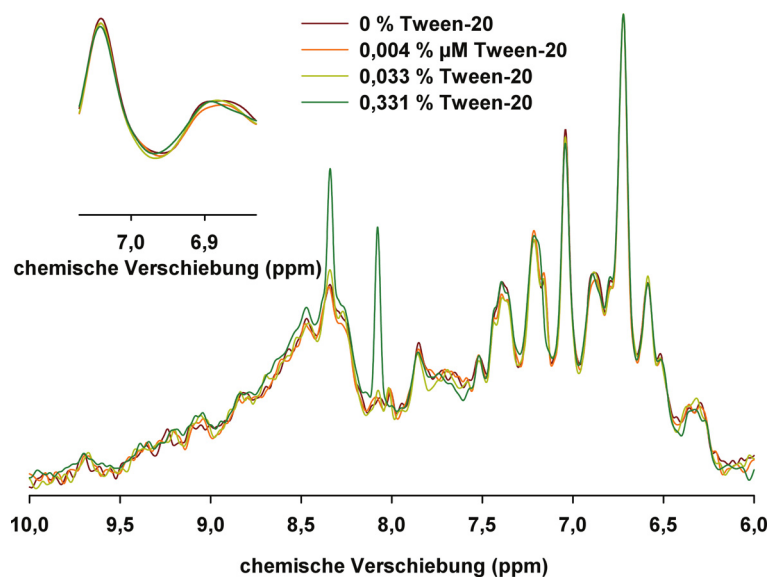


Abbildung A3: ^1H -NMR-Spektrum von TNF-alpha mit und ohne Detergens Tween-20.

^1H -NMR-Spektren von TNF- α in PBS, 1 mM EDTA pH 7,4 mit verschiedenen Tween-20-Konzentrationen wurden bei 20 °C aufgenommen. Dargestellt ist der Bereich der Amidprotonen. Die Änderung der Feinstrukturen zeigt lokale Veränderungen der Tertiärstruktur. Der Ausschnitt oben links zeigt eine Tween-20-abhängige Tieffeld-Verschiebung des Peakmaximums bei 6,9 ppm. Für die Methylprotonen wurden keine signifikanten Differenzen zwischen den Spektren beobachtet. Die Peaks bei 8,4 und 8,1 ppm bei 0,331 % Tween-20 konnten in Pufferspektren dem Detergens zugeordnet werden.

Danksagung

Für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit unter seiner Betreuung zu promovieren, möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Rainer Rudolph danken. Sein Interesse, seine Diskussionsbereitschaft und seine unkomplizierte Art bei der Betreuung haben mir sehr geholfen.

Nach dem unerwarteten Tod von Prof. Rudolph wurde die Betreuung freundlicherweise durch Herrn PD Dr. Hauke Lilie übernommen. Dafür gilt ihm mein großer Dank. Sein kritisches Interesse und die Diskussionsbereitschaft haben die entscheidenden, positiven Impulse zum Gelingen der Arbeit gegeben.

Ohne die unermüdliche Arbeit von Herrn Dr. Sven Pfeifer bei der Schaffung von wirklich hervorragenden Arbeitsbedingungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dafür und für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu promovieren, möchte ich Sven herzlich danken.

Bei der Scil Proteins GmbH (Halle/Saale), insbesondere Frau Dr. Ulrike Fiedler, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Bearbeitung des gewählten Themas und die gute Kooperation bedanken. Ein beträchtlicher Teil der Laborarbeiten war nur möglich durch die Arbeit in den Laboren der Scil Proteins GmbH. Weiterhin möchte ich besonders folgenden Mitarbeitern für ihre Hilfestellungen bei Dingen wie Abfassen einer wissenschaftlichen Arbeit, Protonenkonzentration von Salzsäurelösungen, Primerdesign usw. danken: Markus Fiedler, Erik Fiedler, Arnd Steuernagel, Ede Anton, Michael Schräml, Jörg Nerkamp, Anja Kunert, Manja Gloser und Eva Bosse-Doenecke (beide haben Zellkulturassays durchgeführt).

Frau Prof. Dr. Andrea Sinz und ihren Mitarbeitern der Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, insbesondere Mathias Müller und Christian Ihling, danke ich für ihre hervorragende Betreuung und Durchführung der massenspektrometrischen Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. Jochen Balbach und seinen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Biophysik, vor allem bei Michael Kovermann, möchte ich mich für die exzellente Zusammenarbeit bei den NMR-Experimenten bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Diplomanden Peter, den Bachelorandinnen Anja und Tina und den „HiWi's“ Edgar, Marcus, Kalojan für ihre Zuarbeit bedanken und wünsche ihnen viel Erfolg auf dem Weg zu ihrer eigenen Promotion und im Berufsleben.

Großer Dank gilt natürlich auch der gesamten Nachwuchsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ für das angenehme Klima im Laborleben und darüber hinaus.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Geduld und das Verständnis, die zur Anfertigung der Promotion ihrerseits notwendig waren sowie die Unterstützung auf allen Ebenen.

Claudi, dir danke ich noch einmal besonders für deine Unterstützung!

Publikationen und Poster

Publikationen

Hoffmann, A., Müller, M. Q., Gloser, M., Sinz, A., Rudolph, R. und Pfeifer, S. (2010). Recombinant production of bioactive human TNF-[alpha] by SUMO-fusion system - High yields from shake-flask culture. *Protein Expression Purif* 72, 238-243.

Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R. und Pfeifer, S. New binding mode to TNF-alpha revealed by ubiquitin-based artificial binding protein. Eingereicht bei PLoS ONE, in Überarbeitung.

Poster

Hoffmann, A., Müller, M. Q., Gloser, M., Sinz, A., Rudolph, R. und Pfeifer, S. High yield expression of mature, bioactive TNF-alpha by SUMO-fusion system. PEGS Europe, Hannover (2009).

Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Balbach, J., Rudolph, R. und Pfeifer, S. Insights into the binding mode of an ubiquitin-based binding protein against tumor necrosis factor-alpha. 25th Anniversary Symposium of the Protein Society, Boston (2011)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale),

Andreas Hoffmann

Angaben zur Person

Familienname:	Hoffmann
Vorname:	Andreas
vorhandener akademischer Grad:	Diplom-Biochemiker
Geburtsdatum:	19. September 1981
Geburtsort:	Köthen/Anhalt
Geschlecht:	männlich
Wohnsitz und Korrespondenzanschrift:	Eichendorffstraße 29a 06114 Halle
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Fachgebiet der Promotion:	Biochemie
Bildungsgang:	
1988 – 1992	Grundschule Sigmund Jähn, Köthen
1992 – 06/2000	Gymnasium An der Rüsternbreite, Köthen Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)
07/2000 – 04/2001	Grundwehrdienst
10/2001 - 07/2006	Studium Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss Diplom (Note 1,1) Thema der Diplomarbeit: „Künstliche Bindeproteine auf der Grundlage von SUMO-2“ angefertigt bei der Scil Proteins GmbH, Halle (Saale)
10/2006 - 12/2007	Forschungsstipendiat der Graduiertenförderung des Landes Sachsen-Anhalt in der InnoProfile- Nachwuchsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Anfertigung der Promotionsarbeit unter Prof. Dr. Rainer Rudolph
01/2008 - heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei InnoProfile-Nachwuchsgruppe „Künstliche Bindeproteine“ von Dr. Sven Pfeifer Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Anfertigung der Promotionsarbeit unter Prof. Dr. Rainer Rudolph bzw. ab 12/2009 unter PD Dr. habil. Hauke Lilie
