Dissertation



Artifizielle Bindeproteine auf der Basis des ultrastabilen *scaffold* Proteins M7



Claudius Stordeur



Artifizielle Bindeproteine auf der Basis des ultrastabilen *scaffold* Proteins M7

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

vorgelegt der

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

von

Claudius Stordeur geboren am 21.08.1982 in Halle/Saale

Gutachter: Dr. Sven Pfeifer Prof. Dr. Rudolf Glockshuber Prof. Dr. Mike Schutkowski Tag der öffentlichen Verteidigung: 30.09.2013

Zusammenfassung

Künstliche Bindeproteine befinden sich seit zirka 20 Jahren in der Entwicklung und auf dem Weg, ein wichtiges molekulares Werkzeug für Forschung und Diagnostik zu werden. Genau wie die Antikörper sind künstliche Bindeproteine dabei in der Lage, nahezu jede gewünschte Zielstruktur zu erkennen. Um die Bandbreite an krankheitsrelevanten Zielstrukturen experimentell bearbeiten zu können, muss mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Gerüstproteinen, sogenannten *scaffolds*, und Selektionssystemen gearbeitet werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung des Proteins M7 als neues Gerüstprotein. Das 92 Aminosäuren große und äußerst stabile ($\Delta G_U = 79 \text{ kJ/mol}$) Protein M7 lässt sich einfach in großen Mengen in *E. coli* Zellen herstellen und bildet deshalb eine ideale Grundlage für die Erzeugung neuer künstlicher Bindeproteine. Zehn Lösungsmittel-exponierte Reste auf dem fünfsträngigen β -Faltblatt des Proteins, welche eine Fläche von 645 Å² bilden, wurden für einen Randomisierungsprozess verwendet. Die Zufallsmutagenese aller zehn Reste gleichzeitig sollte einen neuen Oberflächenbereich mit hoher Diversität, ähnlich den Bindungsstellen von Antikörpermolekülen, schaffen. Dazu wurde eine DNA-Bibliothek erstellt, auf ihre Funktionalität hin untersucht und weiter evolviert. Schließlich konnte eine finale Bibliothek mit einer Komplexität von $6,27 \times 10^9$ Spezies erzeugt werden. Für diese erstmalig erstellte, auf dem *scaffold* M7 basierende Bibliothek, wurde im Rahmen dieser Arbeit als Selektionssystem das Ribosomen-*display* etabliert.

Es wurde eine Selektion über sechs Runden gegen das pharmakologisch relevante Zielprotein TNF α durchgeführt und anschließend über ein halbautomatisiertes Verfahren bindende Varianten identifiziert. Drei der so gefundenen Varianten wurden gereinigt und näher charakterisiert. Sie zeigten Affinitäten zwischen 7 und 120 μ M. Die Analyse der Komplexe wurde allerdings durch eine schnelle Dissoziationsgeschwindigkeit wesentlich erschwert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der A β (1-42) Fibrillen bindenden Proteinvariante 4.G11, die ebenfalls aus der M7 Bibliothek selektiert wurde. Für diese Variante konnte ein K_D-Wert von 21 µM bestimmt werden. 4.G11 ist in der Lage, Fibrillen verschiedener amyloidogener Proteine konformationsspezifisch zu binden. Unter dem Einfluss von 4.G11 konnte eine wesentliche Verlangsamung der Fibrillenbildung von A β (1-40) Peptiden nachgewiesen werden. Die Interaktion der Proteinvariante mit der Fibrille verändert die molekularen Eigenschaften der Fibrille. Über einen bis jetzt unverstandenen Mechanismus führt eine Bindung von 4.G11 zur Fragmentierung von A β (1-42) und A β (1-40) Fibrillen, ein Effekt, welcher konzentrationsabhängig auftritt und bei Fibrillen anderen proteinogenen Ursprungs nicht gezeigt werden konnte. Erste Messungen deuten darauf hin, dass die entstandenen Fragmente weder den bekannten Protofibrillen, noch den bekannten oligomeren Zuständen von A β (1-42) entsprechen. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig den Effekt der Fragmentierung von Fibrillen durch ein konformationsspezifisches Bindeprotein.

Anhand der erzielten Selektionserfolge konnte eindeutig die Eignung des Proteins M7 als *scaffold* nachgewiesen werden.

Zusamm	enfassung	I
Inhaltsve	erzeichnis	II
Abkürzu	ngsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Künstliche Bindeproteine	2
1.2	Das Protein M7	5
1.3	Selektionssysteme	8
1.4	Die Zielmoleküle	8
1.4.1	Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα)	9
1.4.2	Reife Aβ(1-42) Fibrillen	12
1.5	Zielstellung	17
2	Materialien	18
2.1	Chemikalien	18
2.2	Puffer und Lösungen	20
2.3	Nährmedien und Antibiotika	21
2.4	Enzyme und andere Proteine	22
2.5	Standards und Kits	23
2.6	Oligonukleotide	23
2.7	Plasmide	24
2.8	Mikroorganismen	25
2.9	Geräte und Zubehör	25
2.10	Sonstige Materialen	28
2.11	Software	29
3	Methoden	30
3.1	Mikrobiologische Methoden	30
3.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von E. coli	30
3.1.2	Herstellung kompetenter Zellen	30
3.1.3	Transformation von E. coli Zellen	31
3.1.4	Genexpression	32
3.1.5	Zellernte und Zellaufschluss	32
3.2	Proteinbiochemische Methoden	34
3.2.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	34
3.2.2	Biotinylierung von TNFα	34
3.2.3	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	34
3.2.4	Proteinreinigung mittels IMAC und SEC	35
3.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
3.2.6	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	37
3.2.7	Analytische Größenausschlusschromatographie	38
3.3	Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	39
3.3.2	Agarosegelelektrophorese	39
3.3.3	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	39

3.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
3.3.5	Restriktionsspaltung und Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.3.7	Ethanolfällung von DNA	41
3.3.8	Sequenzanalyse von DNA-Molekülen	42
3.4	Selektion und Evolution durch Ribosomen-display	42
3.4.1	Konstruktion einer DNA-Bibliothek auf Basis des M7-Gens	43
3.4.2	In vitro Translation und Transkription (ITT)	45
3.4.3	Vorbereitung der magnetischen beads	46
3.4.4	Prä-Selektion	46
3.4.5	0. Runde Ribosomen-display	46
3.4.6	Selektion in Lösung	47
3.4.7	Gesamt-RNA Isolierung	47
3.4.8	Reverse-Transkriptase Reaktion	
3.4.9	Real-Time PCR zur Quantifizierung von cDNA	48
3.4.10	Subklonierung von Bibliotheks-DNA	48
3.4.11	Automatisiertes screening im Hochdurchsatz-Verfahren	49
3.5	Herstellung und Analyse von Fibrillen	50
3.5.1	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	51
3.5.2	Fibrillierungskinetik	51
3.5.3	Fragmentierung von reifen Fibrillen durch die Zugabe von 4.G11	51
3.5.4	Zellzytotoxizitätstest	51
3.5.4 4	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse	51 53
3.5.4 4 4.1	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste	51 53 53
3.5.4 4 4.1 4.2	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek	51 53 53 54 55 55 56
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten	51 53 53 53 54 55 55 56 56 58 58 61
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1	Zellzytotoxizitätstest	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Produktion und Reinigung TNFα-bindender Varianten	51 53 53 54 55 55 56 56 58 61 62 62
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten	51 53 53 54 55 55 56 56 58 61 62
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Spezifität und Bindungsstärke TNFα-bindender Varianten Das Bindeprotein 4.G11 Produktion und Reinigung von 4.G11	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2	ZellzytotoxizitätstestErgebnisseAuswahl der zu randomisierenden AminosäureresteEvolution der naïven BibliothekSelektion gegen TNF α Sequenzanalyse und Entwicklung der BibliothekIdentifizierung TNF α -bindender VariantenCharakterisierung von TNF α -bindenden EinzelvariantenSequenzanalyse von drei selektierten VariantenProduktion und Reinigung TNF α -bindender VariantenDas Bindeprotein 4.G11Produktion und Reinigung von 4.G11Spezifität und Bindungsstärke von 4.G11	
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse	51 53 53 54 55 56 58 61 62 64 68 70 73
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3 4.7.4	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNF α Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNF α -bindender Varianten Charakterisierung von TNF α -bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Produktion und Reinigung TNF α -bindender Varianten Spezifität und Bindungsstärke TNF α -bindender Varianten Das Bindeprotein 4.G11 Produktion und Reinigung von 4.G11 Einfluss von 4.G11 auf die Fibrillierungskinetik Einfluss von 4.G11 auf reife Fibrillen	51 53 53 54 55 56 58 61 62 64 68 70 73 75
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3 4.7.4 4.7.5	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNF α Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNF α -bindender Varianten Charakterisierung von TNF α -bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Produktion und Reinigung TNF α -bindender Varianten Das Bindeprotein 4.G11 Produktion und Reinigung von 4.G11 Einfluss von 4.G11 auf die Fibrillierungskinetik Einfluss von 4.G11 auf reife Fibrillen Bestimmung der Toxizität der fragmentierten Fibrillen	51 53 53 54 55 56 58 61 62 64 68 70 73 75 78
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3 4.7.4 4.7.5 5	Zellzytotoxizitätstest Ergebnisse Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste Evolution der naïven Bibliothek Selektion gegen TNFα Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek Identifizierung TNFα-bindender Varianten Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten Produktion und Reinigung TNFα-bindender Varianten Spezifität und Bindungsstärke TNFα-bindender Varianten Das Bindeprotein 4.G11 Produktion und Reinigung von 4.G11 Spezifität und Bindungsstärke von 4.G11 Einfluss von 4.G11 auf die Fibrillierungskinetik Einfluss von 4.G11 auf reife Fibrillen Bestimmung der Toxizität der fragmentierten Fibrillen Diskussion	51 53 53 54 55 56 58 61 62 64 68 70 73 75 78 81
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3 4.7.4 4.7.5 5 5.1	ZellzytotoxizitätstestErgebnisseAuswahl der zu randomisierenden AminosäureresteEvolution der naïven BibliothekSelektion gegen TNF α Sequenzanalyse und Entwicklung der BibliothekIdentifizierung TNF α -bindender VariantenCharakterisierung von TNF α -bindenden EinzelvariantenSequenzanalyse von drei selektierten VariantenSequenzanalyse von drei selektierten VariantenSequenzanalyse von drei selektierten VariantenProduktion und Reinigung TNF α -bindender VariantenSpezifität und Bindungsstärke TNF α -bindender VariantenDas Bindeprotein 4.G11Produktion und Reinigung von 4.G11Spezifität und Bindungsstärke von 4.G11Einfluss von 4.G11 auf die FibrillierungskinetikEinfluss von 4.G11 auf reife FibrillenBestimmung der Toxizität der fragmentierten FibrillenDiskussionQualität der erstellten M7 Bibliothek	51 53 53 54 55 56 58 61 62 64 68 70 73 75 78 81 82
3.5.4 4 4.1 4.2 4.3 4.4 4.5 4.6 4.6.1 4.6.2 4.6.3 4.7 4.7.1 4.7.2 4.7.3 4.7.4 4.7.5 5 5.1 5.2	ZellzytotoxizitätstestErgebnisseAuswahl der zu randomisierenden AminosäureresteEvolution der naïven BibliothekSelektion gegen TNF α Sequenzanalyse und Entwicklung der BibliothekIdentifizierung TNF α -bindender VariantenCharakterisierung von TNF α -bindenden EinzelvariantenSequenzanalyse von drei selektierten VariantenProduktion und Reinigung TNF α -bindender VariantenSpezifität und Bindungsstärke TNF α -bindender VariantenDas Bindeprotein 4.G11Produktion und Reinigung von 4.G11Spezifität und Bindungsstärke von 4.G11Einfluss von 4.G11 auf die FibrillierungskinetikEinfluss von 4.G11 auf die FibrillenBestimmung der Toxizität der fragmentierten FibrillenDiskussionQualität der erstellten M7 Bibliothek	51 53 53 54 55 56 58 61 62 62 64 68 70 73 75 78 81 82 83

6	Ausblick	
7	Literaturverzeichnis	
8	Anhang	103
8.1	DNA Sequenzen	103
8.2	Massenspektrum	105
8.3	Supplementäre Informationen zu 4.G11	105
8.3.1	Selektionsbedingungen	105
8.3.2	IMAC Elutionsprofil von 4.G11	106
8.3.3	Kompetitionsexperiment mit Aβ(1-40) Fibrillen und 4.G11	107
8.3.4	Bedingungen zur Herstellung von Fibrillen	107
Danksagu	ng	109
Eidesstatt	liche Erklärung	110
Publikatio	Publikationen und Poster	
Angaben	Angaben zur Person	

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
AcO ⁻	Acetat (CH ₃ COO ⁻)
AU	Absorptionseinheiten
Ab	Amyloid-beta
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CDR	complementarity determining region (hypervariable Schleifen)
CV	column volume (Säulenvolumen)
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IMAC	Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie
ITT	In vitro Transkriptions/Translations Reaktion
LB-Medium	lysogeny broth Medium
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
min	Minute
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (molekulare Größenausschlussgrenze)
OD _{600 nm}	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p.A.	pro analysi (für die Analyse, analyserein)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Probenpuffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RMSD	root-mean-square deviation
rRNA	ribosomale-Ribonukleinsäure
RU	response units
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEC	Größenausschlusschromatographie/Gelfiltration		
SPR	surface plasmon resonance spectroscopy (Oberflächenplasmonresonanz-		
	Spektroskopie)		
SS	einzelsträngig		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TBS	tris-buffered saline		
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie		
TMB	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine		
TNFα	Tumornekrosefaktor-alpha		
TOF	time of flight (Flugzeit)		
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure		
U	units (Einheiten)		
UTR	untranslated region (nicht translatierte Region)		
UV	ultraviolett		
V _H H	variable heavy chain of a heavy chain antibody		

1 Einleitung

"Es sind die Proteine, welche die eigentliche Maschinerie der Zelle bilden. Bestimmte Proteine (die Enzyme) zerkleinern die Nahrung zu einzelnen Molekülen und bauen daraus wieder andere Moleküle auf, welche die Zelle benötigt; weitere geben der Zelle eine bestimmte Struktur (Strukturproteine), wieder andere sorgen für Bewegungen innerhalb der Zelle (Motorproteine) oder binden Botenstoffe (Rezeptoren). Der größte Teil der Proteine jedoch ist an der Regulation anderer Proteine beteiligt, einschließlich der Steuerung, wie viel von einem bestimmten Protein hergestellt werden soll." (Plückthun 2011).

Bei nahezu jedem dieser biologischen Prozesse findet auf molekularer Ebene ein Bindungsereignis statt. Hormone müssen an ihre Rezeptoren docken, um ihre Wirkung zu entfalten, andere Proteine binden an Proteine, um deren Translokationsorte zu bestimmen oder für den Abbau zu markieren. Einen speziellen Fall stellen dabei die Antikörper dar. Die Immunglobuline der Klasse IgG zum Beispiel bestehen aus zwei leichten und zwei schweren Ketten und hypervariablen Schleifen, welche die Bindefläche repräsentieren. Aufgrund ihrer Diversität sind sie in der Lage, nahezu jede molekulare Struktur zu binden und damit der Immunabwehr zugänglich zu machen. Seit der Erfindung der Hybridom-Technik (Kohler und Milstein 1975), die die Herstellung monoklonaler Antikörper ermöglicht, macht man sich die Diversität und Spezifität der Antikörper auch in der Forschung und Therapie zu Nutze. 1986 wurde der erste Antikörper für therapeutische Zwecke zugelassen. Seit dem sind etliche Antikörper oder Antikörperderivate zur Behandlung am Menschen genehmigt worden. Die Anwendungen reichen dabei von Entzündungskrankheiten bis hin zur Krebstherapie (Nelson et al. 2010, Ruigrok et al. 2011). In Forschung und Diagnostik sind Antikörper nicht mehr wegzudenken und seit Jahrzehnten eine etablierte Technologie, die in fast allen Bereichen der Biowissenschaften eine Anwendung findet. Dennoch besitzen Antikörper auch einige Nachteile, die sie für bestimmte Therapieformen oder Anwendungen unbrauchbar machen. Es sind relativ große Moleküle, die ein kompliziertes disulfidverbrücktes Faltungsmuster aufweisen. Zusätzlich bedingt ihre Funktion bestimmte Glykosylierungen, wodurch sie in aufwändigen Prozessen in eukaryotischen Expressionssystemen hergestellt werden müssen. Weiterhin ist der pH-Bereich, in dem Antikörper stabil sind, limitiert, was ihre Anwendung in der Grundlagenforschung einschränkt. Antikörper sind aufgrund ihrer komplexen Struktur anfällig für Degradation, Aggregation, Modifizierungen (Oxidationsprozesse oder Desaminierungen) und Denaturierung (Ruigrok et al. 2011). Schließlich hat die intensive Forschung an Antikörpern zu einer unübersichtlichen Patentsituation geführt, was eine weiterführende Forschung und Vermarktung einschränkt (Binz et al. 2005).

Um diese Hindernisse zu überwinden, wird seit zirka 20 Jahren an künstlichen Bindeproteinen geforscht. Bis vor ungefähr 25 Jahren galt das Immunsystem als einzige Quelle für molekulare Diversität, aus der gezielt spezifisch-bindende Proteine gewonnen werden konnten. Neue Technologien, wie zum Beispiel die Erzeugung von synthetischen Bibliotheken und die Entwicklung diverser Selektionssysteme ermöglichten eine gezielte Forschung an Alternativen zu Antikörpern (Binz *et al.* 2005). Eine mögliche Alternative ist es, die gewünschten Eigenschaften von Antikörpern auf Gerüstproteine, auch *scaffolds* genannt, zu übertragen. Das Resultat der Forschungen sind die künstlichen Bindeproteine, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

1.1 Künstliche Bindeproteine

In den letzten 20 Jahren wurden über 50 neue alternative Gerüstproteine beschrieben, welche nicht zu der Klasse der Immunglobuline gehören. Diese Proteingerüste bilden eine äußerst diverse Gruppe von Bindeproteinen, welche sich in ihrer Größe, ihrem Ursprung, ihrer strukturellen Topologie und ihrer Herstellungsstrategie unterscheiden, um nur einige Aspekte zu nennen (Ruigrok *et al.* 2011). Eine Klassifizierung dieser Proteine wird meistens anhand ihrer Struktur oder der verwendeten Strategie zur Herstellung der Bindefläche durchgeführt.

Allen künstlichen Bindeproteinen ist gemeinsam, dass sie auf Polypeptidgerüsten, sogenannten *scaffolds* basieren. Der Begriff *scaffold* beinhaltet dabei bereits einige unabdingbare intrinsische Eigenschaften für die Erzeugung neuer Bindemoleküle (Skerra 2000). Ein *scaffold* besteht idealerweise aus nur einer Polypeptidkette, ist in der Regel zwischen 8 und 30 kDa groß, einfach in bakteriellen Expressionssystemen herzustellen und besitzt eine sehr hohe intrinsische Stabilität, die es ermöglicht, einen gewissen Anteil des Proteins zu verändern ohne dabei die wesentlichen Eigenschaften des Proteins zu verlieren (Hey *et al.* 2005). Das häufige Fehlen von Cystein in den *scaffolds* erleichtert durch die Abwesenheit von Disulfidbrücken den Herstellungsprozess, jedoch steht damit auch kein Cystein für eventuelle chemische Modifikationen zur Verfügung (Friedman und Stahl 2009).

Es gibt mehrere Möglichkeiten eine Bindefläche auf den Gerüstproteinen zu erzeugen. Gleichzeitig ist so eine Kategorisierung der unterschiedlichen *scaffolds* gegeben. Im Folgenden werden die Möglichkeiten zur Herstellung der Bindefläche beschrieben und einige ausgewählte Beispiele genannt.

(1) Randomisierung oder Insertion von einzelnen loops (loop grafting)

Der Grundgedanke bei der Methode des *loop graftings* beruht auf der Idee, dass sich die bindenden *loop*-Regionen (CDRs) der Antikörper auf ein rigides Gerüst übertragen lassen. So wurde zum Beispiel die bindende Peptidregion eines V_H H-Kamel Antikörpers auf das Gerüstprotein Neocarzinostatin übertragen, und eine Bindung gegen das Zielmolekül Lysozym konnte nachgewiesen werden (Nicaise *et al.* 2004).

Ein weiteres Beispiel ist das 2009 therapeutisch zugelassene Medikament Kalbitor zur Behandlung des hereditären Angioödems (Beck *et al.* 2010). Es beruht auf einem rationellen Design der *loop*-Strukturen der ersten Kunitz Domäne des humanen Lipoprotein-assoziierten Koagulationsinhibitors und einer anschließenden Selektion mittels Phagen-*display* (Williams und Baird 2003). So konnte ein sehr effektiver Inhibitor der Serinprotease Plasma-Kallikrein hergestellt werden (inhibitorische Konstante K_i = 44 pM) (Lehmann 2008). Abbildung 1 I zeigt die Kunitz Domäne, welche als *scaffold* verwendet wurde.



Abbildung 1: Repräsentative Beispiele für verschiedene Möglichkeiten der Oberflächenrandomisierung auf *scaffold* Proteinen. Es werden die unterschiedlichsten Proteintopologien als Gerüstproteine verwendet. Dargestellt sind Beispiele für die im Text beschriebenen Kategorien von Bindeproteinen.

(I) Randomisierung oder Insertion von einzelnen loops (loop grafting). Dargestellt ist die Kunitz Domäne (Kette A von PDB: 1AAP). (II) Randomisierung von mehreren loops zur Bildung einer kontinuierlichen Bindefläche. (A) Zehnte Fibronectin Type III Domäne (PDB: 1FNA), (B) Lipocalin (Kette A von PDB: 1BBP). (III) Randomisierung von Sekundärstrukturelementen. (A) Ankyrin-repeat Protein (PDB: 1MJO), (B) Z-Domäne von Protein A (PDB: 2SPZ), (C) Ubiquitin (PDB: 1UBQ). Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.99 erstellt und basiert auf einem Übersichtsartikel von Friedman und Stahl (Friedman und Stahl 2009).

(2) Randomisierung von mehreren loops zur Bildung einer kontinuierlichen Bindefläche

Es wurde versucht, *scaffold* Proteine zu finden, die ähnlich den Antikörpern mehrere *loops* präsentieren, welche für eine Mutagenese und damit dem Erzeugen einer Bindefläche zugänglich sind. Beispiele hierfür sind das Fibronectin und Lipocalin. Die Zehnte Fibronectin Type III Domäne wurde genutzt, um ein Bindeprotein gegen TNF α zu erzeugen, das in einem Protein-*microarray* System Verwendung fand (Xu *et al.* 2002). Weiterhin konnten Binder gegen Ubiquitin und gegen den humanen Östrogen-Rezeptor α auf Basis des Fibronectins generiert werden (Koide *et al.* 1998, Koide *et al.* 2002). Bei dem zweiten angeführten Beispiel werden Mitglieder der Lipocalin-Familie als *scaffold* Proteine verwendet (Flower 1996). Durch Veränderungen der *loop* Strukturen und unter Ausnutzung der kelchartigen Struktur dieser Proteine (Bindungskavität) wurden Binder gegen verschiedene Haptene sowie CTLA-4 und Hämoglobin erzeugt, um nur einige Beispiele zu nennen (Vogt und Skerra 2004, Schlehuber und Skerra 2005, Skerra 2008). Die auf der Lipocalin-Topologie basierenden Bindemoleküle werden unter dem Begriff der Anticaline zusammengefasst. In Abbildung 1 II A und B sind die Fibronectin Domäne und ein Lipocalin dargestellt.

(3) Randomisierung von Sekundärstrukturelementen

Völlig unabhängig von den antikörperähnlichen *loop* Strukturen oder *loops per se* ist die Methode, Sekundärstrukturelemente als zusammenhängende Bindeflächen zu nutzen. Den Anfang auf diesem Gebiet stellen die sogenannten Affibody-Moleküle dar. Basierend auf der Z-Domäne von Protein A wurden Bindemoleküle gegen humanes Insulin und die *Taq*

DNA-Polymerase mittels Phagen-*display* selektiert (Nord *et al.* 1997). Dabei wurden 13 Lösungsmittel-exponierte Reste auf den α -Helices 1 und 2 mittels Mutagenese verändert (siehe auch 3.4.1) (Nord *et al.* 1995). Die Bindungskonstanten der ersten Generation der Affibodies lagen im mikromolaren Bereich. Mittlerweile gehören die Affibodies zu den erfolgreichsten künstlichen Bindeproteinen. So konnten zum Beispiel Bindeproteine gegen HER2 (Wikman *et al.* 2004), das A β Peptid (Grönwall *et al.* 2007), EGFR (Friedman *et al.* 2007), Faktor VIII (Nord *et al.* 2001) und TNF α (Kronqvist *et al.* 2008) generiert werden. Die Bindungskonstanten der zweiten Generation von Affibodies liegen im mittleren bis unteren nanomolaren Bereich (Friedman und Stahl 2009).

Das erste Affibody-Molekül, was Menschen verabreicht wurde, ist $Z_{HER2:342}$, das zur Tumordiagnostik eingesetzt wird (Löfblom *et al.* 2010). Abbildung 1 III B zeigt die Z-Domäne von Protein A, welche das Grundgerüst für die Affibody-Moleküle darstellt.

Eine weitere sehr erfolgreiche scaffold Gruppe innerhalb dieser Kategorie sind die designed ankyrin repeat Proteine, kurz DARPine (Boersma und Plückthun 2011). Sie bestehen aus mehreren Ankyrin-repeats (in der Regel drei bis fünf) und können durch das modulare Design in ihrer Größe an das entsprechende Zielmolekül angepasst werden. Auch bei diesem scaffold wird die Oberfläche von α-Helices zur Erzeugung der Bindefläche genutzt, jedoch werden zusätzlich auch noch loop-Bereiche mit in den Designprozess einbezogen. Diese randomisierte Fläche entspricht der Interaktionsfläche von natürlichen Ankyrin-repeat Proteinen (Binz et al. 2004). Der Großteil der bindenden DARPine wurde mit Hilfe des Ribosomen-displays selektiert. So konnten Bindeproteine beispielsweise gegen Kinasen (Amstutz et al. 2005), Membranproteine (Milovnik et al. 2009) und gegen IgE (Eggel et al. 2011) erzeugt werden (Boersma und Plückthun 2011). Aber auch mit Hilfe des Phagen-displays wurden DARPin Moleküle erfolgreich selektiert. Dabei konnten Affinitäten im picomolaren Bereich gegen die Zielproteine TNFa und HER2 erreicht werden (Steiner et al. 2008). Vor kurzem wurden die klinischen Untersuchungen der Phase I/II von zwei DARPin-Molekülen abgeschlossen. Das DARPin MP0112 erwies sich dabei als ein sehr potenter VEGF (vascular endothelial growth factor) Inhibitor. Da es von den Patienten auch gut toleriert wurde, könnte es eine mögliche neue Therapieform der neovaskulären (feuchten), altersbedingten Makuladegeneration sein (Tamaskovic et al. 2012). Abbildung 1 IIIA zeigt ein Ankyrinrepeat Protein.

Das letzte in dieser Kategorie genannte Beispiel ist das humane Ubiquitin (Fiedler *et al.* 2004). Es steht stellvertretend für die Erzeugung einer Bindefläche auf einem β -Faltblatt. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte ein Binder gegen TNF α auf Basis des Ubiquitins erzeugt werden (Hoffmann *et al.* 2012). Abbildung 1 IIIC stellt das Ubiquitin dar. Weitere Beispiele für die erfolgreiche Nutzung eines β -Faltblattes als Bindeoberfläche sind die Bindeproteine, die mit dem humanen- γ -B-Kristallin als *scaffold* erzeugt worden sind (Fiedler und Rudolph 2001). Es wurden Binder gegen proNGF (Ebersbach *et al.* 2007) sowie gegen den humanen Papillomavirus E7 (Mirecka *et al.* 2009) generiert.

Alle bisher dargestellten Beispiele zeigen das Potential, das in der Technologie neuer Bindeproteine liegt. Durch ihre einfache Handhabung, ihre bemerkenswerte Stabilität und durch ihre Fähigkeit, mittels Protein *engineering* an ihre jeweilige Aufgabe angepasst werden zu können (erhöhte Halbwertszeiten im Serum, Fusion mit Effektor-Molekülen), stellen neue künstliche Bindeproteine ein wertvolles, zukünftiges molekulares Werkzeug für Forschung und Therapie dar. Weitere Informationen zu künstlichen Bindeproteinen sind in den Übersichtsartikeln von Beck, Ruigrok, Binz, Hey, Friedman, Nygren, Gebauer und Löfblom anschaulich zusammengefasst (Beck *et al.* 2010, Ruigrok *et al.* 2011, Binz *et al.* 2005, Hey *et al.* 2005, Friedman und Stahl 2009, Nygren und Skerra 2004, Gebauer und Skerra 2009, Löfblom *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem neuen *scaffold* Protein, dem M7, gearbeitet, um künstliche Bindeproteine gegen verschiedene Zielproteine zu erzeugen. Der folgende Abschnitt stellt das *scaffold* Protein M7 vor.

1.2 Das Protein M7

Das 10,4 kDa große Protein M7 ist der zentrale Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Auf Basis von M7 sollen künstliche Bindeproteine generiert werden, indem erstmals eine funktionale Bibliothek auf DNA-Ebene erstellt wird. Das Protein wurde aufgrund seiner außergewöhnlichen Eigenschaften ausgewählt. Es handelt sich dabei um ein nicht natürlich vorkommendes Protein, welches komplett *in silico* designt wurde.

Die Geschichte von M7

Im Jahre 2003 konnten Kuhlman und Mitarbeiter zeigen, dass es möglich ist, Primärsequenzen zu berechnen, die eine zuvor definierte, nicht natürlich vorkommende Faltungstopologie einnehmen. Es handelte sich bei dem Protein Top7 um das erste, vollständig am Computer designte Protein (Kuhlman *et al.* 2003). Für die Berechnung der Primärsequenz wurde das Programm RossettaDesign verwendet, das Energieminimierungsfunktionen und einen Monte Carlo Algorithmus beinhaltet.

Die neue, berechnete α/β -Faltungstopologie von Top7 hatte einige bemerkenswerte Eigenschaften, wie zum Beispiel eine thermodynamische Stabilität von $\Delta G_U = 55,3$ kJ/mol bei 25 °C und die Neigung zu einer Kältedenaturierung. Drei Jahre später konnte gezeigt werden, dass bei der Expression von Top7 ein Nebenprodukt auftritt, welches sich als das C-terminale Fragment des Proteins herausstellte. Interessanterweise war der isolierte C-terminale Teil des Proteins hochgradig strukturiert und in der Topologie identisch mit dem C-terminalen Teil innerhalb der Gesamtstruktur (Dantas *et al.* 2006). Zwar zeigte das Protein Top7 auf den ersten Blick eine kooperative Faltung, weiterführende Studien konnten jedoch nachweisen, dass sich der C-terminale Teil des Proteins zuerst faltet, während der Rest der Struktur noch ungeordnet ist (Zhang und Chan 2009, Watters *et al.* 2007).

Diese neue Proteintopologie von Top7 inspirierte Proteinwissenschaftler der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, einen eigenen Proteindesignalgorithmus zu erschaffen. Als Zielstruktur für das Proteindesign wurde Top7 ausgewählt. Mit Hilfe eines neuen tetrapeptidbasierten Designalgorithmus wurden Primärsequenzen berechnet, welche bei einer Sequenzidentität von unter 30 % zu Top7 in die gewünschte Topologie falten sollten. (Dallüge *et al.* 2007, Dallüge 2008). Zwei der berechneten Varianten, M5 und M7, zeigten ein kooperatives Faltungsverhalten und eine hohe thermodynamische Stabilität (Dallüge *et al.* 2007).

Von der Variante M7 konnte 2008 die dreidimensionale Struktur mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Stordeur 2007, Stordeur *et al.* 2008). Die Strukturanalyse zeigte, dass der tetrapeptidbasierte Designalgorithmus eine Primärsequenz berechnet hatte, die genau in die vorgegebene Topologie faltete. So wurde eine durchschnittliche Abweichung des Proteinrückgrates von der Zielstruktur von lediglich $1,24\pm0,10$ Å (Rückgrat-RMSD) festgestellt. Dieser Proteindesignalgorithmus führte schließlich zu einem neuen, nicht natürlich vorkommenden Protein von bemerkenswerter Stabilität.

Interessanterweise konnten Anfang 2012 Strukturähnlichkeiten von M7 und einem natürlich vorkommenden Protein festgestellt werden. Han und Mitarbeiter klärten die Struktur des Proteins PF2050 aus *Pyrococcus furiosus* auf (Han *et al.* 2012). Eine strukturbasierte Datenbanksuche ergab daraufhin, dass sich der N-terminale Teil von PF2050 (Reste 2-43) und der N-terminale Teil von M7 (Reste 1-42) mit einem RMSD-Wert von 2,4 Å zur Deckung bringen lassen. Natürlich gilt das auch für den N-terminalen Teil von Top7 (RMSD 2,0 Å). So konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Teil dieser designten Proteintopologie auch in natürlichen Proteinen gefunden werden kann, bemerkenswerterweise in einem thermophilen Organismus, welcher in einem Temperaturbereich zwischen 70 °C und 103 °C lebt (Fiala und Stetter 1986).

Molekulare Eigenschaften von M7

Das Protein M7 besteht aus 92 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 10407,9 Da. Es zeigt ein kooperatives Faltungsverhalten und lässt sich in großen Mengen in *E. coli* Zellen herstellen. Da Cysteine vom Designprozess ausgeschlossen waren, besitzt es keine Disulfidbrücken.

Die Struktur ist dominiert von einem fünfsträngigen β -Faltblatt und von zwei vorgelagerten α -Helices (Abbildung 2). M7 besitzt außerdem eine sehr hohe thermodynamische Stabilität von $\Delta G_U = 79$ kJ/mol bei 20 °C. Es ist damit sogar stabiler als Top7, welches die Zielstruktur des Designprozesses darstellte. Das Protein M7 kann ohne die Zugabe von denaturierenden Agenzien bis 100 °C nicht hitzedenaturiert werden, und eine chemisch induzierte Entfaltung findet erst bei einer Übergangskonzentration von 6,6 M Guanidiniumchlorid statt. Es besitzt damit eine äußerst bemerkenswerte Stabilität für ein Protein dieser Größe (Kuhlman *et al.* 2003).

Nimmt man alle diese Eigenschaften zusammen, kann man von einem idealen Kandidaten für ein Gerüstprotein sprechen.



Abbildung 2: Sekundärstrukturelemente des Proteins M7 (PDB: 2JVF) in *cartoon* Darstellung. Es sind das fünfsträngige β -Faltblatt und die beiden α -Helices zu erkennen. Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.99 erstellt.

Das scaffold Protein M7

Das Protein M7 sollte im Rahmen dieser Arbeit auf seine Eignung als Gerüstprotein hin untersucht werden. Wie bereits oben erwähnt, ist allen *scaffold* Proteinen die Eigenschaft gemeinsam, dass sie die Randomisierung mehrerer Positionen in ihrer Primärsequenz überstehen, ohne dabei wesentlich von ihren ursprünglichen Eigenschaften einzubüßen. Für das Protein Top7 konnte bereits gezeigt werden, dass es als ein *scaffold* Protein fungieren kann (Boschek *et al.* 2009). Dazu wurde innerhalb des *loops* zwischen dem zweiten β -Faltblattstrang und der ersten α -Helix eine Oktapeptidsequenz eingebracht, welche aus einem CD4 bindenden Antikörper entnommen worden ist. Das neu entstandene Bindeprotein Top7_{CB1} behielt seine Struktur und thermodynamische Stabilität und besaß die gewünschte Affinität gegenüber CD4. Es konnte also bereits gezeigt werden, dass diese Proteintopologie für die Methode einer *loop*-Präsentation auf einem rigiden Gerüst zugänglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von M7 als universelles Gerüstprotein untersucht werden. Dazu wurde die Methode der Randomisierung auf Sekundärstrukturelementen angewendet, nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass dieser Ansatz bei anderen Proteinen sowohl bei α -Helices als auch bei β -Faltblättern zu Bindeproteinen mit hohen Affinitäten führte (Ebersbach *et al.* 2007, Nord *et al.* 1997). Die so erzeugte Bibliothek soll gegen verschiedene Zielmoleküle selektiert werden. Dazu wird in diesem Falle das Ribosomen-*display* verwendet. Der folgende Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über die gängigsten Selektionssysteme.

