

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Strukturbiologische Untersuchungen von  
Anticalin/Ligand-Komplexen

Till Giese

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Langosch

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Skerra

2. Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Die Dissertation wurde am 26.08.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 25.11.2014 angenommen.



## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Arne Skerra für die interessante und herausfordernde Themenstellung, seine vielfältigen Hilfestellungen sowie sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie in Weihenstephan danke ich für die angenehme und sehr kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Der Firma Pieris AG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Großer Dank gebührt Dr. Gabriele Matschiner, Dr. Stefan Trentmann, Dr. Martin Hülsmeier und Dr. Andreas Hohlbaum für die Zurverfügungstellung von Daten und Materialien.

Zu großem Dank bin ich Dr. Uwe Müller am BESSY für die Hilfe bei der Datensammlung verpflichtet.

Ich danke Dr. André Schiefner (Lehrstuhl für Biologische Chemie), für seine große Hilfsbereitschaft bei kristallographischen Fragestellungen.

Ich danke Dr. Walter Stelzer (Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, Weihenstephan) für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ein riesiger Dank geht an meine gesamte Familie, die mich stets unterstützt hat, und ohne die ich es nicht geschafft hätte.

*Meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Alternative Bindeproteine – Anticaline.....	1
1.2 VEGF als therapeutisches Zielmolekül.....	3
1.2.1 Funktion von VEGF .....	3
1.2.2 Avastin: ein therapeutischer Antikörper gegen VEGF .....	4
1.2.3 Angiocal <sup>®</sup> : eine bessere Alternative zu Avastin .....	5
1.3 Der IL4-Rezeptor als therapeutisches Zielmolekül.....	6
1.3.1 Biologische Funktion von IL4 und seinem Rezeptor .....	6
1.3.2 Therapie von Allergien durch Inhibition des IL4-Rezeptors $\alpha$ .....	7
1.3.3 Struktur des IL4-Rezeptors $\alpha$ .....	8
1.3.4 Ac2: ein Anticalin gegen den IL4-Rezeptor .....	9
1.4 Hepcidin als therapeutisches Zielmolekül.....	9
1.4.1 Funktion von Hepcidin .....	9
1.4.2 Struktur von Hepcidin.....	11
1.4.3 Ac3: ein Anticalin gegen Hepcidin.....	11
1.5 Zielsetzung.....	12
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Materialien .....	13
2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide.....	13
2.1.2 Übersicht: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide.....	13
2.1.3 Oligodesoxynukleotide .....	15
2.1.4 Enzyme und sonstige Proteine.....	16
2.1.5 Chemikalien.....	17
2.1.6 Standards, Kristallisations-Screens und Kits .....	20
2.1.7 Geräte.....	21
2.1.8 Sonstiges Material .....	25

---

2.1.9	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen .....	26
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen .....	30
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	30
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	31
2.2.3.1	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA .....	31
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA .....	32
2.2.4.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.4.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA- Fragmenten .....	32
2.2.5	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA .....	33
2.2.5.1	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	33
2.2.5.2	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	34
2.2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA .....	34
2.2.5.4	Ligierung von DNA-Fragmenten .....	35
2.2.5.5	Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	36
2.3	Gentechnische Methoden .....	36
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	36
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben .....	36
2.3.1.2	Periplasmatische Produktion von Proteinen im Schüttelkolben .....	37
2.3.1.3	Cytoplasmatische Produktion von Proteinen als Einschlusskörper .....	38
2.3.2	Proteinproduktion mit Selenomethionin-Substitution .....	38
2.4	Proteinchemische Methoden .....	39
2.4.1	Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern .....	39
2.4.1.1	Rückfaltung von VEGF(8-109) .....	39
2.4.1.2	Rückfaltung des IL4-Bindeproteins .....	39
2.4.2	Chromatographische Verfahren .....	41
2.4.2.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose .....	41
2.4.2.2	Metallchelate-Affinitätschromatographie .....	41
2.4.2.3	Größenausschlusschromatographie .....	42
2.4.2.4	Ionenaustauschchromatographie .....	43

2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
2.4.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	45
2.4.5	Konzentrierung von Proteinen .....	46
2.4.5.1	Konzentrierung durch Ultrafiltration in der Zentrifuge .....	46
2.4.5.2	Konzentrierung durch Ultrafiltration mit Druckluft .....	47
2.4.5.3	Konzentrierung durch Querstrom-Ultrafiltration.....	47
2.4.6	<i>Western Blotting</i> .....	47
2.5	Biophysikalische Methoden.....	48
2.5.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS).....	48
2.5.2	Massenspektrometrie .....	49
2.6	Proteinkristallographische Methoden.....	50
2.6.1	Kristallisation von Proteinen .....	50
2.6.1.1	Suche nach Kristallisationsbedingungen .....	50
2.6.1.2	Optimierung von Kristallisationsbedingungen .....	51
2.6.2	Kryokristallographie .....	51
2.6.3	Sammlung von Röntgenbeugungsdatensätzen.....	52
2.6.4	Datenauswertung .....	53
2.6.5	Phasenbestimmung .....	53
2.6.5.1	Phasierung mittels Molekularem Ersatz .....	53
2.6.5.2	Phasierung mittels Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel <i>Single-Wavelength Anomalous Diffraction</i> (MRSAD).....	54
2.6.5.3	Phasierung mittels UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP) .....	55
2.6.6	Modellbau und Verfeinerung.....	55
2.6.7	Strukturanalyse und graphische Darstellung .....	56
2.7	Computerprogramme und Datenbanken .....	56
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
3.1	Strukturanalyse des Ac1/VEGF-Komplexes.....	58
3.1.1	Bakterielle Produktion, Rückfaltung und Reinigung des humanen VEGF .....	58
3.1.1.1	VEGF(8-109).....	58

3.1.1.2	VEGF(8-109)strepII .....	59
3.1.2	Klonierung, Expression und Reinigung von Ac1-Versionen sowie Komplexbildung mit VEGF .....	60
3.1.2.1	Klonierung und Expression der verschiedenen Ac1-Versionen .....	60
3.1.2.2	Reinigung der verschiedenen Ac1-Versionen .....	62
3.1.2.3	Komplexbildung mit VEGF und Reinigung des Komplexes .....	64
3.1.3	Kristallisation der Ac1-Versionen in Komplex mit VEGF(8-109) .....	67
3.1.4	Sammlung von Röntgen-Beugungsdatensätzen am Synchrotron .....	70
3.1.5	Versuche zur Phasenbestimmung .....	73
3.1.5.1	Versuche zur Phasenbestimmung durch Molekularen Ersatz .....	73
3.1.5.2	Versuche zur Phasenbestimmung durch <i>Multiple Wavelength Anomalous Dispersion</i> .....	74
3.1.6	Phasenbestimmung .....	76
3.1.6.1	Phasenbestimmung mit Kombination aus Molekularem Ersatz und <i>Single Wavelength Anomalous Diffraction</i> (MRSAD) .....	76
3.1.6.2	Phasenbestimmung mit UV-RIP .....	79
3.1.7	Modellbau .....	79
3.1.8	Die Kristallstruktur des Ac1/VEGF-Komplexes .....	82
3.1.8.1	Gesamtstruktur .....	82
3.1.8.2	Struktur von VEGF(8-109) .....	82
3.1.8.3	Struktur von Ac1 .....	82
3.1.8.4	Strukturelle Analyse der Bindung .....	85
3.2	Bakterielle Produktion und Analyse des IL4-Bindungsproteins .....	88
3.2.1	Versuche zur löslichen Produktion des IL4-Bindungsproteins .....	88
3.2.1.1	Versuch der Produktion als Fusionsprotein mit <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> (SUMO) .....	89
3.2.1.2	Versuch der Co-Produktion des IL4-Bindungsproteins mit Ac2 .....	90
3.2.2	Produktion des IL4-Bindungsproteins als Einschlusskörper und Rückfaltung .....	94
3.2.2.1	Produktion, Isolierung und Reinigung von Einschlusskörpern .....	94
3.2.2.2	Rückfaltung, Komplexbildung und Reinigung des Komplexes .....	96
3.2.2.3	Versuche zur Kristallisation des Ac2/IL4BP-Komplexes .....	101
3.2.2.4	Klonierung weiterer IL4-BP-Versionen .....	102