1.3 Selektionssysteme

Die Reifung der Antikörper bzw. die Auswahl aus ihrer Diversität findet in der Natur im sogenannten Keimzentrum statt. Wird jetzt aber Diversität in vitro erzeugt, dann braucht man ein Selektionssystem mit dessen Hilfe Moleküle mit den gewünschten Eigenschaften angereichert werden können. Allen Selektionssystemen ist dabei gemeinsam, dass die Diversität auf DNA-Ebene erzeugt wird, jedoch die gewünschte Eigenschaft (der Phänotyp) auf Proteinebene zum Tragen kommt. Damit muss in jedem der Systeme eine Genotyp-Phänotyp Kopplung bewerkstelligt werden. Je nach verwendetem System wird diese essentielle Kopplung unterschiedlich realisiert. Eine Selektion wird typischerweise ausgehend von einer großen Bibliothek unterschiedlicher Proteinvarianten, welche an ihre codierende DNA gebunden sind, durchgeführt. Die Proteine können dann anhand ihrer gewünschten Eigenschaften, wie zum Beispiel Affinität, Stabilität, Löslichkeit oder katalytischen Aktivität, selektiert werden (Friedman und Stahl 2009). Die Wahl des Selektionssystems hängt dabei von vielen Faktoren und vor allem vom scaffold Protein selbst ab. Nicht jedes Protein ist mit allen Selektionssystemen kompatibel. Weiterhin unterscheiden sich die Systeme in der Größe der Bibliothek, die selektiert werden kann, in ihrer Möglichkeit der Feinabstimmung (z.B. off-rate Selektion) und in ihrer chemischen Umgebung (in vitro und in vivo Systeme). Zu den am meisten angewendeten Systemen zählen das Phagen-display (Smith 1985), das yeast display (Boder und Wittrup 1997) und das Ribosomen-display (Plückthun 2012). Alle Selektionen werden dabei rundenbasiert durchgeführt. Eine DNA-Bibliothek wird exprimiert, und auf dem Phagen, der Hefezelle oder dem Ribosom werden die entsprechenden Phänotypen (Proteine) präsentiert. Eine Inkubation mit dem Zielmolekül ermöglicht dann die Bindung der präsentierten Proteine an die Zielstruktur. Nicht bindende Varianten werden weggewaschen. Über eine Reamplifikation der DNA erhält man eine selektierte Version der ursprünglichen Bibliothek. Diese DNA steht nun für einen weiteren Selektionszyklus zur Verfügung. Anhand mehrerer Selektionsrunden ist man dann in der Lage, den Genpool immer weiter einzuengen und Varianten mit der gewünschten Eigenschaft (in diesem Falle Bindung an das Zielmolekül) zu isolieren.

Weitere Selektionssysteme sind zum Beispiel das mRNA-*display* (Wilson *et al.* 2001) und das *cell-surface display* (Francisco *et al.* 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich das Ribosomen-*display* genutzt. Es ist in Einzelheiten im Abschnitt 3.4 beschrieben. Mit Hilfe des Ribosomen-*displays* sollen Bindeproteine gegen unterschiedliche Zielmoleküle selektiert werden. Der folgende Abschnitt stellt die Zielmoleküle vor.

1.4 Die Zielmoleküle

Idealerweise ist man mit einer guten Bibliothek in der Lage, Bindeproteine gegen eine Vielzahl von verschiedenen Zielmolekülen zu generieren. Die Variabilität innerhalb der Bibliothek erlaubt es, für die jeweiligen Zielstrukturen die passenden Binder zu selektieren.

Um die Qualität der selbst erstellten Bibliothek zu untersuchen, wurde mit verschiedenen Zielmolekülen gearbeitet. Die Zielmoleküle wurden dabei nach ihrer pharmakologischen

Relevanz und ihrer Heterogenität ausgewählt. Es sollte gezeigt werden, dass Bindeproteine gegen verschiedenste Proteine generiert werden können. Der folgende Abschnitt stellt die beiden in dieser Arbeit verwendeten Zielstrukturen vor.

1.4.1 Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα)

Der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin und für erste zelluläre Reaktionen bei Krankheiten oder Infekten verantwortlich. Es reguliert in seinen Zielzellen die Expression von bis zu 500 Genen, und seine Wirkweise ist äußerst komplex. TNF α spielt eine Rolle beim Zelltod, aber ist ebenso wichtig für das Überleben der Zelle. Es wirkt bei der Proliferation und Differenzierung und hat einen Einfluss auf die Expressionsraten anderer Zytokine. Deshalb wird es auch als ein regulatorisches Zytokin bezeichnet (Faustman und Davis 2010). Es ist entzündungsfördernd und wird von Monozyten und Makrophagen nach entsprechender Stimulation als membranständige Proform gebildet. Durch eine membranständige Metalloprotease kann ein Homotrimer abgespalten werden (Black *et al.* 1997). Beide Formen (membranständig und löslich) können die jeweiligen Rezeptoren aktivieren und somit sehr komplexe, regulatorische Kaskaden auslösen (Idriss und Naismith 2000).

TNF α spielt bei nahezu jeder Entzündungskrankheit eine zentrale Rolle. Die Entzündungsreaktion, welche eigentlich gegen bakterielle Angriffe gerichtet ist, verläuft bei einer Überproduktion von TNF α chronisch. Unter den von TNF α induzierten Krankheitsbildern findet man den septischen Schock, die Kachexie, Asthma und rheumatische Arthritis, um nur einige zu nennen.

Meilensteine in der Forschungsgeschichte von TNFa

TNF α wurde erstmals 1975 als ein Protein beschrieben, welches durch Endotoxinbehandlung von Makrophagen freigesetzt wird und eine nekrotische Wirkung auf bestimmte Tumorzellen *in vitro* hat (Carswell *et al.* 1975). Dieser beobachteten Wirkung verdankt das Molekül seinen Namen. Es dauerte zirka zehn Jahre bis die Klonierung und rekombinante Expression des Proteins gelangen (Pennica *et al.* 1984, Marmenout *et al.* 1985, Shirai *et al.* 1985). Anhand von Sequenzvergleichen konnte festgestellt werden, dass der parallel beschriebene Faktor Cachectin (Beutler *et al.* 1985b) und TNF α ein und dasselbe Molekül sind (Beutler *et al.* 1985a, Beutler und Cerami 1986). Die Bindung von TNF α an eine einzigartige Klasse von Rezeptoren auf der Oberfläche von Karzinomzellen konnte 1985 entdeckt werden (Aggarwal *et al.* 1985). TNF α besitzt demnach eigene Rezeptoren auf Körperzellen. Ein Jahr später wurde gezeigt, dass das Protein in seiner trimeren Form vorliegen muss, um seine biologische Aktivität zu entfalten (Smith und Baglioni 1987). 1989 konnte schließlich die Struktur des TNF α mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgeklärt werden (Eck und Sprang 1989). TNF α ist ein glockenförmiges Homotrimer, wobei jede Untereinheit aus zwei antiparallelen Faltblättern mit einer *jelly-roll* Topologie besteht.

Die Klonierung der beiden TNFα-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 gelang 1989 respektive 1990 (Engelmann *et al.* 1989, Engelmann *et al.* 1990). Deren Entdeckung, sowie die Strukturaufklärung von TNFα ebneten endgültig den Weg für die pharmakologische Forschung.

Jüngere Forschungsergebnisse zeigen, dass TNF α sowohl eine Tumor zerstörende als auch eine Tumor verstärkende Wirkung hat (Devoogdt *et al.* 2006, Balkwill 2006).

Dennoch wird TNFα in der Tumortherapie als Medikament eingesetzt (Lejeune *et al.* 2006). Einen exzellenten Überblick über die Geschichte der Forschung rund um Tumornekrosefaktor-alpha gibt auch der Übersichtsartikel von Balkwill (Balkwill 2009).

Molekulare Eigenschaften von TNFa

TNF α ist ein 52 kDa großes Protein, bestehend aus drei monomeren Untereinheiten (je 17,3 kDa). Die drei Untereinheiten lagern sich zusammen und bilden in der Mitte des Proteins einen Kanal, welcher oben und unten von polaren und in der Mitte von hydrophoben Aminosäuren gesäumt ist (Eck und Sprang 1989), siehe Abbildung 3.

Für die Trimerassoziation ist ein hydrophober Bereich am C-Terminus (Reste 101-114) verantwortlich (Liu *et al.* 2012). Das Trimer hat eine Halbwertszeit von 17,5 bis 20 Stunden (Poiesi *et al.* 1993). Im Rahmen dieser Zeitspanne kommt es zur Dissoziation des Trimers. Dieses Gleichgewicht ist empfindlich von den Pufferzusammensetzungen abhängig und kann zum Beispiel durch Detergenzien gestört werden (Alzani *et al.* 1995, Hoffmann *et al.* 2012, He *et al.* 2005).

Pro Monomer gibt es eine Disulfidbrücke. Das Fehlen dieser setzt die biologische Aktivität herab, jedoch ist sie für die Struktur nicht essentiell (Narachi *et al.* 1987, Arakawa *et al.* 1990). Die biologische Aktivität kann nur von dem intakten Trimer vermittelt werden. Jeweils zwei Monomere zusammen bilden eine Furche, die für die Rezeptor-



Abbildung 3: Strukturdarstellung von TNF α (PDB: 1TNF). Es sind die einzelnen Untereinheiten in Gelb, Magenta und Rot dargestellt. Die für die Trimerassoziation essentiellen Bereiche befinden sich im unteren Bereich des Moleküls. Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.99 erstellt.

bindung verantwortlich ist (siehe Abbildung 4) (Mukai *et al.* 2010). Damit ist eine Trimerdissoziation eine Möglichkeit, die Signalübertragung mittels TNF α zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit das Molekül zu blockieren, ist die Bindestellen zwischen TNF α und Rezeptor zu besetzen. Beide Ansätze werden in der pharmakologischen Forschung fokussiert, und es sind bereits fünf Medikamente, welche TNF α inhibieren, zugelassen.



Abbildung 4: Strukturdarstellung von TNFα im Komplex mit TNFR2 (PDB: 3ALQ). Es sind die einzelnen Untereinheiten des TNFα in Gelb, Magenta und Rot dargestellt. Die TNFR2-Rezeptoren sind in Blau abgebildet. Es ist deutlich die Interaktionsfläche zwischen einem Rezeptormolekül und zwei TNFα-Monomeren zu erkennen. Somit bindet ein TNFα-Trimer drei Rezeptormoleküle. Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.99 erstellt.

TNFα als pharmakologisch relevantes Zielmolekül

Die pharmakologische Bedeutung der TNF-Superfamilie wird besonders deutlich, wenn man den Markt für TNF-Blocker betrachtet. Dieser liegt bei über 20 Milliarden US \$. Es werden mit Hilfe der Blocker rheumatische Arthritis, Schuppenflechte, Morbus Crohn und Osteoporose behandelt, was noch einmal deutlich die Vielseitigkeit dieser Proteinfamilie zeigt. Das zentrale Molekül der pharmakologischen Forschung aus dieser Familie ist TNFα (Ghezzi und Cerami 2005).

So wurde zum Beispiel versucht, TNF α durch verschiedenste Moleküle zu binden und damit an seiner Funktion zu hindern. Das können sehr kleine Moleküle sein, die die Dissoziation des Trimers veranlassen und durch eine sterische Blockade die Reassoziation verhindern (He *et al.* 2005), oder aber Bindeproteine, welche TNF α binden (Löfdahl *et al.* 2009, Jonsson *et al.* 2009, Steiner *et al.* 2008). Dabei beruht die Inhibierung auf einer Überlagerung der Rezeptorbindestelle von TNF α mit der Bindestelle des erzeugten Affibodies bzw. DARPins. Auch Antikörper ähnliche Proteine wurden verwendet, um Bindeproteine gegen TNF α zu erzeugen. Ein auf der Fibronectin Type III Domäne basierendes Bindemolekül wurde mit Hilfe des mRNA-*displays* generiert und zeigte Bindungskonstanten im picomolaren Bereich (Xu *et al.* 2002).

Fünf Medikamente sind gegen TNF α zugelassen und werden routinemäßig verabreicht. Diese sind Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Certolizumab pegol und Golimumab (Tracey *et al.* 2008). Alle fünf Medikamente basieren auf Antikörpern oder machen sich die Antikörpertechnologie zu Nutze.

Neben der Tatsache, dass TNF α ein pharmakologisch äußerst relevantes Zielmolekül ist, ist es in unseren Laboren, dank der Arbeit von Dr. Andreas Hoffmann, in großen Mengen verfügbar (Hoffmann *et al.* 2010). Das macht es zu einem idealen Kandidaten, um die Qualität der in dieser Arbeit erzeugten Bibliothek zu testen und künstliche Bindeproteine gegen diese Zielstruktur zu erzeugen.

1.4.2 Reife $A\beta(1-42)$ Fibrillen

Eine weitere pharmakologisch sowie biochemisch interessante Zielstruktur stellen reife $A\beta(1-42)$ Fibrillen dar. Diese Fibrillen sind das Endprodukt einer spontanen (Aggregations) Reaktion des Proteins $A\beta(1-42)$ bzw. $A\beta(1-40)$. Gleichzeitig sind sie die Hauptkomponente in Plaques, welche in Gehirnschnitten von Alzheimer Patienten gefunden werden können (Masters *et al.* 1985, Kang *et al.* 1987). Damit sind das Protein $A\beta$ und die daraus bestehenden Fibrillen untrennbar mit der Alzheimer Krankheit assoziiert.

Alzheimer als Volkskrankheit

Erstmals beschrieben wurde die Alzheimer Krankheit 1907 von dem deutschen Arzt und Psychiater Alois Alzheimer. Eine 51-jährige Frau, Auguste Deter, war in eine Nervenheilanstalt eingewiesen worden, weil sie räumlich und zeitlich stark desorientiert war. Sie litt trotz ihres geringen Alters an Demenz. Nach ihrem Tod sezierte Alzheimer das Gehirn der Frau und beschrieb erstmals die sichtbaren Veränderungen des Gehirns, welche heute als Plaques bezeichnet werden (Alzheimer 1907). Die Benennung der Krankheit als Morbus Alzheimer geht auf Emil Kraepelin im Jahre 1910 zurück (Zilka und Novak 2006).

Morbus Alzheimer tritt in seiner sporadischen Form als typische Alterskrankheit ab zirka dem 65. Lebensjahr auf. Es gibt aber auch den sehr seltenen Fall (unter 1% aller Betroffenen) der erblichen Form von Alzheimer. Eine genetische Mutation verursacht hier einen verfrühten Ausbruch der Krankheit (Bird 2008, Selkoe 2001b, Selkoe 2001a).

Heutzutage sind weltweit zirka 30 Millionen Menschen an Alzheimer erkrankt, und es wird extrapoliert, dass sich diese Zahl bis zum Jahr 2050 vervierfachen wird. Damit hat die Alzheimer Krankheit auch eine enorme wirtschaftliche Komponente. Es wird geschätzt, dass im Jahr 2010 allein in den USA 172 Milliarden US \$ ausgegeben wurden, um die Versorgung von Alzheimer Patienten zu gewährleisten (Holtzman *et al.* 2011).

Das Peptid Abeta (Aβ)

Das zirka 4 kDa große Peptid A β bildet, wie bereits erwähnt, den Hauptbestandteil in den senilen Plaques. Es wird darin in unterschiedlichen Isoformen gefunden. Diese sind hauptsächlich A β (1-40) (~ 90%) und A β (1-42) (~ 10%), wobei A β (1-42) die toxischere Form ist (Härd 2011). Die Isoformen unterscheiden sich neben ihrer Länge auch in ihrer Tendenz, Fibrillen auszubilden, wobei A β (1-42) eine sehr starke Aggregationsneigung im Vergleich zu A β (1-40) zeigt (Bitan *et al.* 2003). Die physiologische Bedeutung des A β Peptides ist nicht geklärt. Die Isoformen von A β entstehen *in vivo* durch eine proteolytische Spaltung des Amyloid-Präkursorproteins (APP), welches im Gehirn ubiquitär exprimiert wird (Zheng und Koo 2006).

Im Gehirn findet ein ständiges Wechselspiel zwischen Bildung und Abbau der A β Peptide statt (Hardy und Selkoe 2002). Ist diese Balance gestört, kommt es zur Ablagerung der Peptide in den Plaques. Bis jetzt sind die genauen molekularen Mechanismen der Alzheimer Krankheit unverstanden. Es gibt keinen Konsens darüber, ob die Fibrillen (Hardy und Higgins 1992, Petkova *et al.* 2005) oder die niedermolekularen Aggregate (Deshpande *et al.* 2006, Hardy und Selkoe 2002, Klein *et al.* 2004) das Absterben der Gehirnzellen verursachen. Neueste Ergebnisse deuten aber auf eine hohe bzw. höhere Neurotoxizität der oligomeren Spezies hin (Bieschke *et al.* 2012, Ahmed *et al.* 2010, Lauren *et al.* 2009, Fändrich 2012). Ein weiteres Argument gegen die Toxizität von Fibrillen ist, dass Fälle berichtet wurden, bei denen große Mengen an senilen Plaques nicht mit einer Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten einhergehen (Delaere *et al.* 1990).

Trotzdem stellen die reifen Fibrillen das Endstadium der Peptide *in vivo* dar. Es ist wichtig, diagnostische Werkzeuge wie Antikörper oder Bindeproteine gegen sie zu besitzen, um die Forschung an ihnen zu ermöglichen. Auch die Interaktion von Bindeproteinen mit der Fibrille oder Vorstufen von dieser kann dazu beitragen, Erkenntnisse zu erlangen, welche helfen, die molekularen Abläufe der Alzheimer Krankheit besser zu verstehen.

$A\beta(1-42)$ Fibrillen

Die reifen A β (1-42) Fibrillen bilden das kinetische Endprodukt der A β (1-42) Peptid-Ablagerungen. Über eine bis jetzt noch nicht in allen Einzelheiten verstandene Kaskade bilden sich reife Fibrillen über verschiedene Zwischenstufen. Es beginnt mit der Bildung von Oligomeren bzw. höhermolekularen Aggregaten. Diese können sich dann zu Protofibrillen (Harper *et al.* 1997, Walsh *et al.* 1997) zusammenlagern. Die Dicke der Protofibrillen liegt unter 10 nm, und ihre Form ist kreisförmig und gekrümmt (siehe Abbildung 5). In den Protofibrillen ist bereits ein gewisser Anteil an der für Fibrillen typischen β -Faltblattstruktur auszumachen. (Scheidt *et al.* 2011). Bereits die Protofibrillen reagieren mit den für den Amyloidnachweis typischerweise verwendeten Farbstoffen Kongorot und Thioflavin T (Haass und Selkoe 2007, Meinhardt und Fändrich 2009).

Aus den Protofibrillen werden letztendlich reife Fibrillen gebildet, welche typische strukturelle Eigenschaften besitzen. Die reifen Fibrillen sind zwischen 10 und 20 nm breit und bis zu mehreren Mikrometern lang (Meinhardt und Fändrich 2009). Abbildung 5 zeigt am Beispiel von dem A β (1-40) Peptid die eben beschriebenen unterschiedlichen Zwischenstufen während der Reifung der Fibrillen.



Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (negativ kontrastiert) des A β (1-40) Peptides in unterschiedlichen Konformationen. Es sind die Oligomere (links), die Protofibrillen (Mitte) und die reifen Fibrillen zu erkennen. Bild und Beschriftung entnommen aus (Meinhardt und Fändrich 2009).

Strukturelle Merkmale von Fibrillen

Fibrillen zeigen sich äußerst inert gegen denaturierende Agenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid oder proteolytischen Abbau (Soto 2003, Masters *et al.* 1985). Klassischerweise werden Fibrillen als extrazelluläre Ablagerungen definiert, die ein typisches Röntgenbeugungsmuster zeigen und nach Anfärben mit dem Farbstoff Kongorot eine Doppelbrechung im grünen Wellenlängenbereich zeigen (Westermark *et al.* 2005). Eine etwas modernere Definition bezieht sich auf die gemeinsame Struktur dieser Polymere (Meinhardt und Fändrich 2009).

Das gemeinsame strukturelle Merkmal aller Fibrillen ist die cross- β -Struktur. Dabei werden, theoretisch beliebig lange, intermolekulare β -Faltblätter ausgebildet. Die einzelnen β -Faltblattstränge verlaufen dabei im rechten Winkel zur Fibrillenachse, während die Wasserstoffbrückenbindungen des Faltblattes parallel dazu verlaufen (Sunde *et al.* 1997). Eine reife Amyloidfibrille kann aus einem oder mehreren Protofilamenten bestehen (Meinhardt und Fändrich 2009). Ein Protofilament ist dabei die filamentöse Grundeinheit der Fibrille (Jimenez *et al.* 2002, Schmidt *et al.* 2009).

Generell gibt es, auch in Fibrillen der gleichen Polypeptidkette, strukturelle Polymorphismen. Eine Präparation von Fibrillen enthält also immer eine Mischung aus mehreren Typen von Fibrillen. So unterscheiden sich Fibrillen strukturell zum Beispiel in ihrer Anzahl der Protofilamente, in der Anordnung der Protofilamente und der Konformation der Polypeptide (Fändrich *et al.* 2009). Abbildung 6 zeigt zwei unabhängig voneinander gefundene Strukturen von A β (1-42) Fibrillen.

Fibrillen sind also langgezogene Polymere, welche aus einem bis mehreren Protofilamenten bestehen können, und ihre Präparationen sind deswegen immer heterogen. Somit stellen sie, durch die Vielzahl der unterschiedlichen Epitope, ein schwer zu bearbeitendes Zielmolekül dar (Meinhardt *et al.* 2009).



Abbildung 6: Strukturen von A β (1-42) Fibrillen.

(A) Darstellung einer aus elektronenmikroskopischen Daten rekonstruierten A β (1-42) Fibrille und die Dichtekarte eines Querschnittes des dazugehörigen Protofilamentes (*structure*). In der Mitte ist eine mögliche Anordnung der Peptide dargestellt (*model*). Diese Fibrille ist aus nur einem Protofilament aufgebaut. Abbildung entnommen und modifiziert aus (Schmidt *et al.* 2009).

(**B**) Darstellung eines Protofilamentes mit einer Auflösung von 5 Å. Die ersten beiden Peptide am geraden Ende der Fibrille sind in Rot, respektive Blau dargestellt. Die Reste, die den intermolekularen Kontakt herstellen, sind in Stäbchenform visualisiert. Die β -Faltblattstränge sind durch große Pfeile symbolisiert. Abbildung nach (Lührs *et al.* 2005) PDB: 2BEG.

*A*β Fibrillen als pharmakologisch relevante Zielstruktur

Es handelt sich bei den A β Fibrillen um krankheitsassoziierte Proteinstrukturen, entsprechend hoch ist ihre Relevanz als pharmakologische Zielstruktur einzuschätzen. Von der eigentlichen Polypetidkette über die Oligomere bis hin zu den reifen Fibrillen können sämtliche Zwischenstufen der Aggregationskaskade als potentielle Epitope für Antikörper und Bindeproteine in Betracht gezogen werden (Dumoulin und Dobson 2004). Das Naheliegendste sind dabei sequenzspezifische Antikörper (Solomon *et al.* 1996, Frenkel *et al.* 2000, McLaurin *et al.* 2002). Für diese wurde berichtet, dass sie den Fibrillationsprozess verhindern und reife Fibrillen wieder auflösen.

Aufgrund von therapeutischen Erfolgen der Antikörper im Mausmodell (Lambert *et al.* 2001, Dodart *et al.* 2002) wurde in einer weiterführenden klinischen Studie versucht, Patienten mit aggregiertem A β Peptid zu immunisieren. Aufgrund der Antwort des Immunsystems konnten einige Patienten ihre kognitiven Leistungen verbessern (Hock *et al.* 2003). Vier Prozent der teilnehmenden Patienten aber entwickelten Symptome ähnlich der Meningoenzephalitis, was schließlich zu einem Abbruch der Studie führte (Check 2002, Dumoulin und Dobson 2004). Ebenso wurden konformationsspezifische Antikörper sowohl gegen die Fibrillen (Habicht *et al.* 2007, O'Nuallain und Wetzel 2002) als auch gegen leicht veränderte Oligomere-Zustände (Kayed *et al.* 2003) generiert. Neueste Arbeiten beschreiben die Selektion eines Kamelantikörpers aus einer Bibliothek, welcher nur die oligomeren Zustände des A β (1-40) Peptides erkennt (Morgado *et al.* 2012).

Auch kleine, nicht proteinogene Moleküle können mit der Fibrille interagieren und interessante Effekte hervorrufen (Bieschke *et al.* 2010, Ehrnhoefer *et al.* 2008). So konnte zum Beispiel für das chemische Molekül O4 beobachtet werden, dass es die *lag*-Phase der Fibrillation von A β (1-42) wesentlich verkürzt und somit die Fibrillenbildung beschleunigt (Bieschke *et al.* 2012).

Auch künstliche Bindeproteine, in diesem Falle Affibodies, wurden gegen A β Peptide generiert (Grönwall *et al.* 2007). Es konnte auch hier ein Einfluss auf die Fibrillation nachgewiesen werden. Die Anwesenheit des Affibody-Moleküls unterdrückt die Bildung der Fibrillen vollständig (Hoyer *et al.* 2008). Interessanterweise ist das Bindeprotein bis zur Interaktion mit dem Zielmolekül zum größten Teil unstrukturiert und faltet erst während der Bindung in seine stabile Konformation (Hoyer und Härd 2008). Da das Affibody-Molekül die Aggregation der A β Peptide verhindert, konnte es für eine Koexpression mit den Peptiden eingesetzt werden. Auf diese Art konnten A β Peptide rekombinant gewonnen werden, welche ohne Aggregationsinhibitor in ihrer monomeren Form rekombinant nicht zugänglich wären (Macao *et al.* 2008).

Reife A β (1-42) Fibrillen stellen also ein medizinisch sehr interessantes Zielmolekül dar. Im Rahmen dieser Arbeit soll die erzeugte Bibliothek gegen Fibrillen selektiert werden, um so konformationsspezifische Bindeproteine zu erzeugen.

1.5 Zielstellung

Der zentrale Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist das artifizielle Protein M7. Es soll erstmalig gezeigt werden, dass sich M7 als *scaffold* eignet und für eine Randomisierung auf Sekundärstrukturelementen zugänglich ist. Unter Ausnutzung der hohen intrinsischen Stabilität von M7 soll auf dem 5-strängigen β -Faltblatt eine universelle Bindefläche generiert werden. Dazu soll im Einzelnen:

- eine funktionale DNA-Bibliothek auf Grundlage des M7 Gens erstellt werden
- die Funktionalität der Bibliothek auf DNA- und Proteinebene überprüft und bestätigt werden
- das Ribosomen-display für die erstellte Bibliothek etabliert werden
- eine Selektion der Bibliothek mittels Ribosomen-*display* gegen die Zielmoleküle TNF α und reife A β (1-42) Fibrillen durchgeführt werden
- über geeignete screening Verfahren Zielmolekül bindende Varianten isoliert werden
- bindende Varianten produziert und biochemisch analysiert werden.

Anhand der so generierten Daten soll die Eignung des Proteins M7 als ein *scaffold* Protein eingehend untersucht werden. Im Vordergrund stehen dabei die Fragen, ob es möglich ist, eine auf DNA- und Proteinebene funktionale Bibliothek zu erstellen, diese für das gewählte *display*-Verfahren zugänglich ist, und ob sich letztlich bindende Varianten generieren lassen. Eine biochemische Charakterisierung der erzeugten Varianten, sofern möglich, soll Aufschluss darüber geben, ob die Eigenschaften des gewählten *scaffold* Proteins erhalten geblieben sind.

2 Materialien

Im folgenden Kapitel werden die für die Erstellung dieser Arbeit notwendigen Materialien aufgeführt.

2.1 Chemikalien

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Chemikalien verwendet (Tabelle 1). Sofern nicht gesondert angegeben, besaßen alle Chemikalien den Reinheitsgrad p.A.

Chemikalien	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol	Applichem (Darmstadt)
Agarose Sieve GP	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth GmbH (Karlsruhe)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Soytone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Tryptone	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson (Heidelberg)
Borsäure	Roth GmbH (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt)
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth GmbH (Karlsruhe)
Carbenicillin	Roth GmbH (Karlsruhe)
Cobalt(II)-chlorid - Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Coomassie R250	Applichem (Darmstadt)
D(+)-Glukose	Roth GmbH (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem (Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth GmbH (Karlsruhe)
dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)	Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA	Roth GmbH (Karlsruhe)
EDTA (für die Mikrobiologie)	Applichem (Darmstadt)
Eisen(III)-chlorid - Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Essigsäure	Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol (96%ig), vergällt	Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethanol reinst	Roth GmbH (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (1%)	Roth GmbH (Karlsruhe)
Glukose - D(+)	Roth GmbH (Karlsruhe)
Glycerin	Applichem (Darmstadt)
Glycin	Applichem (Darmstadt)
Glykogen	Roche Applied Science (Mannheim)

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Bezugsquelle
HEPES {2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethansulfon- säure}	Applichem (Darmstadt)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Applichem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Roth GmbH (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Applichem (Darmstadt)
Kanamycin-Sulfat	Roth GmbH (Karlsruhe)
Kupfer(II)-chlorid - Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Laktose (α-Laktose Monohydrat)	Roth GmbH (Karlsruhe)
LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Applichem (Darmstadt)
Methanol	Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Applichem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumdisulfit	Applichem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (20%)	Applichem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Roth GmbH (Karlsruhe)
Natriummolybdat - Dihydrat	Applichem (Darmstadt)
Natriumselenit	Applichem (Darmstadt)
Natriumsulfat	Roth GmbH (Karlsruhe)
Nickel(II)chlorid - Hexahydrat	Applichem (Darmstadt)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Applichem (Darmstadt)
rRNA, 16S und 23S, E. coli	Roche Applied Science (Mannheim)
Salzsäure (37%)	Roth GmbH (Karlsruhe)
Schwefelsäure (96%)	Roth GmbH (Karlsruhe)
Silbernitrat	Applichem (Darmstadt)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Tetracyclin-Hydrochlorid	Roth GmbH (Karlsruhe)
TMB Xtra (Peroxidase Substrat)	Kem-En-Tec Diagnostics (Taastrup, DK)
Tricin	Applichem (Darmstadt)
Tris [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan] (für die Molekularbiologie)	Applichem (Darmstadt)
tRNA, aus E. coli	Roche Applied Science (Mannheim)
Tween-20	Applichem (Darmstadt)
Wasser, DEPC behandelt	Fermentas (St. Leon-Rot)
Wasser, nukleasefrei	Applichem (Darmstadt)
Zinksulfat - Heptahydrat	Applichem (Darmstadt)

2.2 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die verwendeten Standardpuffer gelistet (Tabelle 2). Alle Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem, gefilterten Wasser hergestellt und vor Verwendung erneut filtriert. Puffer für die Chromatographie wurden zusätzlich mit Hilfe einer Vakuumanlage für mindestens 30 min entgast.

Bezeichnung	Zusammensetzung (Bezugsquelle)		
Sonstige Puffer und Lösungen			
$10 \times blocking \ buffer$	Sigma-Aldrich (München)		
$(10 \times)$ Blocker BSA in TBS	Pierce (Rockford, USA)		
PBS	137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na $_2$ HPO $_4$, 15 mM KH $_2$ PO $_4$, pH 7,4		
PBST0,05	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20		
Zell-Lyse-Puffer	PBS mit 0,3 mM PMSF, 0,1 mg/ml Lysozym, 5 U/ml Benzonase, 2 mM ${\rm MgSO}_4$		
Puffer für die SDS-PAGE			
$5 \times \text{SDS-PP}$	300 mM Tris-HCl, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8		
$5 \times \text{SDS-PP}$ (reduzierend)	$5 \times$ SDS-PP mit 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol		
Tris-Tricin-Laufpuffer (Clearpage)	0,1 % (w/v) SDS, 40 mM Tricin, 60 mM Tris, 2,5 mM Natriumdisulfit, pH 8,2		
PageBlue Protein Staining Solution	(Fermentas)		
Puffer für die SPR			
Laufpuffer HBS-EP+ (10 × Puffer)	0.1 M HEPES, 1,5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0,5 % (v/v) <i>surfactant</i> P20, pH 7,4 (nach Verdünnung) (GE Healthcare)		
Regenerationslösung	10 mM Glycin-HCl, 1 M NaCl, pH 1,5		
Puffer für die Agarosegelelektrophorese			
TAE-Puffer	12,5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,5		
$6 \times$ Orange Loading Dye	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)		
Puffer für die chromatographische Reinigung			
NPI-20	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8,0		
NPI-500	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol pH 8,0		
Puffer für das Ribosomen-display			
WB (Waschpuffer)	20 mM HEPES-NaOH, 100 mM KAcO, 50 mM MgCl ₂ , pH 7,5		
WBT (Waschpuffer mit Tween-20)	WB mit 0,05 % (v/v) Tween-20		
BWB (Blockierungspuffer)	WB mit 10 % (v/v) $10 \times blocking buffer$ (Sigma)		

Tabelle 2: Liste häufig verwendeter Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung (Bezugsquelle)	
SB (Stopppuffer)	WB mit 10 % (v/v) (10×) Blocker BSA in PBS (Pierce), 0,05 % (v/v) Tween-20	
EB (Elutionspuffer)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mg/ml rRNA, 1 mg/ml tRNA, pH 7,5	
Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen		
TB-Puffer	10 mM HEPES-KOH, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ , pH = 6,7	

2.3 Nährmedien und Antibiotika

Zur Kultivierung von *E. coli* Zellen dienten verschiedene Nährmedien (Tabelle 3). Diese wurden vor Verwendung 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden zuvor steril filtrierte, hitzeempfindliche Stoffe (Antibiotika) den Medien zugesetzt.

Medium / Stammlösungen	Zusammensetzung
$50 \times M$ 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 Glukose, 100 g/l α-Laktose- Monohydrat
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
$1 \times ZY$ -Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Agar
ZYM 5052 Autoinduktionsmedium	$1\times$ ZY-Medium, $1\times$ M Lösung, $1\times$ 5052 Lösung, 2 mM MgSO ₄ , 0,02 % (v/v) 1000 \times Spurenelemente-Lösung
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glukose

Tabelle 3: Liste der verwendeten Nährmedien.

2.4 Enzyme und andere Proteine

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Enzyme und Proteine gelistet (Tabelle 4).

Enzym oder Protein	Bezugsquelle
Antikörper und Immunkonjugate	
anti-M7 Antikörper (aus Kaninchen)	Davids Biotechnologie (Regensburg)
anti-His6-Peroxidase-Konjugat (BMG-His-1)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
anti-Kaninchen-Peroxidase Konjugat (aus Ziege) (A9169)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Polymerasen	
Phusion DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
Transcriptor Reverse-Transkriptase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Taq Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzyme	
NcoI Fast Digest	Fermentas (St. Leon-Rot)
XhoI Fast Digest	Fermentas (St. Leon-Rot)
Eco31I	Fermentas (St. Leon-Rot)
SpeI	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
NheI	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
Sonstige Enzyme und Proteine	
Alkaline Phosphatase (aus Shrimps) (1 U/µl)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Amyloid β -Protein (1-42) (N-terminal biotinyliert)	Bachem (Bubendorf)
Benzonase (25 U/µl)	Novagen (Darmstadt)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Humanes AB Serum	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Applichem GmbH (Darmstadt)
Murine RNAse Inhibitor	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
T4-DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle 4: Liste der verwendeten Enzyme und Standardproteine.

2.5 Standards und Kits

Im Folgenden sind die verwendeten Kits und Standards aufgelistet (Tabelle 5).

Standard oder Kit	Bezugsquelle
Standards	
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Kits	
GeneJet PCR Cloning Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
PURExpress In Vitro Protein Synthesis Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt /Main)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Wizard Plus SV Minipreps	Promega (Mannheim)
Wizard SV Gel and PCR Clean up System	Promega (Mannheim)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce (Rockford, USA)

Tabelle 5: Liste der verwendeten Standards und Kits.

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 6 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (*primer*) zusammen. Alle *primer* wurden von der Firma Thermo Scientific (Ulm) bezogen und standardmäßig HPCL gereinigt geliefert. Überstieg die Größe der Oligonukleotide 40 bp, erfolgte von oben genannter Firma eine PAGE Reinigung der *primer*.

primer	Größe in bp	Sequenz (5' nach 3')
F1	65	GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTAAG- AAGGAGATATACATATG
F1A	48	CATACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC
primer 6a	62	AGACGTGGTCTCAGGCGCGCGTAATGTTNNKATTNNKATCAGCCGG- AAAATGATGAACAGG
primer 7a	49	CACTTCGGTGCCATTAACMNNCACMNNGATATCTTTATACCCAGTTTC
primer 8a	44	GACATGGTCTCTCGCCTGCGCGTGCCAGCGCTTTTTCCAGTTCC
primer 9a	60	ATTCAGCGTGATGGCCAGGAAATCNNKATTNNKATCCGCGTGACAC-CGGTAAAGAACTG
primer 10	69	GAAGGAGATATACCATGGGCAGCCATATGAAAGTGGATATCNKATCNN- KATTCAGCGTGATGGCCAGG

Tabelle 6: Liste der verwendeten primer.

primer	Größe in bp	Sequenz (5' nach 3')
primer 11	47	CGGCGGCTAGCAACGCGAACMNNGATMNNCACTTCGGTGCCATTAAC
primer 12a	60	CGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAC-CATGGGCAGCC
primer 13	24	GCGGCGGCTAGCAACGCGAACTTC
primer 14	69	CCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC- TCTAGAAATAATTTTGTTTAAC
primer 15	59	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGA- CTCACTATAGGG
primer 16	29	GATCGCCATGGGCAGCCATATGAAAGTGG
primer 18	33	GGAGATATACCATGGGCAGCCATATGAAAGTGG
primer 20	32	CCCGCACCGCTACCTGCACTAGCAACGCGAAC
primer 21	32	CTAGCCTCGAGACCTGCACTAGCAACGCGAAC
primer 26	34	CGGAGCGGAGCCTCCCCCTCCACTACCACCACCG
primer 27	48	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGCAGCCATATGAAAGTGGATATC
primer 28	23	CGGAGCGGAGCCTCCCCCCCCAC
primer 29	33	GAGATATACATATGGGCAGCCATATGAAAGTGG
L17for_Spe	38	GCGGCGACTAGTGCAGGTAGCGGTGCGGGTGCGGGTTC
L17rev_P	20	CGGCGCGCTACCGCCACCAC

2.7 Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet (Tabelle 7).

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pET28a(+)	Expressionsvektor, T7-Promotor, Kan ^R , T7-Terminator, His ₆ - <i>tag</i> N- oder C-terminal möglich	Novagen (Darmstadt)
pUC19	Klonierungsvektor, Amp ^R	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pUC18	Testplasmid für die Transformation Amp ^R	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pCS003	Expressionsvektor pET28a(+) mit subklo- niertem Gen für das originale M7-Protein oder Varianten davon, C-terminale Fusion mit His6- <i>tag</i> , Kan ^R	diese Arbeit
pPCRScript-M7	Amp ^R , kommerzieller Vektor, welcher das synthetische Gen für das M7-Protein enthält	Gene Art (Regensburg)

 Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

2.8 Mikroorganismen

Es wurden verschiedene Mikroorganismen für die Kultur von Plasmiden und Expression von Genen benutzt. Tabelle 8 gibt einen Überblick dazu.

E. coli Stamm	Genotyp	Referenz
DH5alpha	fhuA2 $\Delta(argF-lacZ)U169$ phoA glnV44 $\Phi 80$ $\Delta(lacZ)M15$ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	Invitrogen (Carlsbad, USA)
NovaBlue(DE3)	endA1 hsdR17(rK12– mK12+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (DE3)F'[proA+B+ lacI $qZ\Delta M15$::Tn10] (TetR)	Novagen (Darmstadt)
BL21(DE3)	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3)	(Studier und Moffatt 1986)

 Tabelle 8: Liste der verwendeten Mikroorganismen.

2.9 Geräte und Zubehör

Neben der Standardlaborausstattung wurden im Zuge der experimentellen Arbeiten folgende Geräte verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Liste der verwendeten Geräte und Zubehör.

Geräte und Zubehör	Hersteller
Absorptionsspektrometer	
UV-Vis Spektrophotometer DU 730	Beckman Coulter (Krefeld)
QS 10.00 mm	Hellma Analytics (Müllheim)
100 µl Mikroküvette	Hellma Analytics (Müllheim)
Tray Cell 0,2 mM /1 mm	Hellma Analytics (Müllheim)
Einmalküvetten Polystyrol	Brand GmbH (Wertheim)
Autoklav	
Systec V75	Systec (Wettenberg)
Chromatographie Anlagen	
ÄKTAexplorer	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ÄKTAxpress	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
ÄKTAFPLC	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Fraktionssammler Frac-900	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superloop 10 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superloop 500 µl	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Chromatographiesäulen und -materialien	
Affinitätschromatographie	
HisTrap HP 5 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HisTrap HP 1 ml	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)

Geräte und Zubehör	Hersteller
Größenausschlusschromatographie	
HiLoad 16/60 Superdex S75 (prep grade)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
PD-10 Sephadex G25 Desalting column	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Superose 12 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Elektroporationsgerät	
Elektroporator ECM 630	BTX Harvard Apparatus (Holliston, USA)
Elektroporationsküvetten, 2 mm	BTX Harvard Apparatus (Holliston, USA)
Geldokumentationseinheit	
Bio-Vision 3000	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Gelelektrophoresegeräte	
Electrophoresis Power Supply Consort EV 261	Camlab (Cambridge, UK)
Agarosegelelektrophorese	
Owl B1A/B1/B2 EasyCast Mini Gel	Thermo Scientific (Langenselbold)
SDS-PAGE	
Xcell SureLock Novex Mini-Cell	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Inkubatoren	
Inkubator Heraeus BK 5060 E-S	Heraeus (Hanau)
Innova 44 R	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
TiMix Control mit TH 15 Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
Kleinschüttelgerät	
Vortex-Genie2	Scientific Industries (New York, USA)
Laborroboter	
Liquid-handling-systems	
Biomek FX	Beckman Coulter (Krefeld)
Koloniepicker	
Qpix2 mit	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
Qtray (X6023)	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
Laminarflowbox	
HERAsafe (Typ KS 12)	Thermo Scientific (Langenselbold)
Magnetrührer	
MR Hei-Standard	Heidolph (Schwarzbach)
Plattenlesegeräte	
DTX880 Multimode Plattenlesegerät	Beckman Coulter (Krefeld)
Multimode Detektor Biomek Paradigm	Beckman Coulter (Krefeld)
pH-Messgerät	
inoLab pH720 (Elektrode: SenTix 81)	WTW (Weilheim)

Geräte und Zubehör	Hersteller
Schüttelinkubatoren	
Heidolph Unimax 1010	Heidolph (Schwarzbach)
Rollenmischer	
Stuart SRT9	Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
Thermomixer	
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Mikrotiterplatten-Aufsatz	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	
Tpersonal	Biometra (Göttingen)
LabCycler gradient 96	Sensoquest (Göttingen)
LightCycler 480	Roche Diagnostics GmbH (Göttingen)
Ultraschallgerät	
Vibra Cell VC 750	Sonics & Materials (Newton, USA)
Sonotrode 6 mm	Zinsser Analytic (Frankfurt/M.)
Vakuumgeräte	
Vakuumfiltrationsgerät	Sartorius Stedim Biotech (Aubagne Cedex, F)
Vakuumpumpe Model Nr. 25227-02	Welch (Sheboygan, USA)
Waagen	
Feinanalysewaage SI-234	Denver Instruments (New York, USA)
Waage SI-2002	Denver Instruments (New York, USA)
Wasserreinigungsanlage	
PURELAB PLUS UV/UF	USF (Ransbach-Baumbach)
Type PL51124 02	
Zentrifugen und Rotoren	
Zentrifugen	
Allegra X-15R	Beckman Coulter (Krefeld)
Avanti J-26XP	Beckman Coulter (Krefeld)
TL-100 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Biofuge Fresco 21	Thermo Scientific (Langenselbold)
Galaxy Mini Mikrozentrifuge	VWR International (Darmstadt)
Rotoren	
FX-6100	Beckman Coulter (Krefeld)
JA-25.50	Beckman Coulter (Krefeld)
JA-8.100	Beckman Coulter (Krefeld)
JS-5.3	Beckman Coulter (Krefeld)
SX-4750 A	Beckman Coulter (Krefeld)
TLA-100	Beckman Coulter (Krefeld)
2.10 Sonstige Materialen

Weitere benötigte Materialien sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Sonstige Materialien.

Materialien	Bezugsquelle
Dynabeads	
Dynabeads M-270 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dynabeads M-280 Streptavidin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dynabeads Protein A	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dynabeads Protein G	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Filter für Vakuumfiltrationsgerät	
Membranfilter (PES, 0,22 µm)	Sartorius Stedim Biotech (Aubagne Cedex, F)
Supor 200 PES Membrane Disc Filter	Pall Corporation (Michigan, USA)
Einmalspritzen	
3/5/10/50 ml BD Plastipak Luer-Lok	Becton Dickinson (Heidelberg)
Mikrotiterplatten	
96-well, U-Boden (650201)	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well, U-Boden (650101)	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
96-well, F-Boden, MediSorp	Nunc (Roskilde, DK)
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Applied Science (Mannheim)
Abdeckfolien	
Breath-easy	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Aluminium Seal Tape	Nunc (Roskilde, DK)
LightCycler 480 Sealing Foil	Roche Applied Science (Mannheim)
Reagenz-Reservoirs	
25 ml (steril)	VWR (Dresden)
100 ml (steril)	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
SDS-PAGE-Gele	
ClearPAGE 16 % SDS Gel 12/17 well	C.B.S. Scientific (Del Mar, USA)
Spritzenvorsatzfilter	
0,22 μm	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
0,44 μm	Laborfachhandel Schubert (Leipzig)
Weitere Materialien	
DNA-ExitusPlus	Applichem (Darmstadt)
Einmal Injektionskanülen Gr. 2	Braun (Melsungen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
pH – Indikatorstäbchen	Roth GmbH (Karlsruhe)
RNase Blaster Solution	Clontech Laboratories (Mountain View, USA)
Zellkulturröhrchen 14 ml Tube	Greiner-Bio-One GmbH (Frickenhausen)
1,5 ml-Reaktionsgefäße ProteinLowBind	Eppendorf (Hamburg)

Materialien	Bezugsquelle
Zentrifugenkonzentratoren	
Vivaspin 20	Sartorius Stedim Biotech (Aubagne Cedex, F)
Vivaspin 4	Sartorius Stedim Biotech (Aubagne Cedex, F)

2.11 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Programme verwendet (Tabelle 11).

Programm und Version	Bezugsquelle
BIO-1D 5.1.26	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software (Cary, USA)
Multimode Analysis Software	Beckman Coulter (Krefeld)
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/ (abgerufen am 17.12.2012)
PyMOL 0.99rc6	DeLano Scientific (South San Francisco, USA)
Qsoft XP	Molecular Devices (Biberach an der Riss)
Roche Light Cycler Software release 1.5.0	Roche Applied Science (Mannheim)
Sigma Plot 11.0	Systat Software (Erkrath)
UNICORN 4.11 Control-Software	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Vector NTI Suite 10	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Biacore T100 Evaluation Software 1.1	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)

Tabelle 11: Liste der verwendeten Software.

3 Methoden

Dieser Abschnitt befasst sich mit den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden. Dabei wird zwischen mikrobiologischen, proteinbiochemischen, molekularbiologischen, evolutionären Methoden und Methoden, die spezifisch für das Experimentieren mit Fibrillen sind, differenziert.

3.1 Mikrobiologische Methoden

Es wurde mit verschiedenen Stämmen des Mikroorganismus *Escherichia coli (E. coli)* gearbeitet. Für den Umgang mit diesem Organismus wurden verschiedene Methoden benötigt, welche im Folgenden dargestellt sind.

3.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von E. coli

Um mit *E. coli* Zellen über kürzere Zeiträume (bis zu vier Wochen) zu arbeiten, wurden diese auf LB-Agar Platten propagiert. Nach der Inkubation erfolgte die Lagerung der Platten bei 4 °C.

Für eine langfristige Stammhaltung wurden Kryokulturen angelegt. Dazu wurden Übernachtkulturen mit sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 8-10 % (v/v) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \degree$ C gelagert.

Um Zellen in Flüssigkulturen zu vermehren wurden 5 ml LB-Medium, welche das entsprechende Antibiotikum enthielten, mit einer Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht erfolgte in 14 ml Zellkulturröhrchen.

3.1.2 Herstellung kompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen (Dower *et al.* 1988) wurden 500 ml antibiotikahaltiges LB-Medium in einem 2 l Kolben mit 5 ml einer Übernachtkultur angeimpft und die Zellen bis zu einer Dichte von $OD_{600 \text{ nm}} = 0,6$ bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Alle folgenden Schritte fanden unter Einhaltung der Sterilität und bei 4 °C statt. Die Zellen wurden 60 min lang auf Eis inkubiert und anschließend bei 1.600 × g für 16 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 ml sterilem, entionisiertem Wasser durch Schütteln resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1.800 × g für 18 min, nach dieser das Zellpellet in 250 ml sterilem Wasser resuspendiert wurde. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2.000 × g für 20 min folgte.

Schließlich wurde das Pellet in 125 ml 10% igen Glycerin resuspendiert und eine finale Zentrifugation bei $1.600 \times \text{g}$ für 16 min durchgeführt. Das Pellet wurde in 2,2 ml 10% igen Glycerin gelöst und die Zellsuspension auf 40 µl aliquotiert. Die erhaltenen Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

Chemisch kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen fand eine modifizierte Methode nach Inoue (Inoue *et al.* 1990) Anwendung. Dazu wurden 100 ml antibiotikahaltiges LB-Medium in ei-

nem 500 ml Schüttelkolben mit 2 ml einer Übernachtkultur angeimpft und die Zellen bis zu einer Dichte von $OD_{600 \text{ nm}} = 0,6$ bei 25 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Alle weiteren Schritte erfolgten unter Einhaltung der Sterilität und bei 4 °C. Die Zellen wurden 10 min lang auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 2.500 × g zentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 16 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wiederholte sich der oben beschriebene Zentrifugationsschritt. Das entstandene Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) mit DMSO versetzt. Die Zellen inkubierten daraufhin weitere 10 min auf Eis. Abschließend wurden die Zellen auf 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der Transformationseffizienz

Sowohl von elektrisch als auch von chemisch kompetenten Zellen wurde die Transformationseffizienz bestimmt, nachdem die Zellen mindestens über Nacht bei –80 °C lagerten. Dazu wurde für die Transformation eines Aliquotes kompetenter Zellen 1 µl des Testplasmids pUC18 mit einer Konzentration von 10 pg/µl verwendet. Nach erfolgter Transformation wurden 100 µl auf einer LB-Agar Platte [Amp^r] ausplattiert und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C die Kolonien gezählt. Gleichung 1 gibt an, wie daraus die Transformationseffizienz in cfu/µg berechnet werden kann (cfu = *colony forming unit*).

Transformationseffizienz =
$$\frac{Anzahl Kolonien \cdot Gesamtvolumen in \mu l}{Menge DNA in pg. ausplattiertes Volumen in \mu l} \cdot 10^6$$
 Gleichung 1

3.1.3 Transformation von E. coli Zellen

Transformation von elektrokompetenten Zellen

Escherichia coli Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Dazu wurde ein 40 μ l Aliquot elektrokompetenter Zellen mit zirka 1 ng Plasmid-DNA oder 1 μ l Ligationsansatz versetzt und das Gemisch in eine auf –20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, die einen Elektrodenabstand von 2 mm hatte. Die Elektroporation erfolgte am Elektroporator ECM 630 mit den folgenden Einstellungen:

Spannung:	1,8 kV
Widerstand:	200 Ω
Kapazität:	25 µF

Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Eine anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer für 30–45 min. Je nach gewünschter Zellzahl wurde der gesamte Ansatz, Teile oder Verdünnungen davon auf Agarplatten, die mit den entsprechenden Antibiotika versehen waren, ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Um chemisch kompetente Zellen zu transformieren, wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und mit zirka 1 ng Plasmid-DNA oder 1 µl Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz inkubierte dann 10 min lang auf Eis. Im Thermomixer wurden die Zellen hitzeschockbehandelt (42 °C für 30 s) und anschließend erneut auf Eis für 2 min inkubiert. 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium wurden hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer für 30–45 min inkubiert. Je nach gewünschter Zellzahl wurde der gesamte Ansatz, Teile oder Verdünnungen davon auf Agarplatten, die mit den entsprechenden Antibiotika versehen waren, ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

3.1.4 Genexpression

Genexpression für präparative Reinigung

Um Proteine im größeren Maßstab herzustellen, wurden *E. coli* Zellen in Schüttelkolben (5 l, 3 l, 2 l) mit Schikane inkubiert. Dazu wurden die Kolben mit maximal 10 % ihres Eigenvolumens mit ZYM-5052-Autoinduktionsmedium (Studier 2005), das die entsprechenden Antibiotika enthielt, gefüllt und zur Inokulation eine Übernachtkultur im Verhältnis 1 : 100 bis 1 : 500 verwendet. Die Zellen wurden 6 h bei 37 °C und weitere 14 h bei 30 °C ohne Unterbrechung bei 220 rpm inkubiert. Nach 20 h Gesamtinkubation wurden Proben entnommen und die Optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Im Anschluss erfolgte eine Zellernte.

Genexpression im 96-well Format

Für die Analyse von mehreren hundert Einzelklonen diente ein Expressionsformat im 96well Maßstab. Dazu wurden Transformationsansätze auf Q-Tray Agar-Platten (Format: $24 \times 24 \times 2$ cm) ausgestrichen und inkubiert. Mit Hilfe des QPix2 Koloniepicking-Roboters wurden die so erhaltenen Einzelkolonien in 96-well Polystyrolplatten (300 µl Volumen/Kavität) überführt. Diese waren mit 180 µl je Kavität LB-Medium befüllt und wurden über Nacht bei 37 °C und 700 rpm im Mikrotiterplatten-Inkubator belassen. Diese Vorkulturen fanden Verwendung Glycerolstocks herzustellen oder direkt 96-*well* Expressionskulturen anzuimpfen. Für eine Expression im 96-*well* Format wurden 180 µl ZYM-5052-Autoinduktionsmedium pro *well* vorgelegt, und die Platte mit Hilfe des Qpix2 Roboters angeimpft. Die Expression wurde für 20 h bei 37 °C und 700 rpm ausgeführt.

3.1.5 Zellernte und Zellaufschluss

Zellernte

Eine Zellernte erfolgte stets durch eine Zentrifugation bei $5.000 \times g$ und 4 °C für mindestens 15 min. Der Überstand wurde dekantiert, und das Zellpellet direkt im Anschluss aufgeschlossen oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zellaufschluss für präparative Reinigung

Für die präparative Proteinreinigung wurden die Zellpellets in 2 ml NPI-20-Puffer pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert, danach 800 μ g/ml Lysozym hinzugegeben und eine PMSF Konzentration von 0,5 mM eingestellt. Dazu fand eine 100 mM Stammlösung von PMSF in Isopropanol Verwendung. Die Zellen wurden 30 min lang bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für 3 min eingefroren und im Wasserbad für 8 min bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieser Gefrier/Tau-Zyklus wurde in Summe viermal ausgeführt.

Um zelluläre DNA aus dem Gemisch zu entfernen, wurde im Anschluss mit Hilfe einer Stammlösung die Mg²⁺-Ionenkonzentration auf 2 mM eingestellt und 0,25 µl Benzonase pro ml dazugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Rollmischer.

Abschließend wurde das Zelllysat bei 50.000×g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand für die Proteinreinigung verwendet.

Zellaufschluss für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe von Ultraschall. Dazu wurde vor der Ernte der Zellen die Optische Dichte $(OD_{600 \text{ nm}})$ bestimmt und Proben auf die Optische Dichte normiert entnommen (1/OD in ml). Die entsprechende Menge Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch eine Zentrifugation bei 21.600 × g und 4 °C für 15 min wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl PBS-Puffer resuspendiert. Ein Ultraschallaufschluss fand mit der 6 mm Sonotrode und unter ständiger Eiskühlung mit folgenden Parametern statt:

Schallzeit:	50	S
Pulsdauer:	5	S
Pause zwischen den Pulsen:	10	S
Amplitude:	21	%

Um lösliche von unlöslichen Bestandteilen zu trennen, erfolgte erneut eine Zentrifugation mit den gleichen Parametern wie oben. Der Überstand wurde abgenommen und als lösliche Fraktion bezeichnet. Das entstandene Pellet aus unlöslichen Zelltrümmern und Proteinen wurde in 300 μ l PBS-Puffer resuspendiert und als unlösliche Fraktion bezeichnet. Beide Fraktionen wurden mit je 60 μ l 5 × SDS-PP versetzt, 5 min bei 99 °C inkubiert und direkt für die SDS-PAGE-Analyse verwendet.

Zellaufschluss im 96-well Format

Nach Zentrifugation der 96-*well* Platten wurde der Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die erhaltenen Zellpellets wurden in je 100 μ l Zell-Lyse-Puffer resuspendiert und die Platten 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit einer dichten Alufolie verschlossen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei zirka 37 °C. Dieser Gefrier/Tau-Zyklus wurde in Summe viermal durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 6.300 × g für 30 min, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Der lösliche Überstand wurde mit einer Mehrkanalpipette (zirka 80 μ l) abgenommen und konnte für weitere Analysen verwendet werden.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

Zur Bestimmung und Analyse von Proteinen werden in dem folgenden Abschnitt die dazu notwendigen Methoden vorgestellt.

3.2.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine proteinanalytische Methode, welche eine Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Molekularmasse ermöglicht (Laemmli 1970). Hierzu kamen ClearPAGE 16 % SDS-Gele mit 12 und 17 Probenkammern zum Einsatz. Die Proteinproben, versetzt mit 20 % (v/v) $5 \times$ SDS-PP, inkubierten für 5 min bei 99 °C. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 45 min bei 200 V. Zur Größenabschätzung der Proteine wurde ein Markergemisch mit auf das Gel aufgetragen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe einer kommerziell erhältlichen, Coomassie G-250 basierten Färbelösung nach Angaben des Herstellers (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas).

3.2.2 Biotinylierung von TNFa

Um das Zielmolekül TNF α mit einem Biotin-*tag* zu versehen, wurde mit dem Sulfo-NHS-LC-Biotin Kit von Pierce gearbeitet. Gereinigtes TNF α (Reinheit >96 %) stellte freundlicherweise Herr Dr. Andreas Hoffmann zur Verfügung (Hoffmann *et al.* 2010, Hoffmann 2011). Es wurde versucht, präferenziell nur den N-Terminus des TNF α -Moleküls zu biotinylieren. Deshalb wurden Reaktionsbedingungen bei pH 6,5 gewählt (Selo *et al.* 1996). Es wurden 1,5 ml TNF α Proteinlösung (c = 100 µM) über eine PD-10 Entsalzungssäule nach Angaben des Herstellers (GE Healthcare) in 25 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 umgepuffert. Die Elutionsfraktionen, die das Protein in Phosphatpuffer enthielten, wurden vereinigt. So konnten 3 ml Proteinlösung gewonnen werden, die mit 80 µl einer 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin Lösung versetzt wurden. Die Reaktion verlief über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde ein Vivaspin 4 Zentrifugenkonzentrator (MWCO = 5.000 Da) dazu verwendet, die Reaktionslösung zu konzentrieren und gleichzeitig überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Zentrifugenkonzentrator diente ebenfalls dazu, durch fünfmaligen Pufferaustausch, die Probe in einen anderen Puffer (PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4) zu überführen. Eine massenspektrometrische Analyse von Frau Dr. Schierhorn (Martin-Luther-Universität Halle) bestätigte die erfolgreiche Biotinylierung (siehe Anhang: Abbildung 35).

3.2.3 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Um Protein-Protein Interaktionen spezifisch nachzuweisen und die Bindungsstärke von Liganden zu ermitteln, wurde mit Hilfe des ELISA im 96-*well* Format gearbeitet. Dazu wurden über Nacht 500 ng Zielprotein (pro Kavität) in 50 μ l bei 4 °C und 300 rpm auf Nunc Medi-Sorp Platten immobilisiert. Nach Entfernung der Lösung erfolgte ein dreimaliges Waschen mit je 300 μ l/Kavität PBS Puffer. Alle sich nun anschließenden Schritte erfolgten bei 22 °C und 300 rpm und schlossen mit einem dreimaligen Waschen mit je 300 μ l/Kavität PBST0,05 Puffer ab. Um eventuell noch freie Bindungsstellen in den Kavitäten zu blockieren, wurden die Platten mit 300 μ l/Kavität 1× *blocking buffer* für 2 h inkubiert. Der *blocking buffer* wurde abgenommen, die entsprechende Ligandenlösung (gereinigtes Protein, oder Zelllysat) 50 μ l/Kavität hinzugegeben und die Platte 1 h lang inkubiert. Wenn ein primärer Antikörper zum Einsatz kam, dann erfolgte ein Inkubationsschritt für 1 h mit 50 μ l/Kavität des Antikörpers (Verdünnung in 1× *blocking buffer* nach Herstellerangaben).

Im Falle eines direkten ELISA fand ein POD-konjugierter primärer Antikörper Verwendung, und der Inkubationsschritt mit dem sekundären Antikörper wurde ausgelassen.

Ein POD-konjugierter sekundärer Antikörper wurde nach Herstellerangaben in $1 \times blocking$ buffer verdünnt und 50 µl/Kavität hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 1 h. Vor der Substratzugabe wurde ein zusätzlicher Waschschritt mit dreimal 300 µl/Kavität PBS ausgeführt. Um die Farbreaktion zu starten, wurden 50 µl/Kavität TMBXtra hinzugegeben und die Platte 10–60 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Kavität 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 450 nm und 620 nm (Hintergrund) mit Hilfe eines Plattenlesegerätes.

Im Falle eines kompetitiven ELISAs wurde die Ligandenlösung zuvor für mindestens 1 h mit dem entsprechenden Kompetitor vorinkubiert.

Die mathematische Auswertung von konzentrationsabhängigen ELISAs erfolgte nach folgender Gleichung:

$$y = \frac{AU_{max} \cdot x}{K_p + x}$$
 Gleichung 2

3.2.4 Proteinreinigung mittels IMAC und SEC

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Reinigung von Proteinen, welche einen His₆-*tag* angefügt hatten. Dazu wurden die Verfahren der immobilisierten Metallchelat-Affinitätschromatographie und der Größenausschlusschromatographie angewendet.

Immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

Durch eine Wechselwirkung von Polyhistidinpeptiden mit immobilisierten Nickelionen ist es möglich, aus einem Proteingemisch mehr oder weniger spezifisch, diejenigen Proteine zu binden, welche einen Histidin-Affinitäts-*tag* tragen. Alle Proteine ohne *tag* wechselwirken kaum mit der Matrix und können so abgereichert werden. Um die gebundenen Proteine wieder von der stationären Phase zu entfernen, macht man sich das Prinzip der kompetitiven Elution zu Nutze. So kann eine Elution in diesem Fall zum Beispiel mit einer hohen Imidazolkonzentration erfolgen.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie ist ein Trennverfahren für unterschiedliche, gelöste Stoffe. Das Trennprinzip beruht hierbei auf der unterschiedlichen Größe oder genauer auf dem unterschiedlichen hydrodynamischen Radius dieser Stoffe. Dabei werden Stoffgemische über eine poröse, inerte Matrix geleitet. Je nach ihrem hydrodynamischen Radius interagieren

sie mit den Poren der Matrix. Kleine Moleküle wechselwirken vergleichsweise stark mit den Poren, während größere Moleküle die Matrix ohne nennenswerte Interaktion passieren können. Dadurch kommt es zu einer unterschiedlichen Verweilzeit der Moleküle auf der Matrix, was sich in entsprechenden Retentionszeiten bzw. Retentionsvolumina widerspiegelt.

Reinigung von M7 und M7-Varianten

Zur Reinigung von M7 und selektierten Varianten dieses Proteins wurde mit dem automatisierten ÄKTAxpress System (GE Healthcare) gearbeitet. Es wurden 1 ml HisTrap HP Säulen für die IMAC und eine HiLoad 16/60 Superdex S75 (*prep grade*) Säule für die Größenausschlusschromatographie nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Säulen wurden vor ihrer Verwendung mit mindestens 1,2 CV (*column volume*) des entsprechenden Puffers äquilibriert. Nach erfolgtem Zellaufschluss und Zentrifugation (siehe 3.1.5) wurde das Zelllysat einer automatisierten Zweischritt-Reinigung unterzogen. Dazu wurde das Lysat mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine HisTrap HP aufgetragen und, um die Beladung abzuschließen, mit 10 CV NPI-20-Puffer nachgespült. Anschließend wurden mit 15 CV NPI-20-Puffer die ungebundenen Proteine von der Säule gewaschen. Ein Stufenelutionsschritt auf 100 % NPI-500-Puffer über 8 CV eluierte gebundenes Protein von der Säule. Das Eluat wurde dabei automatisiert in systeminternen Probenschleifen (*loops*) gesammelt. Folgende Parameter dienten für die automatische Peakerkennung:

maximales Peakvolumen:	5 ml
Peak UV-Startwert:	20 mAU
Peak UV-Endwert:	15 mAU
Peak UV-Anfangssteigung:	10 mAU/min

Im Anschluss wurden 5 ml des gesammelten Peaks automatisiert auf die Gelfiltrationssäule geladen und die Größenausschlusschromatographie mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min ausgeführt. Ab einem Volumen von 0,55 CV wurde das Eluat kontinuierlich fraktioniert gesammelt. Erkannte das Programm einen Peak, dann besaßen die Fraktionen die Größe von 1 ml, ansonsten wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt. Für die Peakerkennung waren folgende Parameter relevant:

Peak UV-Startwert:	2	mAU
Peak UV-Endwert:	2	mAU
Peak UV-Anfangssteigung:	3	mAU/min
Peak Minimalbreite:	0,	5 min
Peak UV-Endsteigung:	3	mAU/min

Anhand der erhaltenen Chromatogramme war es möglich, das apparente Molekulargewicht zu bestimmen. Zusätzlich konnten Schlüsse auf den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen gezogen werden. Das Ergebnis der Proteinreinigung wurde mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft.

3.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Um die Konzentration von Proteinen in wässriger Lösung zu bestimmen, kam die Methode der UV/VIS Spektroskopie zum Einsatz. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin zeigen im Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm charakteristische Absorptionsspektren (Galla 1988). Gemessen wurde in wässriger Lösung in Präzisionsküvetten aus Quarzglas. Den Konzentrationsberechnungen liegt das hier geltende Lambert-Beer'sche Gesetz zugrunde:

$$A = log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$
 Gleichung 3

- I Intensität des nicht absorbierten Lichtes
- I₀ Intensität des eingestrahlten Lichtes
- ε molarer Extinktionskoeffizient [M⁻¹ cm⁻¹]
- c molare Konzentration der Proteinlösung [M]
- d Schichtdicke der Küvette [cm]
- A gemessene Absorption (Extinktion).

Es wurden die Absorptionsmaxima von pufferkorrigierten Spektren bei 280 nm (Tryptophan) bzw. 276 nm (wenn das Protein nur Tyrosine enthielt) zur Bestimmung der Konzentration herangezogen.

Die molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden mit Hilfe des *online* Programmes ProtParam [http://web.expasy.org/protparam/ (abgerufen am 17.12.2012)] berechnet (Gasteiger *et al.* 2005, Gill und von Hippel 1989).

3.2.6 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Um Protein-Protein Interaktionen quantitativ zu untersuchen, wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) (Schasfoort und Tudos 2008) verwendet. Diese Methode beruht auf dem physikalischen Effekt der Oberflächenplasmonresonanz, wie er zum Beispiel an dünnen Goldfilmen auftritt. Monochromatisches Licht, das auf den Goldfilm in einem bestimmten Winkel eingestrahlt wird, wechselwirkt mit den freien Elektronen des Metalls und verliert dadurch an Energie. Der Energieverlust des reflektierten Lichtes kann über einen Detektor aufgezeichnet werden. Der Winkel, bei dem diese Resonanzbedingung erfüllt ist, hängt wesentlich vom Brechungsindex der Goldschicht ab. Dieser wiederum ist stark abhängig vom Beladungszustand der Goldschicht.

Auf der Goldschicht ist es möglich, über kovalente oder nicht kovalente Bindungen, Zielmoleküle zu immobilisieren. Ein Flusssystem erlaubt es, über die Zielmoleküle eine Analytlösung zu leiten. Kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Zielmolekül und Analyt (Bindung), ändert sich der Brechungsindex der oberflächennahen Schicht. Die daraus resultierende Winkeländerung, bei der der Resonanzeffekt auftritt, kann in Echtzeit detektiert werden. Die Winkeländerung ist also ein direktes Maß für den Beladungszustand der Goldoberfläche.

38

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem Biacore T100 System und Streptavidin (SA) Sensorchips der Firma GE Healthcare gearbeitet. Dazu wurden partiell biotinylierte A β (1-42) Fibrillen (finale Beladung: 793 RU) oder N-terminal biotinyliertes, disaggregiertes A β (1-42) Peptid (finale Beladung: 232 RU) auf unterschiedlichen Flusszellen eines SA Sensorchips immobilisiert. Sämtliche Messwerte wurden um die Messwerte einer unbehandelten Referenzflusszelle korrigiert. Es wurden nur die korrigierten Spektren dargestellt und ausgewertet. Die Flussrate betrug stets 30 µl/min. Als Laufpuffer diente HBS-EP+ Puffer (GE Healthcare). Die Assoziations- und Dissoziationszeiten betrugen 180 s, respektive 300 s. Um gebundenen Analyt vollständig zu entfernen, wurde eine Regenerationslösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 2) nach jeder Messung für 60 s über den Chip geleitet. Zur Basislinienstabilisierung erfolgte im Anschluss für 300 s eine Spülung mit Laufpuffer. Die K_D-Werte berechneten sich nach einem 1 : 1 Bindungsmodell, wozu Werte aus dem *steady-state* 5 s vor Beginn der Dissoziation über einen Bereich von 5 s gemittelt wurden (Habicht *et al.* 2007). Dabei dienten immer monomere Einheiten als Grundlage für die Konzentrationsbestimmung, sowohl bei den Fibrillen als auch bei den zu analysierenden Proteinen.

Kompetitionsexperimente mit Hilfe der SPR

Für Kompetitionsexperimente mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie fiel die Wahl auf folgenden experimentellen Ablauf. Es wurden drei Ansätze mit einer Endkonzentration von 15 μ M 4.G11 (Analyt) in HBS-EP+ Puffer erstellt, ein Ansatz zusätzlich auf 100 μ M A β (1-42) Fibrillen eingestellt. Die drei Ansätze wurden 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gelagert und zwei Ansätze (4.G11 allein und 4.G11 mit Fibrillen) bei 100.000 × g für 30 min zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend abgenommen und das Pellet verworfen. Somit konnten die Fibrillen und damit gebundenes 4.G11 Protein aus dem System entfernt werden. Die Überstände und die nicht zentrifugierte 4.G11 Probe (Positivkontrolle) wurden auf ihre Bindungsfähigkeit hin im Biacore mit den oben beschriebenen Parametern untersucht. Analog fand dieses Experiment auch mit A β (1-40) Fibrillen statt.

3.2.7 Analytische Größenausschlusschromatographie

Um Protein-Protein Interaktionen qualitativ nachzuweisen, wurde die Methode der analytischen Größenausschlusschromatographie verwendet. Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst einzeln über die Säulenmatrix gegeben, um ihre Chromatogramme und Retentionsvolumina zu detektieren. Wenn die beiden Proteine miteinander interagieren, also eine Bindung stattfindet, dann sollte sich das in einem geänderten Laufverhalten in der Größenausschlusschromatographie widerspiegeln.

Dazu wurden äquimolare Mengen an TNF α und potentiellem Bindemolekül gemischt und 1:45 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde im Anschluss per Größenausschlusschromatographie analysiert.

Die Läufe wurden auf einer ÄKTAFPLC mit einer Flussrate von 1 ml /min durchgeführt. Als Chromatographiesäule fand eine Superose 12 10/300 GL Verwendung. Zur Beladung

der Anlage wurde ein 500 µl *superloop* verwendet. Bei dieser Art der Beladung konnte eine reproduzierbare Beladung der Säule nicht sichergestellt werden. Somit sind die erhaltenen Daten qualitativ aber nicht quantitativ auswertbar. Die Chromatogramme wurden bei 280 nm detektiert und als Puffersystem PBST0,05 verwendet. Während aller Läufe fand eine fraktionierte Probensammlung statt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden die wichtigsten angewendeten molekularbiologischen Methoden vorgestellt.

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA (pDNA) aus *E. coli* Zellen zu isolieren, wurde mit dem Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Das Elutionsvolumen wurde hierbei auf 40 μ l nukleasefreies Wasser herabgesetzt und anschließend die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt. Die erhaltene Probe wurde bei –20 °C gelagert.

3.3.2 Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Moleküle anhand ihrer Größe zu trennen, kam eine Agarosegelelektrophorese zum Einsatz. Alle DNA-Gemische wurden vor der elektrophoretischen Trennung mit 1/4 ihres Volumens mit 6 × Orange Loading Dye versetzt. Um Moleküle ≥1000 bp zu separieren, wurden 1,5%ige (w/v in TAE-Puffer) Agarosegele (LE Agarose) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Laufkammern unter TAE-Puffer bei 110 V für mindestens 45 min. Der Fortschritt der Elektrophorese wurde optisch, anhand der im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe, abgeschätzt. Für Moleküle unter 1000 bp wurden 3%ige (w/v in TAE-Puffer) SieveGP Agarose Gele verwendet. Die Trennzeit hierbei konnte bis zu mehreren Stunden betragen. Um eine Größenabschätzung der DNA-Fragmente vornehmen zu können, wurde als Referenz auf jedes Gel ein Markergemisch (Gene Ruler, Fermentas) der entsprechenden Größenkategorie aufgetragen.

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele in ein Färbebad, bestehend aus TAE-Puffer mit 2 µg/ml Ethidiumbromid, überführt und mindestens 30 min lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Banden mit Hilfe des BioVision 3000 Geldokumentationssystem unter UV-Licht visualisiert. Wenn DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA isoliert werden sollte, wurde ausschließlich mit *genetic pure* (GP) Agarosen gearbeitet.

3.3.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um DNA aus Agarosegelen zu isolieren, wurde mit dem 'Wizard SV Gel and PCR Clean-Up' System (Promega) weitestgehend nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Abweichend davon wurde der Durchlauf bei der DNA Bindung erneut aufgetragen. Zusätzlich wurde mit 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und das Eluat für einen zweiten Elutionsschritt erneut auf die Säule aufgetragen. Anschließend erfolgte die Konzentrationbestimmung der DNA photometrisch.