3.3	Strukturanalyse des Ac3/Hepcidin-Komplexes .....	104
3.3.1	Kristallisation des Ac3/Hepcidin-Komplexes.....	104
3.3.2	Sammlung von Röntgen-Beugungsdaten am Synchrotron .....	106
3.3.3	Phasenbestimmung durch Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel-Single-Wavelength Anomalous Diffraction (MRSAD) .....	107
3.3.4	Modellbau .....	109
3.3.5	Die Kristallstruktur des Ac3/Hepcidin-Komplexes .....	111
3.3.5.1	Gesamtstruktur .....	111
3.3.5.2	Struktur des Hepcidins.....	111
3.3.5.3	Struktur des Ac3 .....	111
3.3.5.4	Analyse der Bindung von Hepcidin durch Ac3 .....	112
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>116</b>
4.1	Einfluss des Affinitätsanhängsels auf die Kristallisation von Anticalin-Ligandkomplexen .....	116
4.2	Strukturelle Besonderheiten des Ac1 .....	118
4.3	Vergleich der Epitope von verschiedenen VEGF(8-109)-Bindepoteinen .....	121
4.4	Potenzial von Ac1 als Wirkstoff .....	125
4.5	Faktoren für die Rückfaltung des IL4-Bindepoteins .....	126
4.6	Vergleich der Anticaline Ac3 und PRS-010 mit wtLcn1 .....	127
4.7	Vergleich von Ac3 mit dem hepcidinbindenden Fab-Fragment .....	129
4.8	Potenzial von Ac3 als Wirkstoff .....	130
4.9	Betrachtung der Ergebnisse mit Blick auf das Design von Bibliotheken zur Selektion von Anticalinen .....	131
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>137</b>



# 1. Einleitung

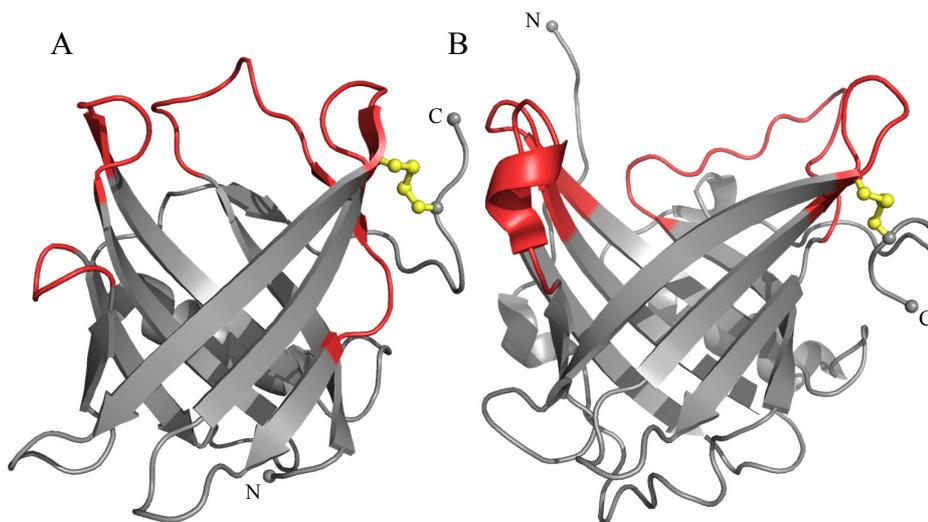
## 1.1 Alternative Bindeproteine – Anticaline

Innerhalb der letzten 15 Jahre haben sich Antikörper als therapeutische Proteine etabliert und bilden mittlerweile einen erheblichen Anteil der neu zugelassenen Medikamente (Overington *et al.*, 2006). Insgesamt gibt es bereits über 20 klinisch angewandte therapeutische Antikörper in Europa und den USA und sie bilden einen beträchtlichen Markt (Dimitrov & Marks, 2009; Ducancel & Muller, 2012; Reichert, 2012; Reichert & Valge-Archer, 2007; Scolnik, 2009). Der Erfolg der Antikörper ist zum einen durch die relativ leichte Generierung gegen verschiedene medizinisch relevante Zielmoleküle, sowohl durch Immunisierung von Tieren als auch durch *in vitro* Selektion von Genbibliotheken (Lonberg, 2008), zu erklären. Zum anderen spielt die große Spezifität der Antikörper für ihre Zielmoleküle eine Rolle.

Zunehmend wird man sich aber auch der Nachteile bewusst. Diese bestehen in der Größe und der komplizierten Zusammensetzung aufgrund derer die Antikörper nur in eukaryotischen Expressionssystemen produziert werden können. Deshalb wurden kleinere Fragmente von Antikörpern wie Fab und einzelkettige Fv (scFv) für den therapeutischen Einsatz in Betracht gezogen; diese zeigen aber ihrerseits Nachteile hinsichtlich Ausbeute bei der gentechnischen Herstellung oder Oligomerisierungstendenz (Skerra, 1993). Außerdem wurde an alternativen Proteinstrukturen geforscht, die sich dazu eignen, als Gerüst für eine neue Bindungsstelle gegen ein medizinisch relevantes Zielmolekül zu dienen. Als Gerüstproteine erscheinen kleine, monomere und gut lösliche Proteine, wie Kunitzinhhibitoren, Lipocaline oder extrazelluläre Domänen von Zelloberflächenrezeptoren, wie Protein A, Fibronectin oder Ankyrin-Repeat-Proteine, attraktiv. Diese Proteingerüste sind stabiler als Antikörper und lassen sich leichter in Mikroorganismen produzieren. Außerdem ist die patentrechtliche Situation besser überschaubar (Hey *et al.*, 2005).

Insgesamt wurde in den letzten 10-15 Jahren an mehr als 50 unterschiedlichen Proteingerüsten gearbeitet, von denen sich aber die wenigsten etabliert haben. Zu den erfolgreicherer Proteingerüsten gehören die Affibodies, die auf der Z-Domäne des Protein A aus *Staphylococcus aureus* beruhen. Bisher wurden unter anderem Affibodies gegen die *Taq* DNA Polymerase (Nord *et al.*, 1997), humanes Apolipoprotein A-1 (Nord *et al.*, 2000), das Alzheimer Amyloid- $\beta$ -Peptid (Hoyer *et al.*, 2008) und den Tumormarker Her2 (Orlova *et al.*, 2006) entwickelt. Weiterhin gehören Monobodies, die auf der zehnten extrazellulären Domäne des humanen Fibronectin III basieren und auch Adnectine genannt werden, zu den

erfolgreicheren Proteingerüsten. Bisher werden beispielsweise Monobodies gegen den VEGF-Rezeptor 2 (Dineen *et al.*, 2008), die SH2 Domäne der Abl-Kinase (Wojcik *et al.*, 2010) und humanes SUMO1 (Gilbreth *et al.*, 2011) generiert. Auch die sogenannten „Designed Ankyrin Repeat Proteine“ (DARPin) haben sich mittlerweile etabliert. Zum Beispiel gibt es DARPins gegen das Epithelzell-Adhäsionsmolekül (EpCAM) (Winkler *et al.*, 2009), gegen den Neurotensinrezeptor I (NTR1) (Milovnik *et al.*, 2009) und gegen CD4 (Schweizer *et al.*, 2008).



**Abbildung 1: Struktur des Wildtyp Lcn1 (A) (3EYC) und Lcn2 (B) (1L6M).** Die Struktur ist als *Cartoon* dargestellt. Die Disulfidbrücken sind als *sticks* und *spheres* in gelb dargestellt. Die vier *Loops* am Eingang zur Bindungstasche sind rot gefärbt.