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe einer Tray Cell Küvette (Hellma) und eines Spektrophotometers bestimmt. Als Referenzsubstanz diente nukleasefreies Wasser. Es wurden pufferkorrigierte Spektren aufgenommen. Die Absorption wurde bei 260 und 280 nm gemessen, und das Verhältnis der Werte zueinander wurde verwendet, um die Reinheit der Probe abzuschätzen (Roche 2011). Der Konzentrationsberechnung lagen folgende Gleichungen zu Grunde:

DNA: 50
$$\frac{ng}{\mu l}$$
 dsDNA = 1 Absorptionseinheit bei 260 nm Gleichung 4
RNA: 40 $\frac{ng}{\mu l}$ ssRNA = 1 Absorptionseinheit bei 260 nm Gleichung 5

3.3.5 Restriktionsspaltung und Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente spezifisch zu ligieren, erfolgte zuvor eine Behandlung mit Restriktionsendonukleasen. Dabei wurde stets nach Angaben des Enzymherstellers gearbeitet. Exemplarisch ist hier ein typischer Reaktionsansatz für einen Doppelverdau eines linearen PCR-Fragmentes dargestellt (Tabelle 12). Die Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C im Thermocycler ausgeführt und abschließend die Enzyme durch eine Inkubation bei 80 °C für 10 min inaktiviert.

Agenzien	Endkonzentration	Volumen in µl
DNA-Fragment	A-Fragment 1500 ng	
Fast-NcoI	-	1
Fast- <i>Xho</i> I	-	1
FastDigest buffer (10×)	1×	2
Wasser	-	ad 20

Tabelle 12: Typischer Reaktionsansatz für einen DNA Doppelverdau.

Wenn Plasmid-DNA verdaut wurde, wurde der Reaktion nach 2 h Inkubationszeit eine entsprechende Menge Alkaline Phosphatase [5,66 % (v/v)] zugesetzt und für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Somit konnte der Vektor dephosphoryliert werden und die Wahrscheinlichkeit einer Selbstligation verringerte sich. Eine Inaktivierung fand auch in diesem Fall statt (siehe oben).

Die verdauten DNA-Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese gereinigt.

Um die gereinigten DNA-Fragmente zu ligieren, wurde mit der T4-DNA-Ligase von NEB oder Fermentas jeweils nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente zu amplifizieren, Restriktionsschnittstellen einzuführen und Mutagenesen durchzuführen, fand die Technik der Polymerasekettenreaktion (PCR) Anwendung (Mullis *et al.* 1986). Es wurde überwiegend mit der Phusion Polymerase (Finnzymes) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Anzahl der Zyklen, die Elongationszeiten und die Annealingtemperaturen wurden jeweils dem zu amplifizierenden DNA-Fragment angepasst. Im Folgenden sind ein typischer Ablauf einer PCR-Amplifikation und ein Pipettierschema (Tabelle 13) dargestellt.

Initiale Denaturierung:	99 °C für 60 s	$1 \times$
Denaturierung:	99 °C für 20 s	7
Annealing	50–68 °C für 15 s	$-20-30 \times$
Elongation	72 °C für 15 s	
Finale Elongation	72 °C für 300 s	$1 \times$

Tabelle 13: Typisches Pipettierschema für eine PCR-Reaktion.

Zutat	Konzentration	Endkonzentration	Volumen in µl
template DNA	-	2 ng/µl	< 14,4
forward primer	50 pmol/µl	0,5 μΜ	0,2
reverse primer	50 pmol/µl	0,5 μΜ	0,2
dNTPs	10 mM	0,20 mM	0,4
DMSO	100 %	3%	0,6
Phusion GC buffer	5×	1 ×	4
Phusion Polymerase	2 U/µl	0,4 U	0,2
nukleasefreies Wasser	-	-	ad 20

Das verwendete Pipettierschema ist bis in den Milliliterbereich erweiterbar, dabei wurde ein Reaktionsvolumen von 50 μ l pro 200 μ l PCR-*tube* nicht überschritten. Die Ansätze wurden entsprechend aliquotiert, das entstandene PCR Produkt mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese untersucht und gegebenenfalls aus dem Gel isoliert.

3.3.7 Ethanolfällung von DNA

Um DNA zu präzipitieren und somit zu konzentrieren, wurde mit Hilfe der Ethanolfällung gearbeitet. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 5 % (v/v) Glykogen und dem zweifachen seines Volumens mit -20 °C kaltem Ethanol (reinst) versetzt und nach Durchmischen des Ansatzes dieser für mindestens 1 h bei -80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 21.100 × g bei 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde durch Zugabe von -20 °C kaltem 70%igen Ethanol (gleiches Volumen wie zuvor das 100%ige Ethanol) gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei 37 °C für mindestens 30 min getrocknet und je nach ursprünglicher DNA Menge in 10–50 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

3.3.8 Sequenzanalyse von DNA-Molekülen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sequenzieraufträge, je nach Art des zu sequenzierenden Objektes, an unterschiedliche Firmen erteilt.

Die Sequenzierung von gereinigten Plasmiden (oder pDNA) übernahm die Firma Qiagen (Hilden). Wenn die Sequenzen von linearen PCR Produkten untersucht werden sollten (quantitative Analyse von NNK-Motiven), wurde die Firma SequiServe (Vaterstetten) beauftragt.

Für die Sequenzierung von mehreren hundert Bibliotheksmitgliedern wurde mit der Firma GATC (Konstanz) zusammengearbeitet. In diesem Fall wurden *E. coli*-Stichkulturen in 96-*well* Mikrotiterplatten versandt und die Plasmidpräparation und Sequenzierung dann von GATC vorgenommen.

3.4 Selektion und Evolution durch Ribosomen-display

Eine Möglichkeit, evolutionäre Selektion im Labor zu realisieren, ist die Methode des Ribosomen-*displays* (Plückthun 2011, Zahnd *et al.* 2007). Bei dieser Methode wird eine DNA- oder RNA-Bibliothek *in vitro* translatiert und ternäre Komplexe bestehend aus Ribosomen, RNA und naszenter Polypeptidkette erzeugt, wodurch gleichzeitig die Genotyp/Phänotyp Kopplung gewährleistet wird. Diese Komplexe können jetzt anhand ihrer Bindungseigenschaften gegenüber einer immobilisierten Zielstruktur selektiert werden (Abbildung 7). Nur die Komplexe, bei denen die Polypeptidkette eine Bindung zur Zielstruktur aufweist, sollten positiv selektiert werden.



Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Ribosomen-*display* Zyklus. Ribosomen sind durch rote Ellipsen, RNA-Moleküle durch Wellenlinien und Proteine durch Rechtecke symbolisiert. Exemplarisch ist hier die Bindung an immobilisiertes Zielprotein (blaues "L") dargestellt.

Nach der Selektion kann durch eine gesamt-RNA Isolation, Reverse-Transkription und eine cDNA-Amplifkation die genetische Information der bindenden Varianten gewonnen werden. Diese selektierte Bibliothek kann in einer weiteren Runde Ribosomen-*display* verwendet oder in einen Expressionsvektor subkloniert werden. Durch Fehler bei den PCR-Reaktionen kann es zu einer weiteren Evolution des Zielmoleküls kommen. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte des Ribosomen-*displays* dargestellt.

3.4.1 Konstruktion einer DNA-Bibliothek auf Basis des M7-Gens

Das Gen des M7-Proteins diente zum Aufbau einer NNK-basierten DNA-Bibliothek. Die zu verändernden Positionen wurden aufgrund einer visuellen Begutachtung der Struktur des M7 Proteins festgelegt. Es erfolgte die Auswahl von zehn Resten, welche Lösungsmittel-exponiert und zentral im β -Faltblatt lokalisiert sind. Damit sollte eine planare und rigide Bindefläche geschaffen werden. Um die Eignung des Proteins M7 als Bindeprotein zu testen, wurde sich für ein NNK-Motiv-basiertes Bibliotheksdesign entschieden. Tabelle 14 fasst die möglichen Codons eines NNK-Motives zusammen.

		2. Position					
		А	С	G	Т		
	Δ	Asn (N)	Thr (T)	Ser (S)	Ile (I)	Т	
	A	Lys (K)	Thr (T)	Arg (R)	Met (M)	G	
ų	C	His (H)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	Т	ω
sitic	C	Gln (Q)	Pro (P)	Arg (R)	Leu (L)	G	. Po
Po	C	Asp (D)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	Т	stio
-	U	Glu (E)	Ala (A)	Gly (G)	Val (V)	G	n
	т	Tyr (Y)	Ser (S)	Cys (C)	Phe (F)	Т	
		Amber	Ser (S)	Trp (W)	Leu (L)	G	

 Tabelle 14: Überblick über die möglichen Codons bei NNK Motiven. Tabelle entnommen aus (Hoffmann 2011).

Durch die Verwendung dieser Motive reduziert sich der genetische Code. Das hat vor allem den Vorteil, dass zwei von drei möglichen Stopp-Codons nicht vorhanden sind. Dennoch sind Codons für alle 20 proteinogenen Aminosäuren vorhanden. Somit wird auf Proteinebene die maximale Variabilität erreicht.

Da die zu verändernden Codons relativ gleichmäßig über das gesamte Gen verteilt sind, wurde eine Strategie in vier Schritten für die Erstellung der Bibliothek gewählt (siehe Abbildung 8). Alle PCR-basierten Schritte zur Erstellung der Bibliothek erfolgten mittels der Phusion Polymerase (vgl. 3.3.6). Nach jedem Schritt wurde die erhaltene DNA über eine Agarosegelelektrophorese gereinigt und anschließend aus dem Gel isoliert.



Abbildung 8: Schematische Darstellung des Bibliotheksdesigns. Das Gen für das M7-Protein ist schwarz dargestellt. Grüne Pfeile symbolisieren *primer*, welche in den rot markierten Bereich die degenerierten Codons eingebaut haben. Der gelbe Bereich markiert die *Eco31*I Schnittstelle, der blaue Bereich steht für eine *NheI* Schnittstelle.

- Es erfolgten zwei PCR-Reaktionen, eine Reaktion mit *primer* 6a und 7a und eine Reaktion mit *primer* 8a und 9a. Jeder *primer*, außer *primer* 8a, führte hierbei zwei degenerierte Codons ein. Als Template diente jeweils das M7-Gen in einem pUC19 Vektor. So konnten die Fragmente 6a7a und 8a9a erhalten und gereinigt werden.
- II. Die beiden Fragmente besaßen jetzt aufgrund des *primer*-Designs eine zueinander kompatible *Eco31*I Schnittstelle. Es wurde eine simultane Restriktions/Ligations-Reaktion (Cost 2007, Cost und Cozzarelli 2007) ausgeführt. Dazu sind dem Reaktionsansatz die beiden Fragmente 6a7a und 8a9a und das Enzym *Eco31*I sowie T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (Fermentas) zugesetzt worden. Nach abgeschlossener Reaktion wurde die DNA einer Ethanolfällung unterzogen und anschließend über ein Agarosegel gereinigt.
- III. Das so erhaltene Fragment 8a9a6a7a enthielt bereits sechs degenerierte Codons, wie über Sequenzierungen bestätigt werden konnte. Es diente als Template für eine weitere PCR-Reaktion mit *primer* 10 und *primer* 11. Pro *primer* konnten so weitere zwei degenerierte Codons in die Bibliothek eingebaut werden. *Primer* 11 fügte zusätzlich eine *Nhe*I Schnittstelle am 3'Ende an.
- IV. Das erhaltene Fragment 1011 wurde gereinigt und per Sequenzanalyse untersucht. Es enthielt die erwarteten zehn randomisierten NNK Positionen.

Dieses Fragment diente anschließend dazu, die Bibliothek in das Ribosomen-*display* Format zu überführen. (Abbildung 9).



Abbildung 9: Schematische Darstellung des Bibliotheksdesigns im Ribosomen-*display* Format. Das Gen für das M7-Protein ist schwarz dargestellt. Grüne Pfeile symbolisieren *primer*, rot markiert die degenerierten Codons. Der blaue Bereich steht für eine *NheI/SpeI* Schnittstelle. Die 5'UTR ist in grau und die Ribosomen-Anker-Sequenz in Ocker dargestellt.

Dazu wurde am 5'Ende die 5'UTR (UTR = *untranslated region*) eingeführt, welche alle für eine Genexpression nötigen regulatorischen Elemente enthält. Dazu wurden nacheinander PCR-Reaktionen mit den *forward primern* 12a, 14 und 15 ausgeführt. Als *reverse primer* diente hierbei stets der *primer* 13. Die Zwischenprodukte wurden gereinigt und jeweils als Template für die nächste PCR Reaktion eingesetzt, bis man das Fragment 1513 erhielt.

Eine simultane Restriktions/Ligations-Reaktion wurde verwendet, um die Ribosomen-Anker-Sequenz (siehe Anhang Abbildung 31) am 3'Ende anzufügen. Dazu wurden dem Reaktionsansatz das Fragment 1513 und die Ribosomen-Anker-Sequenz sowie die Enzyme *Nhe*I, *Spe*I und T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion schloss sich eine Ethanolfällung an. Das erhaltene Pellet wurde in 25 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und über ein Agarosegel gereinigt. Die komplette Sequenz der finalen Bibliothek ist im Anhang in Abbildung 32 hinterlegt.

3.4.2 In vitro Translation und Transkription (ITT)

Für eine gekoppelte Translation und Transkription wurde das PURExpress *In Vitro Protein Synthesis* Kit von NEB nach Angaben des Herstellers genutzt. Das Reaktionsvolumen wurde dabei auf 60 μ l erhöht und alle Komponenten dementsprechend angepasst. Vor Zugabe der Bibliotheks-DNA wurde der Ansatz 3 min bei 30 °C und 350 rpm im Thermomixer vorinkubiert, anschließend 5 μ l entnommen und mit 195 μ l EB-Puffer gemischt. Diese Probe diente als Nullwert (Negativkontrolle) für die *Real-Time* PCR-Analyse und lagerte bis zur gesamt-RNA Isolation auf Eis.

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von mindestens 1×10^{12} Molekülen linearer, doppelsträngiger DNA gestartet. Nach 55 min Inkubation bei 30 °C und 350 rpm im Thermomixer wurde die Reaktion durch Zugabe von 1100 µl eiskaltem SB-Puffer und 2,4 µl Chloramphenicol (50 mM in EtOH_{reinst}) gestoppt. Der Ansatz wurde 1 min lang auf Eis gelagert und im Anschluss erfolgte zur Abtrennung von Aggregaten eine Zentrifugation von 10 min bei 21.100 × g und 4 °C. Es wurden 5 µl vom Überstand abgenommen und mit 195 µl EB-Puffer gemischt. Diese Probe diente als Positivkontrolle für die *Real-Time* PCR-Analyse und lagerte bis zur RNA Isolation auf Eis. Der restliche Überstand wurde für die sich anschließenden Selektionsschritte verwendet, welche ausschließlich bei 4 °C erfolgten.

3.4.3 Vorbereitung der magnetischen beads

Magnetische *beads* wurden verwendet, um nach erfolgter Selektion der M7-Bibliothek gegen das Zielprotein, das Zielprotein zusammen mit gebundenen M7-Varianten zu immobilisieren. Diese haben je nach Art unterschiedliche Oberflächen und Bindungseigenschaften. Während der Selektion wurde je nach gewünschter Eigenschaft mit verschiedenen *beads* gearbeitet. Um eine Anreicherung von Bindern gegen bestimmte Oberflächenmerkmale der *beads* zu unterbinden, wurden während der Selektion carboxylierte (M270) und tosylaktivierte (M280, T1) *beads* verwendet. Alle *beads* wurden vor ihrer Applikation wie folgt vorbereitet.

Die *beads* wurden durch Zugabe von 500 µl WB-Puffer gewaschen und anschließend im Magneten fokussiert. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Um die Oberfläche der *beads* zu blocken, mussten diese mit 500 µl BWB-Puffer versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert werden. Am nächsten Tag wurden die *beads* fokussiert und dreimal mit je 500 µl WBT-Puffer gewaschen. Der WBT-Puffer des letzten Waschschrittes wurde erst unmittelbar vor dem Einsatz der *beads* in der Selektion abgenommen.

3.4.4 Prä-Selektion

Um ternäre Komplexe des Ribosomen-*displays*, welche unspezifisch mit der Oberfläche der *beads* interagieren, zu entfernen, wurde in einigen Selektionsrunden eine Prä-Selektion durchgeführt (siehe Tabelle 15 und 16). Dazu wurde der gesamte Überstand auf eine bestimmte Menge zuvor geblockter *beads* gegeben und für 15 min bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden die *beads* mit Hilfe eines Magneten fokussiert und der Überstand abgenommen. Die gebrauchten *beads* wurden verworfen und die Prozedur mit neuen *beads* wiederholt. Der so erhaltene präselektierte Überstand mit den verbliebenen ternären Komplexen fand im nächsten Schritt, der Selektion, Verwendung.

3.4.5 0. Runde Ribosomen-display

Um die Funktionalität der erstellten Bibliothek (siehe 3.4.1) zu erhöhen, wurde eine Runde Ribosomen-*display* vollzogen, bei der kein Zielprotein, sondern ein M7-Varianten-spezifischer Antikörper (anti-M7) als *target* vorlag. Der polyklonale Antikörper aus Kaninchen ist gegen die beiden Helices des M7-Proteins gerichtet. Die beiden Helices sind in der Primärsequenz N- und C-terminal angeordnet. Somit sollten überwiegend Proteinspezies erkannt werden, welche keine verkürzten Varianten sind. Die absolute Anzahl der Stopp-Codons in der Bibliothek sollte auf diesem Wege verringert werden. Dadurch erhöht sich gleichzeitig der statistische Anteil an funktionalen Bibliotheksmolekülen. Es wurde eine Selektion in Lösung durchgeführt. Um die gebundenen Antikörper aus der Lösung zu entfernen, wurden Protein G *beads* eingesetzt. Tabelle 15 fasst die Bedingungen zusammen, die für die 0. Runde gültig waren. Die Bibliotheks-DNA, die aus der 0. Runde gewonnen werden konnte, fand Verwendung für alle weiteren Selektionsrunden.

RD-	[anti-M7]	Prä-Selektion	Inkubation	Menge an	Waaabaabuitta
Zyklus (nM) (Art der beads)		(min)	beads	waschschritte	
0	500	200 µl M280 Inkubation für 75 min	60	200 μl Prote- in G	$3 \times 1 \min_{i} 1 \times 5 \min_{i}$

Tabelle 15: Übersicht über die experimentellen Bedingungen in der 0. Runde Ribosomen-display.

3.4.6 Selektion in Lösung

Im Rahmen der Selektion gegen TNF α wurde ausschließlich die Methode der Selektion in Lösung angewendet. Das Zielmolekül TNF α ist hierbei biotinyliert (siehe 3.2.2) und kann nach erfolgter Reaktion mit Hilfe von Streptavidin beschichteten, magnetischen *beads* immobilisiert bzw. aus dem System entfernt werden. Die eigentliche Bindung an das Zielmolekül kann also vorher in Lösung stattfinden.

Dazu wurde der erhaltene Überstand aus der ITT-Reaktion bzw. aus der Prä-Selektion halbiert, der eine Teil mit dem Zielmolekül TNF α versetzt, der andere mit einer äquivalenten Menge an SB-Puffer als Negativkontrolle. Die Menge an Zielmolekülen wurde hierbei von Runde zu Runde erniedrigt, um den Selektionsdruck zu erhöhen. Nach erfolgter Inkubation wurde der Überstand auf eine entsprechende Menge zuvor geblockter, magnetischer *beads* gegeben und für 30 min auf dem Rollmischer inkubiert. Anschließend wurden die *beads* im Magneten fokussiert und mehrfach mit 500 µl WBT-Puffer gewaschen. Die genauen Selektionsbedingungen, die von Runde zu Runde angepasst wurden, können Tabelle 16 entnommen werden.

RD- Zyklus	[TNFα] (nM)	Prä-Selektion (Art der <i>beads</i>)	Inkubation (min)	Menge an <i>beads</i>	Waschschritte
1	1200	-	30	125 μl M-280	$4 \times 5 \min$
2	450	-	30	70 μl M-270	$3 \times 2 \min$
3	250	50 µl M-270	55	50 μl M-270	$3 \times 1 \min$
4	166	50 µl M-270	100	30 µl M-270	$4 \times 2 \min$
5	143	40 μl T1, 15 μl Protein G, 15 μl Protein A	60	20 µl T1	$3 \times 1 \min, 1 \times 7 \min$
6	100	30 μl T1, 15 μl Protein G, 15 μl Protein A	60	15 µl T1	1 × 1 min 3 × 1 min 7 × 1 min

Tabelle 16: Übersicht über die Selektionsbedingungen der Ribosomen-display Zyklen.

Nach dem Waschen wurden die *beads* fokussiert und der Überstand verworfen. Mit den *beads* wurde im Anschluss eine gesamt-RNA Isolation durchgeführt.

3.4.7 Gesamt-RNA Isolierung

Um die genetische Information der gebundenen ternären Komplexe zu erhalten, musste die RNA isoliert werden. Dazu wurden die *beads* nach der Selektion in 100 μ l EB-Puffer re-

suspendiert und für 10 min bei 20 °C und 300 rpm geschüttelt. Nach erfolgter Fokussierung wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die *beads* wurden erneut mit 100 μ l EB-Puffer versetzt (siehe oben). Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt und bei 16.200 × g bei Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene *beads* vollständig abzutrennen. Die erhaltene flüssige Fraktion fand Verwendung für die RNA-Reinigung. Zusätzlich wurden zu diesem Zeitpunkt auch die Proben der Negativkontrolle und Positivkontrolle der ITT Reaktion aufgearbeitet.

Um RNA quantitativ zu reinigen, wurde mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Es wurde die Inkubationszeit für den DNaseI Verdau auf 20 min erhöht und zusätzlich vor der Elution ein weiterer Zentrifugationsschritt von $14.000 \times g$ bei Raumtemperatur für 2 min durchgeführt. Eluiert wurde mit 20 µl des Elutionspuffers. Das Eluat wurde zur Erhöhung der Ausbeute erneut auf die Säule aufgetragen. Von jeder Probe wurden 2 µl abgenommen und mit Hilfe der Tray Cell Küvette die Konzentration photometrisch bestimmt. Für die folgende Reverse-Transkriptase Reaktion konnten maximal 4 µg eingesetzt werden.

3.4.8 Reverse-Transkriptase Reaktion

Um cDNA zu synthetisieren, wurde der Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurde für die 0. Runde bis einschließlich der 1. Runde Ribosomen-*display* der *primer* L17rev_P in einer Endkonzentration von 1 μ M verwendet, ab der 2. Runde aber mit einer modifizierten 3'Ankersequenz gearbeitet. Aus diesem Grund war ab diesem Zeitpunkt die Verwendung von *primer* 28 als *reverse primer* notwendig.

Nach erfolgter Reaktion lagerte die synthetisierte cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.4.9 Real-Time PCR zur Quantifizierung von cDNA

Um nach den Ribosomen-*display* Runden eine spezifische Anreicherung von M7 Bibliotheks-DNA zu detektieren, wurde die cDNA quantifiziert. Dazu wurde mit dem LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master Kit von Roche nach Angaben des Herstellers gearbeitet und alle Messungen und Auswertungen mit dem Roche Light Cycler 480 und zugehöriger Software vorgenommen.

Zur genauen Quantifizierung von DNA ist eine Standardreihe notwendig. Dazu fand das M7-Gen ohne NNK Motive Verwendung. Ein *primer*-Paar wurde so designt, dass es ohne Einfluss auf die NNK Motive, auf der erhaltenen cDNA sowie auch auf der Vergleichsprobe (Standard) bindet und zu einem Produkt derselben Länge führt. Die Quantifizierung der Ribosomen-*display* Runden 0 und 1 erfolgte mit *primer* 18 und *primer* 20. Ab der 2. Runde wurde mit einer modifizierten 5'UTR Sequenz gearbeitet und der *forward primer* 18 durch *primer* 29 ersetzt. Zu diesem Zweck wurde auch eine neue Standardreihe erstellt.

3.4.10 Subklonierung von Bibliotheks-DNA

Um nach den Ribosomen-*display* Runden bindende Varianten zu identifizieren, muss die erhaltene DNA am Ende einer Selektionsrunde in einem Expressionsvektor subkloniert wer-

den. Dazu wurde eine PCR Reaktion mit 1 μ l der Bibliotheks-DNA als *template* mit den *primern* 16 und 21 durchgeführt. Das PCR Produkt besitzt dann am 5'Ende eine *Nco*I und am 3'Ende eine *Xho*I Schnittstelle. Somit konnte es in die Expressionskassette von einem pET28a Vektor kloniert werden. Dabei wird der C-terminale His₆-*tag*, welcher im Vektor codiert ist, verwendet. Hergestellte Proteinvarianten tragen dann also einen C-terminalen His₆-*tag*.

3.4.11 Automatisiertes screening im Hochdurchsatz-Verfahren

Um mehrere hundert Einzelklone auf ihre Bindung gegen das Zielmolekül und ihre Spezifität hin zu untersuchen, wurde mit Hilfe des Laborroboters Biomek FX ein automatisierter ELISA durchgeführt. Das Besondere an diesem *screening*-Verfahren ist, dass dabei Zelllysat benutzt wird.

Die Handhabung ist analog zu dem manuellen ELISA (siehe 3.2.3). Zuvor wurden *target*-Platten mit jeweils 500 ng/Kavität TNF α bzw. 500 ng/Kavität Lysozym beschichtet. Das Zelllysat (Vorbereitung Lysat siehe 3.1.5), das jeweils eine exprimierte M7-Variante enthielt, kam dabei im Verhältnis 1 : 1 mit PBST0,05 Puffer verdünnt zum Einsatz. Von dem verdünnten Lysat wurden jeweils 50 µl/Kavität auf die TNF α bzw. auf die Lysozym *target*-Platte gegeben. Als Nachweisreagenz für die His₆-*tag* Proteine diente das anti-His₆-Peroxidase-Konjugat (BMG-His-1) von Roche. Damit konnte die Bindung gegen TNF α und gleichzeitig eine eventuell auftretende unspezifische Wechselwirkung mit Lysozym detektiert werden. Nur Varianten, welche gegen TNF α binden, jedoch nicht gegen Lysozym, sollten aus dem ELISA als positive *Hits* hervorgehen. Zu diesem Zweck wurden pro Platte noch vier Kontrollen mitgeführt, die eine mathematische Normierung erlauben.

Um die Vergleichbarkeit der Platten untereinander zu gewährleisten, wurden pro Platte zwei Kavitäten mit je 162,5 ng anti-M7 Antikörper beschichtet. In den entsprechenden Kavitäten wurde das Lysat verwendet, bei dem originales M7-Protein als His₆-*tag* Variante exprimiert wurde. Somit ist eine Positivkontrolle der Expression möglich.

Zwei weitere Kavitäten funktionierten als Negativkontrolle. Sie wurden zwar ebenfalls mit je 500 ng Zielprotein beschickt, jedoch wurde in den entsprechenden Kavitäten kein His₆*tag* Protein exprimiert. Es kam in dem Falle ein pET28a Vektor ohne *insert* zum Einsatz. Anhand dieser Kavitäten lassen sich die Hintergrundsignale des ELISA bestimmen (Negativkontrolle).

Mathematische Analyse des automatisierten screenings

Um die erhaltenen Daten zu analysieren und grafisch auszuwerten, diente ein Excel Makro, das gruppenintern von Herrn Holger Herrmann entwickelt wurde. Im Folgenden sind die mathematischen Operationen beschrieben, die von dem Programm automatisiert ausgeführt werden.

Um die Signalintensitäten aller Platten miteinander vergleichen zu können, wurde zuerst ein plattenspezifischer externer Normierungsfaktor (N_{extern}) bestimmt (Gleichung 6).

 $N_{extern} = \frac{6 \text{ aller Positivkontrollen}}{6 \text{ der platteninternen Positivkontrollen}}$

Mit Hilfe des externen Normierungsfaktors lassen sich die untereinander normierten Signalintensitäten (Sig_{normiert}) berechnen (Gleichung 7). Diese sind ein Maß für die Bindungsstärke.

$$Sig_{normiert} = Messsignale \cdot N_{extern}$$
 Gleichung 7

Um auch eine Kenngröße für die Bindungsspezifität zu erhalten, erfolgte die Berechnung eines internen plattenspezifischen Normierungsfaktors (N_{intern}) (Gleichung 8).

$N_{intern} = N_{extern} \cdot \mathbf{0} \ der \ platteninternen \ Negativkontrollen$ Gleichung 8

Dieser wurde dazu verwendet, alle Platten auf ihre interne Negativkontrolle zu normieren und der erhaltene Wert interne Signalintensität (Sig_{intern}) genannt (Gleichung 9). Ein zu hohes Hintergrundsignal konnte somit mathematisch gemittelt werden.

$$Sig_{intern} = \frac{Sig_{normiert}}{N_{intern}}$$
 Gleichung 9

Schließlich konnte von den so prozessierten Daten das Verhältnis der Werte von TNFα zu Lysozym gebildet werden (Gleichung 10). Dieses Signalverhältnis gibt Aufschluss über die Bindungsspezifität.

Signalverhältnis =
$$\frac{Sig_{intern}(TNF\alpha)}{Sig_{intern}(Lysozym)}$$
 Gleichung 10

Zur grafischen Auswertung wurde ein Plot erstellt. Dieser trägt die normierte Signalintensität (Gleichung 7) auf der x-Achse gegen das Signalverhältnis (Gleichung 10) auf der y-Achse auf. Die x-Achse ist dabei ein Maß für die Bindungsstärke gegen TNF α und die y-Achse ein Maß für die Spezifität. Hochaffine und spezifische Binder sind in dieser Auftragung in der oberen rechten Ecke zu finden.

3.5 Herstellung und Analyse von Fibrillen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Analytik des A β (1-42) fibrillenbindenden Proteins 4.G11 mit verschiedenen A β - und Fibrillenproben gearbeitet. Dieses geschah in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Marcus Fändrich an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle. Die praktischen Arbeiten führte Senthil Kumar aus. Es wurden biotinylierte, sowie nicht biotinylierte A β (1-42) und A β (1-40) Fibrillen (siehe Anhang 8.3.4) erhalten [Protokoll für die Biotinylierung von Fibrillen siehe supplementäre Daten (Habicht *et al.* 2007)]. Ebenso wurde von Herrn Kumar N-terminal biotinyliertes A β (1-42) Peptid einer Disaggregation unterzogen (Chen und Wetzel 2001).

Die Bedingungen, unter denen Fibrillen hergestellt wurden, können dem Anhang entnommen werden (Anhang 8.3.4). Alle folgend beschriebenen Methoden wurden ausschließlich von Senthil Kumar im Rahmen der Kooperation angewandt.

3.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden die morphologischen Analysen der Fibrillen durchgeführt. Dazu wurden 4 μ l der zu analysierenden Probe direkt auf ein Kupfer-Gitter, welches mit Formvar® (Polyvinyl Formal) und Kohlenstoff Filmen bedeckt war, gegeben. Im Anschluss fand die Negativkontrastierung mit Hilfe der *droplet* Technik und der Zugabe von 2 % (w/v) Uranylacetat statt (Harris 1996).

Alternativ dazu wurden 5 μ l der Probe zwischen die Schichten eines kohlenstoffbeschichten *mica* Papiers gegeben, welches dann über einem Tropfen aus 2%igen (w/v) Uranylacetat platziert und für 1 min inkubiert wurde. Danach wurde der aufschwimmende Kohlenstofffilm über dem Tropfen mit einen Kupfer-Gitter (Plano GmbH) aufgenommen und über Nacht luftgetrocknet (Fändrich und Dobson 2002).

Die Einzelproben wurden mit einem Zeis 902 Elektronenmikroskop unter einer Spannung von 80 kV betrachtet, und die Bilder mit Hilfe einer Orius SC 1000 CCD Kamera (Gatan) aufgenommen.

3.5.2 Fibrillierungskinetik

Der Farbstoff Thioflavin T bindet an β -Faltblatt-reiche Regionen in Proteinen, wie sie in Fibrillen vorkommen. Dabei findet eine Verstärkung der Fluoreszenz des Farbstoffes bei gleichzeitiger Rotverschiebung des Emissionsspektrums statt (LeVine 1993). Mit Hilfe dieser erhöhten Fluoreszenz kann die Ausbildung von Fibrillen kinetisch verfolgt werden. Dazu wurde im 96-*well* Maßstab nach dem in Hortschansky *et al.* beschriebenen Protokoll mit einigen Ausnahmen gearbeitet (Hortschansky *et al.* 2005). So wurde aller 30 min ein Datenpunkt aufgenommen und folgende Pufferzusammensetzung verwendet: 50 µM A β (1-40) in 50 mM HEPES (pH = 7,4), 20 µM Thioflavin T, 1 mM Natriumazid (Endkonzentrationen). Die zugesetzten Mengen an 4.G11 und M7 wurden variiert und sind der Legende der jeweiligen Abbildung zu entnehmen.

3.5.3 Fragmentierung von reifen Fibrillen durch die Zugabe von 4.G11

Um den Einfluss von 4.G11 auf reife Fibrillen zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen 4.G11 (0, 10, 25, 50 μ M) 48 h lang bei 37 °C und konstantem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Fibrillen hatten dabei eine Konzentration von 10 mM (bezogen auf das Monomer) in 50 mM HEPES Puffer (pH = 7,4). Als Kontrolle wurden Fibrillen ohne die Zugabe von 4.G11 unter denselben Bedingungen mitgeführt. Im Anschluss wurden zur Analyse der Proben transmissionselektronenmikroskopische Bilder aufgenommen.

3.5.4 Zellzytotoxizitätstest

Um die Toxizität von verschiedenen Fibrillenspezies auf humane SH-SY5Y Neuroblastomzellen zu untersuchen wurde, mit einem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Zellzytotoxizitätstest gearbeitet (Mosmann 1983). Der Test beruht auf der Reduktion des MTT durch die in der Zelle gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und NADPH zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Die Reaktion kann anhand ihrer Farbänderungen spektroskopisch verfolgt werden und ist damit ein direktes Maß für die Glykolyserate und damit die Vitalität der Zelle.

Dazu wurden SH-SY5Y Zellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), welches mit 10 % (v/v) FBS (fötales Rinderserum) versetzt wurde, bei 37 °C und unter 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen (100 μ L) wurden anschließend mit einer Zellzahl von 100.000 Zellen/Kavität in 96-*well* Platten überführt und für weitere 24 h bei 37 °C und unter 5 % CO₂ inkubiert.

Für die Messungen wurde das Medium der Zellen ausgetauscht gegen eine Mischung aus 90 % Medium und 10 % Fibrillen- oder Proteinprobe ausgetauscht. Die Konzentrationen wurden dabei variiert und sind der jeweiligen Abbildungslegende zu entnehmen. Es sind immer die Endkonzentrationen im Medium angegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden pro Kavität 10 μ l einer 12 mM MTT Lösung zugegeben und die Zellen weitere 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden 100 μ l pro Kavität einer 10%igen SDS in 10 mM HCl Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte am nächsten Tag bei 550 nm in einem Plattenlesegerät, wobei die gemessenen Werte um den Hintergrund bei 690 nm korrigiert wurden.

4 Ergebnisse

Zielstellung dieser Arbeit war es, auf Basis des *scaffold* Proteins M7 eine Bibliothek von Proteinvarianten zu erstellen und diese gegen mehrere Zielmoleküle zu selektieren. Es sollte gezeigt werden, dass sich das neue Gerüstprotein M7 für die Generierung künstlicher Bindeproteine eignet. Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse dieser Arbeit dar.

4.1 Auswahl der zu randomisierenden Aminosäurereste

Wie bereits beschrieben (siehe 1.2), besitzt das Protein M7 einige Merkmale, die es zu einem geeigneten Kandidaten für ein *scaffold* Protein machen. Aufgrund der strukturellen Eigenschaften und Zugänglichkeit fiel die Entscheidung für eine Randomisierung von zehn zentralen, Lösungsmittel-exponierten Resten innerhalb des β-Faltblattes. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Reste nicht in direkter Nachbarschaft zu den sehr kurzen *loop*-Regionen liegen, um die Struktur des Proteins nicht zu beeinflussen. So wurden die Aminosäuren T5, K7, E16, D18, Q47, T49, N78, R80, K87 und E89 für die Randomisierung ausgewählt. Abbildung 10 zeigt die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche des Proteins M7 und die ausgewählten Reste.

Diese zehn Reste sollen im Zusammenspiel schließlich eine planare und rigide Bindefläche

erzeugen. Es wurde sich für eine NNK-Codon basierte Randomisierung entschieden, somit sind in der finalen Bibliothek alle 20 proteinogenen Aminosäuren vertreten (siehe auch 3.4.1). Mit diesem Ansatz werden über 10% der Primärsequenz des Proteins verändert, und es muss gezeigt werden, dass gefaltete und stabile Proteinvarianten generiert werden können.

Berechnet man die Lösungsmittel-exponierte Fläche für die zehn originalen Reste, so ergibt sich ein Wert von 645 Å². Legt man die Berechnungen von Houk und Mitarbeitern zugrunde (90 Å² = 1 Einheit lg K_A), dann würde man erwarten, dass eine Assoziationskonstante (K_A) von zirka 10⁷ zu erreichen ist, wenn die gesamte Fläche an der Bindung beteiligt ist (Houk *et al.* 2003). Mit der Annahme, dass letztlich 400–550 Å² an der Bindung beteiligt sind, würde man resultierende Dissoziationskonstanten (K_D) im unteren mikromolaren Bereich erwarten.

Die Bibliothek wurde, wie unter 3.4.1 beschrieben, konstruiert und im Folgenden näher charakterisiert. Diese Bibliothek bildet die Grundlage für eine Selektion mittels Ribosomen-*display* gegen verschiedene Zielmoleküle.



Abbildung 10: Darstellung der Oberfläche des Proteins M7. In Gelb sind die für die Randomisierung ausgewählten zehn Reste dargestellt. Eine Berechnung der Lösungsmittel-exponierten Oberfläche für diese zehn Reste ergab eine Fläche von 645 Å². Die Abbildung wurde mit PyMOL 0.99 erstellt.

4.2 Evolution der naïven Bibliothek

Die naïve Bibliothek LIB.10.1 konnte mit einer praktischen Komplexität von $2,17 \times 10^{12}$ Einzelvarianten erzeugt werden. Nach einer Subklonierung der Bibliothek in einen Expressionsvektor und Transformation fand eine Einzelklon-Analyse zur Überprüfung der Funktionalität der naïven Bibliothek statt. Mit Hilfe eines ELISAs und SDS-PAGE-Analyse wurde die Löslichkeit von 80 individuellen Klonen aus der LIB.10.1 untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnte ein Anteil von löslichen Bibliotheksmitgliedern von 14% bestimmt werden (Tabelle 17).

Um die Funktionalität der naïven Bibliothek zu erhöhen, wurde eine 0. Runde Ribosomendisplay durchgeführt (siehe 3.4.5). Dazu wurden 1×10^{12} DNA-Moleküle eingesetzt. Dieser Wert entspricht gleichzeitig der maximalen Anzahl an Ribosomen, welche in einem Reaktionsansatz bereitgestellt werden können. Es erfolgte ebenfalls eine Subklonierung und eine Löslichkeits- und Funktionalitätsanalyse der vorselektierten Bibliothek, welche als LIB.10.1_0R bezeichnet wurde. Zusätzlich zu den Löslichkeitsanalysen wurde sowohl von der naïven, als auch von der vorselektierten Bibliothek die statistische Verteilung der NNK-Motive auf DNA-Ebene ermittelt (Abbildung 11).



Abbildung 11: Übersicht über die statistische Verteilung der Basen an den NNK-Positionen. In der naïven Bibliothek sind kaum Abweichungen von der erwarteten 25%, 25%, 50% Verteilung zu beobachten. In der LIB.10.1_0R gibt es an der Position N1 eine Erhöhung von Guanosintriphosphat (GTP).

Da an den ersten beiden Codonpositionen der NNK-Motive alle vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) erlaubt sind, erwartet man eine statistische Gleichverteilung von 25% (siehe Methodenteil Tabelle 14). An der dritten NNK-Position sind nur die beiden Basen Guanin und Thymin erlaubt, was einer Idealverteilung von 50% entspricht. Es ist zu erkennen, dass es nur sehr geringe Abweichungen von der Idealverteilung auf DNA-Ebene gibt. Es wurde ebenso die Funktionalität auf Proteinebene untersucht. Tabelle 17 stellt die Funktionalitäten der naïven und der vorselektierten Bibliothek gegenüber.

	LIB.10.1	LIB.10.1_0R
untersuchte Sequenzen	182 (100%)	135 (100%)
funktionale Sequenzen (DNA)	123 (68%)	92 (68%)
funktionale Sequenzen (Protein)	84 (46%)	80 (59%)
lösliche Bibliotheksmitglieder	11 von 80 (14%)	41 (30%)

Tabelle 17: Übersicht über die Funktionalität der naïven Bibliothek und der Bibliothek nach der 0. Runde.

Obwohl sich durch diese erste Selektion gegen den anti-M7 Antikörper die Komplexität auf $6,27 \times 10^9$ Moleküle verringerte, konnte eine wesentliche Verbesserung der Funktionalität der Bibliothek auf Proteinebene erreicht werden. Der statistische Anteil der löslich exprimierten Bibliotheksmitglieder konnte sogar verdoppelt und auf 30% erhöht werden. Die Bibliothek LIB.10.1_0R wurde als Ausgangspunkt für alle folgenden Selektionen verwendet.

4.3 Selektion gegen TNFa

Wie unter 3.4.6 beschrieben wurde eine Selektion der M7-Bibliothek gegen biotinyliertes TNF α in Lösung durchgeführt. Es wurden für jede Runde mindestens 1×10^{12} DNA-Moleküle eingesetzt. Damit ist die vorhandene Komplexität (6,27 × 10⁹) zirka 160fach abgedeckt. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Anzahl der DNA-Moleküle, welche in jeder Runde gegen das Zielmolekül selektiert werden konnten.

Tabelle 18: Übersicht über den Fortschritt der	Ribosomen-display-Runden.	Die quantitativen	Werte	für c	lie
DNA wurden mittels <i>Real-Time</i> PCR ermittelt.					

RD- Zyklus	[TNFα] (nM)	Waschschritte	DNA vs. TNFα	DNA vs. SB- Puffer	DNA TNFα / SB-Puffer
1	1200	$4 \times 5 \min$	$3,29 \times 10^{8}$	$1,00 \times 10^{8}$	3,29
2	450	$3 \times 2 \min$	$4,10 \times 10^{6}$	8,84×10 ⁵	4,64
3	250	$3 \times 1 \min$	$5,44 \times 10^{8}$	$2,15 \times 10^{8}$	2,53
4	166	$4 \times 2 \min$	$6,24 \times 10^{8}$	$4,41 \times 10^{8}$	1,41
5	143	3×1 min, 1×7 min	5,16×10 ⁷	$1,40 \times 10^{8}$	0,37
		$1 \times 1 \min$	$7,64 \times 10^{8}$	1,41×10 ⁹	0,54
6	100	$3 \times 1 \min$	$1,33 \times 10^{9}$	$1,17 \times 10^{9}$	1,14
		$7 \times 1 \min$	$2,54 \times 10^{8}$	$3,74 \times 10^{8}$	0,68

Das berechnete Verhältnis zwischen der erhaltenen DNA aus der Selektion gegen TNF α und der DNA, die aus der Selektion ohne Zielmolekül (Kontrolle, SB-Puffer) erhalten wurde, sollte verwendet werden um eine Anreicherung bzw. den Fortschritt der Selektion zu kontrollieren. Es zeigte sich jedoch, dass dieser ermittelte Faktor als Kontrollparameter ungeeignet ist, da teilweise mehr Moleküle in der Negativkontrolle detektiert werden konnten.

Nach jeder Runde Ribosomen-*display* wurde das Produkt der Reversen-Transkriptase Reaktion als Template für PCR Reaktionen verwendet, die dazu dienten die 5'UTR Region wieder aufzubauen und die DNA zu amplifizieren. Als *reverse primer* fungierte der L17_revP *primer*, welcher am 3'Ende der Ribosomen-Anker-Sequenz bindet. Als *forward primer* fanden, in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen, die *primer* 14 und 15 Verwendung. Das so erhaltene Produkt konnte direkt für den nächsten Ribosomen-*display* Zyklus verwendet werden.

Ab der zweiten Selektionsrunde gegen TNFα war zu beobachten, dass mit Hilfe der oben benannten *primer*-Paare keinerlei Produktamplifikation mehr möglich ist. Der Grund hierfür könnte in der repetitiven Sequenz am 3'Ende des Konstrukts liegen. Es ist ebenfalls möglich, dass *primer* 14 unter den gewählten Bedingungen nicht binden kann.

Deshalb wurde das Bibliotheksformat mit Hilfe mehrerer PCR-Reaktionen geändert. Innerhalb der Ribosomen-Anker-Sequenz wurde am 3'Ende die *codon usage* verändert. Dadurch wird eine spezifischere Bindung des *reverse primers* ermöglicht. Die 5'UTR-Region wurde auf die Sequenzen der *primer* F1 und F1A hin angepasst (Abbildung 33 und Abbildung 34 im Anhang). Diese 5'UTR-Region war bereits innerhalb der Arbeitsgruppe etabliert und hatte unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ihre Funktionalität unter Beweis gestellt. Die Sequenzen für die 5'UTR-Region, sowie für die *primer* F1 und F1A wurden von der Firma Scil Proteins GmbH (Halle) zur Verfügung gestellt.

Nach erfolgter Umkonstruktion des Bibliotheksformates konnten die Selektionsrunden zwei bis sechs gegen TNFα erfolgreich durchgeführt werden.

4.4 Sequenzanalyse und Entwicklung der Bibliothek

Um den Fortschritt der Selektion verfolgen zu können, wurde die DNA aus den Ribosomen-*display* Runden drei, vier, fünf und zweimal aus der sechsten Runde (1 × waschen und 7 × waschen) in einen Expressionsvektor subkloniert. Nach erfolgter Transformation wurden Einzelkolonien in Kultur genommen, eine DNA Sequenzanalyse durchgeführt und dabei 92 individuelle Klone pro Ribosomen-*display*-Runde betrachtet. Die folgende Tabelle (Tabelle 19) fasst die erhaltenen Sequenzdaten und Funktionalitäten zusammen. Ein Sequenzvergleich sollte eventuell vorhandene Anreicherungen von bestimmten Sequenzen aufzeigen, jedoch konnte keine Konsensussequenz gefunden werden. Anhand von Tabelle 19 ist zu erkennen, dass die Selektionsrunden zu keinem merklichen Verlust der Funktionalität geführt haben. Über alle Runden hinweg liegt die Funktionalität der Bibliothek auf Proteinebene bei 50% oder höher. Das heißt, die Hälfte der Sequenzen ist intakt und codiert für Volllängen-Proteine. Zusätzlich wurden die funktionalen Sequenzen für eine statistische Auswertung der NNK-Motive im Einzelnen verwendet. Anhand dieser Daten konnte untersucht werden, ob es über die Dauer der Selektionsrunden an bestimmten Positionen Präferenzen für bestimmte Aminosäuren gibt.

RD-Zyklus	auswertbare Sequenzen	funktionale Sequenzen auf Proteinebene
0	135	80 (59%)
3	92	49 (53%)
4	81	44 (54%)
5	91	46 (50%)
$6 (1 \times \text{waschen})$	90	45 (50%)
6 (7× waschen)	91	50 (55%)

Tabelle 19: Überblick über die auswertbaren DNA-Sequenzen der einzelnen RD-Runden.

Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Entwicklung für das NNK-Motiv 1. Aus Abbildung 12 ist zu entnehmen, dass es während der Selektion an der Position NNK1 zu einem großen Anstieg des Einbaus an Alanin gekommen ist (über 30% Gesamtanteil). Weiterhin ist zu beobachten, dass Phenylalanin, Tyrosin und Asparagin, welche in der ursprünglichen Bibliothek noch enthalten waren, nicht mehr zu finden sind.



Abbildung 12: Aminosäureverteilung an Position NNK1 in Abhängigkeit der Selektionsrunden. Es sind die Häufigkeiten in Prozent aufgetragen. Die einzelnen Ribosomen-*display*-Runden sind farblich gekennzeichnet und der Legende zu entnehmen. An diesem Beispiel ist gut zu erkennen, dass es über die Dauer der Selektion einen deutlichen Anstieg von Alanin gegeben hat.

Diese statistische Auswertung wurde für alle zehn NNK-Motive durchgeführt, um eine Evolution der Bibliothek zu beobachten. Tabelle 20 fasst die Ergebnisse für die einzelnen Motive zusammen. Es ist zu erkennen, dass eine Evolution an den einzelnen Positionen stattgefunden hat.

NNK Motiv	0. Runde über 25%	0. Runde nicht vorhanden	Runde 3–6 über 25%	Runde 3–6 nicht vorhanden
1	-	-	Ala	Phe, Tyr, Asn
2	-	-	Ala	Asn
3	-	Phe	Gly	Phe, Ile
4	-	Ile, Asn	Ala	Ile, Phe, Asn, Lys
5	-	Phe, Tyr	Ala, Gly	Ile, Phe, Tyr, Cys, Asn, His
6	-	-	-	Phe, Asn, Ile
7	-	Tyr, Trp	Ala	Ile, Phe, Trp, Cys, Gln
8	-	Lys	His	-
9	-	-	-	-
10	Glu	Tyr, Lys	Glu	-

Tabelle 20: Zusammenfassung der Analyse der NNK-Motive über die Selektionsrunden 3-6. Der hohe Anteil an Glutamat an Position 10 der Ausgangsbibliothek erklärt sich durch ein fehlerhaftes *primer*-design.

Aus diesen Daten ist zusammenfassend zu entnehmen, dass die Bibliothek über den Zeitraum der Selektion evolviert wird. Es sind deutliche Unterschiede an den einzelnen Positionen auszumachen. Ob diese Veränderungen schließlich zu funktionalen und bindenden Proteinen führen, sollte mit Hilfe eines automatisierten *screenings* untersucht werden.

4.5 Identifizierung TNFα-bindender Varianten

Um nach der Selektion der Bibliothek individuelle Proteine zu identifizieren, die TNF α binden, erfolgte ein automatisiertes *screening* (siehe 3.4.11). Dazu wurden Einzelklone im 96-*well* Format exprimiert, aufgeschlossen und das Zelllysat, welches die His₆-*tag* Proteine enthielt, direkt für den ELISA verwendet. Insgesamt 460 Einzelklone aus den Selektionsrunden 3–6, verteilt auf fünf 96-*well* Platten (92 individuelle Klone pro Selektionsrunde) wurden untersucht. Das Ergebnis des *screenings* ist in Abbildung 13 dargestellt.

Wie bereits beschrieben, stellt die Signalintensität im ELISA unter anderem ein Maß für die Affinität der M7-Varianten gegen TNF α dar. Das Signalverhältnis spiegelt hingegen die Spezifität wider. Die Schwellenwerte für ein signifikantes Signal in der Bindungsanalyse wurden subjektiv wie folgt festgelegt:

Signalintensität größer als0,4Signalverhältnis größer als4.

Auf diese Weise wurden 19 individuelle Kandidaten als potentielle TNFα-Binder identifiziert und ein Ranking der Varianten anhand ihres Signalverhältnisses erstellt. Da die Grenzwerte der Signalintensität subjektiv festgelegt wurden, wurden fünf weitere Klone mit in die folgende Charakterisierung einbezogen. Diese fünf Kandidaten erfüllen die Bedingungen Signalintensität größer als 0,2 und Signalverhältnis größer als 10. Somit wurden 24 Kandidaten für eine nähere Charakterisierung ausgewählt.



Abbildung 13: Grafische Auswertung des automatisierten *screenings* (ELISA) von 460 Einzelklonen gegen TNFα. Die gestrichelten Linien stehen für die programmintern festgelegten Schwellenwerte. Alle Klone, die die angelegten Kriterien erfüllen, sind innerhalb der gestrichelten Linien zu finden und namentlich gekennzeichnet. Zusätzlich wurden fünf weitere Klone für eine nähere Charakterisierung ausgewählt. Diese finden sich links oben im Plot und sind ebenfalls gekennzeichnet.

Zusätzlich wurde das in den dem *screening* verwendete Lysat direkt einer SDS-PAGE Analyse unterzogen (Abbildung 14) und anhand dieser Daten die Löslichkeit der Kandidaten definiert. Zwei Klone wurden von dieser Analyse aufgrund fehlerhafter Sequenzen ausgeschlossen (4R_83 und 5R_13).



Abbildung 14: SDS-PAGE Analyse von 22 ausgewählten Klonen. Es wurde direkt das Zelllysat verwendet, das auch im automatisierten *screening* eingesetzt wurde. Somit ist hier nur die lösliche Fraktion visualisiert. Der rote Pfeil markiert die typische Laufhöhe von M7-Varianten, bei zirka 12 kDa.

Es sind verschiedene Laufhöhen und Expressionslevel zu erkennen. Die unterschiedliche Laufhöhe der einzelnen Varianten erklärt sich durch die Sequenzunterschiede und den damit verbundenen Massenunterschieden. Manche Varianten zeigen einen sehr hohen Proteinanteil in der löslichen Fraktion (5R_16, +++) während andere nur schwach (5R_18, ++) oder gar nicht (3R_29, -) löslich sind.

Die Ergebnisse aus dem automatisierten *screening* und der darauffolgenden SDS-PAGE-Analyse sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Fehlerhafte Sequenzen oder mangelnde Löslichkeit führten zu einem Ausschluss der betreffenden Variante von einer weiteren Charakterisierung.

Tabelle 21: Übersicht über die 24 besten Varianten, die aus dem automatisierten *screening* erhalten wurden. Die fünf zusätzlich ausgewählten Varianten sind kursiv dargestellt und wurden am Ende in die Tabelle aufgenommen. Grau hinterlegte Varianten wurden aufgrund fehlerhafter Sequenzen oder mangelnder Löslichkeit von einer weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. n. d. = nicht detektiert.

Rang	Name	Signalver- hältnis	Signal- intensität	Funktionalität DNA Ebene	Funktionalität Protein Ebene	Löslichkeit
1	4R_65	18,59	1,19	ja	ja	-
2	5R_18	14,33	0,47	ja	ja	+
3	6R_1×_39	14,00	0,43	ja	ja	+
4	6R_1×_60	12,81	0,66	ja	ja	+
5	4R_28	11,99	1,99	ja	ja	-
6	5R_68	9,84	0,53	ja	ja	+
7	5R_9	9,56	0,81	ja	ja	++
8	4R_33	9,00	0,51	ja	ja	+
9	4R_83	8,36	0,52	ja	nein	n. d.
10	6R_7×_43	7,76	0,45	ja	ja	-
11	5R_28	6,64	0,48	ja	ja	+
12	5R_24	6,43	0,53	ja	ja	+
13	6R_7×_64	5,39	0,80	ja	ja	-
14	5R_16	5,01	0,49	ja	ja	+++
15	3R_29	5,00	0,62	ja	ja	-
16	5R_7	4,96	0,57	ja	ja	+
17	3R_20	4,64	1,52	ja	ja	-
18	3R_58	4,48	0,51	ja	ja	-
19	6R_7×_8	4,25	0,43	ja	ja	+
20	5R_67	23,00	0,26	ja	ja	++
21	5R_43	17,24	0,37	ja	ja	+
22	5R_19	14,54	0,36	ja	ja	+
23	5R_13	11,43	0,24	nein	n.d	n. d
24	4R_85	10,18	0,33	ja	ja	-

Nach der Sequenz und Löslichkeitsanalyse blieben 14 Varianten übrig, welche näher charakterisiert werden sollten. Diese wurden im 500 ml Maßstab exprimiert und chromatographisch gereinigt.

4.6 Charakterisierung von TNFα-bindenden Einzelvarianten

Um zu entscheiden, welche von den 14 Varianten die gewünschten Eigenschaften eines Bindeproteins gegen TNF α aufweisen, wurden verschiedene Kriterien untersucht. Dazu wurden alle 14 Varianten gereinigt und anschließend in einem Spezifitäts-ELISA getestet. Der Verlauf der Reinigung und die Ausbeute war dabei das erste Ausschlusskriterium. Wenn sich die Varianten nicht ohne größeren Aufwand mit dem bestehenden Protokoll als monomeres Protein reinigen ließen, dann wurden sie bereits auf dieser Stufe von einer weiteren Charakterisierung ausgeschlossen.

Für den Spezifitäts-ELISA wurden verschiedene Kontrollproteine immobilisiert. So konnte eine Bindung gegen das Zielmolekül TNF α sowie gegen Lysozym, Bovines Serum Albumin und Humanes Serum getestet werden. Wenn das Signal gegen TNF α im Vergleich zu den Kontrollen zu gering war, dann wurde die Variante aufgrund unspezifischer Bindung von einer weiteren Charakterisierung ausgeschlossen.

Wurden die angelegten Bedingungen bis hierher erfüllt, dann erfolgte eine Bestimmung des K_D -Wertes mit Hilfe eines konzentrationsabhängigen ELISAs. Aufgrund der Größe der neu generierten Bindefläche wurde eine Bindungsstärke im unteren mikromolaren Bereich erwartet. Wurde der K_D -Wert größer als 200 μ M detektiert, dann wurden anhand dieses Kriteriums die Varianten von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Tabelle 22 listet die Ergebnisse der Charakterisierung der Einzelvarianten auf.

Rang	Name	Reinigung (Ausbeute)	Spezifitäts-ELISA	Konzentrationsabhängiger- ELISA
2	5R_18	möglich (~10 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 465 \ \mu M$
3	6R_1×_39	möglich (22,7 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 118 \ \mu M$
4	6R_1×_60	möglich (~3 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 1322 \ \mu {\rm M}$
6	5R_68	möglich (5,4 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 7 \ \mu M$
7	5R_9	möglich (19,9 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 28 \ \mu M$
8	4R_33	möglich (n.d.)	unspezifisch	-
11	5R_28	möglich (~4 mg)	unspezifisch	-
12	5R_24	nicht möglich	-	-
14	5R_16	möglich (1,73 mg)	spezifisch	nicht auswertbar
16	5R_7	möglich (~7,8 mg)	unspezifisch	-

Tabelle 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten Charakterisierung. Grau hinterlegte Varianten wurden von einer weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Kriterien die zum Ausschluss führten siehe Text. Das Kulturvolumen betrug jeweils 500 ml.

Rang	Name	Reinigung (Ausbeute)	Spezifitäts-ELISA	Konzentrationsabhängiger- ELISA
19	6R_7×_8	möglich (~2 mg)	spezifisch	$K_{\rm D} = 593 \ \mu {\rm M}$
20	5R_67	nicht möglich	-	-
21	5R_43	möglich (~27 mg)	unspezifisch	-
22	5R_19	möglich (~0,4 mg)	unspezifisch	-

Es ist ersichtlich, dass drei Varianten die angelegten Bedingungen erfüllten und diese wurden für eine nähere Charakterisierung ausgewählt. Für die Varianten $6R_1 \times _39$, $5R_68$ und $5R_9$ sind im Folgenden die Ergebnisse der ersten Charakterisierung im Detail dargestellt.

4.6.1 Sequenzanalyse von drei selektierten Varianten

Zuerst wurden die Sequenzen der Varianten und speziell die Aminosäureverteilung an den NNK-Motiven untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf eventuell auftretende Konsensussequenzen gelegt, beziehungsweise nach Bereichen gesucht, in denen Aminosäuren mit bestimmten Eigenschaften (z.B. hohe Hydrophobizität) gehäuft auftreten. Das könnten erste Indikatoren für einen Bindungsmechanismus sein. Tabelle 23 zeigt die an den NNK-Motiven gefundenen Aminosäuren für diese drei Varianten.

Tabelle 23: Aminosäureerteilung an den zehn NNK-Motiven für die drei besten TNF α -Binder. Positiv geladene Aminosäuren sind rot und negativ geladene blau hinterlegt. Alle hydrophoben Aminosäuren sind gelb markiert.

NNK-Motiv Variante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6R_1x_39	Thr	Leu	Val	Ala	Gln	Gln	Ala	Met	Met	Thr
5R_68	Gly	Ala	Trp	Thr	Val	His	Arg	Arg	Met	Glu
5R_9	Asn	Asp	Met	Ala	Arg	Cys	Asp	Thr	Tyr	Glu

An Position drei und zehn sind ausschließlich hydrophobe Aminosäuren zu finden. Ein Muster der geladenen Aminosäuren zeichnet sich hingegen nicht ab.

Bei der Variante 5R_68 war zusätzlich eine Mutation außerhalb der gewählten NNK-Motive zu beobachten. Aspartat 16 wurde hierbei durch Valin (D16V) ersetzt. Diese Position ist in der Struktur innerhalb der ersten *loop*-Region zu finden.

Um die Bindungseigenschaften der drei Varianten im Detail zu analysieren, wurden die Varianten produziert und chromatographisch gereinigt.

4.6.2 Produktion und Reinigung TNFα-bindender Varianten

Die drei Varianten wurden, wie oben beschrieben (siehe 3.1.4), im 500 ml Maßstab produziert und anschließend chromatographisch mittels IMAC und Gelfiltration gereinigt. Tabelle 24 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ausbeuten.

Variante Parameter	6R_1×_39	5R_9	5R_68
Kulturvolumen	500 ml	500 ml	500 ml
Optische Dichte	6,13	6,05	5,89
Zellfeuchtmasse	8,45 g	9,31 g	10,35 g
molare Masse	12148,0 Da	12286,1 Da	12281,2 Da
Extinktionskoeffizient	1490 M ⁻¹ cm ⁻¹	2980 M ⁻¹ cm ⁻¹	6990 M ⁻¹ cm ⁻¹
Konzentration des gereinigten Proteins	196,64 μM = 2,39 mg/ml	140,27 μM = 1,73 mg/ml	43,63 μM = 0,53 mg/ml
Gesamtausbeute in mg	22,7 mg	19,9 mg	5,4 mg

Tabelle 24: Überblick über die Ausbeuten der chromatographischen Reinigung der drei besten Varianten.

Es ist zu erkennen, dass bei allen drei Varianten Ausbeuten von über 10 mg gereinigtes Protein aus 1 l Kulturvolumen erhalten wurden. Zum Vergleich konnten beim originalen M7 über 40 mg gereinigtes Protein pro Liter Kulturvolumen erhalten werden. Die Variante 6R 1×39 zeigt das beste Expressionslevel, sehr ähnlich dem von M7.

Abbildung 15 zeigt die Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe zur Reinigung der drei Varianten im Vergleich mit M7.



Abbildung 15: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie (Superdex 75) zur Reinigung der drei TNF α -bindenden Varianten und von M7. Die Chromatogramme unterscheiden sich nur geringfügig. Folgende Retentionsvolumina konnten ermittelt werden: M7: 84,28 ml, 5R_68: 85,54 ml, 5R_9: 80,37 ml und 6R_1_39: 80,54 ml.
Alle drei Varianten konnten, wie gezeigt, mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie gereinigt werden. Die Auflösung war ausreichend, um monomere Proteinspezies abtrennen zu können. Der Erfolg der Reinigung wurde per SDS-PAGE überwacht. Alle drei Proteine konnten bandenrein erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Die gereinigten, monomeren Proteine wurden für weitere Analysen verwendet.

4.6.3 Spezifität und Bindungsstärke TNFα-bindender Varianten

Um die Spezifität der Bindung gegenüber TNF α der einzelnen Varianten zu bestimmen, wurden, wie unter 3.2.3 beschrieben, ELISAs durchgeführt. Dazu wurden jeweils 500 ng Zielprotein immobilisiert. Von dem Humanen Serum wurde eine 1:10 Verdünnung in PBS hergestellt und davon dann 50 µl pro *well* für das Beschichten verwendet. Detektiert wurden die Varianten mit Hilfe eines anti-His-POD konjugierten Antikörpers. Um Wechselwirkungen von M7 mit TNF α auszuschließen, wurde gereinigtes M7 als Kontrolle mitgeführt. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse des Spezifitäts-ELISA.



Es ist zu sehen, dass alle drei Varianten das Zielmolekül TNF α erkennen, während M7 in äquimolaren Konzentrationen nur sehr geringe bzw. gar keine Aktivität gegen TNF α zeigt. Jedoch fallen die Reaktionen gegen die anderen Testproteine sehr unterschiedlich aus. Variante 6R_1×_39 zeigt gegen Lysozym und BSA keine Kreuzreaktion, jedoch erkennt sie das Humane Serum in einer sehr heftigen Nebenreaktion. Im Gegensatz zeigt Variante 5_R9 eine Nebenreaktion stärker gegen Lysozym als gegen das Humane Serum. Variante 5R_68 zeigt eine leichte Reaktion gegen Lysozym und eine sehr starke Nebenreaktion gegen Humanes Serum. Das Kontrollprotein Bovines Serum Albumin wird hingegen von keiner der drei Varianten oder M7 erkannt.

Trotz der detektierten Nebenreaktion wurde die Bindungsstärke der einzelnen Varianten mit Hilfe eines konzentrationsabhängigen ELISAs bestimmt. Dazu wurden ebenfalls 500 ng TNF α immobilisiert und die Varianten nach Bindung mit Hilfe des anti-His-POD Antikörpers detektiert. Abbildung 17 stellt die Ergebnisse dar.





Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger-ELISA von verschiedenen Varianten gegen das Zielmolekül TNFα. Jede Messreihe wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

- (A) Variante 6R_1×_39
- (B) Variante 5R_9
- (C) Variante 5R_68.

Alle drei Varianten lieferten Messwerte, die einen hyperbolen Kurvenverlauf zeigen. Somit konnte eine konzentrationsabhängige Bindung gegen das Zielprotein TNF α nachgewiesen werden. Die Quantitative Auswertung der Daten ist in Tabelle 25 zusammengefasst.

Variante Parameter	6R_1x_39	5R_9	5R_68		
maximales Signal AU _{max}	$1,66 \pm 0,15$	$2,23 \pm 0,22$	$1,38 \pm 0,14$		
K _D -Wert	$118,10 \pm 25,6 \ \mu M$	$27{,}57\pm5{,}35~\mu M$	$6{,}99\pm1{,}84~\mu M$		
R ² -Wert	0,9787	0,9872	0,9679		

Tabelle 25: Berechnete Parameter anhand der Daten des konzentrationsabhängigen ELISAs.

Daraus lässt sich entnehmen, dass die Variante $5R_{68}$ den niedrigsten K_{D} -Wert aufweist. Es wurde deshalb beschlossen, nur mit dieser Variante weiter zu arbeiten und diese Bindung bzw. den Komplex näher zu charakterisieren.

Um den Komplex zwischen 5R_68 und TNF α mit einer weiteren, unabhängigen Methode qualitativ nachzuweisen, wurde eine analytische Gelfitration durchgeführt (siehe Absatz 3.2.7). Es konnte für das Zielmolekül TNF α bereits gezeigt werden, dass eine Comigration eines Bindungspartners auf einer Säulenmatrix nachweisbar ist (Hoffmann *et al.* 2012). Jedoch hängt das Laufverhalten des Komplexes sowohl vom Bindungsmechanismus, als auch von der Dissoziationskonstante (K_D) ab. Zusätzlich zu den aufgezeichneten Chromatogrammen wurden die gesammelten Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration. Es wurden jeweils 200 µl der entsprechenden Lösung aufgetragen. Die Konzentrationsangaben für TNF α beziehen sich auf das Trimer.



Abbildung 18: Nachweis des Komplexes aus 5R 68 und $TNF\alpha$ mit analytischer Gelfiltration:

(A) Gesamtübersicht über den Gelfiltrationslauf.

(**B**) Vergrößerung des Bereiches zwischen 13 und 21 ml. Zusätzlich sind die gesammelten Fraktionen gekennzeichnet. Diese wurden mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert (unten rechts).



Es konnte kein Einfluss auf das Retentionsverhalten von $5R_{68}$ (18,32 ml allein und 18,35 ml im Komplexlauf) oder TNF α (immer 15,85 ml) ausgemacht werden. Die SDS-PAGE zeigt deutlich, dass es zu keiner Comigration der beiden Proteine kommt. Erst in der Fraktion 5 sind erste Spuren von $5R_{68}$ auszumachen. Bei diesem Retentionsvolumen eluiert aber bereits ein Teil von $5R_{68}$ von der Säule. Das Protein ist ab dieser Fraktion also zu erwarten.

Somit war ein eindeutiger qualitativer Nachweis des Komplexes aus $5R_{68}$ und $TNF\alpha$ mit Hilfe einer analytischen Gelfiltration nicht möglich. Um dennoch den Komplex zu detektieren, wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt. Dazu wurde die Variante $5R_{68}$ mit verschiedenen Konzentrationen an freiem TNF α als Kompetitor inkubiert, anschließend die Mischung in *wells* gegeben, wo je 500 ng TNFα immobilisiert waren (siehe auch 3.2.3). Zur Detektion vom gebundenen 5R_68 wurde wieder ein anti-His-POD konjugierter Antikörper verwendet. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse des kompetitiven ELISAs dar.

Das Bindungssignal konnte, auch bei einem wesentlichen Überschuss an TNF α als Kompetitor, nur auf 55% des Ausgangssignals reduziert werden. Eine Bindung in Lösung an TNF α findet also statt, allerdings weist der Komplex wahrscheinlich eine sehr hohe Dynamik und damit auch eine schnelle Dissoziationsreaktion auf, so dass eine vollständige Kompetition mit diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden kann. Eine quantitative Auswertung von Daten des kompetitiven ELISAs war aufgrund dieses Verhaltens von 5R 68 nicht möglich (Daten nicht



Abbildung 19: Kompetitiver-ELISA der Variante 5R_68. Es wurden jeweils 35 μ M 5R_68 verwendet. Es ist ein Abfall des Signals auf 55% des Ausgangssignals bei 250 μ M TNF α Kompetitor-Konzentration zu erkennen.

gezeigt). Somit konnte der oben erwähnte K_D-Wert noch nicht bestätigt werden.

Ein weiterer Versuch den Komplex aus $5R_68$ und TNF α qualitativ nachzuweisen wurde mit Hilfe eines *pulldown*-Experimentes durchgeführt. Dazu wurden Nickelsäulen verwendet, die Proteine mit His-*tag* binden können. Es sollten sich in einer Mischung aus $5R_68$, welches einen His-*tag* trägt, und TNF α in der Elutionsfraktion von der His-Säule beide Proteine per SDS-PAGE nachweisen lassen. Jedoch lieferte der Versuch keine interpretierbaren Ergebnisse, da TNF α allein unspezifisch mit der Säulenmatrix interagiert (Daten nicht gezeigt). Deshalb konnte auch mit dieser Methode der Komplex nicht eindeutig nachgewiesen werden. Gleichzeitig schließt das erhaltene Ergebnis das Vorhandensein des Komplexes nicht aus.

Zusammenfassend konnte während der Selektion der Bibliothek Lib10.1_0R gegen TNF α eine Evolution der Bibliothek mittels Sequenzierungsdaten nachgewiesen werden. Ein automatisiertes *screening*-Verfahren wurde dazu verwendet, aus einem Pool von mehreren hundert Klonen 14 TNF α -bindende Varianten zu identifizieren. Eine erste Analyse dieser ergab für drei Varianten eine Bindungsaffinität im unteren mikromolaren Bereich, wobei die Variante 5R_68 einen K_D-Wert von unter 10 μ M zeigte. Die Selektion mittels Ribosomen-*display* führte zu bindenden Varianten und war somit erfolgreich. Die Variante 5R_68 wurde näher charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass der Komplex aus Variante und TNF α eindeutig nur im konzentrationsabhängigen ELISA nachweisbar ist. Weitere verwendete Methoden zur Analyse des Komplexes, wie analytische Gelfiltration, kompetitiver ELISA und *pulldown*, zeigten ein Ergebnis, welches auf eine sehr schnelle Dissoziation des Komplexes hindeutet, bzw. welches nicht interpretierbar war. Um die Analytik von 5RB_68 abzuschließen, müsste ein größeres Spektrum an Methoden verwendet werden. Einige Möglichkeiten hierzu werden im Diskussionsteil vorgestellt. Aus zeit-lichen Gründen wurde die Analytik von 5R_68 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter fokussiert.

4.7 Das Bindeprotein 4.G11

Wie bereits beschrieben, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Zielmolekül bearbeitet. Die Bibliothek Lib10.1_0R wurde dazu gruppenintern zur Verfügung gestellt. Die A β (1-42) Fibrillen stellen ebenfalls ein medizinisch relevantes Zielmolekül dar (siehe 1.4.2). Mit Hilfe des Ribosomen-*displays* gegen reife A β (1-42) Fibrillen sollte ein konformationsspezifisches Bindeprotein generiert werden. Die Selektion und das *screening* wurden hierbei von Frau Dr. Sladjana Tomić durchgeführt. Zur Selektion fand, wie unter 4.2 beschrieben, die vorselektierte Bibliothek nach der 0. Runde Verwendung. Zum Wiederaufbau der 5'UTR wurden *primer* 14 und 15 zusammen mit *primer* L17rev_P verwendet (siehe Abbildung 32 im Anhang). Eine Umkonstruktion der 5'UTR war bei einer Selektion gegen dieses Zielmolekül nicht notwendig. Die Selektion fand unter den Bedingungen statt, wie sie im Anhang in Kapitel 8.3.1 beschrieben sind.

Im Anschluss folgte das primäre *screening* mit Hilfe eines automatisierten ELISAs. Nach der Eingrenzung auf wenige Kandidaten wurden erste Messungen mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) gemacht, um die Bindungsaktivität zu bestätigen (Dr. Sladjana Tomić, Daten nicht gezeigt). Das Bindemolekül 4.G11, welches aus der 5. Runde Ribosomen-*display* stammte, erwies sich als geeignet, und im Rahmen dieser Arbeit wurde eine umfassende Analytik dieses Proteins durchgeführt. In Tabelle 26 sind die an den zehn NNK-Positionen für dieses Bindeprotein erhaltenen Aminosäuren im Vergleich zum M7 dargestellt.

Tabelle 26: Vergleich der Aminosäuren an den zehn NNK-Motiven von der Variante 4.G11 und M7. Positiv geladene Aminosäuren sind rot und negativ geladene blau hinterlegt. Alle hydrophoben Aminosäuren sind gelb markiert.

NNK-Motiv Variante	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4.G11	Ala	Arg	Val	Ser	Gln	Ala	Thr	Asp	Glu	Arg
M7	Thr	Lys	Glu	Asp	Gln	Thr	Asn	Arg	Lys	Glu

Zusätzlich zu den gewünschten zehn Mutationen konnte in dieser Variante der Austausch des Glycin 73 gegen Serin (G73S) beobachtet werden. Die Aminosäure 73 befindet sich in der Struktur in einer kurzen *loop*-Region nach α -HelixII. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Mutation weder einen Einfluss auf die Struktur noch auf das Bindungsverhalten hat.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Charakterisierung dieses Bindeproteins dargestellt.