Schließlich zählen die Anticaline zu vielversprechenden alternativen Proteingerüsten (Skerra, 2000). Sie basieren auf den Lipocalinen (Flower, 1996b; Grzyb *et al.*, 2006), die in vielen Organismen vorkommen und dort kleine, meist hydrophobe Liganden wie Steroide, Lipide, Vitamine oder Sekundärmetabolite binden und transportieren. Die Komplexbildung erfolgt in einer kelchartigen Bindungstasche, die namensgebend für die Proteinfamilie ist (lateinisch: *calix*; griechisch: *kalyx* = Kelch). Die Bindungstasche wird von acht antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen gebildet, die in einer fassartigen Struktur ( $\beta$ -*Barrel*) angeordnet sind, genauer, ein Sandwich aus zweimal vier  $\beta$ -Faltblattsträngen bilden. Vier Peptidschleifen verschließen die fassartige Struktur an einem Ende, während am anderen vier Peptidschleifen den Eingang zur Bindungstasche bilden und für die Ligandenspezifität verantwortlich sind.

Um Anticaline, also künstliche Lipocalinproteine mit neuen Bindungseigenschaften, zu gewinnen, werden Positionen in diesen vier Peptidschleifen mutiert. Die ersten Anticaline wurden entwickelt, um kleine Liganden, wie Digoxigenin (Schlehuber *et al.*, 2000) und Fluoreszin (Götz *et al.*, 2002) zu binden, die den natürlichen Liganden der Lipocaline relativ ähnlich sind. Inzwischen gibt es eine wachsende Anzahl an unterschiedlichen Anticalinen, die auch gegen Proteine, wie CTLA-4 (Schönfeld *et al.*, 2009) oder EDB (Gebauer *et al.*, 2013), gerichtet sind. Während die Anticaline der ersten Generation noch auf Lipocalinen aus Insekten basierten, stammen die neueren Anticaline von dem humanen Lipocalin 1 (Lcn1 oder auch Tränenlipocalin) und Lipocalin 2 (Lcn2 oder auch Neutrophil Gelatinase-assoziiertes Lipocalin) ab.

## 1.2 VEGF als therapeutisches Zielmolekül

### 1.2.1 Funktion von VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist der wichtigste Regulator der Vaskulogenese und der Angiogenese (Mustonen & Alitalo, 1995; Shibuya, 1995). Bei der Vasculogenese wird das Blutgefäßsystem in der Embryonalentwicklung gebildet; im erwachsenen Organismus dagegen spielt die Angiogenese eine wichtigere Rolle.

Es existieren mehrere Formen von VEGF, die durch unterschiedliches Splicing eines einzigen Gens entstehen (Shibuya, 2001). Die kürzeste funktionale Variante ist VEGF<sub>121</sub>, der die Reste, die durch die Exons 6 und 7 kodiert werden, fehlen. VEGF<sub>165</sub> ist die vorherrschende Form; dieser Variante fehlen nur die Reste, die durch Exon 6 kodiert werden. VEGF<sub>186</sub> hat eine Insertion von 24 Aminosäuren, und VEGF<sub>206</sub> besitzt eine zusätzliche Insertion von 17 Aminosäuren. VEGF<sub>121</sub> enthält 8 konservierte Cysteinreste, von denen 6 drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden, während die anderen beiden zwei intermolekulare Disulfidbrücken bilden, so dass ein Homodimer entsteht (Wiesmann *et al.*, 1997).

Die Expression von VEGF wird durch unterschiedliche Stimuli reguliert. Zu diesen gehören Wachstumsfaktoren, Östrogen, Stickstoffmonoxid, Tumorpromotoren und Mutationen in p53. Der aus medizinischer Sicht interessanteste Stimulus ist zudem die Hypoxie. Wenn Gewebe unter Sauerstoffmangel leiden, werden die Transkriptionsfaktoren HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  stabilisiert und in den Nukleus verlagert. Dort interagieren sie mit HIF $\beta$  und aktivieren auf diese Weise über ein spezifisches DNA Sequenz-Motiv, das Hypoxie-Rückmeldungselement, das VEGF-Gen (Shibuya, 2001).

Das sekretierte VEGF bindet an zwei unterschiedliche Rezeptoren, Flt-1 (VEGF-Rezeptor 1) und KDR (VEGF-Rezeptor 2) (Shibuya *et al.*, 1999). Bei beiden handelt es sich um Tyrosinkinaserzeptoren, die 7 Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen aufweisen. Die Bindung eines dimeren VEGF-Moleküls führt zur Dimerisierung des Rezeptors, woraufhin die Tyrosinkinasefunktion aktiviert wird. Dies führt zur Autophosphorylierung des Rezeptors, so dass Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) binden und durch Phosphorylierung aktiviert werden kann. Die aktivierte PLC $\gamma$  stimuliert ihrerseits die Aktivierung von PKC, welche über Raf-1 die MAP-Kinasekaskade aktiviert. Dies führt letztendlich zu einer erhöhten Zellproliferation (Takahashi & Shibuya, 1997; Takahashi *et al.*, 1999). Das VEGF bindet an den Rezeptor über die zweite und dritte Domäne. Die Domänen 4 bis 7 sind hingegen für die Dimerisierung des Rezeptors nach der Bindung von VEGF verantwortlich (Keyt *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1997).

VEGF<sub>165</sub> überträgt Signale effektiver als VEGF<sub>121</sub>, da es mittels einer basischen Aminosäuresequenz, die durch Exon 7 kodiert wird, mit dem Zelloberflächenmolekül Neuropilin-1 interagiert, wodurch die Affinität zu KDR um den Faktor 10 gesteigert wird. Flt-1 bindet VEGF<sub>121</sub> mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 1-10 pM, während KDR eine Dissoziationskonstante von etwa 200 pM zeigt. Trotz schwächerer Affinität besitzt KDR eine stärkere Tyrosinkinaseaktivität und ist somit der Hauptsignalgeber für das Wachstum der Endothelzellen.

Zur VEGF-Familie gehören weitere Proteine, die strukturell mit VEGF verwandt sind: PlGF (placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. PlGF und VEGF-B binden und aktivieren ausschließlich den Rezeptor Flt-1 (Shibuya, 2001). Dahingegen binden VEGF-C und VEGF-D die Rezeptoren Flt-4 (VEGF-Rezeptor 3) und KDR (VEGF-Rezeptor 2). Bei diesen Wachstumsfaktoren handelt es sich um wichtige Regulatoren der Lymphangiogenese (Jeltsch *et al.*, 1997; Joukov *et al.*, 1997; Joukov *et al.*, 1996). VEGF-E bindet ausschließlich an den Rezeptor KDR (VEGF-Rezeptor 2) (Ogawa *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Avastin: ein therapeutischer Antikörper gegen VEGF

Tumore, die größer als 1 mm<sup>3</sup> werden, sekretieren VEGF, um die Bildung von Blutgefäßen zu stimulieren und somit ihren erhöhten Bedarf an Sauerstoff zu decken. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der von Genentech und Hoffmann-La Roche unter dem Namen Avastin vertrieben wird. Er bindet VEGF in antagonistischer Weise und verhindert somit die Bindung und Aktivierung des Rezeptors, wodurch die Bildung von neuen

Blutgefäßen gebremst bzw. gestört wird (Ferrara *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 1993; Presta *et al.*, 1997). Dies führt zu einem stark verlangsamten Wachstum des Tumors. Avastin ist eines der erfolgreichsten Krebsmedikamente mit einem weltweiten Umsatz von 6,66 Milliarden US Dollar in 2011 (Business Report Roche, 2011).

Ranibizumab ist ein Fab-Fragment von Bevacizumab mit 6 affinitätssteigernden Mutationen, von denen 4 in der Interaktionsfläche mit VEGF liegen. Im Gegensatz zu Bevacizumab wird Ranibizumab gentechnisch in *E. coli* produziert und ist somit auch nicht glykosyliert. Es wird von Genentech Novartis unter dem Namen Lucentis<sup>®</sup> vertrieben und für die Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration eingesetzt (Chen *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2012). Bei dieser Krankheit kommt es zu einem irregulären Wachstum von Gefäßen unter der Netzhaut, was letztendlich zur Erblindung führt. Die Injektion von Lucentis in den Glaskörper des Auges führt zu einem Wachstumsstopp der irregulär wachsenden Gefäße und teilweise sogar zu deren Zurückbildung.