4.7.1 Produktion und Reinigung von 4.G11

Die Variante 4.G11 wurde, wie oben beschrieben (siehe 3.1.4), exprimiert und anschließend chromatographisch gereinigt. Die Reinigung fand an einem ÄKTAexplorer System statt. Im Vergleich zur unter 3.2.4 beschriebenen automatisierten Reinigung gibt es folgende Unter-

schiede: Zur Elution des Proteins von der IMAC Säule wurde ein linearer Immidazolgradient verwendet und die Detektion fand bei 276 nm statt (Chromatogramm siehe Anhang Abbildung 36). Die erhaltenen Fraktionen wurden von Hand gepoolt und mit Hilfe eines 10 ml *superloops* auf eine Superdex S75 Gelfiltrationssäule geladen. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ausbeuten.

Variante	4.G11		
Kulturvolumen	500 ml		
Optische Dichte	6,68		
Zellfeuchtmasse	6,92		
molare Masse	12085,7		
Extinktionskoeffizient	1490 M ⁻¹ cm ⁻¹		
Konzentration des gereinigten Proteins	$34,23 \ \mu\text{M} = 0,41 \ \text{mg/ml}$		
Gesamtausbeute in mg	3,08 mg		

 Tabelle 27: Überblick über die Ausbeuten der chromatographischen Reinigung der Variante 4.G11.

Es ist zu erkennen, dass die Variante 4.G11 vergleichsweise geringe Ausbeuten liefert. So konnten aus 1 l Kulturvolumen zirka 6 mg gereinigtes Protein erhalten werden. Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm der Reinigung mittels Gelfiltration von 4.G11.



Abbildung 20: Chromatogramm der Reinigung von 4.G11. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 276 nm auf einer ÄKTAexplorer. Das Retentionsvolumen beträgt 81,52 ml. Zum Vergleich wurde das Chromatogramm einer M7 Reinigung auf einer ÄKTAxpress detektiert bei 280 nm dargestellt. Das Retentionsvolumen von M7 beträgt 84,28 ml.

Der Peak bei einem Retentionsvolumen von 81,5 ml wurde fraktioniert gesammelt, die Fraktionen im Anschluss vereinigt und für höhere Konzentrationen die Probe mit Hilfe eines Zentrifugenkonzentrators aufkonzentriert. Der Verlauf der Reinigung wurde per SDS-PAGE überwacht. Abbildung 21 zeigt, dass bandenreines Protein erhalten werden konnte.

Die so erhaltene, gereinigte, monomere Proteinfraktion wurde für die sich anschließenden analytischen Experimente verwendet.





Abbildung 21: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von 4.G11.

4.7.2 Spezifität und Bindungsstärke von 4.G11

Bestimmung der Spezifität von 4.G11

Um die Spezifität der Variante 4.G11 gegen $A\beta(1-42)$ Fibrillen und andere Fibrillen zu testen, wurde ein Spezifitäts-ELISA durchgeführt (vgl. 3.2.3). Dazu wurden von jeder Proteinspezies 500 ng immobilisiert und anschließend mit 4.G11 inkubiert. Um eine Kreuzreaktion des originalen *scaffold* Proteins M7 mit den Fibrillen auszuschließen, wurde gereinigtes M7 als Kontrolle mitgeführt. Detektiert wurden 4.G11 und M7 mit Hilfe eines POD konjugierten anti-His₆-Antikörpers. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des Spezifitäts-ELISA. Es ist zu sehen, dass 4.G11 wie gewünscht mit den $A\beta(1-42)$ Fibrillen interagiert. Zusätzlich ist es in der Lage, $A\beta(1-40)$ Fibrillen zu erkennen und zwischen verschiedenen anderen Fibrillen zu diskriminieren. Die Kontrollen wurden dabei nach Haupt *et al.* und ihrer Verfügbarkeit ausgewählt (Haupt *et al.* 2011). $A\beta(16-22)$, hSAA, Insulin und N-(+7)Ala PABPN1 Fibrillen werden nicht erkannt. Gegen die mSAA Fibrillen hingegen konnte eine starke Bindung detektiert werden. Die N-(+7)Ala PABPN1 Fibrillen (Sackewitz *et al.* 2008) wurden freundlicherweise von Reno Winter (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Halle), alle andern Fibrillen von Senthil Kumar (siehe 8.3.4) zur Verfügung gestellt.

Das nicht fibrilläre, lösliche Protein BSA (Bovines Serum Albumin) wurde weder von 4.G11 noch von M7 erkannt. Somit sind rein hydrophobe, unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen.



Abbildung 22: Spezifitäts-ELISA der Variante 4.G11 und M7. Jeweils 500 ng der Fibrillen bzw. des Zielproteins wurden immobilisiert. Detektiert wurden 4.G11 und M7 mit Hilfe eines anti-His-POD konjugierten Antikörpers. Verwendet wurden 4.G11 und M7 in einer Konzentration von 75 μ M. Es sind deutliche Bindungssignale von 4.G11 gegen A β (1-42) bzw. A β (1-40) Fibrillen, sowie gegen mSAA Fibrillen zu erkennen.

Das Protein 4.G11 ließ sich in ausreichenden Mengen bis zur Homogenität reinigen und zeigt die gewünschte Bindung an A β (1-42) Fibrillen. Zusätzlich erkennt 4.G11 auch A β (1-40) und mSAA Fibrillen. Andere getestete Fibrillen werden nicht erkannt, somit wird kein Epitop gebunden was ubiquitär auf Fibrillen vorhanden ist. Im Folgenden wurde die Bindung bezüglich Affinität und Konformationsspezifität hin näher charakterisiert.

Bestimmung der Bindungsstärke von 4.G11

Nachdem die Bindung und die Spezifität von 4.G11 gegen die A β (1-42) Fibrillen qualitativ nachgewiesen werden konnte, wurde mit verschiedenen Methoden die Bindungsstärke bestimmt. Wie unter 3.2.3 beschrieben, wurde zuerst ein konzentrationsabhängiger ELISA durchgeführt (Abbildung 23 A). Es ist ein hyperboler Kurvenverlauf mit einer Sättigungsphase zu erkennen. Der nach Gleichung 2 ermittelte K_D-Wert beträgt 13,3 µM.

Um den K_D -Wert mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden wie unter 3.2.6 beschrieben, kinetische Messungen am Biacore durchgeführt (Abbildung 23 B). Es ist eindeutig eine konzentrationsabhängige Bindung an die immobilisierten Fibrillen zu erkennen. Die Auswertung der Daten im Bindungsgleichgewicht ergab einen K_D -Wert von 21,2 μ M. Dieser bestätigt somit den mit Hilfe des ELISAs bestimmten K_D -Wert. Damit konnte eine Bindungsstärke im niedrigen mikromolaren Bereich nachgewiesen werden.



Abbildung 23: Bestimmung der Bindungsstärke und der Spezifität der Variante 4.G11 gegenüber A β (1-42) Fibrillen.

(A) Konzentrationsabhängiger-ELISA gegen je 500 ng immobilisierte A β (1-42) Fibrillen. Detektiert wurde 4.G11 mit Hilfe eines anti-His-POD konjugierten Antikörpers (n=2). Die Punkte stellen den Mittelwert dar, die Fehlerbalken geben den niedrigsten und den höchsten Messwert an. Die quantitative Auswertung nach Gleichung 2 ergab folgende Werte: AU_{max} = 0,83; K_D = 13,27 μ M; R² = 0,96.

(**B**) Bindungskinetik von 4.G11 gegen immobilisierte A β (1-42) Fibrillen. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind im Bild angegeben. Die Auswertung im *steady-state* ergab einen K_D-Wert von 21,2 μ M.

(C) Kompetitionsexperiment mit $A\beta(1-42)$ Fibrillen. Eine Vorinkubation von 4.G11 mit Fibrillen führt zu einer Kompetition (schwarze Linie). Als Kontrollen wurden 4.G11 und 4.G11 zentrifugiert mitgeführt. Experimenteller Aufbau siehe Text.

(**D**) Bindung von 4.G11 gegen disaggregiertes A β (1-42) Peptid. Konzentrationen von 4.G11 siehe Bild. Experimenteller Aufbau siehe Text.

Da beide Methoden, ELISA und SPR, die Wechselwirkungen der Bindungspartner an der Oberfläche des Reaktionsgefäßes messen, wurde, wie unter 3.2.6 beschrieben, ein Kompetitionsexperiment in Lösung mit A β (1-42) Fibrillen ausgeführt (Abbildung 23 C). Es ist zu erkennen, dass eine Vorinkubation von 4.G11 mit Fibrillen in Lösung und die anschließende Entfernung dieser aus der Lösung zu einer stark verminderten Bindungsaktivität des vermessenen Überstandes führt. Somit fand zuvor eine Bindung in Lösung von 4.G11 an die Fibrillen statt. 4.G11 wurde mit den Fibrillen zusammen aus dem System entfernt (Ultrazentrifugation), was zu einer verminderten Aktivität des Überstandes führte. Die Kontrollen hingegen zeigten die erwartete Bindungsaktivität von 4.G11 gegen Fibrillen und belegen gleichzeitig, dass die verminderte Aktivität keine Folge der Ultrazentrifugation ist. Somit konnte der Komplex aus 4.G11 und A β (1-42) Fibrillen in Lösung qualitativ nachgewiesen werden. Das Kompetitionsexperiment wurde zusätzlich mit A β (1-40) Fibrillen durchgeführt. Auch gegen diese Fibrillen konnte eine Bindung in Lösung nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 37).

Um zu testen, ob die Bindung an die Fibrillen sequenzspezifisch oder konformationsspezifisch erfolgt, wurde die Bindung gegen disaggregiertes $A\beta(1-42)$ Peptid (Chen und Wetzel 2001) getestet. Dazu wurde ein Biacore SA Chip mit disaggregiertem Peptid beladen (siehe 3.2.6). Die Funktionalität des Chips wurde mit Hilfe eines monoklonalen sequenzspezifischen Antikörpers bestätigt (Sigma Aldrich, A8978, Daten nicht gezeigt). Zwei Konzentrationen von 4.G11 wurden über den Chip gegeben, und es konnte keinerlei Interaktion detektiert werden (Abbildung 23 D). Die verwendete 4.G11 Fraktion war zuvor auf ihre Bindungsaktivität gegen $A\beta(1-42)$ Fibrillen positiv getestet worden. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Bindung nicht auf einer Sequenzerkennung beruht. Um ein positives Bindungsereignis zu detektieren, muss $A\beta(1-42)$ in seiner fibrillären Konformation vorliegen. Das Ziel, ein konformationsspezifisches Bindeprotein gegen $A\beta(1-42)$ Fibrillen zu generieren, wurde also erreicht.

Ob die Bindung von 4.G11 an reife Fibrillen irgendeinen Einfluss auf das Verhalten der Fibrillen hat, wurde im Folgenden untersucht.

4.7.3 Einfluss von 4.G11 auf die Fibrillierungskinetik

Da nachweislich eine Interaktion von 4.G11 mit den Fibrillen stattfindet, ist es denkbar, dass dadurch die Fibrillen selbst in ihrem molekularen Verhalten beeinflusst werden. Um diesen Aspekt näher zu betrachten wurden Fibrillierungskinetiken unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen 4.G11 durchgeführt (siehe 3.5.2). Als Gegenkontrolle wurde M7 mitgeführt. Abbildung 24 zeigt die grafische Auswertung der Kinetiken.



Abbildung 24: Fibrillierungskinetik von A β (1-40) Peptid unter der Zugabe von (**A**) verschiedenen Konzentrationen an 4.G11 und (**B**) verschiedenen Konzentrationen an M7. Als Kontrolle wurden jeweils 4.G11 und M7 alleine vermessen. Die Konzentration von Thioflavin T betrug in jeder Messung 20 μ M. Es wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt. Die verwendeten Proteinkonzentrationen sind der Abbildung zu entnehmen.

Anhand dieses Experimentes ist zu erkennen, dass 4.G11 die Kinetik der Fibrillenbildung wesentlich beeinflusst. Während das A β (1-40) Peptid nach einer *lag*-Phase von einigen Stunden eine deutliche Reaktion mit dem fibrillenspezifischen Farbstoff Thioflavin T zeigt, ist die *lag*-Phase durch die Zugabe von 4.G11 wesentlich verlängert. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Weiterhin ist zu beobachten, dass unter dem Einfluss von 4.G11 nicht das maximale Fluoreszenzsignal, wie in der A β (1-40) Reaktion, erreicht wird. 4.G11 allein zeigt keinerlei Reaktion mit dem Farbstoff, das heißt es werden unter diesen Bedingungen keine 4.G11 Fibrillen gebildet, welche das abweichende Verhalten erklären könnten (Abbildung 24 A). Da M7, das originale *scaffold*, kaum mit der Fibrille interagiert, wurde auch keine Beeinflussung der Kinetik durch die Zugabe von M7 postuliert. Um das zu überprüfen, wurde der *assay* analog mit M7 durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass M7 keinerlei Einfluss auf die Geschwindigkeit der Fibrillenbildung nimmt. Ebenso zeigt M7 allein keinerlei Reaktion mit dem Farbstoff Thioflavin T (Abbildung 24 B). Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur 4.G11 das molekulare Verhalten von A β (1-40) während der Bildung von Fibrillen beeinflusst.

Im Rahmen dieses Versuches wurde auch das Endprodukt der Fibrillenbildung mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Dabei wurde das Augenmerk auf eventuelle morphologische Veränderungen gelegt. Abbildung 25 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der erhaltenen Fibrillen.



Abbildung 25: TEM-Aufnahmen (negativ kontrastiert) der Endprodukte der Fibrillierungskinetik. Es wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Regionen der Probe Aufnahmen gemacht (oberes und unteres Bild). Der Skalierungsbalken entspricht 200 nm. (A) 50 μ M A β (1-40), (B) 50 μ M A β (1-40) + 25 μ M M7, (C) 50 μ M A β (1-40) + 5 μ M 4.G11, (D) 50 μ M A β (1-40) + 10 μ M 4.G11, (E) 50 μ M A β (1-40) + 25 μ M 4.G11. M7 beeinflusst die Morphologie der Fibrillen nicht. 4.G11 hingegen führt mit steigender Konzentration zu kürzeren Fibrillenfragmenten.

A β (1-40) Fibrillen erscheinen normalerweise im transmissionselektronenmikroskopischen Bild als fadenförmige, mehr oder weniger geradlinige Polymere (Meinhardt und Fändrich 2009). Abbildung 25 A zeigt die erwarteten Polymere als Endprodukt der Fibrillenbildung. Die Zugabe von M7 beeinflusst die Morphologie der Fibrillen dabei nicht (Abbildung 25 B). Betrachtet man aber die Endprodukte der Kinetik mit 4.G11, dann ist eine konzentrationsabhängige Veränderung der Fibrillenmorphologie zu erkennen (Abbildung 25 C, D und E). Besonders augenscheinlich ist der Effekt bei einem molekularen Verhältnis von A β (1-40) Peptid zu 4.G11 von 2:1 (Abbildung 25 E). Bei diesen Konzentrationen sind sehr kurze Fragmente, anstelle von langen linearen Polymeren, beobachtet worden. Die Bindung von 4.G11 an die Fibrillen führt also während der Bildung der Fibrillen zu einer verzögerten Kinetik und zu einer Fragmentierung. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt ausschließlich auf die Bildungsreaktion der Fibrillen beschränkt ist, wurden Fragmentierungsexperimente mit reifen Fibrillen durchgeführt.

4.7.4 Einfluss von 4.G11 auf reife Fibrillen

Um die Fragmentierung durch 4.G11 auch bei reifen Fibrillen nachzuweisen oder auszuschließen, wurden Experimente wie unter 3.5.3 beschrieben durchgeführt. Dabei erfolgte eine Untersuchung von A β (1-42), A β (1-40), mSAA und hSAA Fibrillen analog zum Spezifitäts-ELISA. Es wurden reife Fibrillen (Probe 0 h) 48 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen an 4.G11 inkubiert. Als Kontrolle wurden Fibrillen ohne 4.G11 Zugabe mitgeführt. Am Ende des Experimentes wurde die Morphologie der Fibrillen unter dem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse für A β (1-42) Fibrillen.



Abbildung 26: TEM-Aufnahmen (negativ kontrastiert) von A β (1-42) Fibrillen mit und ohne 4.G11. Es wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Regionen der Probe Aufnahmen gemacht (oberes und unteres Bild). Bei der Probe zum Startpunkt wurde nur ein Bild aufgenommen. Der Skalierungsbalken entspricht 500 nm. (A) 10 μ M reife A β (1-42) Fibrillen zum Startpunkt des Experimentes (0 h), (B) 10 μ M reife A β (1-42) Fibrillen nach 48 h Schütteln, (C) 10 μ M reife A β (1-42) Fibrillen + 10 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln, (D) 10 μ M reife A β (1-42) Fibrillen + 50 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln. Es ist eine Fragmentierung der Fibrillen mit zunehmender Konzentration zu beobachten.

Es ist zu erkennen, dass die A β (1-42) Fibrillen allein unter dem Einfluss des Schüttelns keine Änderung in ihrer Morphologie zeigen. Zwischen dem Startpunkt des Experimentes (Abbildung 26 A) und 48 h danach (Abbildung 26 B) gibt es keine Unterschiede. Es finden sich aber bereits bei äquimolaren Konzentrationen von 4.G11 Bereiche in der Probe, die eine deutliche Fragmentierung zeigen (Abbildung 26 C). Dieser Effekt nimmt mit steigender Konzentration von 4.G11 zu. Reife A β (1-42) Fibrillen lassen sich also durch die Zugabe von 4.G11 fragmentieren.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit vorgeformten A β (1-40) Fibrillen beobachtet. Abbildung 27 zeigt die Aufnahmen für A β (1-40) Fibrillen.



Abbildung 27: TEM-Aufnahmen (negativ kontrastiert) von $A\beta(1-40)$ Fibrillen mit und ohne 4.G11. Es wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Regionen der Probe Aufnahmen gemacht (oberes und unteres Bild). Bei der Probe zum Startpunkt wurde nur ein Bild aufgenommen. Der Skalierungsbalken entspricht, wenn nicht anders in Klammern angegeben, 200 nm. (A) 10 μ M reife A $\beta(1-40)$ Fibrillen zum Startpunkt des Experimentes (0 h), (B) 10 μ M reife A $\beta(1-40)$ Fibrillen nach 48 h Schütteln, (C) 10 μ M reife A $\beta(1-40)$ Fibrillen + 10 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln (Skalierung unteres Bild: 500 nm), (D) 10 μ M reife A $\beta(1-40)$ Fibrillen + 50 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln (Skalierung unteres Bild: 500 nm), (E) 10 μ M reife A $\beta(1-40)$ Fibrillen + 50 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln (Skalierung oberes Bild: 1 μ M, unteres Bild: 500 nm). Es ist eine Fragmentierung der Fibrillen mit zunehmender Konzentration zu beobachten.

Auch mit reifen A β (1-40) Fibrillen ist eine Fragmentierung durch 4.G11 detektierbar. Allerdings ist der Effekt bei äquimolaren Konzentrationen noch nicht wirklich ausgeprägt zu beobachten (Abbildung 27 C). Erst bei einer Konzentration von 25 μ M 4.G11 (2,5facher molarer Überschuss) ist eine deutliche Fragmentierung sichtbar (Abbildung 27 D). Das Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung des Spezifitäts-ELISA (siehe Abbildung 22) wo gegen A β (1-40) Fibrillen ein geringeres Bindungssignal als gegen A β (1-42) Fibrillen gemessen wurde. Dennoch ist die Fragmentierung augenscheinlich.

Im Spezifitäts-ELISA konnte ebenfalls eine Bindung an mSAA Fibrillen nachgewiesen werden. Eine Fragmentierung der reifen Fibrillen könnte somit auch in diesem Falle erwartet werden. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse für die Fragmentierung der mSAA Fibrillen. Mit zunehmender Konzentration ist keine eindeutige Fragmentierung beobachtet worden. Manche Teilausschnitte der Probe deuten allerdings auf eine beginnende Fragmentierung hin (Abbildung 28 C oberes Bild). Die Morphologie der reifen mSAA Fibrillen scheint sich mehr dahin zu verändern, dass ihr Durchmesser zunimmt. Das könnte durch die bereits nachgewiesene Bindung von 4.G11 an die Fibrillen verursacht werden. Die relativ starke Bindung von 4.G11 an diese Fibrillen würde, wie bei den beiden Fibrillen der Isoformen des Aβ Peptides, eine Fragmentierung erwarten lassen. Dieses konnte aber nicht eindeutig gezeigt werden.



Abbildung 28: TEM-Aufnahmen (negativ kontrastiert) von mSAA Fibrillen mit und ohne 4.G11. Es wurden jeweils von mindestens zwei unterschiedlichen Regionen der Probe Aufnahmen gemacht, da die Morphologie nicht eindeutig bestimmbar war. Bei der Probe zum Startpunkt wurde nur ein Bild aufgenommen. Der Skalierungsbalken entspricht 500 nm. (A) 10 μ M reife mSAA Fibrillen zum Startpunkt des Experimentes (0 h), (B) 10 μ M reife mSAA Fibrillen nach 48 h Schütteln, (C) 10 μ M reife mSAA Fibrillen + 10 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln, (D) 10 μ M reife mSAA Fibrillen + 25 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln, (E) 10 μ M reife mSAA Fibrillen + 50 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln. Es ist eine Änderung der Morphologie der Fibrillen zu erkennen. Der Durchmesser der Fibrillen scheint größer zu werden. Eine Fragmentierung konnte nicht eindeutig beobachtet werden.

Als Kontrolle wurde auch die Wirkung von 4.G11 auf reife hSAA Fibrillen untersucht. Da diese im Spezifitäts-ELISA keinerlei Interaktion zeigten, ist hier die klare Erwartungshaltung, dass ein "Scheren" der Fibrillen nicht stattfindet. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Eine Fragmentierung der Fibrillen ist tatsächlich zu keinem Zeitpunkt zu erkennen. Ab einem molekularen Verhältnis von hSAA zu 4.G11 von 1:2,5 erscheinen die Fibrillen kontrastierter und dicker (Abbildung 29 D). Das könnte durch eine Präzipitation von 4.G11 erklärt werden, das ja in der Probe vorhanden ist und folglich auch einen Kontrast im elektronenmikroskopischen Bild geben könnte.



Abbildung 29: TEM-Aufnahmen (negativ kontrastiert) von hSAA Fibrillen mit und ohne 4.G11. Es wurden jeweils von zwei unterschiedlichen Regionen der Probe Aufnahmen gemacht (oberes und unteres Bild). Bei der Probe zum Startpunkt wurde nur ein Bild aufgenommen. Der Skalierungsbalken entspricht 500 nm. (A) 10 μ M reife hSAA Fibrillen zum Startpunkt des Experimentes (0 h), (B) 10 μ M reife hSAA Fibrillen nach 48 h Schütteln, (C) 10 μ M reife hSAA Fibrillen + 10 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln, (D) 10 μ M reife hSAA Fibrillen + 25 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln, (E) 10 μ M reife hSAA Fibrillen + 50 μ M 4.G11 nach 48 h Schütteln. Es ist keine größere Änderung der Morphologie zu erkennen. Eine Fragmentierung konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Mit steigender Konzentration von 4.G11 erscheinen die Fibrillen etwas kontrastierter und dicker.

Weiterhin wurden die Fibrillen von A β (16-22) und Insulin untersucht. Jedoch trat bei diesen Proben eine Zerstörung (Fragmentierung) bereits durch den Einfluss der Inkubation unter Schütteln auf. So konnten diese Proben nicht eindeutig auf eine Fragmentierung durch 4.G11 hin untersucht werden. Da aber keine Bindung im Spezifitäts-ELISA nachgewiesen werden konnte, wurde auch keine Fragmentierung für diese Fibrillen postuliert.

Eine Fragmentierung von vorgeformten Fibrillen durch die Zugabe von 4.G11 ließ sich also bei A β (1-42) und A β (1-40) Fibrillen eindeutig nachweisen. Das auftretende Bindungsereignis führt konzentrationsabhängig zu einer augenscheinlichen Veränderung der Morphologie der Fibrillen. Die molekulare Identität der erhaltenen Fragmente lässt sich aus diesen Experimenten nicht eindeutig ableiten. Deshalb wurde im Folgenden versucht, die Toxizität der fragmentierten Fibrillen zu untersuchen.

4.7.5 Bestimmung der Toxizität der fragmentierten Fibrillen

Oligomere Zustände des A β Peptides sind toxischer als reife Fibrillen. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Fragmentierung der Fibrillen zu toxischen Endprodukten führt, wurde, wie unter 3.5.4 beschrieben, ein Zellzytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden A β (1-40)

Fibrillen und durch 4.G11 fragmentierte A β (1-40) Fibrillen eingesetzt. Um einen größtmöglichen Effekt zu erzielen, wurden 10 μ M reife A β (1-40) Fibrillen in Gegenwart von 50 μ M 4.G11 inkubiert und somit die maximale experimentell beobachtete Fragmentierung induziert (vgl. Abbildung 27). Humane SH-SY5Y Neuroblastomzellen (Biedler *et al.* 1978) wurden mit unterschiedlichen Endkonzentrationen an diesen fragmentierten Fibrillen inkubiert. Abbildung 30 zeigt das Ergebnis des Zytotoxizitätstestes.



Abbildung 30: Zellzytotoxizitätstest. SH-SY5Y Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von $A\beta(1-40)$ Fibrillen oder durch 4.G11 fragmentierte Fibrillen [10 µM reife $A\beta(1-40)$ Fibrillen + 50 µM 4.G11] behandelt (n=2). Als Kontrolle wurden SH-SY5Y Zellen unbehandelt, mit Staurosporin und mit äquivalenten Mengen an 50 mM HEPES Puffer pH=7,4 versetzt gemessen. Anschließend wurde der Anteil lebender Zellen mit Hilfe eines MTT-*assays* bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es ist bei allen drei eingesetzten Endkonzentrationen zu erkennen, dass die reifen $A\beta(1-40)$ Fibrillen einen Vitalitätswert von zirka 83 % erreichen. Die fragmentierten Fibrillen erreichen einen Wert von zirka 86 % und liegen damit in derselben Größenordnung. Für 4.G11 allein konnte ein Wert von 90 % bestimmt werden, der damit im Bereich des Kontrollwertes mit HEPES Puffer (93 %) liegt. Eine erwartete hohe Zellzytotoxizität der fragmentierten Fibrillen konnte nicht bestätigt werden.

80

Bei dem Test konnte keine erhöhte Toxizität der fragmentierten Fibrillen beobachtet werden. Die gemessenen Werte liegen im Bereich der reifen Fibrillen. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Fragmentierung durch 4.G11 zu bekannten zytotoxischen, oligomeren Zuständen führt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass 4.G11 allein die Zellen nicht negativ beeinflusst. Ein konzentrationsabhängiger Verlauf der Toxizität konnte über den gemessenen Bereich nicht beobachtet werden.

5 Diskussion

Die Technik künstliche Bindeproteine zu erzeugen, ist gerade im Begriff, sich als Standardwerkzeug in der Grundlagenforschung zu etablieren. Ein gewisser prozentualer Anteil auf der Oberfläche eines *scaffold* Proteins wird verändert, um vorrangig Diversität und letzten Endes Affinität gegenüber einem Zielprotein zu erzeugen. Das geschieht, indem eine DNA-Bibliothek erzeugt wird. Um die gewünschte Bindung des neu erzeugten Proteins gegen bestimmte Zielmoleküle zu selektieren, stehen verschiedenste Selektionsmethoden zur Auswahl (vgl. 1.3). Ein fundamentaler Schritt bei der Erzeugung neuer Bindeproteine mit gewünschten Eigenschaften ist dabei die Auswahl des *scaffold* Proteins selbst und der zu randomisierenden Positionen. Neben vielen anderen Eigenschaften (siehe 1.1) ist eine hohe intrinsische Stabilität des Gerüstproteins von entscheidender Bedeutung. Das Protein M7 stellt mit einer thermodynamischen Stabilität von $\Delta G_u = 79$ kJ/mol einen sehr geeigneten Kandidaten dar (vgl. 1.2).

Bei den meisten anderen *scaffold* Proteinen basiert die neu geschaffene Bindefläche auf natürlichen Interaktionsflächen (Protein-DNA oder Protein-Protein Bindung) der *scaffold* Proteine. Da es sich bei M7 um ein vollständig *in silico* designtes Protein handelt, konnte bei der Auswahl der Reste eine natürliche Bindefläche nicht berücksichtigt werden. Ein Konsensusdesign, welches konservierte natürlich vorkommende Reste berücksichtigt, konnte ebenfalls nicht angewandt werden. Es musste eine Auswahl an zu randomisierenden Resten anhand empirischer Daten getroffen werden. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Oberflächenrandomisierung auf Sekundärstrukturelementen erfolgreich zur Generierung von Bindeproteinen genutzt werden kann, fiel die Entscheidung hier ebenfalls für die Randomisierung von Lösungsmittel-exponierten Resten auf dem fünfsträngigen β-Faltblatt (Ebersbach *et al.* 2007, Mirecka *et al.* 2009) (siehe auch 1.1). Rigide und stabile Bindeflächen haben während des Bindungsereignisses zusätzlich den Vorteil, dass der Verlust an Entropie durch die Bindung vergleichsweise gering ist (Skerra 2000).

Anhand der Strukturdaten von M7 ist bekannt, dass das Protein über eine sehr kompakte Topologie mit sehr kurzen *loop*-Strukturen (meist vier bis sechs Aminosäuren) verfügt. (Stordeur *et al.* 2008). Um diese *loops* durch die Randomisierung nicht zu destabilisieren, was eventuell einen kompletten Verlust der Faltungsfähigkeit des Proteins nach sich ziehen könnte, wurde die Fläche im Inneren des Faltblattes ausgewählt (siehe 4.1). Damit stehen für die Erzeugung einer *de novo* Bindefläche zehn Lösungsmittel-exponierte Reste zur Verfügung. Bei einer Gesamtlänge von 92 Aminosäuren sind das 11% der gesamten Sequenz. Damit steht eine theoretische Fläche von 645 Å² für die Protein-Protein Interaktion zur Verfügung (10% der gesamten Lösungsmitttel-exponierten Proteinoberfläche). Im Vergleich dazu beginnt die Interaktionsfläche von Antikörper-Protein Komplexen bei zirka 680 Å² und liegt im Mittel um 800 Å², was für Affinitäten im nanomolaren Bereich ausreicht (Rees *et al.* 1994). Welche Reste und damit Oberfläche sich aber final an der Bindung beteiligen, kann zu diesem Zeitpunkt des Designprozesses nicht vorhergesagt werden.

Es wurden also diese zehn Reste für eine zufällige Mutagenese ausgewählt, um eine DNA-Bibliothek auf Basis des M7 Proteins zu erstellen und damit erstmalig die Sekundärstrukturelemente dieser sehr stabilen Topologie zur Erzeugung von künstlichen Bindeproteinen zu nutzen.

5.1 Qualität der erstellten M7 Bibliothek.

Bei der Erzeugung von künstlichen Bindeproteinen spielt die Qualität der verwendeten DNA-Bibliothek eine übergeordnete Rolle. Die Diversität auf DNA-Ebene und Funktionalität auf Proteinebene der Bibliothek sind von entscheidender Bedeutung für den experimentellen Erfolg (Steiner et al. 2008). In der ersten Generation der Bibliothek, die in dieser Arbeit erstellt wurde, konnte eine Funktionalität von 46% auf Aminosäureebene erreicht werden. Im Vergleich zu publizierten Funktionalitäten von bis zu 75 % war dieser Wert verhältnismäßig gering (Nord et al. 1995, Hoffmann 2011, Kronqvist et al. 2008). Deshalb wurde eine sogenannte 0. Runde Ribosomen-display gegen einen polyklonalen anti-M7 Antikörper durchgeführt, um die Qualität der Bibliothek zu verbessern (vgl. 4.2). Der Anteil von funktionalen Bibliotheksmitgliedern konnte damit auf 59% erhöht werden, was im oberen Mittelfeld der literaturbekannten Werte liegt. Die Qualität der Bibliothek konnte durch dieses Experiment wesentlich verbessert werden, gleichzeitig belegt es, dass die Bibliothek und damit das scaffold an sich funktional im Ribosomen-display präsentiert werden kann. Dieser Nachweis der Funktionalität des gewählten Selektionssystems war für alle folgenden Experimente essentiell. Weiterhin konnte der Anteil der löslich hergestellten Bibliotheksmitglieder auf 30% Gesamtanteil verdoppelt werden. Dieser Wert kann aufgrund fehlender Quellen nicht in Bezug zu bereits veröffentlichten Bibliotheken gesetzt werden. Er impliziert aber, dass rund 70% der hergestellten Proteine aus dieser Bibliothek nicht löslich sind, was zu massiven Problemen beim Selektionsverfahren führen kann. Um diesen Umstand Rechnung zu tragen, wurde in fast allen Selektionsrunden eine Prä-Selektion gegen verschiedene beads durchgeführt (vgl. 3.4.4). Durch die Präsentation von verschiedenen Oberflächen (hydrophob und hydrophil) wurden unlösliche und unspezifische Binder aus dem System entfernt.

Eine weitere Möglichkeit die Qualität der Bibliothek zu verbessern, wäre eine Vorselektion gegen einen anti-C-Myc Antikörper gewesen. Die hier verwendete Ribosomen-Anker-Sequenz (siehe Abbildung 31) enthält am 3'Ende die Sequenz für einen C-Myc-*tag*. Damit wird am C-terminalen Ende des Proteins dieser *tag* präsentiert. Eine Selektion gegen einen anti-C-Myc-Antikörper wäre gleichzeitig, genau wie die Selektion gegen den anti-M7-Antikörper, eine Art Leserahmenkontrolle. Es würden nur Proteine erkannt, die am C-Terminus die korrekte Sequenz präsentieren und somit vorher keine Leserahmenverschiebung aufweisen. Eine weitere Möglichkeit, Leserahmenverschiebungen zu vermeiden und somit die Qualität der Bibliothek zu verbessern, besteht darin, direkt bei der Erstellung der Bibliothek auf einen korrekten Leserahmen zu selektieren. Dazu muss die Bibliothek allerdings in einen bestimmten Selektionsvektor eingebracht werden, welcher nur bei einem korrekten Leserahmen eine Antibiotikaresistenz vermittelt (Gerth *et al.* 2004). Der Nachteil dieser Methode ist, dass man auf Transformationsschritte angewiesen ist und somit die Diversität der Bibliotthek durch Transformationseffizienzen begrenzt ist.

Mit Hilfe von molekularbiologischen Arbeiten, Sequenz- und Löslichkeitsanalysen und einer Runde Ribosomen-*display* konnte eine funktionale Bibliothek (Lib10.1_0R) erstellt werden, wobei kaum Abweichungen von der idealen NNK-Verteilung und eine tatsächli-

che Komplexität von $6,27 \times 10^9$ erreicht wurde (vgl. 4.2). Damit übersteigt die hier erreichte Komplexität die der meisten Bibliotheken, die für *in vivo* Selektionssysteme (Phagen-*display, cell-surface-display*) vorgesehen und damit auf limitierende Transformationsschritte angewiesen sind (Nord *et al.* 1997, Garcia-Ibilcieta *et al.* 2008). Für *in vitro* Selektionssysteme wie das Ribosomen-*display* sind theoretische Bibliotheksgrößen von bis zu 10^{23} individuellen Mitgliedern berichtet worden (Binz *et al.* 2003). Jedoch können diese Werte nur zu einem Bruchteil in einem Selektionsprozess, der durch die Anzahl an freien Ribosomen limitiert ist (meistens 10^{12}), real ausgenutzt werden.

Es konnte also eine Bibliothek auf Basis des M7 *scaffolds* erstellt und ihre Funktionalität getestet bzw. verbessert werden. Eine ideale Bibliothek besitzt eine hohe Diversität und Funktionalität. Ob die Leistungsfähigkeit einer Bibliothek groß genug ist, lässt sich am Ende nur anhand des Selektionserfolges ermitteln.

5.2 Ergebnisse der Selektion gegen TNFa

Die Bibliothek Lib10.1 OR wurde in sechs aufeinanderfolgenden Runden Ribosomen-display eingesetzt, um ein Bindeprotein gegen TNFa zu selektieren. Um den Fortschritt der Selektion zu detektieren und schließlich auf bindende Proteine zu selektieren, wurde die DNA aus den Ribosomen-display Runden drei, vier, fünf und zweimal aus der sechsten Runde in einen Expressionsvektor subkloniert. Pro Runde wurden so 92 individuelle Klone betrachtet, in Summe also 460 Klone. Eine Sequenzanalyse zeigte, dass über alle getesteten Runden die Funktionalität der Bibliothek auf Aminosäureebene bei über 50% lag. Die Selektion hatte also zu keinem dramatischen Verlust der Funktionalität geführt (Startwert 59%). Eine detaillierte Analyse der lesbaren 445 Sequenzen ergab, dass eine Evolution der Bibliothek stattgefunden hat (siehe Abbildung 12 und Tabelle 20). Über den Verlauf der Selektionsrunden ist zu erkennen, dass sich der Gesamtanteil an Alaninen in der Bibliothek stark erhöht hat. Weiterhin ist auffällig, dass es unter den gewählten Bedingungen einen Selektionsdruck gegen große aromatische Reste zu geben scheint. Phenylalanin zum Beispiel ist an sechs von zehn mutierten Positionen bereits ab der dritten Selektionsrunde nicht mehr in der Bibliothek nachweisbar. Das könnte in den Eigenschaften der Aminosäure selbst begründet liegen. Obwohl Phenylalanin als amphiphil beschrieben wird, ist die Lösungsmittel-exponierte Präsentation einer aromatischen Aminosäurenseitenkette energetisch eher ungünstig. Möglichweise treten an bestimmten Positionen im Protein auch sterische Einschränkungen für Aminosäuren mit großen Seitenketten auf. Ein weiterer Grund liegt sicherlich in der Besonderheit des NNK-basierten Bibliotheksdesigns. Wird in der Natur die Aminosäure Phenylalanin durch zwei Codons repräsentiert (TTT und TTC), so fällt in einer NNK-Bibliothek das Codon TTC weg, da an der letzten Position nur G oder T erlaubt sind. Damit reduziert sich der ideale erwartete Gesamtanteil von Phenylalanin auf 3,1%. Nach der 0. Runde Ribosomen-display konnten de facto nur 1,1% Gesamtanteil an Phenylalanin nachgewiesen werden. Dieser geringe Startwert ist vermutlich der Hauptgrund für den kompletten Rückgang des Anteiles von Phenylalanin nach der 3. Selektionsrunde.

Hier spiegelt sich gleichzeitig ein Nachteil der NNK-basierten Zufallsmutagenese wider, nicht alle Aminosäuren kommen gleichberechtigt vor. Eine Alternative hierzu wäre zum

Beispiel die Trinukleotidsynthese, wie sie bereits kommerziell angeboten wird. Dabei werden an die Positionen der zu veränderten Codons nur vorher festgelegte Trinukleotidmischungen gekoppelt (Virnekas *et al.* 1994). Damit hat man eine bessere Kontrolle über die Zusammensetzung der Codons und ist in der Lage, die Diversität der Bibliothek zu erhöhen (Krumpe *et al.* 2007).

Der hohe gefundene Anteil an Alaninen in der evolvierten Bibliothek kann mit diesem Ansatz allerdings nicht erklärt werden. Auch für Alanin besteht durch die NNK-Motive eine Einschränkung auf zwei von normalerweise vier möglichen Codons. Auch wurde zum Start der Selektionen eine Gesamtverteilung von 7,6 % gefunden, die nur leicht über der errechneten idealen Verteilung von 6,3 % liegt. Hier scheint wirklich eine Adaptation an das Zielmolekül stattzufinden. Als sehr kleine Aminosäure trägt Alanin allerdings kaum zur Bindungsenergie bei. Eventuell wird durch die kleine Aminosäure Alanin an bestimmten Positionen eine Bindung gegen TNF α sterisch erst ermöglicht.

Es gibt also neben der Anpassung an das präsentierte Zielprotein verschiedene Gründe, warum Aminosäuren an bestimmten Positionen gänzlich verschwinden oder überproportional zu finden sind. Das Verfahren des Ribosomen-*displays* führte jedenfalls zu merklichen Änderungen in der Gesamtzusammensetzung der Bibliothek. Wie zielführend diese Veränderungen in Hinblick auf eine Bindung waren, sollte mit dem *screening* untersucht werden.

Die oben bereits erwähnten 460 Klone wurden einem automatisierten screening unterzogen (siehe 3.4.11), um damit TNF α -bindende Varianten zu identifizieren. Durch die Verwendung eines *liquid handling* Roboters war es möglich, alle 460 Klone parallel auf Bindung gegen das Zielmolekül zu testen. Das Besondere an diesem assay ist, dass mit Zelllysat gearbeitet werden konnte. Eine aufwändige Proteinreinigung entfiel, und ein interner Plattenstandard bewerkstelligte dabei, dass alle Signale untereinander vergleichbar waren. Zusätzlich ist dadurch gewährleistet, dass nur gut lösliche Proteine ein positives Signal geben, da die unlösliche Proteinfraktion zuvor abgetrennt wurde (siehe 3.1.5). Allerdings können falschpositive Signale nicht vollständig ausgeschlossen werden. Lösliche Mikroaggregate, die bei geringer Bindungsstärke des einzelnen Proteinmoleküls große Aviditätseffekte aufweisen können, werden bei den verwendeten Zentrifugalkräften von 6.300 × g nicht abgetrennt. Eine grafische Auswertung der Signale (siehe Abbildung 13) ergab trotzdem ein adäquates Bild, anhand dessen 24 Proteinvarianten als potentielle TNFa-Binder identifiziert werden konnten. Davon wurden 14 Varianten (58%) als lösliche Varianten per SDS-PAGE identifiziert, was die Funktionalität des screenings belegt. Gleichzeitig hat man in dem Experiment, durch die Art und Weise der Auftragung, einen ersten Indikator für die Spezifität der einzelnen Varianten. Nach eingehender Untersuchung wurden fünf der 14 Varianten, aufgrund unspezifischer Bindung an verschiedene Kontrollproteine, von einer weiteren Charakterisierung ausgeschlossen.

Drei Varianten schließlich zeigten eine ausreichende Spezifität und K_D -Werte unterhalb von 120 μ M. Eine Reinigung der Kandidaten als monomere Proteine war mit den bestehenden Protokollen (vgl. 4.5.2) ohne Probleme möglich, wobei aber in einem Fall ein signifikanter Verlust an Ausbeute zu beobachten war (nur 27% im Vergleich zum M7). Bei einer Verän-

derung von über 10% der Gesamtaminosäuresequenz sind solche Abweichungen aber zu erwarten.

Bei der Untersuchung der Spezifität zeigten alle drei Kandidaten eine Nebenreaktion gegen Humanes Serum (siehe Abbildung 16). Diese kann aufgrund der unbekannten Zusammensetzung des Testreagenz nicht eindeutig interpretiert werden. Es gibt Indizien dafür, dass bereits das *scaffold* Protein M7 zu einer Reaktion mit Humanen Serum neigt (Daten nicht gezeigt). Deshalb scheint diese Kontrolle im Nachhinein als nicht sonderlich geeignet, um die Spezifität der erhaltenen Bindeproteine zu untersuchen.

Alle drei Varianten zeigten in einem ELISA eine konzentrationsabhängige Bindung gegen TNF α (siehe Abbildung 17), was den generellen Erfolg der Selektion und des *screenings* bestätigte. Es konnten also drei Proteine selektiert werden, die mit einer Bindungskonstante von unter 120 μ M an TNF α binden. Die stärkste Bindung zeigte dabei die Variante 5R_68 mit einem K_D-Wert von 7 μ M.

Es wurde versucht, diesen gemessenen K_p-Wert mit einer zweiten Methode zu bestätigen. Die quantitative Auswertung eines kompetitiven ELISAs war allerdings nicht möglich (siehe Abbildung 19). Das Experiment belegt aber erneut die Bindung von 5R 68 gegen TNFa. Eine analytische Gelfiltration konnte ebenfalls keinen qualitativen Nachweis des Komplexes erbringen. Schlussfolgernd aus den vorliegenden Ergebnissen ist von einer sehr schnellen Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) des Komplexes auszugehen. Das könnte die Ergebnisse im kompetitiven ELISA und der analytischen Gelfiltration erklären. Findet eine schnelle Dissoziation statt, dann lösen sich während des Gelfiltrationslaufes 5R 68 Moleküle vom TNFα und werden dann einer Trennung unterworfen, die ihrer eigenen Größe entspricht. Aufgrund des angelegten Flusses während des Trennverfahrens ist eine erneute Bindung kaum möglich. Die Ergebnisse des kompetitiven ELISAs deuten auch auf eine sehr schnelle Einstellung eines neuen Gleichgewichtes hin. 5R 68, welches an in Lösung befindliches TNFα gebunden hat, dissoziiert innerhalb kürzester Zeit ab und bindet an das immobilisierte TNFα. Damit kann das Signal auch bei hohen Kompetitorkonzentrationen nicht vollständig unterdrückt werden. Es müssten experimentelle Wege gefunden werden, den Kompetitor und damit gebundenes 5R 68 vollständig aus dem System zu entfernen, bevor der restliche Überstand zu dem immobilisiertem TNFα gegeben wird. Damit würde man eine erneute Gleichgewichtseinstellung verhindern können. Praktisch lösbar wäre das Problem durch den Einsatz von biotinylierten TNFa und Streptavidin beads, um dieses zu entfernen. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit, war kein biotinyliertes TNFα verfügbar.

Um die Theorie der schnellen Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes zu bestätigen, könnten SPR Messungen durchgeführt werden (siehe 3.2.6). Mit dieser Methode ist man in der Lage, direkt Dissoziationsgeschwindigkeiten zu messen. Allerdings ist der Aufbau des Experimentes aufgrund des natürlichen Vorkommens von TNF α als Trimer nicht trivial, weil eine Immobilisierung des TNF α dadurch erschwert wird. Eine Dissoziation des Trimers während der Messzeit würde das Experiment beeinflussen. Das Problem könnte umgangen werden, wenn das zu vermessende Bindeprotein immobilisiert werden kann und TNF α im Fluss dazugegeben wird (Löfdahl *et al.* 2009). Eine Dissoziation des Trimers ist innerhalb der kurzen Messzeit nicht zu erwarten (siehe 1.4.1). Sollte sich die Vermutung einer schnellen Dissoziation bewahrheiten, dann empfiehlt es sich, eine neue Selektion mit dieser Bibliothek durchzuführen, wobei *off-rate* Selektionsschritte einzubinden wären (Zahnd *et al.* 2010). Damit könnte die Qualität eines finalen Binders erhöht werden.

Um den Komplex qualitativ und eventuell auch quantitativ nachzuweisen, könnte auch auf die Methode der analytischen Ultrazentrifugation zurückgegriffen werden. Das setzt aber voraus, dass beide Proteine anhand von Absorptionsmessungen unterschieden werden können. Da sowohl TNF α als auch 5R_68 Tryptophane beinhaltet, ist das ohne ein *label* für eines der beiden Proteine nicht möglich. Eines der Proteine könnte zum Beispiel mit Fluorescein markiert werden, was bei einer Wellenlänge von 495 nm absorbiert.

Aufgrund der unbefriedigenden Datenqualität über den Komplex aus TNF α und 5R_68 wurde auf Kompetitionsversuche mit bereits bekannten TNF α -Bindern, wie zum Beispiel Etanercept vorerst verzichtet.

Mit der Selektion gegen TNFα konnte eindeutig gezeigt werden, dass es möglich ist, auf der Basis des *scaffold* Proteins M7 Bindeproteine zu generieren. Die Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung der Bibliothek über die Ribosomen-*display* Runden zeigt die Funktionalität des gewählten Selektionssystems. Eine Anpassung an das Zielmolekül findet also statt. Um die Qualität des erhaltenen Binders 5R_68 weiter zu verbessern, könnte eine Affinitätsmaturierung und eine *off-rate* Selektion durchgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Selektion gegen $TNF\alpha$ zu bindenden Varianten führt, welche isoliert und näher charakterisiert werden konnten.

5.3 4.G11 – Bindeprotein gegen reife Aβ(1-42) Fibrillen

Wie bereits beschrieben, wurde die Bibliothek der zweiten Generation Lib.10.1_0R arbeitsgruppenintern für weitere Selektionen zur Verfügung gestellt. Dr. Sladjana Tomić ist es gelungen, aus dieser Bibliothek das Bindeprotein 4.G11 gegen reife A β (1-42) Fibrillen zu selektieren (siehe 4.6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Analytik des Proteins durchgeführt.

Das Protein 4.G11 ließ sich ebenfalls mit dem bereits etablierten Reinigungsprotokoll bandenrein gewinnen (siehe 4.6.1). Allerdings sind nur vergleichsweise geringe Ausbeuten (15,4%, im Vergleich zum M7) möglich, da ein Teil des Proteins unlöslich produziert wird (siehe Abbildung 21).

Eine Bindung an reife A β (1-42), A β (1-40) und mSAA Fibrillen konnte mit Hilfe eines Spezifitäts-ELISAs nachgewiesen werden (siehe 4.6.2). Da vier ebenfalls getestete Fibrillen von unterschiedlichen Proteinen nicht erkannt werden, ist ausgeschlossen, dass 4.G11 ein Epitop erkennt, welches ubiquitär auf der Fibrillenoberfläche vorkommt. Rein hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Bindeprotein und Zielstruktur wurden durch die nicht detektierte Bindung an Bovines Serum Albumin ausgeschlossen. 4.G11 ist also in der Lage, wie gewünscht, A β (1-42) Fibrillen zu binden und zusätzlich noch zwischen verschiedenen anderen Fibrillen zu diskriminieren. Mit Hilfe von SPR (13 μ M) und ELISA (21 μ M) Experimenten wurde ein K_D -Wert im unteren mikromolaren Bereich bestimmt. Eine Bindung gegen monomeres (disaggregiertes) A β (1-42) Peptid konnte mit Hilfe eines SPR Experimentes ausgeschlossen werden. 4.G11 bindet keine Monomere sondern konformationsspezifisch an die Fibrillen. Eine Bindung an Di- und Tetramere, sowie Oligomere und Protofibrillen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden. Diese ist aber unwahrscheinlich, da die Selektion gegen reife Fibrillen durchgeführt wurde, und es nach der Reifung kaum reversible Prozesse gibt (Liu und Bitan 2012, Cannon *et al.* 2004). Es wurden nur reife Fibrillen als Zielstruktur angeboten und während der Selektion die Bindung mit monomeren (disaggregiertem) A β (1-42) Peptid kompetiert (siehe 8.3.1).

Überprüft werden könnte dieser Sachverhalt in *dot-blot* Experimenten, wo die einzelnen Spezies immobilisiert auf einer Membran als Ziel dargeboten und 4.G11 mit Hilfe eines sekundären Antikörpers detektiert wird. Weiterhin sollte die Bindungsstärke von 4.G11 gegen $A\beta(1-40)$ und mSAA Fibrillen bestimmt werden.

Eine fortführende Analytik ergab, dass 4.G11 einen sehr interessanten Effekt auf die Fibrillierungskinetik des A β (1-40) Peptides hat. Bei einem molaren Verhältnis von A β (1-40) zu 4.G11 von 2:1 zeigte sich eine Verlängerung der *lag*-Phase um das bis zu Siebenfache (siehe 4.6.3). Die Bildung von reifen Fibrillen wird durch die Anwesenheit von 4.G11 wesentlich verlangsamt. 4.G11 allein hingegen bildet unter den gewählten Bedingungen keine Fibrillen, ebenso wurde ein Einfluss von M7 auf die Kinetik der Fibrillenbildung von A β (1-40) ausgeschlossen. Dieser gemessene Effekt ist also direkt mit der neu erschaffenen Bindefläche korreliert und sollte ebenfalls mit A β (1-42) Peptid untersucht werden.

Ein weiterer Einfluss von 4.G11 konnte auf die Endprodukte dieses Fibrillierungsexperimentes nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von 4.G11 bildeten sich keine Fibrillen mit der normalen, länglichen Morphologie (Meinhardt und Fändrich 2009). Stattdessen wurden in den TEM-Aufnahmen kürzere Fibrillenfragmente detektiert. Diese entsprechen in Form und Größe weder den Oligomeren, noch den Protofibrillen (vgl. hierzu Abbildung 5).

Um zu klären, ob dieser Effekt nur während der Bildung der Fibrillen auftritt, oder ob auch reife Fibrillen fragmentiert werden, wurden Experimente mit vorgeformten Fibrillen und Zugabe von 4.G11 durchgeführt. A β (1-42) und A β (1-40) werden durch 4.G11 konzentrationsabhängig fragmentiert. Bei A β (1-42) Fibrillen ist der Effekt ausgeprägter als bei A β (1-40) Fibrillen, was mit dem höheren Bindungssignal im Spezifitäts-ELISA korreliert. Ebenfalls ein starkes Bindungssignal im ELISA zeigten die mSAA Fibrillen. Hier konnte jedoch keine eindeutige Fragmentierung nachgewiesen werden. Eine Bindung an die Fibrillen bedingt also nicht automatisch eine Fragmentierung. Die molekularen Hintergründe, warum eine Bindung an die Fibrillen nicht stabilisierend wirkt, sondern zu kleineren Fragmenten führt, sind bis jetzt unverstanden. Der gefundene Effekt könnte auch zeitlich aufgelöst untersucht werden, indem vorgeformte Fibrillen unter dem Einfluss von Thioflavin T durch 4.G11 fragmentiert werden, was eine Abnahme des Fluoreszenzsignals erwarten ließe.

Der Effekt, dass reife Fibrillen wieder aufgelöst werden, ist bereits für sequenzspezifische Antikörper gegen das A β Peptid beschrieben (Solomon *et al.* 1996, Frenkel *et al.* 2000, McLaurin *et al.* 2002). Auch Antikörper, die konformationsspezifisch für den nativen Zu-

stand des Monomers sind, führen zu einer Auflösung der Fibrillen (in diesem Fall Lysozym Fibrillen) (Dumoulin *et al.* 2003).

Wahrscheinlich reicht die Bindungsstärke der Antikörper (typischerweise im unteren nanomolaren Bereich) aus, um die Interaktionsflächen der Peptide innerhalb der Fibrillen zu besetzen und damit die Fibrillenbildung komplett zu unterdrücken bzw. durch eine Bindung der Monomere die Fibrille wieder aufzulösen (Solomon *et al.* 1996). Auch eine Auflösung der Fibrille durch das Entfernen des Monomers aus dem Gleichgewicht wäre denkbar. Der K_D-Wert für die Bildung von A β (1-40) Fibrillen wurde zu 0,8-1 μ M bestimmt (O'Nuallain *et al.* 2005, Cannon *et al.* 2004). Eine Bindung der sequenzspezifischen Antikörper an das Monomer ist also rund 1000fach stärker. Ungeklärterweise tritt dieser Effekt nicht bei allen sequenzspezifischen Antikörpern auf. Besonders ausgeprägt ist er bei Antikörpern, die den N-terminalen Teil des A β Peptides (Reste 1-16) erkennen (Solomon *et al.* 1997).

Für eine konformationsspezifische Bindung, wie es nachgewiesenermaßen bei 4.G11 der Fall ist, ist ein solcher Effekt noch nicht beschrieben worden. Im Gegenteil, eine Bindung an die Oberfläche der Fibrille würde eine Stabilisierung der Struktur erwarten lassen, wie es für das organische Molekül O4 berichtet wurde (Bieschke et al. 2012). Eine solche Stabilisierung geht allerdings auch mit einer wesentlich beschleunigten Bildung der Fibrillen unter dem Einfluss von O4 einher. Allerdings wurde für das Polyphenol Epigallocatechingallat (EGCG) berichtet, dass es an reife A β (1-42) Fibrillen binden kann und diese "umformt" (Bieschke et al. 2010). In den mit EGCG behandelten Gemischen wurden typische Fibrillen, als auch kleinere, oligomere Spezies, sowie amorphe Proteinaggregate nachgewiesen. Gleichzeitig führt die Behandlung der Fibrillen mit EGCG zu weniger toxischen Spezies. Ein Effekt, der bei den in dieser Arbeit verwendeten, fragmentierten A β (1-40) Fibrillen nicht beobachtet werden konnte. Für EGCG selbst ist beschrieben, dass es an hydrophobe Bereiche in Proteinen sowohl über hydrophobe Interaktionen als auch über Wasserstoffbrückenbindung bindet (Maiti et al. 2006). Es ist damit weder sequenz- noch konformationsspezifisch. Vielmehr ist es in der Lage, an die Monomere der Fibrillen mit einer höheren Affinität als an reife Fibrillen zu binden. ECGC unterdrückt die Fibrillenbildung vollständig, indem es die Bildung von off-pathway Aggregaten, die nicht toxisch sind, initiiert (Ehrnhoefer et al. 2008).

Für den konformationsspezifischen Antikörper B10 ist berichtet worden, dass dieser durch eine Bindung an Protofibrillen die Fibrillenbildung unterdrückt. Reife Fibrillen werden durch B10 aber nicht wieder aufgelöst oder fragmentiert (Habicht *et al.* 2007). Es sind noch weitere Antikörper beschrieben, die die Konformation der Fibrille spezifisch erkennen, jedoch sind keine Daten über einen kinetischen Einfluss auf die Fibrillenbildung oder eine Fragmentierung bekannt (O'Nuallain und Wetzel 2002, Kayed *et al.* 2007).

Weder für die beobachtete Fragmentierung, noch für die daraus entstandenen Produkte lassen sich in der derzeit bekannten Literatur Entsprechungen finden. Die molekulare Identität der durch 4.G11 Zugabe entstandenen Fragmente ist ungeklärt. Vom elektronenmikroskopischen Bild her können Oligomere oder Protofibrillen mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Um das zu bestätigen, wurde ein Zytotoxizitätstest (siehe 4.6.5) durchgeführt. Protofibrillen und Oligomere sollten eine höhere Toxizität aufweisen als Fibrillen und damit auch als fragmentierte Fibrillen (Walsh und Selkoe 2007, Ahmed *et al.* 2010). Das Ergebnis des Tests zeigt, dass weder die reifen A β (1-40) Fibrillen, noch die daraus entstandenen Fragmente eine erhöhte Toxizität aufweisen. Somit können oligomere Zustände und Protofibrillen die gefundenen Fragmente nicht erklären. 2009 konnte für Fibrillen bestehend aus humanem β_2 -Mikroglobulin (Gosal *et al.* 2005), eine erhöhte Toxizität gezeigt werden, wenn sie zuvor mechanisch fragmentiert wurden (Xue *et al.* 2009). Dieser Effekt konnte hier für die fragmentierten A β (1-40) Fibrillen nicht beobachtet werden. Es empfiehlt sich, den Toxizitätstest mit fragmentierten A β (1-42) Fibrillen zu wiederholen, wobei oligomere Spezies als Kontrolle mitgeführt werden. Damit wäre ein genauerer Vergleich der Toxizität der einzelnen Spezies möglich.

Wenn es sich bei den Fragmenten aber einfach um kürzere Fibrillen handelt (wie sie z.B. durch eine Ultraschallbehandlung erhalten werden können), steht das im Widerspruch zu der verlangsamten Fibrillenbildungskinetik. Mehrere kleine Fibrillen sollten eine größere Anzahl an freien Enden beinhalten und somit die Monomerassoziation und damit das Fibrillenwachstum merklich beschleunigen (Cannon *et al.* 2004).

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass das Wachstum der Fibrillenfragmente durch die Bindung von 4.G11 sterisch blockiert ist. Was vorrausetzt, dass 4.G11 am Ende der Fibrille bindet. Eine Möglichkeit das zu überprüfen wäre, mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie die Bindungstelle/n von 4.G11 zu lokalisieren. Zu diesem Zweck könnte ein Fusionsprotein aus 4.G11 und dem Enzym Alkalische Phosphatase hergestellt werden. Führt man eine TEM-Untersuchung mit Hilfe einer Ceriumphosphat Färbung aus, dann kommt es zu einer Akkumulation des Ceriumphosphates in der Nähe des aktiven Zentrums der Alkalischen Phosphatase. Damit ist dort lokal die Elektronendichte erhöht, und eine deutliche Kontrastierung im TEM-Bild ist die Folge (Habicht et al. 2007). Sollte sich 4.G11 ausschließlich an den Enden der Fibrille anlagern, dann wäre mit diesem Experiment ein optischer Nachweis möglich. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Markierung mit Hilfe von Goldpartikeln erfolglos getestet (Daten nicht gezeigt). Eine Visualisierung von biotinylierten 4.G11 mit Streptavidin gekoppelten Goldpartikeln führte in TEM-Aufnahmen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Möglicherweise reicht die Affinität im mikromolaren Bereich nicht aus, um die für die Färbung (negative Kontrastierung mit Uranylacetat bei pH = 2-3) notwendigen Waschschritte zu überstehen. Dann wäre auch mit dem Fusionsprotein kein positives Ergebnis zu erwarten. Alternativ dazu könnten andere Färbemethoden bei neutralem pH angewendet oder eine vorhergehende Fixierung mit Glutaraldehyd durchgeführt werden, um das Problem zu umgehen. In jedem Falle hätte man durch die Fusion von 4.G11 mit einer Alkalischen Phosphatase eine Möglichkeit, das Protein direkt durch den Umsatz eines chromogenen Substrates zu detektieren (z.B. im ELISA oder dot-blot), vorausgesetzt die Bindungseigenschaften werden durch den Fusionspartner nicht negativ beeinträchtigt, was es zu testen gilt.

Um den molekularen Mechanismus der Fragmentierung der Fibrillen besser zu verstehen, könnte eine Rückmutation der zehn Reste durchgeführt werden. Dabei empfiehlt es sich, auf die Reste des originalen M7 zurückzumutieren, sowie auch einen Alaninscan durchzuführen, bei dem die Reste einzeln zu Alanin mutiert werden. Bindungsstudien der so erzeugten Varianten sollten Hinweise auf die Reste geben, welche für die Bindung essentiell sind. Auch könnten so Reste identifiziert werden, welche maßgeblich an der Fragmentierung beteiligt sind. Dabei sollten beide Aβ Isoformen [Aβ(1-40), Aβ(1-42)] untersucht werden.

Möglicherweise führt auch eine erhöhte Affinität zu eindeutigeren Effekten. Um das zu erreichen, könnte eine Affinitätsmaturierung durchgeführt werden. Dazu sollten, ausgehend von 4.G11, weitere Runden Ribosomen-*display* durchgeführt werden, wobei über *error-prone*-PCR weitere Mutationen eingeführt werden. Besser bindende Varianten könnten so isoliert werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre es 4.G11 zu dimerisieren, da das Epitop auf den Fibrillen vermutlich mehrfach vorhanden ist. Dieser Ansatz könnte die Affinität deutlich erhöhen. Um eine Dimerisierung sinnvoll durchzuführen, werden aber relativ genaue Kenntnisse über das Epitop benötigt, die wiederum in das *linker*-Design (Länge, Zusammensetzung) einfließen.

Zusammenfassend konnte an dem Bindeprotein 4.G11 gezeigt werden, dass es möglich ist, mit Hilfe der in dieser Arbeit erstellten DNA-Bibliothek schwierige, proteinogene Zielstrukturen zu bearbeiten. 4.G11 ist in der Lage A β (1-42) Fibrillen mit einem K_D-Wert von zirka 20 μ M zu binden, wobei Monomere nicht erkannt werden. 4.G11 erkennt A β (1-42), A β (1-40) und mSAA Fibrillen, wobei Fibrillen anderer Proteine nicht gebunden werden. Das Epitop kommt also nicht generisch auf Fibrillen vor. Für A β (1-42) und A β (1-40) Fibrillen konnte gezeigt werden, dass sich durch die Bindung von 4.G11 ihre molekularen Eigenschaften wesentlich verändern. So wird die Fibrillenbildungsreaktion von A β (1-40) durch die Anwesenheit von 4.G11 deutlich verlangsamt. Erstmalig konnte durch die Zugabe eines konformationsspezifischen Bindeproteins eine Fragmentierung von reifen Fibrillen induziert werden. Die molekularen Mechanismen dieser Fragmentierung sind derzeit noch unbekannt.

Hier liegt auch der Schlüssel zu einer möglichen Anwendung von 4.G11 in der Grundlagenforschung. Versteht man die molekularen Prozesse der Fragmentierung, dann erhält man Informationen zur molekularen Beschaffenheit und Stabilität der Fibrille. Möglicherweise ergeben sich daraus neue Ansätze für Therapie und Diagnostik.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung des artifiziellen Proteins M7 als Gerüstprotein unter Beweis gestellt werden. Drei Varianten gegen verschiedenste Zielmoleküle konnten aus ein und derselben Bibliothek isoliert werden. So wurden Bindeproteine gegen TNF α , A β (1-42) Fibrillen und DiUbiquitin [Daten nicht gezeigt, (Böhme 2011)] erzeugt. Alle drei Binder besitzen Affinitäten im unteren mikromolaren Bereich. Die Bindeproteine gegen A β (1-42) Fibrillen und DiUbiquitin sind zusätzlich noch in der Lage, zwischen bestimmten Konformationen der Zielmoleküle zu diskriminieren. Damit ist die Eignung des Gerüstproteins, sowie des gewählten Selektionssystems eindeutig unter Beweis gestellt worden.

Die erhaltenen Bindeproteine besitzen im Vergleich zu bereits etablierten Gerüstproteinen verhältnismäßig geringe Affinitäten. Um M7 langfristig als *scaffold* zu etablieren, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. So empfiehlt es sich, eine größere Bindefläche zu generieren, da die zu erwartenden Affinitäten direkt von der Größe der Bindefläche abhängen. Eine Möglichkeit hierzu wäre, das M7 Protein direkt zu dimerisieren und damit die theoretisch nutzbare Fläche zu verdoppeln. Entsprechend der sterischen Gegebenheiten müssten dann auch die Zielmoleküle ausgewählt werden. Eine Dimerisierung ist nicht für jedes Zielmolekül von Vorteil.

Die Bindung an nicht proteinogene Zielstrukturen ist bis jetzt noch nicht untersucht worden, ist aber ebenso von wissenschaftlicher Bedeutung. So könnte versucht werden, durch die rigide Fläche des β -Faltblattes z. B. Steroidhormone zu binden. Auf Basis eines solchen Binders könnten analytische *assays* entwickelt werden, die auf einem chemisch sehr robusten System aufbauen, vorausgesetzt die Binder wären ähnlich stabil wie das *scaffold*.

Weiterhin gilt es zu untersuchen, ob die anderen Methoden zur Erzeugung von Bindeproteinen für das M7 geeignet oder möglicherweise noch geeigneter wären. So könnten, wie bei den Affibodies, Reste in den α -Helices und *loop*-Strukturen für die Erzeugung von neuen Epitopen genutzt werden. Eine Anwendung des *loop*-graftings ist ebenfalls denkbar.

Um M7 generell als *scaffold* zu etablieren, müssten auch weitere Selektionsmethoden, wie z.B. das Phagen-*display* für dieses Gerüstprotein angewendet werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. und Hass, P. E. (1985). Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. Nature *318*, 665–667.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J. I., Van Nostrand, W.
 E. und Smith, S. O. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. Nature structural & molecular biology 17, 561–567.
- 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.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift fuer Psychiatrie und Psychischgerichtliche Medizin *64*, 146–148.
- Amstutz, P., Binz, H. K., Parizek, P., Stumpp, M. T., Kohl, A., Grutter, M. G., Forrer, P. und Plückthun, A. (2005). Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. The Journal of biological chemistry 280, 24715–24722.
- 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 factoralpha by replacing cysteines 69 and 101 with aspartic acid 69 and arginine 101. Protein engineering 3, 721–724.
- **Balkwill, F.** (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. Cancer metastasis reviews 25, 409–416.
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. Nature reviews. Cancer 9, 361–371.
- Beck, A., Wurch, T., Bailly, C. und Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. Nature reviews. Immunology *10*, 345–352.
- Beutler, B. und Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 320, 584–588.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R. und Cerami, A. (1985a). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 316, 552–554.
- Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. und Cerami, A. (1985b). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. The Journal of experimental medicine 161, 984–995.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. und Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. Cancer research 38, 3751–3757.
- Bieschke, J., Herbst, M., Wiglenda, T., Friedrich, R. P., Boeddrich, A., Schiele, F., Kleckers, D., Lopez del Amo, J. M., Gruning, B. A., Wang, Q., Schmidt, M. R., Lurz, R., Anwyl, R., Schnoegl, S., Fändrich, M., Frank, R. F., Reif, B., Gunther, S., Walsh, D. M. und Wanker, E. E. (2012). Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic beta-sheet-rich amyloid fibrils. Nature chemical biology 8, 93–101.
- Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R. P., Ehrnhoefer, D. E., Wobst, H., Neugebauer, K. und Wanker, E. E. (2010). EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 7710–7715.
- Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M. G. und Plückthun, A. (2004). High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. Nature biotechnology 22, 575–582.
- Binz, H. K., Amstutz, P. und Plückthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nature biotechnology 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. Journal of molecular biology 332, 489–503.
- Bird, T. D. (2008). Genetic aspects of Alzheimer disease. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics 10, 231–239.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B. und Teplow, D. B. (2003). Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 330–335.
- 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. Nature biotechnology 15, 553–557.
- **Boersma, Y. L. und Plückthun, A.** (2011). DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. Current opinion in biotechnology *22*, 849–857.
- Böhme, M. (2011). Selektion M7-basierter künstlicher Bindeproteine mittesl *ribosome display*. Institut für Biochemie und Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Diplomarbeit.
- Boschek, C. B., Apiyo, D. O., Soares, T. A., Engelmann, H. E., Pefaur, N. B., Straatsma, T. P. und Baird, C. L. (2009). Engineering an ultra-stable affinity reagent based on Top7. Protein engineering, design & selection : PEDS 22, 325–332.
- Cannon, M. J., Williams, A. D., Wetzel, R. und Myszka, D. G. (2004). Kinetic analysis of betaamyloid fibril elongation. Analytical biochemistry 328, 67–75.
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 72, 3666–3670.
- Check, E. (2002). Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. Nature 415, 462.
- Chen, S. und Wetzel, R. (2001). Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. Protein science : a publication of the Protein Society *10*, 887–891.
- **Cost, G. J.** (2007). Enzymatic ligation assisted by nucleases: simultaneous ligation and digestion promote the ordered assembly of DNA. Nature protocols *2*, 2198–2202.
- **Cost, G. J. und Cozzarelli, N. R.** (2007). Directed assembly of DNA molecules via simultaneous ligation and digestion. BioTechniques *42*, 84, 86–89.
- **Dallüge, R.** (2008). Tetrapeptidbasiertes Proteindesign Ein Lösungsansatz für das inverse Proteinfaltungsproblem. Institut für Biochemie und Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Dissertation.
- Dallüge, R., Oschmann, J., Birkenmeier, O., Lucke, C., Lilie, H., Rudolph, R. und Lange, C. (2007). A tetrapeptide fragment-based design method results in highly stable artificial proteins. Proteins 68, 839–849.
- Dantas, G., Watters, A. L., Lunde, B. M., Eletr, Z. M., Isern, N. G., Roseman, T., Lipfert, J., Doniach, S., Tompa, M., Kuhlman, B., Stoddard, B. L., Varani, G. und Baker, D. (2006). Mistranslation of a computationally designed protein yields an exceptionally stable homodimer: implications for protein engineering and evolution. Journal of molecular biology 362, 1004–1024.

- Delaere, P., Duyckaerts, C., Masters, C., Beyreuther, K., Piette, F. und Hauw, J. J. (1990). Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. Neuroscience letters 116, 87–93.
- Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C. und Busciglio, J. (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 26, 6011–6018.
- **Devoogdt, N., Revets, H., Kindt, A., Liu, Y. Q., De Baetselier, P. und Ghassabeh, G. H.** (2006). The tumor-promoting effect of TNF-alpha involves the induction of secretory leukocyte protease inhibitor. J Immunol *177*, 8046–8052.
- Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M. und Paul, S. M. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. Nature neuroscience 5, 452–457.
- **Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W.** (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic acids research *16*, 6127–6145.
- Dumoulin, M. und Dobson, C. M. (2004). Probing the origins, diagnosis and treatment of amyloid diseases using antibodies. Biochimie 86, 589–600.
- Dumoulin, M., Last, A. M., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D., Larsson, G., Spencer, A., Archer, D. B., Sasse, J., Muyldermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C. V. und Dobson, C. M. (2003). A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. Nature 424, 783–788.
- 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. Journal of molecular biology 372, 172–185.
- Eck, M. J. und Sprang, S. R. (1989). The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. The Journal of biological chemistry 264, 17595–17605.
- Eggel, A., Buschor, P., Baumann, M. J., Amstutz, P., Stadler, B. M. und Vogel, M. (2011). Inhibition of ongoing allergic reactions using a novel anti-IgE DARPin-Fc fusion protein. Allergy 66, 961–968.
- Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A. und Wanker, E. E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. Nature structural & molecular biology 15, 558–566.
- Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D. und Wallach, D. (1989). A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. The Journal of biological chemistry 264, 11974–11980.
- Engelmann, H., Novick, D. und Wallach, D. (1990). Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. The Journal of biological chemistry 265, 1531–1536.
- Fändrich, M. (2012). Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. Journal of molecular biology 421, 427–440.
- Fändrich, M. und Dobson, C. M. (2002). The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. The EMBO journal 21, 5682–5690.
- **Fändrich, M., Meinhardt, J. und Grigorieff, N.** (2009). Structural polymorphism of Alzheimer Abeta and other amyloid fibrils. Prion *3*, 89–93.
- Faustman, D. und Davis, M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. Nature reviews. Drug discovery 9, 482–493.
- Fiala, G. und Stetter, K. O. (1986). Pyrococcus furiosus sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaebacteria growing optimally at 100 °C. Archives of microbiology 145, 56–61.