Aufgrund der geringeren Größe soll Ranibizumab besser für die Behandlung der feuchten Form der altersabhängigen Makuladegeneration geeignet sein als Bevacizumab, da es besser vom Glaskörper des Auges zum eigentlichen Wirkungsort gelangt. Allerdings ist Ranibizumab um den Faktor 45 teurer als Bevacizumab, weshalb Bevacizumab häufig von Augenärzten eingesetzt wird, obwohl es nicht für dieses Anwendungsgebiet zugelassen ist. In einer ersten direkten Vergleichsstudie gab es keine Hinweise auf eine Überlegenheit von Ranibizumab gegenüber Bevacizumab (Subramanian *et al.*, 2010). Bisher zeigt jedoch Hoffmann-La Roche keine Bemühungen, Avastin für die Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration zuzulassen.

### 1.2.3 Angiocal<sup>®</sup>: eine bessere Alternative zu Avastin

Ac1 ist ein Anticalin, das auf dem humanen Tränenlipocalin (Lipocalin 1, Lcn1) basiert. Dieses Lipocalin ist das Hauptprotein der Tränenflüssigkeit und hat dort eine antimikrobielle Funktion, indem es Siderophore, die Mikroorganismen verwenden, um Eisen aufzunehmen, bindet (Dartt, 2011; Glasgow *et al.*, 2002).

Zur Entwicklung von Ac1 wurde bei der Pieris AG, Freising eine Lcn1-Bibliothek mit 18 variablen Positionen verwendet, in der die Cystein-Reste 61 und 153, die eine Disulfidbrücke bilden, durch Serin ersetzt worden waren. Die mittels *Phage Display* selektierte Variante hatte eine Affinität von 500 nM zu VEGF. Durch *Error Prone PCR* wurden zusätzlich 4

Aminosäuren ausgetauscht, was zu einer drastisch gesteigerten Affinität von 300 pM führte. Im letzten Schritt der Affinitätsmaturierung wurden 5 Mutationen durch semirationales Protein-Engineering eingeführt, was letztendlich zu Ac1 führte. Es hat eine Dissoziationskonstante von etwa 120 pM bezüglich VEGF. Dieser Wert liegt zwischen der Dissoziationskonstanten von Bevacizumab (~500 pM) und der von Ranibizumab (~5 pM). In einem Mausmodell hat sich gezeigt, dass Ac1 effizienter Tumorwachstum inhibiert als Bevacizumab. Da Ac1 mit 158 Aminosäuren deutlich kleiner ist als Bevacizumab und auch als Ranibizumab, ist zu erwarten, dass es eine noch bessere Gewebepenetration zeigt. Die Tatsache, dass Ac1 nur aus einer Aminosäurekette besteht, erleichtert zudem die gentechnische Herstellung in *E. coli*. Ein Anticalin, das zwecks verlängerter Plasmahalbwertszeit mit Polyethylenglycol modifiziert wurde, hat unter dem Markennamen Angiocal die erste Phase der klinischen Prüfung zur Behandlung solider Tumore erfolgreich abgeschlossen (Mross *et al.*, 2013). Somit hat es das Potenzial, die dominierenden Produkte Avastin und Lucentis zu ersetzen.

## 1.3 Der IL4-Rezeptor als therapeutisches Zielmolekül

### 1.3.1 Biologische Funktion von IL4 und seinem Rezeptor

Wird ein Organismus von einem Parasiten befallen, werden Antigene von antigenpräsentierenden Zellen absorbiert, prozessiert und als MHC-II-Komplexen den T-Helferzellen präsentiert. Im Verlauf dieser Aktivierung werden die T-Helferzellen zudem von Interleukin 4 (IL4) stimuliert, wodurch sie zu T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren. Von diesen Zellen werden ihrerseits IL4, IL5 und IL13 sekretiert. IL4 und IL13 stimulieren im Weiteren bereits aktivierte B-Zellen, und bewirken somit einen Antikörperklassenwechsel von IgG und IgM zu IgE. IgM ist eine pentamere Antikörperklasse, die bei Erstkontakt mit Antigenen gebildet wird und noch relativ unspezifisch ist. Die nach dem Klassenwechsel produzierten IgE sind spezifischer und werden konkret zur Abwehr von Parasiten gebildet (Nakanishi, 2010).

Gleichzeitig zum Antikörperklassenwechsel verursacht IL5 eine Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten. Diese Zellen tragen an der Oberfläche viele F<sub>c</sub>ε-Rezeptoren, die IgE-Moleküle binden. Die IgE-Antikörper bilden somit eine funktionelle Brücke zwischen den Pathogenen und dem zellulären Immunsystem (Burton & Oettgen, 2011; Romagnani, 1990).

Daneben sind IgE-Antikörper aber auch an allen Formen von Allergie beteiligt. Durch eine erhöhte Konzentration an IL4 im Blut wird bei einer Exposition mit einem nichtparasitären Allergen eine Immunantwort ausgelöst, bei der IgE-Antikörper produziert werden. Diese binden mit hoher Affinität an  $F_{c\varepsilon}$ -Rezeptoren an der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Wird der Organismus dem Allergen erneut ausgesetzt, werden die membrangebundenen IgE-Antikörper auf den sensibilisierten Immunzellen quervernetzt, was zur Degranulation führt. Die pharmakologisch aktiven Mediatoren, die von diesen Zellen freigesetzt werden, wirken auf das umgebende Gewebe ein, was zu den allergischen Symptomen führt. Die Neigung zur Ausbildung von Allergien aufgrund einer krankhaft erhöhten Bereitschaft zur Bildung von IgE-Antikörpern wird auch Atopie genannt und ist erblich (Bachert & Zhang, 2012; Oettgen & Geha, 1999).

### 1.3.2 Therapie von Allergien durch Inhibition des IL4-Rezeptors $\alpha$

Sowohl IL4 als auch IL13 binden an den IL4-Rezeptor  $\alpha$  (IL4-R $\alpha$ ) (Cohn *et al.*, 1999). Im Fall von IL4 wird abhängig vom Zelltyp eine zweite Rezeptorkette rekrutiert, um das Signal weiterzuleiten, entweder  $\gamma_c$  (Kondo *et al.*, 1993; Russell *et al.*, 1993) oder IL-13R $\alpha$ 1 (Aman *et al.*, 1996; Hilton *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu bindet IL13 erst an IL-13R $\alpha$ 1. Der entstehende Komplex rekrutiert dann für die Signalweiterleitung IL4-R $\alpha$ . IL4 und IL13 nutzen letztlich den gleichen heterodimeren Rezeptorkomplex IL4-R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1 (Chomarat & Banchereau, 1998; Duschl & Sebald, 1996).

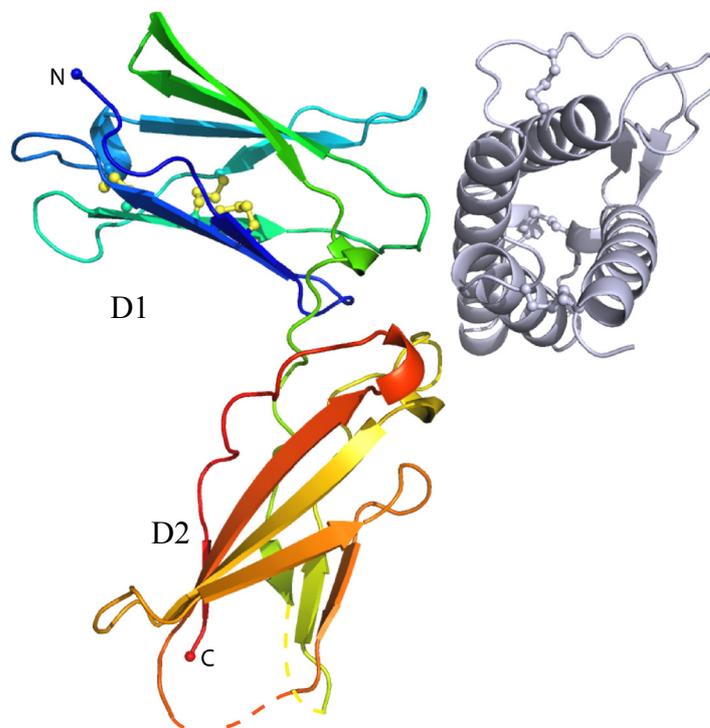
Die meisten allergischen Reaktionen werden sowohl von IL4 als auch von IL13 gesteuert. Allerdings ist IL13 nicht in der Lage, die Differenzierung der T<sub>H</sub>2-Zellen zu induzieren und somit die erste Phase einer Allergie einzuleiten (Chomarat & Banchereau, 1998). Dafür ist IL13 wahrscheinlich stärker in den späteren Phasen von Allergien involviert, da es länger und in größeren Mengen produziert wird als IL4 (Grunig *et al.*, 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998).

Die Bedeutung von IL4 bei der Ausbildung von Allergien wird dadurch hervorgehoben, dass transgene Mäuse ohne ein funktionales Gen für IL4 nicht in der Lage sind, Allergien zu entwickeln (Grunewald *et al.*, 1998). Appliziert man IL4 in die Lungen von Asthmapatienten, so wird dadurch eine heftige asthmatische Attacke ausgelöst (Shi *et al.*, 1998). Gleiches konnte mit IL13 bei Mäusen gezeigt werden (Grunig *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). Somit stellt die Inhibition des IL4/IL13-Systems eine attraktive Möglichkeit zur Behandlung von Allergien und Asthma dar. Dabei sind IL4 und IL13 selbst weniger ideale Zielmoleküle, da

man mit einem entsprechenden Inhibitor nur eines der beiden Cytokine neutralisieren würde. Auf Seite des Rezeptors kommt die Induktion von  $\gamma_c$  nicht in Frage, da diese Rezeptorkette noch von IL2, IL7, IL9 und IL15 verwendet wird. Auf der anderen Seite würde eine Inhibition von IL-13R $\alpha$ 1 nicht zur Inhibition des kompletten Systems führen, da IL4 noch immer an den IL4-R $\alpha$ / $\gamma_c$ -Komplex binden könnte. Da jedoch sowohl IL4 als auch IL13 IL4-R $\alpha$  für die Signalweiterleitung benötigen, stellt es das ideale Zielmolekül für die Entwicklung eines Inhibitors dar, zumal transgene Mäuse ohne ein funktionales Gen für IL4-R $\alpha$  normale Immunantworten aufweisen und keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Viren oder Bakterien zeigen (Barner *et al.*, 1998; Noben-Trauth *et al.*, 1997).

### 1.3.3 Struktur des IL4-Rezeptors $\alpha$

IL4-R $\alpha$  besteht aus einer extrazellulären Domäne und einer Transmembrandomäne. IL4 bindet an die extrazelluläre Domäne, die auch separat exprimiert werden kann oder durch Proteolyse entsteht und in diesem Fall IL4-Bindungsprotein (IL4-BP) genannt wird. Die Struktur vom IL4 in Komplex mit IL4-BP wurde mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt (Hage *et al.*, 1999).



**Abbildung 2: Das IL4-Bindungsprotein.** Struktur des IL4 Bindungsproteins (bunt) in Komplex mit IL4 (grau) (PDB-ID 1IAR). Das IL4-Bindungsprotein ist vom C-Terminus (rot) bis zum N-Terminus (blau) durchgehend gefärbt. Im Bereich des C-Terminus gibt es 2 Schleifen, die nicht definiert sind, da sie flexibel sind (gestrichelt). Disulfidbrücken sind mit ball und sticks dargestellt.

IL4-BP weist eine L-förmige Struktur auf, die aus den Domänen D1 (Aminosäuren 1-91) und D2 (Aminosäuren 97-197) besteht. Diese Domänen werden durch ein kurzes  $\alpha$ -helicales Segment verbunden, gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und ähneln in ihrer Faltung dem Fibronectin-Modul Typ III (Bork *et al.*, 1994; Leahy *et al.*, 1992). D1 enthält sechs Cysteinreste, die drei Disulfidbrücken bilden, während D2 keine Disulfidbrücken enthält. Die Bindungsstelle für IL4 befindet sich an der Grenzfläche der beiden Domänen.

### 1.3.4 Ac2: ein Anticalin gegen den IL4-Rezeptor

Für die Selektion des Anticalins wurde die gleiche kombinatorische Zufallsbibliothek verwendet, die auch schon zur Selektion von Ac1 diente. Unter Verwendung der *Phage Display*-Methode wurde mit Hilfe eines löslichen Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des humanen IL4-Rezeptors  $\alpha$  mit dem Fc-Teil eines menschlichen Antikörpers ein Anticalin selektiert. Die initiale Anticalinvariante wurde durch Zufallsmutagenese (*Error Prone PCR*) und nachfolgende Selektion unter stringenteren Bedingungen optimiert. Das auf diese Weise entstandene Ac2 hat einen  $K_D$  von 14 pM.

## 1.4 Hepcidin als therapeutisches Zielmolekül

### 1.4.1 Funktion von Hepcidin

Hepcidin ist ein Peptidhormon aus 25 Aminosäuren, dem eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Eisenmetabolismus zukommt (Fleming, 2008). Eisen, das im menschlichen Körper in erster Linie für die Bildung neuer roter Blutkörper benötigt wird (Andrews, 1999), gelangt in das Plasma durch Absorption im Darm oder durch Recycling alter roter Blutkörper in Makrophagen. Makrophagen in Leber, Milz und Knochenmark dienen auch als Speicher für Eisen. In gespeicherter Form liegt es als  $Fe^{3+}$  gebunden an Ferritin vor, wobei die Oxidation von diesem Protein selbst katalysiert wird. Für den zellulären Eisenexport ist das Membranprotein Ferroportin verantwortlich. Es befindet sich in der basolateralen Membran von Epithelzellen und befördert  $Fe^{2+}$  aus den intestinalen Enterocyten und den Makrophagen in das Plasma. Nach dem Transport und Oxidation zu  $Fe^{3+}$  durch das Plasmaprotein Caeruloplasmin oder das Membranprotein Hephästin erfolgt die Bindung an Transferrin, das zwei Bindungsstellen für dieses Ion hat. Bindet Hepcidin an Ferroportin, so wird dieses phosphoryliert, ubiquitinyliert und degradiert. Hepcidin reduziert somit die verfügbare Eisenkonzentration im Blut. Die Hepcidinkonzentration seinerseits wird durch den

Transferrinrezeptor 2 reguliert. Ist wenig Eisen vorhanden, so wird Apotransferrin von diesem Rezeptor gebunden, der daraufhin Furin aktiviert. Furin schneidet Hemojuvelin von der Membran, so dass lösliches Hemojuvelin freigesetzt wird. Bindet dieses zusammen mit dem *bone morphogenetic protein* (BMP) an den *bone morphogenetic* Proteinrezeptor 1, so wird dieser Rezeptor blockiert. Bindet dieser Rezeptor hingegen BMP zusammen mit dem membrangebundenem Hemojuvelin, so phosphoryliert die BMP-Rezeptorkinase den Transkriptionsfaktor SMAD1, der daraufhin SMAD4 bindet. Dieser Komplex aktiviert schließlich die Expression von Heparin. Im Fall von hoher Eisenkonzentration im Blut bindet dagegen Holotransferrin an den Transferrinrezeptor 2, wobei kein Furin aktiviert wird (Henningfeld *et al.*, 2000; Lee & Beutler, 2009).

Bei Heparin handelt es sich zudem um ein Akutphaseprotein mit antimikrobieller Wirkung. Wird der Organismus von Mikroorganismen befallen, so schütten Makrophagen IL6 aus. Dieses Cytokin bindet den IL6-Rezeptor, der daraufhin die Proteinkinase Stat3 aktiviert, was zur Expression von Heparin führt. Heparin sorgt wiederum dafür, dass Ferroportin abgebaut wird, so dass die Eisenkonzentration im Plasma sinkt und den Mikroorganismen dieses essentielle Spurenelement nicht mehr zur Verfügung steht (Drakesmith & Prentice, 2012; Lee & Beutler, 2009).