- Fiedler, M., Fiedler, U. und Rudolph, R. (2004). Generation of artificial binding proteins based on ubiquitin proteins. International Patent Application. *WO/2004/106368*.
- Fiedler, U. und Rudolph, R. (2001). Fabrication of beta-pleated sheet proteins with specific binding properties. International Patent Application. *WO 01/04144*.
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. The Biochemical journal 318 (*Pt 1*), 1–14.
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 10444–10448.
- Frenkel, D., Katz, O. und Solomon, B. (2000). Immunization against Alzheimer's beta -amyloid plaques via EFRH phage administration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 11455–11459.
- Friedman, M., Nordberg, E., Hoiden-Guthenberg, I., Brismar, H., Adams, G. P., Nilsson, F. Y., Carlsson, J. und Stahl, S. (2007). Phage display selection of Affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. Protein engineering, design & selection : PEDS 20, 189–199.
- Friedman, M. und Stahl, S. (2009). Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications. Biotechnology and applied biochemistry 53, 1–29.
- Galla, H. J. (1988). Spektroskopische Methoden in der Biochemie, 978-3137123019, Thieme Verlag
- Garcia-Ibilcieta, D., Bokov, M., Cherkasov, V., Sveshnikov, P. und Hanson, S. F. (2008). Simple method for production of randomized human tenth fibronectin domain III libraries for use in combinatorial screening procedures. BioTechniques 44, 559–562.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2005). 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. Current opinion in chemical biology 13, 245–255.
- Gerth, M. L., Patrick, W. M. und Lutz, S. (2004). A second-generation system for unbiased reading frame selection. Protein engineering, design & selection : PEDS 17, 595–602.
- **Ghezzi, P. und Cerami, A.** (2005). Tumor necrosis factor as a pharmacological target. Molecular biotechnology *31*, 239–244.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical biochemistry *182*, 319–326.
- Gosal, W. S., Morten, I. J., Hewitt, E. W., Smith, D. A., Thomson, N. H. und Radford, S. E. (2005). Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-micro-globulin into amyloid. Journal of molecular biology *351*, 850–864.
- Grönwall, C., Jonsson, A., Lindstrom, S., Gunneriusson, E., Stahl, S. und Herne, N. (2007). Selection and characterization of Affibody ligands binding to Alzheimer amyloid beta peptides. Journal of biotechnology 128, 162–183.
- Haass, C. und Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nature reviews. Molecular cell biology *8*, 101–112.
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R. P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K., Gellermann, G. P., Brodhun, M., Gotz, J., Halbhuber, K. J., Rocken, C., Horn, U. und Fändrich, M. (2007). Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 19232–19237.

- Han, B. G., Jeong, K. C., Cho, J. W., Jeong, B. C., Song, H. K., Lee, J. Y., Shin, D. H., Lee, S. und Lee, B. I. (2012). Crystal structure of Pyrococcus furiosus PF2050, a member of the DUF2666 protein family. FEBS letters 586, 1384–1388.
- Härd, T. (2011). Protein engineering to stabilize soluble amyloid beta-protein aggregates for structural and functional studies. The FEBS journal 278, 3884–3892.
- **Hardy, J. und Selkoe, D. J.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science *297*, 353–356.
- Hardy, J. A. und Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science 256, 184–185.
- Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M. und Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. Chemistry & biology 4, 119–125.
- Harris, J. R. (1996). Negative Staining and Cryoelectron Microscopy: The Thin Film Techniques, 1-85996-120-7, Bios Scientific Publishers.
- Haupt, C., Bereza, M., Kumar, S. T., Kieninger, B., Morgado, I., Hortschansky, P., Fritz, G., Rocken, C., Horn, U. und Fändrich, M. (2011). Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils. Journal of molecular biology 408, 529–540.
- He, M. M., Smith, A. S., Oslob, J. D., Flanagan, W. M., Braisted, A. C., Whitty, A., Cancilla, M. T., Wang, J., Lugovskoy, A. A., Yoburn, J. C., Fung, A. D., Farrington, G., Eldredge, J. K., Day, E. S., Cruz, L. A., Cachero, T. G., Miller, S. K., Friedman, J. E., Choong, I. C. und Cunningham, B. C. (2005). Small-molecule inhibition of TNF-alpha. Science 310, 1022–1025.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. und Fiedler, M. (2005). Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. Trends in biotechnology 23, 514–522.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M. A., Umbricht, D., de Quervain, D. J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. und Nitsch, R. M. (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. Neuron 38, 547–554.
- **Hoffmann, A.** (2011). Erzeugung und Charakterisierung Ubiquitin-basierter Bindeproteine. Institut für Biochemie und Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Dissertation.
- Hoffmann, A., Kovermann, M., Lilie, H., Fiedler, M., Balbach, J., Rudolph, R. und Pfeifer, S. (2012). New binding mode to TNF-alpha revealed by ubiquitin-based artificial binding protein. PloS one 7, e31298.
- Hoffmann, A., Müller, M. Q., Gloser, M., Sinz, A., Rudolph, R. und Pfeifer, S. (2010). Recombinant production of bioactive human TNF-alpha by SUMO-fusion system-high yields from shakeflask culture. Protein expression and purification 72, 238–243.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. und Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. Science translational medicine *3*, 77sr1.
- Hortschansky, P., Schroeckh, V., Christopeit, T., Zandomeneghi, G. und Fändrich, M. (2005). The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. Protein science : a publication of the Protein Society *14*, 1753–1759.
- Houk, K. N., Leach, A. G., Kim, S. P. und Zhang, X. (2003). Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. Angew Chem Int Ed Engl 42, 4872–4897.
- Hoyer, W., Grönwall, C., Jonsson, A., Stahl, S. und Härd, T. (2008). Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 5099–5104.
- Hoyer, W. und H\u00e4rd, T. (2008). Interaction of Alzheimer's A beta peptide with an engineered binding protein-thermodynamics and kinetics of coupled folding-binding. Journal of molecular biology 378, 398–411.

- Idriss, H. T. und Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structurefunction relationship(s). Microscopy research and technique *50*, 184–195.
- **Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene *96*, 23–28.
- Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M. und Saibil, H. R. (2002). The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 9196–9201.
- Jonsson, A., Wallberg, H., Herne, N., Stahl, S. und Frejd, F. Y. (2009). Generation of tumournecrosis-factor-alpha-specific affibody molecules capable of blocking receptor binding in vitro. Biotechnology and applied biochemistry 54, 93–103.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325, 733–736.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C. W., Necula, M., Margol, L., Wu, J., Breydo, L., Thompson, J. L., Rasool, S., Gurlo, T., Butler, P. und Glabe, C. G. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. Molecular neurodegeneration 2, 18.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W. und Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science 300, 486–489.
- Klein, W. L., Stine, W. B., Jr. und Teplow, D. B. (2004). Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. Neurobiology of aging 25, 569–580.
- Kohler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495–497.
- Koide, A., Abbatiello, S., Rothgery, L. und Koide, S. (2002). Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 1253–1258.
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X. und Koide, S. (1998). The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. Journal of molecular biology 284, 1141–1151.
- Kronqvist, N., Lofblom, J., Jonsson, A., Wernerus, H. und Stahl, S. (2008). A novel affinity protein selection system based on staphylococcal cell surface display and flow cytometry. Protein engineering, design & selection : PEDS 21, 247–255.
- Krumpe, L. R., Schumacher, K. M., McMahon, J. B., Makowski, L. und Mori, T. (2007). Trinucleotide cassettes increase diversity of T7 phage-displayed peptide library. BMC biotechnology 7, 65.
- Kuhlman, B., Dantas, G., Ireton, G. C., Varani, G., Stoddard, B. L. und Baker, D. (2003). Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. Science 302, 1364–1368.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Lambert, M. P., Viola, K. L., Chromy, B. A., Chang, L., Morgan, T. E., Yu, J., Venton, D. L., Krafft, G. A., Finch, C. E. und Klein, W. L. (2001). Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. Journal of neurochemistry 79, 595–605.
- Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. und Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. Nature 457, 1128–1132.

- 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 opinion on biological therapy 8, 1187–1199.
- Lejeune, F. J., Lienard, D., Matter, M. und Ruegg, C. (2006). Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. Cancer immunity *6*, 6.
- LeVine, H., 3rd (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. Protein science : a publication of the Protein Society 2, 404–410.
- Liu, H., Dai, L. S., Hao, Z. J., Huang, W. D. und Yang, Q. (2012). Hydrophobic cavity in C-terminus is essential for hTNF-alpha trimer conformation. Biochimie 94, 1001–1008.
- Liu, T. Y. und Bitan, G. (2012). Modulating Self-Assembly of Amyloidogenic Proteins as a Therapeutic Approach for Neurodegenerative Diseases: Strategies and Mechanisms. ChemMedChem 7, 359–374.
- Löfblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Stahl, S. und Frejd, F. Y. (2010). Affibody molecules: engineered proteins for therapeutic, diagnostic and biotechnological applications. FEBS letters 584, 2670–2680.
- Löfdahl, P. A., Nord, O., Janzon, L. und Nygren, P. A. (2009). Selection of TNF-alpha binding affibody molecules using a beta-lactamase protein fragment complementation assay. New biotechnology 26, 251–259.
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Dobeli, H., Schubert, D. und Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 17342–17347.
- Macao, B., Hoyer, W., Sandberg, A., Brorsson, A. C., Dobson, C. M. und Hard, T. (2008). Recombinant amyloid beta-peptide production by coexpression with an affibody ligand. BMC biotechnology 8, 82.
- Maiti, T. K., Ghosh, K. S. und Dasgupta, S. (2006). Interaction of (–)-epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: fluorescence, fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. Proteins *64*, 355–362.
- Marmenout, A., Fransen, L., Tavernier, J., Van der Heyden, J., Tizard, R., Kawashima, E., Shaw, A., Johnson, M. J., Semon, D., Muller, R. und et al. (1985). Molecular cloning and expression of human tumor necrosis factor and comparison with mouse tumor necrosis factor. European journal of biochemistry / FEBS 152, 515–522.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L. und Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 82, 4245–4249.
- McLaurin, J., Cecal, R., Kierstead, M. E., Tian, X., Phinney, A. L., Manea, M., French, J. E., Lambermon, M. H., Darabie, A. A., Brown, M. E., Janus, C., Chishti, M. A., Horne, P., Westaway, D., Fraser, P. E., Mount, H. T., Przybylski, M. und St George-Hyslop, P. (2002). Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4–10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. Nature medicine 8, 1263–1269.
- Meinhardt, J. und Fändrich, M. (2009). [Structure of amyloid fibrils]. Der Pathologe 30, 175–181.
- Meinhardt, J., Sachse, C., Hortschansky, P., Grigorieff, N. und Fändrich, M. (2009). Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. Journal of molecular biology 386, 869–877.
- Milovnik, P., Ferrari, D., Sarkar, C. A. und Plückthun, A. (2009). Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1. Protein engineering, design & selection : PEDS 22, 357–366.

- Mirecka, E. A., Hey, T., Fiedler, U., Rudolph, R. und Hatzfeld, M. (2009). Affilin molecules selected against the human papillomavirus E7 protein inhibit the proliferation of target cells. Journal of molecular biology *390*, 710–721.
- Morgado, I., Wieligmann, K., Bereza, M., Ronicke, R., Meinhardt, K., Annamalai, K., Baumann, M., Wacker, J., Hortschansky, P., Malesevic, M., Parthier, C., Mawrin, C., Schiene-Fischer, C., Reymann, K. G., Stubbs, M. T., Balbach, J., Gorlach, M., Horn, U. und Fändrich, M. (2012). Molecular basis of beta-amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 12503–12508.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods 65, 55–63.
- Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshikawa, M., Yoshioka, Y., Tsunoda, S., Nakagawa, S., Yamagata, Y. und Tsutsumi, Y. (2010). Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. Sci Signal 3.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 51 Pt 1, 263–273.
- Narachi, M. A., Davis, J. M., Hsu, Y. R. und Arakawa, T. (1987). Role of single disulfide in recombinant human tumor necrosis factor-alpha. The Journal of biological chemistry 262, 13107– 13110.
- Nelson, A. L., Dhimolea, E. und Reichert, J. M. (2010). Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nature reviews. Drug discovery 9, 767–774.
- Nicaise, M., Valerio-Lepiniec, M., Minard, P. und Desmadril, M. (2004). Affinity transfer by CDR grafting on a nonimmunoglobulin scaffold. Protein science : a publication of the Protein Society 13, 1882–1891.
- 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. Nature biotechnology 15, 772–777.
- Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. und Nygren, P. A. (1995). A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain. Protein engineering *8*, 601–608.
- Nord, K., Nord, O., Uhlen, M., Kelley, B., Ljungqvist, C. und Nygren, P. A. (2001). Recombinant human factor VIII-specific affinity ligands selected from phage-displayed combinatorial libraries of protein A. European journal of biochemistry / FEBS 268, 4269–4277.
- Nygren, P. A. und Skerra, A. (2004). Binding proteins from alternative scaffolds. Journal of immunological methods 290, 3–28.
- **O'Nuallain, B., Shivaprasad, S., Kheterpal, I. und Wetzel, R.** (2005). Thermodynamics of A beta(1-40) amyloid fibril elongation. Biochemistry *44*, 12709–12718.
- **O'Nuallain, B. und Wetzel, R.** (2002). Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 1485–1490.
- 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.
- Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z., Yau, W. M., Mattson, M. P. und Tycko, R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. Science 307, 262–265.
- Plückthun, A. (2011). Darwins langer Arm Evolutionstheorie heute. Vdf Hochschulverlag; Auflage: 1., Heinz-Ulrich Reyer, Paul-Schmid Hempel, 89–105.
Plückthun, A. (2012). Ribosome display: a perspective. Methods Mol Biol 805, 3–28.

- **Poiesi, C., Albertini, A., Ghielmi, S., Cassani, G. und Corti, A.** (1993). Kinetic analysis of TNFalpha oligomer-monomer transition by surface plasmon resonance and immunochemical methods. Cytokine *5*, 539–545.
- Rees, A. R., Staunton, D., Webster, D. M., Searle, S. J., Henry, A. H. und Pedersen, J. T. (1994). Antibody design: beyond the natural limits. Trends in biotechnology *12*, 199–206.
- Roche (2011). Roche Lab FAQs Find a Quick Solution, Roche Diagnostics GmbH.
- Ruigrok, V. J., Levisson, M., Eppink, M. H., Smidt, H. und van der Oost, J. (2011). Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? The Biochemical journal *436*, 1–13.
- Sackewitz, M., Scheidt, H. A., Lodderstedt, G., Schierhorn, A., Schwarz, E. und Huster, D. (2008). Structural and dynamical characterization of fibrils from a disease-associated alanine expansion domain using proteolysis and solid-state NMR spectroscopy. Journal of the American Chemical Society 130, 7172–7173.
- Schasfoort, R. B. M. und Tudos, A. J. (2008). Handbook of Surface Plasmon Resonance, 978-0-85404-267-8, RSC Publishing.
- Scheidt, H. A., Morgado, I., Rothemund, S., Huster, D. und Fändrich, M. (2011). Solid-state NMR spectroscopic investigation of Abeta protofibrils: implication of a beta-sheet remodeling upon maturation into terminal amyloid fibrils. Angew Chem Int Ed Engl 50, 2837–2840.
- Schlehuber, S. und Skerra, A. (2005). Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins". Drug discovery today *10*, 23–33.
- Schmidt, M., Sachse, C., Richter, W., Xu, C., Fändrich, M. und Grigorieff, N. (2009). Comparison of Alzheimer Abeta(1-40) and Abeta(1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 19813–19818.
- Selkoe, D. J. (2001a). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological reviews 81, 741–766.
- Selkoe, D. J. (2001b). Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 11039–11041.
- Selo, I., Negroni, L., Creminon, C., Grassi, J. und Wal, J. M. (1996). Preferential labeling of alpha-amino N-terminal groups in peptides by biotin: application to the detection of specific antipeptide antibodies by enzyme immunoassays. Journal of immunological methods 199, 127–138.
- 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.
- Skerra, A. (2000). Engineered protein scaffolds for molecular recognition. Journal of molecular recognition : JMR 13, 167–187.
- Skerra, A. (2008). Alternative binding proteins: anticalins harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. The FEBS journal *275*, 2677–2683.
- 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. The Journal of biological chemistry *262*, 6951–6954.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. und Hanan-Aharon, E. (1997). Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4109–4112.
- Solomon, B., Koppel, R., Hanan, E. und Katzav, T. (1996). Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 452–455.

- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. Nature reviews. Neuroscience 4, 49–60.
- Steiner, D., Forrer, P. und Plückthun, A. (2008). Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. Journal of molecular biology 382, 1211–1227.
- **Stordeur, C.** (2007). NMR-Spektroskopische Untersuchungen an artifiziellen Proteinen. Institut für Biochemie und Biotechnologie. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Diplomarbeit.
- Stordeur, C., Dallüge, R., Birkenmeier, O., Wienk, H., Rudolph, R., Lange, C. und Lücke, C. (2008). The NMR solution structure of the artificial protein M7 matches the computationally designed model. Proteins 72, 1104–1107.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein expression and purification *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. Journal of molecular biology 189, 113–130.
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B. und Blake, C. C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. Journal of molecular biology 273, 729–739.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M. und Plückthun, A. (2012). Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) from research to therapy. Methods in enzymology *503*, 101–134.
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. und Tak, P. P. (2008). Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacology & therapeutics 117, 244–279.
- Virnekas, 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 research 22, 5600–5607.
- **Vogt, M. und Skerra, A.** (2004). Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. Chembiochem : a European journal of chemical biology *5*, 191–199.
- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M. und Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. The Journal of biological chemistry 272, 22364–22372.
- Walsh, D. M. und Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers a decade of discovery. Journal of neurochemistry 101, 1172–1184.
- Watters, A. L., Deka, P., Corrent, C., Callender, D., Varani, G., Sosnick, T. und Baker, D. (2007). The highly cooperative folding of small naturally occurring proteins is likely the result of natural selection. Cell 128, 613–624.
- Westermark, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J. und Sipe, J. D. (2005). Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis 12, 1–4.
- Wikman, M., Steffen, A. C., Gunneriusson, E., Tolmachev, V., Adams, G. P., Carlsson, J. und Stahl, S. (2004). Selection and characterization of HER2/neu-binding affibody ligands. Protein engineering, design & selection : PEDS 17, 455–462.
- Williams, A. und Baird, L. G. (2003). DX-88 and HAE: a developmental perspective. Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis 29, 255–258.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D. und Szostak, J. W. (2001). The use of mRNA display to select highaffinity protein-binding peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 3750–3755.

- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R. G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A. C., Liu, H., Lohse, P. A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R. W. und Lipovsek, D. (2002). Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. Chemistry & biology 9, 933–942.
- Xue, W. F., Hellewell, A. L., Gosal, W. S., Homans, S. W., Hewitt, E. W. und Radford, S. E. (2009). Fibril fragmentation enhances amyloid cytotoxicity. The Journal of biological chemistry 284, 34272–34282.
- Zahnd, C., Amstutz, P. und Plückthun, A. (2007). Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. Nature methods 4, 269–279.
- Zahnd, C., Sarkar, C. A. und Plückthun, A. (2010). Computational analysis of off-rate selection experiments to optimize affinity maturation by directed evolution. Protein engineering, design & selection : PEDS 23, 175–184.
- Zhang, Z. und Chan, H. S. (2009). Native topology of the designed protein Top7 is not conducive to cooperative folding. Biophysical journal *96*, L25–27.
- Zheng, H. und Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. Molecular neurodegeneration 1, 5.
- Zilka, N. und Novak, M. (2006). The tangled story of Alois Alzheimer. Bratislavske lekarske listy 107, 343–345.

8 Anhang

8.1 DNA Sequenzen

Abbildung 31: Darstellung der Ribosomen-Anker-Sequenz. Diese Sequenz wurde im präparativen Maßstab durch eine PCR Reaktion mit *primer* L17for_Spe und L17rev_P erhalten. Als Template diente eine kommerziell erworbene synthetische Sequenz.



Abbildung 32: Sequenz der Bibliothek im Ribosomen-*display* Format. Dieses Format fand in der 0. und 1. Runde Ribosomen-display gegen TNF α und in allen Runden gegen A β (1-42) Fibrillen Verwendung. Zum Wiederaufbau der 5'UTR nach den Ribosomen-*display* Runden wurden die hier dargestellten *primer* 14 und 15 jeweils zusammen mit dem *reverse primer* L17rev_P verwendet.

									Prime	er F1A																													
	cat	ac	g a	aa	tta	ata	cga	ctc	act	ata	gGG	AGA	CCA	CAA	CGG	TTT	ccc																						
			-				-				-										Prin	ner F1																	
											GG	AGA	CCA	CAA	CGG	TTT	CCC	TCT	AGA	AAT	AAT	TTT	GTT	TAA	CTT	TAA	GAA	GGA	GAT	ATA	CAT	ATG							
1	cat	ac	g s	aa	tta	ata	cga	ctc	act	ata	ggg	aga	cca	caa	cgg	ttt	ccc	tct	aga	aat	aat	ttt	gtt	taa	ctt	taa	gaa	gga	gat	ata	cat	atg	ggc	agc	cat	atg	aaa	gtg (yat
	ł	1	t	k	1	1	r	1	t	i	g	r	р	q	r	f	p	s	r	n	n	f	v	-	1	-	e	g	d	1	h	m	g	3	h	m	k	v	d
	>>.															51	UTR.														>>								
																																>>.			M	7			>
115	ato	: nr	nk s	atc	nnk	att	cag	cgt	gat	ååc	cag	r gaa	atc	nnk	att	nnk	atc	cgc	gtg	agc	acc	ggt	aaa	gaa	ctg	gaa	cgt	åcå	ctg	cag	gaa	ctg	gaa	aaa	aca	ctg	gca	câc (jca
	1		?	1	?	i	q	r	d	g	q	(e	i	?	i	?	i	r	v	3	t	g	k	e	1	e	r	a	1	q	e	1	e	k	a	1	a	r	a
	>											****				• • • •			• • • •	M	7										• • • •								>
229	ggo	; go	g c	gt	aat	gtt	nng	att	nnĸ	atc	age	gcg	gaa	aat	gat	gaa	cag	gcg	aaa	gaa	ctg	ctg	gaa	ctg	att	gcg	cgt	ctg	ctg	cag	aaa	ctg	ggc	tat	aaa	gat	atc	nnĸ 🤉	ltg
	<u>و</u>	1	a	r	n		- 7	1	- 7	1	3	a	e	n	α	e	q	a	ĸ	e w	_ 1	1	e	1	1	a	r	1	1	q	ĸ	1	g	У	к	α	1	- 7	×.
	· · ·																			••••P	····										• • • •								
343	nnk	r at	t s	at	aac	acc	gaa	ata	nnk	atc	nnk	att	cac	at t	act.	agt	aca	aat.	age	aat.	aca	aat.	aca	aat.	tet	aat	aca	aat.	aca	aat.	agt	aat.	act	aat.	aca	tet	cca	aca (aca
			v	n	a	t	e	v	2	i	2	v	r	v	a		a	a	s	a	5-5 8	000 C	3-5 8	a	3	990 a	0-0 a	α 255-	a	a	3	a	t	α 255-	a	8	p	a	,- 5 a
	>							. 117.						>>										- ⁻															
															>>.									R	ibos	omen	-Ank	er-Se	eque	nz									>
457	ggt	co	a c	lcd	gca	ggc	ccg	gca	gca	ggt	ccg	get	gcđ	ggt	cca	gcg	gct	ggt	ccg	gct	gct	ggt	tct	atg	acc	gcg	acc	gcg	gat	gtt	ctg	gct	atg	gcg	gca	aca	gaa	cag a	aaa
	9	1	p	a	a	g	p	a	a	g	p	a	a	g	p	a	a	g	p	a	a	g	3	m	t	a	t	a	d	v	1	a	m	a	a	a	e	q	k
	>																	.Rib	osom	en-A	nker	-Sequ	uenz.																>
																		*			Prir	ner 28																	
5.04																		CA	cer	ccc	cer	cca	AGG	CGA	GGC														
571	ctç	f at	C 8	igc	gaa	gag	gat	ctg	ggt	ggt	ggt	ggt	tet	ggc	ggt	ggt	ggt	agt	gga	ggg	gga	ggc	tcc	gct	ccd														
	¹		1	3	e	e	α	- 1	g	g	Pib	g	s an-ài	g	g	g	g	3	g	g	g	g	3	a	p														
	>>>																																						

Abbildung 33: Sequenz der Bibliothek im Ribosomen-*display* Format, nachdem die 5'UTR Region und die 3'Region modifiziert wurden. Dieses Format wurde für die Ribosomen-*display* Runden zwei bis sechs gegen TNFα verwendet.

01.Runde	1 cgtccggcgtagaggatcgagatctcgatcccgcgaaattaatacgactcactatagggagaccacaacggtttccctctagaaataattttgtttaactttaagaaggagatatacc-atgggcagcca
26. Runde	1
01.Runde	130 tatgaaagtggatatcnnkatcnnkattcagegtgatggeeaggaaatennkattnnkateegegtgageaeeggtaagaaetggaaegtgegegeeggeaegge
26. Runde	102 tatgaaagtggatatennkatennkatteagegtgatggeeaggaaatennkattnnkateegegtgageaeeggtaagaaetggaaegtgegetgeeaggeeggee
01.Runde	260 gegegtaatgttinkattinkateagegeggaaaatgatgaacaggegaaagaactgetggaactgattgegegtetgetgeagaaactgggetataaagatatennkgtginkgttaatggeacegaag
26. Runde	232 gegegtaatgttinkattinkateagegeggaaaatgatgaacaggegaaagaactgetggaactgattgegegtetgetgeagaaactgggetataaagatatennkgtginkgttaatggeacegaag
01.Runde 26. Runde	390 tgnnkatennkgttegegtigetagtgeaggtagegggtgegggttetggtgegggteegggtgeaggtagtggtaetggtgeaetgegegeegggteeggeggeaggea
01.Runde 26. Runde	520 gggtccagcggctggtccggctgctggtcctggtctatgaccgcgacgcggatgttctggctatggcggcagcggaacagaaactgatagggatggtggtggtggtggtggtggtggtggtggt
01.Runde	650 ggtggtggcggtagcgcccg
26. Runde	622 ggagggggggggcgcccc

Abbildung 34: Sequenzvergleich zwischen dem ursprünglich verwendeten Bibliotheksformat (0.-1). Runde gegen TNF α und Selektion gegen A β (1-42) Fibrillen) und dem neuen Bibliotheksformat (2.-6. Runde gegen TNF α), bei dem die *codon usage* geändert wurde.

8.2 Massenspektrum



Abbildung 35: Massenspektrum (MALDI-TOF) des biotinylierten TNF α Proteins. Masse des TNF α ohne Biotin: 17.350,7 Da. Masse des einfach biotinylierten TNF α : 17.690,2 Da. Masse des zweifach biotinylierten TNF α : 18.029,7 Da. Diese Werte lassen sich gut mit den gemessenen Massen von 17.694,44 Da respektive 18.032,14 Da in Einklang bringen. Es konnten nur biotinylierte TNF α Spezies in der Probe nachgewiesen werden, wobei die einfach biotinylierte Spezies den Hauptteil ausmacht.

8.3 Supplementäre Informationen zu 4.G11

Der folgende Abschnitt beinhaltet die supplementären Informationen zum Thema 4.G11.

8.3.1 Selektionsbedingungen

Das Bindeprotein 4.G11 wurde unter den folgenden Bedingungen selektiert, sämtliche praktischen Arbeiten wurden hierbei von Dr. Sladjana Tomić durchgeführt.

Die Waschschritte fanden immer bei Raumtemperatur statt. Um unspezifisch bindende ternäre Komplexe zu entfernen, wurde auch bei dieser Selektion mit einer Prä-Selektion (siehe 3.4.4) gegen verschiedene *beads* gearbeitet.

Um sequenzspezifische Binder zu entfernen, fand in den Runden 3 und 4 eine kompetitive Selektion statt. Dazu wurde mit verschiedenen Konzentrationen von nicht biotinyliertem, disaggregierten A β (1-42) Peptid inkubiert. Die reifen Fibrillen waren biotinyliert und so konnten konformationsspezifische Binder selektiert werden. Im Verlauf dieser Selektion konnten bei dem Verhältnis zwischen der erhaltenen DNA aus der Selektion gegen reife A β (1-42) Fibrillen und der DNA, die aus der Selektion ohne Zielmolekül (SB-Puffer) erhalten wurde, durchweg positive Werte detektiert werden. Tabelle 28 gibt einen Überblick über die im Einzelnen verwendeten Selektionsbedingungen und ermittelten quantitativen DNA-Werte.

RD- Zyklus	[Aβ(1-42) Fibrillen]	Waschschritte	kompetitive Selektion	DNA vs. A β (1-42) Fibrillen	DNA vs. SB-Puffer	Verhältnis
1	500 nm	$3 \times 1 \min,$ $1 \times 5 \min$	-	5,9 × 10 ⁸	$1,2 \times 10^{8}$	4,92
2	50 nm	$3 \times 1 \min,$ $1 \times 5 \min$	-	1×10^{8}	$2,4 \times 10^{7}$	4,16
3	50 nm	$3 \times 1 \min,$ $1 \times 5 \min$	$500 \text{ nm} \\ A\beta(1-42) \text{ Peptid}$	$2,7 \times 10^{7}$	3,6 × 10 ⁶	7,5
4	50 nm	$3 \times 1 \min,$ $1 \times 5 \min$	5000 nm A $\beta(1-42)$ Peptid	6,2 × 10 ⁷	$9,2 \times 10^{6}$	6,74
5	50 nm	$3 \times 1 \min,$ $1 \times 5 \min$	-	6,5 × 10 ⁷	2×10^7	3,25

Tabelle 28: Übersicht über die Bedingungen und den Fortschritt der Ribosomen-*display* Runden, bei der Selektion gegen A β (1-42) Fibrillen. Die quantitativen Werte für die DNA wurden mittels der *Real-Time* PCR ermittelt.

8.3.2 IMAC Elutionsprofil von 4.G11



Abbildung 36: Chromatogramm der IMAC Reinigung von 4.G11. Der Elutionspeak wurde fraktioniert gesammelt und für eine Gelfiltration verwendet.

8.3.3 Kompetitionsexperiment mit Aβ(1-40) Fibrillen und 4.G11



Abbildung 37: Kompetitionsexperiment mit $A\beta(1-40)$ Fibrillen. Eine Vorinkubation von 4.G11 mit Fibrillen führt zu einer Kompetition (schwarze Linie). Als Kontrollen wurden 4.G11 und zentrifugiertes 4.G11 mitgeführt.

8.3.4 Bedingungen zur Herstellung von Fibrillen

Zur Analytik des Bindeproteins 4.G11 wurden verschiedene Fibrillen getestet. Unter den unten genannten Bedingungen wurden diese Fibrillen erzeugt. Abschließend fand eine Kontrolle der reifen Fibrillen durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen statt. Die praktischen Arbeiten wurden hierbei von Senthil Kumar durchgeführt.

$A\beta(1-40)$ Fibrillen

Um reife Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 5 mg/ml A β (1-40) in 50 mM HEPES Puffer (pH = 7,4) für mindestens 2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

$A\beta(1-42)$ Fibrillen

Um reife Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 1 mg/ml A β (1-42) in 50 mM Borate Puffer (pH = 9,0) für mindestens 1 Woche bei 37 °C inkubiert.

hSAA(1-12) all-L Fibrillen

Um reife Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 10 mg/ml hSAA(1-12) in 10% iger Essigsäure (pH = 2,0) für 1 Tag bei Raumtemperatur inkubiert.

mSAA Fibrillen

Um reife mSAA Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH = 8,2) für drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

$A\beta(16-22)$ Fibrillen

Um reife Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 0,5 mg/ml A β (16-22) in Wasser (pH = 7,4), versetzt mit 10 mM Natriumazid für 10 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Insulin Fibrillen

Um reife Fibrillen zu erhalten, wurde eine Probe bei einer finalen Konzentration von 1 mg/ml Insulin in Wasser (pH = 2,0) für 2 Tage bei 60 °C inkubiert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Rainer Rudolph für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Biochemie/Biotechnologie in Halle meine Dissertation anfertigen zu können. Seine Ideen und Diskussionen haben Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Nach dem Tod von Prof. Rudolph wurde die Betreuung meiner Arbeit von PD Dr. Hauke Lilie übernommen. Ihm danke ich besonders für Ratschläge und Diskussionen, die wesentlich zum Erfolg beigetragen haben.

Dr. Sven Pfeifer gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ohne seine Diskussionsbereitschaft und seinen Ideenreichtum, sowie die Möglichkeit auf erstklassig ausgestatte Labore zurückgreifen zu können, wäre diese Arbeit in ihrer jetzigen Form nicht zustande gekommen.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe "Künstliche Bindeproteine" für die schöne Zeit und das durchweg freundschaftliche Arbeitsklima bedanken. Dr. Sladjana Tomić danke ich für die Selektion der Variante 4.G11, Dr. Andreas Hoffmann für die intensive Unterstützung bei den "kleinen Dingen" des Laboralltages. Er hatte oft bei dem einen oder anderen Experiment die entscheidende Idee für den richtigen Kniff, so dass es am Ende gelingen konnte. Weiterhin danke ich ihm für die Bereitstellung großer Mengen an TNF α . Holger Herrmann danke ich für die Datenanalyse und das Programmieren hilfreicher Software. Hannes Grabner danke ich für die Unterstützung bei dem automatisierten *screening*, Patrick Studte und Dominik Schneider gleichfalls für die kollegiale Hilfe.

Mein besonderer Dank geht an Marcus Böhme. Er fertigte eine erstklassige Arbeit zum Thema M7 an und hat durch seine Diskussionen und Ideen dazu beigetragen, das *scaffold* Protein M7 besser zu verstehen.

Bei PD Dr. Marcus Fändrich möchte ich mich für die erfolgreiche Kooperation und hilfreiche Diskussionen bedanken. Die Nutzung von Ressourcen seiner Arbeitsgruppe machten den zweiten Teil dieser Arbeit, die Erzeugung eines Bindeproteins gegen A β (1-42) Fibrillen, erst möglich. Mein besonderer Dank geht an dieser Stelle an Senthil Kumar. Senthil führte etliche Laborarbeiten rund um die Fibrillen aus. Seine Präparationen ermöglichten erst die Selektionen. Er führte auch einen Großteil der Fibrillenanalytik durch.

Allen Korrekturlesern dieser Arbeit einen recht herzlichen Dank für ihre Mühen.

Meinen Freunden danke ich für Verständnis und moralische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, die mich in der ganzen Zeit bestmöglich und in jeder erdenklichen Weise unterstützt hat.

Ein besonderer Dank an meine Freundin Beate Hoffmann. Es hat sie Kraft und Geduld gekostet, mich durch diese nicht immer einfachen Zeiten zu begleiten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis aufgeführt. Ich habe mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder einer anderen Universität um die Erlangung eines akademischen Doktorgrades beworben.

Halle, den 18.12.12

Claudius Stordeur

Publikationen und Poster

Publikationen:

Stordeur, C., Dallüge, R., Birkenmeier, O., Wienk, H., Rudolph, R., Lange, C. and Lücke, C. (2008). "The NMR solution structure of the artificial protein M7 matches the computationally designed model." Proteins *72*, 1104–1107.

Poster:

<u>Claudius Stordeur</u>, Sladjana Tomić, Hannes Grabner, Senthil Kumar Thangaraj, Marcus Fändrich and Sven Pfeifer (2011). "In vitro selection against $A\beta(1-42)$ fibrils leads to a novel binding molecule"; Amyoid Fibrils, Prions and Precursors: Molecules for Targeted Intervention, Halle, Deutschland.

<u>Claudius Stordeur</u>, Sladjana Tomić, Hannes Grabner, Senthil Kumar Thangaraj, Marcus Fändrich and Sven Pfeifer (2011). "In vitro selection of an artificial binding protein against $A\beta(1-42)$ fibrils"; 22nd Faltertage, Regensburg, Deutschland.

<u>Claudius Stordeur</u>, Sven Pfeifer, Rainer Rudolph and Sladjana Tomić (2009). "Alternative non-antibody scaffold suitable for the *in vitro* selection towards $A\beta$ fibrils"; International Bunsen Discussion Meeting on Structure of Amyloid Fibrils and Mechanism of Amyloid Formation, Halle, Deutschland.

Claudius Stordeur, Roman Dallüge, Olaf Birkenmeier, Rainer Rudolph, Christian Lange and <u>Christian Lücke</u> (2008). "A simple tetrapeptide fragment-based protein design algorithm yields a highly accurate structure prediction"; International Congress of Magnetic Resonance in Biological Systems, San Diego, Kalifornien, USA.

Angaben zur Person

Familienname: Vorname: vorhandener akademischer Grad:	Stordeur Claudius Diplom-Biochemiker
Geburtsdatum: Geburtsort: Geschlecht:	21. August 1982 Halle (Saale) männlich
Wohnsitz und Korrespondenz- anschrift:	Hallesche Straße 50 06122 Halle (Saale)
Nationalität:	deutsch
Fachgebiet der Promotion:	Biochemie
Bildungsgang	
1989 – 1993	Grundschule "Friedrichs-Engels-Oberschule", Halle
1993 – 2002	Gymnasium "Im Bildungszentrum", Halle Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2,0)
2002 – 2007	Studium Biochemie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom (Note 1,8) Titel der Diplomarbeit: "NMR-Spektroskopische Un- tersuchungen an artifiziellen Proteinen"
2008 – heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe "Künstliche Bindeproteine" von Dr. Sven Pfeifer Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Anfertigung der Promotionsarbeit unter Prof. Dr. habil. Rainer Rudolph bzw. ab 12/2009 unter PD Dr. habil. Hauke Lilie