Die enorme Rolle von Heparin bei Krankheiten, die mit dem Eisenhaushalt in Verbindung stehen, wird auch dadurch verdeutlicht, dass eine fehlerhafte Lokalisation von Eisen in Zellen oder Geweben eine größere Auswirkung hat als eine fehlerhafte Gesamteisenmenge im Körper (MacKenzie *et al.*, 2008). Der Verlust der Kontrolle der Eisenabsorption, der Eisenlagerung und des Eisentransports steht in Zusammenhang mit Krankheiten wie entzündungsbedingter Anämie (Ganz, 2003), Atherosklerose (Yuan & Li, 2003) und Diabetes (O'Neil & Powell, 2005) sowie neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Parkinson und Friedreich (Moos & Morgan, 2004).

Die herkömmlichen Therapien von Anämien beruhen auf erythropoese-stimulierenden Wirkstoffen, wogegen sich aber häufig Resistenzen ausbilden. Insbesondere die entzündungsbedingte Anämie lässt sich so oft nicht befriedigend behandeln (Macdougall & Cooper, 2002a; Macdougall & Cooper, 2002b). Daher ist Heparin ein neues interessantes Zielmolekül für die therapeutische Intervention, zumal in einem Mausmodell gezeigt werden konnte, dass ein Antikörper gegen Heparin den Eisenhaushalt positiv beeinflussen kann. Eine kombinierte Therapie mit Erythropoetin  $\alpha$  führte zu einem stabilen Hämoglobin-Niveau

und somit zu einer effizienten Therapie, im Gegensatz zur Verabreichung von Erythropoietin  $\alpha$  alleine (Sasu *et al.*, 2010).

### 1.4.2 Struktur von Heparin

Die erste veröffentlichte Struktur von Heparin, die auf NMR-Daten basiert, zeigte eine kompakte Faltung mit einem zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt und einer  $\beta$ -Haarnadelschleife. Weiterhin wies sie 4 Disulfidbrücken mit der folgenden Disulfidkonnektivität auf: Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>8</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>7</sup>, Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>4</sup>-Cys<sup>5</sup> (Hunter *et al.*, 2002). Eine spätere Studie unterstützte dieses Ergebnis (Lauth *et al.*, 2005). Allerdings beruhten beide Strukturen auf unvollständigen NMR-Messungen, da die Resonanzen der benachbarten Cysteinreste Cys<sup>4</sup> und Cys<sup>5</sup> nicht detektiert werden konnten. Die wahre Disulfidkonnektivität wurde erst 2009 aufgeklärt. Dabei wurde die Struktur sowohl mit Hilfe von NMR bei verschiedenen Temperaturen als auch mit Hilfe von Röntgenkristallographie analysiert (Jordan *et al.*, 2009). Zur Lösung der Kristallstruktur wurde das Peptid in Komplex mit einem Antikörper kristallisiert. Die Struktur weist bei ähnlicher Faltung folgende geänderte Disulfidkonnektivität auf: Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>8</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>7</sup>.

### 1.4.3 Ac3: ein Anticalin gegen Heparin

Ac3 wurde aus einer neu entwickelten Bibliothek selektiert, die auf dem humanen Lcn2 basiert (Gebauer *et al.*, 2013). Lcn2 ist die am besten erforschte Lipocalin-Gerüststruktur, so dass hinreichend Daten zur Verfügung standen, um die variablen Positionen für die verbesserte Zufallsbibliothek in optimaler Weise auszuwählen. Diese Bibliothek enthält 20 randomisierte Aminosäurepositionen in den vier Schleifenregionen des Lipocalins. Die Selektion aus der Bibliothek erfolgte erneut unter Verwendung der *Phage Display*-Methode. Die initiale Anticalinvariante wurde durch Zufallsmutagenese (*Error Prone PCR*) und nachfolgende Selektion unter stringenteren Bedingungen optimiert. Das Ac3 hat eine Dissoziationskonstante von etwa 200 pM.

Die Entwicklung eines Anticalins als Wirkstoff gegen Anämie wurde durch das EU-Projekt EUROCALIN (EUROpean Consortium for AntiCALINS as next generation high-affinity protein therapeutics) vorangetrieben. Dabei handelt es sich um eine Kollaboration von 10 Firmen und akademischen Einrichtungen mit dem Ziel, eine neue Therapie gegen Anämie zu entwickeln ([www.eurocalin-fp7.eu](http://www.eurocalin-fp7.eu)).

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit waren strukturelle Untersuchungen an Komplexen aus Anticalinen und deren vorgegebenen Liganden mit Relevanz für die Humantherapie. Dabei lagen insbesondere die spezifischen Interaktionen des Anticalins mit dem Liganden im Zentrum des Interesses. Die gewonnenen Informationen sollen dazu dienen, die Anticalin-Technologie weiterzuentwickeln, da die entstandenen strukturellen Erkenntnisse zur Optimierung zukünftiger Anticalinbibliotheken wertvoll sein dürften. Ac1 und Ac2 beruhen beide auf Lcn1. Da bisher noch keine Struktur eines Anticalins basierend auf diesem Gerüst bekannt war, galt es, bei diesen Proteinen nähere Einblicke in den Mechanismus der Ligandenbindung und die Faltung zu gewinnen. Die Strukturaufklärung von Ac3 versprach besonderes Interesse im Hinblick auf die Komplexbildung mit dem in synthetischer Form zur Verfügung stehenden Peptidliganden Heparin. Im Fall des IL4-BP musste zunächst die gentechnische Produktion sowie die Rückfaltung und Reinigung etabliert werden, um Kristallisationsexperimente mit Ac2 zu ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

E. coli K12-Stämme (Prof. A. Skerra, TU-München)

BL21 (DE3)  $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^- m_B^-$ ), *gal*, *dcm*, (DE3) (Studier *et al.*, 1990)

JM83 *ara*,  $\Delta(lac-proAB)$ , *rpsL* (= *strA*),  $\phi 80$ , *lacZ* $\Delta$ M15

(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

XL1-Blue *endA1*, *hsdR17*( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *supE44*, *thi-1*,  $\lambda^-$ , *recA1*, *gyrA96*, *relA1*,

$\Delta(lacZYA-argF)U169$  [ $F'$ : *proAB*, *lacI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15, Tn10(*Tet<sup>r</sup>*)]

(Bullock *et al.*, 1987)

#### Plasmide

pASK75 Prof. A. Skerra, TU München (Voss & Skerra, 1997)

pASK -IBA4 Prof. A. Skerra, TU München bzw. IBA, Göttingen

pTUM4 Prof. A. Skerra, TU München (Schlapschy *et al.*, 2006)

pET11c Stratagene, Amsterdam, Niederlande

pCD33-6 Stratagene, Amsterdam, Niederlande

#### 2.1.2 Übersicht: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Plasmide selbst konstruiert.

pTlc26 wie pASK75; mit *ompA* (dEcoK12), Tlc-(D1-4 HHLL)-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S-strepII

(Prof. A. Skerra, TU München / Pieris, Freising)

pTlc99 wie pASK75; mit *ompA*,( $\Delta$ 1-4 HHLL) Tlc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S

(Andrea Holla, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)

---

pTLc100	wie pASK75; mit ompA, $(\Delta 1-4$ HHLL) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD) (Andrea Holla, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)
pTLc101	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $(\Delta 1-4$ HHLL) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S-(AKLDL)
pTLc102	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $(\Delta 1-4$ HHLL) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD)
pTLc103	wie pASK75; mit ompA, His <sub>6</sub> -TEV, $(\Delta 1-4$ HHLL) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S
pTLc104	wie pASK75; mit ompA, His <sub>6</sub> -TEV, $(\Delta 1-4$ HHLL) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD)
pTLc105	wie pASK75; mit ompA, His <sub>6</sub> , $(\Delta 1-5$ HHLLA) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S
pTLc106	wie pASK75; mit ompA, His <sub>6</sub> , $(\Delta 1-5$ HHLLA) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD)
pTLc107	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $\Delta$ G, $(\Delta 1-5$ HHLLA) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S
pTLc108	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $\Delta$ G, $(\Delta 1-5$ HHLLA) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD)
pTLc109	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $\Delta$ KG, $(\Delta 1-9$ HHLLASDEE) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S
pTLc110	wie pASK IBA4; mit ompA, strepII, $\Delta$ KG, $(\Delta 1-9$ HHLLASDEE) TLc-C101S-R111P-K114W-C61S-C153S- $(\Delta$ RQSETCSPGSD)
pIL4R-2	wie pCD33-6; mit IL4R-C182S-Y200A- $(\Delta$ REPFEQH)-strepII (Magrit Winkler, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)
pIL4R5-TLc276	wie pASK75; mit ompA, IL4R-2-His <sub>6</sub> , ompA, TLc276.2_K04-strepII (Dr. Michael Schneider, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)

pIL4-3(+E)-SUMO	wie pASK75; mit ompA, IL4R-2-SUMO(-Met1)-strepII (Dr. Michael Schneider, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)
pIL4-3(+E)-TF	wie pASK75; mit ompA, IL4R-2-Trigger Factor-strepII (Dr. Michael Schneider, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München)
pIL4R-7	wie pCD33-6; mit IL4R-C182S-( $\Delta$ NSYREPFEQH)
pIL4R-8	wie pCD33-6; mit IL4R-C182S-( $\Delta$ NSYREPFEQH)-His <sub>5</sub>
pIL4R-9	wie pCD33-6; mit IL4R-C182S
pVEGF	wie pET11c; mit VEGF(8-109) (Pieris, Freising)
pVEGFs	wie pET11c; mit VEGF(8-109)-strepII (Pieris, Freising)

### 2.1.3 Oligodesoxynukleotide

#### Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung (Prof. A. Skerra)

D20: 5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'

F83: 5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'

PR1: 5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

#### Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von den Firmen IBA, Göttingen oder ThermoHybaid (Thermo Fisher Scientific, Bonn) in HPLC-gereinigter Form bezogen.

His<sub>6</sub> $\Delta$ 1TLc 5'-CAT CAC CAC CAT CAT CAC TCA GAC GAG GAG ATT CAG-3'

NTLc 5'-GCC TCA GAC GAG GAG ATT-3'

TGIL4BP1 5'-CGG GGT CGT GGT TCA CCG TGA TTA TTC GAA TCA G-3'

TGIL4BP2	5'-CGG GGT CGT GGT TCA CCG TGG TAG TGG TGG TAG TAA TTA TTC GAA TCA G-3'
TGIL4BP3	5'-GGT CGT GGT TCA CCG TGT TGA GGA TGT CCC TCG GGA AGC TCG TCG TCG TGA TTA TTC GAA TCA G-3'
strepIITLc	5'-GCC TCA GAC GAG GAG ATT-3'
strepIIΔ2TLc	5'-AG TTC GAA AAA TCA GAC GAG GAG ATT CAG GAT-3'
strepIIΔ7TLc	5'-AG TTC GAA ATT CAG GAT GTG TCA GGG AC-3'
TLcC	5'-CTTGGAGGAGAGGTCCTCGATTATTCGAATCAG-3'
TLcΔ148	5'-C CTC TCG TAG GAG TAG GGG ATT ATT CGA ATC AG-3'

## 2.1.4 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
Benzonase, Reinheitsgrad I, 25 U/μL	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol GmbH, Hamburg
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
DNase I aus Rinderpankreas, 2000 U/mg, Reinheitsgrad I	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, (5 u/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 u/μl)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
Taq DNA-Polymerase (5 units/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA-Polymerase (3 units/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4 Polynukleotidkinase (10 units/ $\mu$ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

### 2.1.5 Chemikalien

Alle Chemikalien zur Kristallisation von Proteinen wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz; E. Merck KGaA, Darmstadt; Riedel de Haen, Hannover; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; oder Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

Aceton	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-Gele (Sequagel Concentrate & Diluent)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit 0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat, Na <sub>2</sub> -Salz (ATP)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Agarose (low melting point), electrophoresis grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
Ammoniumacetat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Merck KGaA, Darmstadt; AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt

Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol GmbH, Hamburg
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt

N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isopropyl-thiogalactosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

### 2.1.6 Standards, Kristallisations-Screens und Kits

#### DNA-Größenstandards:

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

#### Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

#### Kristallisations-Screens:

<i>Lorenz Basic Screen</i> (LBS) 1-5	480 Bedingungen, Prof. A. Skerra, TU München
<i>Additive Screen</i>	Hampton Research, CA, USA
<i>Vector Screen</i> 1-5	480 Bedingungen, Prof. A. Skerra, TU München

#### Kits zur DNA-Isolierung:

QIAprep Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Kits zur DNA-Sequenzierung:

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

## 2.1.7 Geräte

ABI-Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
--------------------------------	--

Brutschränke:

BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Friocell	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing

Durchflußdetektoren:

2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Elektrophoresekammern	Biometra, Göttingen
-----------------------	---------------------

Fraktionssammler:

Gradi Frac / Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

French-Press:

French Pressure Cell SLM AMINCO	Horiba Instruments, Irvine, CA, USA
---------------------------------	-------------------------------------

Geltrockner:

Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
-----------------	---------------------

Heizrührer:

---

IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
ÄKTA-Explorer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
ÄKTA-Purifier	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Kristall-Imaging-System:	
RockImager	Formulatrix, MA, USA
Kristallisationsroboter:	
FreedomEvo	Tecan Deutschland, Crailsheim
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Netzgeräte:	
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
PCR-Gerät	
Master Cycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Peristaltische Pumpen:	
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
pH-Meter:	
Inolab, pH level 1	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim
Pipettierhilfen:	
accu-jet / accu-jet pro	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten:	

---

Gilson P10, P20, P100, P200, P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Röntgen-Generator:	
RU-300 Drehanoden-Generator	Rigaku, Tokyo, Japan
Konfokale Optik	Osmic, Troy, MI, USA
Mar345 Detektor	MarResearch, Hamburg
Stickstoff-Kühlstrom	Oxford Cryosystems, Oxford, UK
Rollenmischer	
Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific, Redhill, UK
Signalschreiber:	
REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Österreich
2210	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Schüttelapparate:	
Typ 3012 / Typ 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttelinkubatoren:	
Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Edison, New Jersey, USA
Multitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spektrophotometer:	
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Speed-Vac-Konzentrator	

Univapo UVC 150H	UniEquip, Martinsried
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpen:	
Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Varioklav Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen:	
Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 A	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
2001 MP2	Sartorius GmbH, Göttingen
1202 MP	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbäder:	
Haake F6/K20	Thermo Haake, Karlsruhe
Zentrifugen:	
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode
Sigma 4K15C	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6	Kendro Laboratory Products, München
Sorvall RC 5B, RC 5C Plus, und Evolution RC mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products, München
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Mini Spin

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

**2.1.8 Sonstiges Material**

Dialyseschläuche:

Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa

Carl Roth, Karlsruhe

Typ 27, MWCO: 12-16 kDa

Biomol, Hamburg

Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 mL

Braun Melsungen, Melsungen

Reaktionsgefäße:

0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL(Safelock)

Eppendorf-Netheler-Hinz,  
Hamburg

SDS-PAGE:

Apparaturen, Glasplatten, Spacer,

Biometra, Göttingen

Dichtungen, Kämme

Größenausschlusschromatographie-Säulen:

Amersham Pharmacia Biotech Europe ,  
Freiburg

Superdex 75 HR 10/30

Superdex 200 HR 10/30

Superdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade*Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade*

Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)

Sarstedt, Nümbrecht

Konzentratoren:

Amicon Ultra (5K, 10K, 30K)

Millipore, MA, USA

Klebefolie für die Proteinkristallographie:

Crystal Clear

Hampton Research, CA, USA

Kristallisationsplatten:

CrystalQuick Platte 96well

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Linbro-Plate

Hampton Research, CA, USA

Cryscem-Plate

Hampton Research, CA, USA

## Kunststoffröhrchen:

Kulturröhrchen, 13 mL	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 mL	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht

## Membran:

Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
------------------------------	------------------------------

## Pipetten-Spitzen:

blau (200-1000 $\mu$ L)	Sarstedt, Nümbrecht
gelb (5-200 $\mu$ L)	Sarstedt, Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 $\mu$ L)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg; Sarstedt, Nümbrecht

## Quarzküvetten:

Typ 108.002 QS (Absorption)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 108 QS (Fluoreszenz)	Hellma, Müllheim, Baden
Typ 110 QS (CD)	Hellma, Müllheim, Baden

## Sterilfilter:

Filtropur (0,45 und 0,22 $\mu$ m)	Sarstedt, Nümbrecht
Membransterilfilter (0,45 $\mu$ m; $\varnothing$ 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Spin-X (0,45 $\mu$ m) Costar	Corning, NY, USA

Whatman-Filterpapier 3MM Bender & Hobein AG, München

Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren Nalgene Company, New York, USA

SS-34, SLA-1500 und SLA-3000

### 2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden vor Gebrauch entweder durch Filtration oder im Autoklaven sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore-Wasser hergestellt und, sofern

nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Kulturplatten wurden bei 4°C gelagert. Antibiotikallösungen wurden den Flüssigmedien erst kurz vor deren Verwendung zugesetzt.

#### Antibiotika-Stammlösungen:

Folgende Antibiotika-Stammlösungen wurden für die Herstellung von Selektivmedien verwendet (wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert; 0,45 µM):

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

#### Induktor-Stammlösungen:

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/mL in DMF (1:10.000 zum Medium) oder 5 mg/mL in DMF (1:10.000 zum Medium)
Isopropyl-thiogalactosid (IPTG)	0,5 M in H <sub>2</sub> O (1:1000 zum Medium)
Lagerung bei -20 °C	

#### LB-Medium:

Bacto Tryptone	10 g/L
Bacto Yeast Extract	5 g/L
NaCL	5 g/L
Bacto Agar	15 g/L (nur für Kulturplatten)
mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.	

#### Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

<u>TAE-Puffer:</u>		<u>TBE-Puffer:</u>	
Tris	40 mM	Tris	89 mM
Essigsäure	20 mM	Borsäure	89 mM

EDTA	1 mM	EDTA	2 mM
10x Auftragspuffer für Agarosegele:			
Bromphenolblau	1 mg/mL		
Xylencyanol	1 mg/mL		
Glycerin	50 % v/v		

Puffer für die SDS-PAGE:

*1x SDS-Laufpuffer* (Fling & Gregerson, 1986):

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

*4x Lower-Tris:*

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

*4x Upper-Tris:*

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

*5x Auftragspuffer:*

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

*Färbelösung:*

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

*Entfärbelösung:*

wie Färbelösung, ohne Coomassie
Brilliantblau

*Aufbewahrungslösung:*

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v
Wasser	93 % v/v

Sonstige Puffer:*AP-Puffer:*

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

pH 8,8 mit HCl einstellen

*PBS:*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
NaCl	115 mM

pH 7,4 stellt sich ein

*Periplasma-Aufschlusspuffer:*

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

*PBS/T:*

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

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

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

*TB-Puffer (zur Transformation):*

Pipes	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
CaCl <sub>2</sub>	15
KCl	250 mM

pH 6.7 mit KOH einstellen

*TE-Puffer:*

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

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden durch Ausstreichen auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C Einzelkolonien erzeugt. Die Zugabe von Antibiotika zum Nährmedium ermöglichte die Selektion auf mit Plasmiden transformierte Zellen. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt. Für die Proteinproduktion wurden immer frisch transformierte Zellen verwendet.

Zur Kultivierung in Flüssigkulturen wurde LB-Medium mit geeigneten Antibiotika verwendet, wenn nicht anders angegeben. Solange das Volumen 50 mL unterschritt, wurde die Kultur direkt mit einer Bakterienkolonie einer Agarplatte beimpft. Kulturen mit einem größeren Volumen wurden durch Zugabe einer stationären Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 beimpft. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation der Vorkulturen bei 30 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator. Die Messung der Zelldichte wurde in einer 1 cm Kunststoffküvette durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) im Spektralphotometer vorgenommen. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden Verdünnungen mit einer optischen Dichte angefertigt, die kleiner 1 war, und entsprechend vermessen. Zum Abgleich der Messwerter wurde stets das Medium verwendet, in dem die Zellen kultiviert wurden.

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

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden die Zellen zunächst in eine transformationskompetente Form überführt. Dabei wurde die  $CaCl_2$ -Methode (Cohen *et al.*, 1972) verwendet. Diese resultiert je nach *E. coli*-Stamm in ca.  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA. Bei dieser Methode wurden 50 mL LB-Medium ohne Antibiotikum im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Sobald eine optischen Dichte von  $OD_{550} = 0,5$  erreicht war, wurde die Kultur in ein 50 mL-Sarstedt-Röhrchen überführt. In diesem Röhrchen wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4°C, 10 min) sedimentiert. Das entstandene Zellsediment wurde in 40 mL eiskalter 0,1 M  $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 mL eiskalter 50 mM  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Eine letzte Zentrifugation lieferte die transformationskompetenten

Zellen. Diese wurden in 2 mL 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µL entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Die Transformation wurde mit 200 µL Zellsuspension und 1 ng Plasmid-DNA oder 10 µL eines Ligierungsansatzes durchgeführt. Dabei wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 1 min auf 42 °C erwärmt. Nachdem die Zellen mit 0,8 mL LB-Medium versetzt worden waren, wurden sie für 60 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µL auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Alternativ wurde auch die DMSO-Methode verwendet (Inoue *et al.*, 1990). Dabei werden je nach *E. coli*-Stamm bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten pro µg Plasmid-DNA erhalten. Bei dieser Methode wurden 100 mL SOB-Medium ohne Antibiotikum mit 1 mL einer stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte unter ständigem Schütteln bei 22 °C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>550</sub> = 0,6. Anschließend wurde der Kulturkolben für 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 2500 g, 4°C, 10 min) abgetrennt. Die Zellen wurden in 30 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert, bevor sie erneut durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 2500 g, 4°C, 10 min) abgetrennt wurden. Die Zellen wurden in 8 mL TB-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 600 µL wasserfreies DMSO gegeben (~7 % v/v Endkonzentration). Aliquots der Zellsuspension von 200 µL wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Die Transformation wurde analog der CaCl<sub>2</sub>-Methode durchgeführt.

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

### 2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe von Kits der Firma Qiagen. Die Wirkungsweise dieser Kits beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Dabei wurden die Proteine aus der Lösung gefällt und die Plasmid-DNA selektiv an einem Trägermaterial (z.B. Anionenaustauscher, Silicagel) immobilisiert. Diese immobilisierte Plasmid-DNA wurde in mehreren Schritten gereinigt, bevor sie durch eine Verschiebung des pH-Wertes eluiert wurde.

Zur Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde diese aus stationären 4 mL Übernachtskulturen unter Verwendung des Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Qiagen (QIAprep Plasmid Miniprep Kit) nach Herstellerangaben präpariert. Die Plasmid-DNA wurde

im letzten Schritt in 50 mL autoklaviertem doppeltdestilliertem Wasser aufgenommen und für Restriktions- und Sequenzanalysen wie auch zur Transformation und zur Neukonstruktion von Plasmiden eingesetzt. Die Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA betrug bei diesem Präparationsverfahren 10-20 µg DNA. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

## **2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA**

Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Reinigung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten durchgeführt. Dabei wurden die Fragmente in Abhängigkeit von der Größe durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid getrennt (Sambrook, 1989). Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab, wie bei der Restriktionsanalyse von Plasmiden, als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

### **2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese**

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde 1 % w/v Agarose in TAE-Puffer unter ständigem Erhitzen und Rühren aufgelöst. Nach Abkühlung der gelösten Agarose auf Handwärme wurden 1/10.000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das resultierende Gel war in der Regel 10,5 cm lang, 7,5 cm breit und ca. 0,5 cm dick. Es wurde eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Taschen wurden mit 5-10 µL DNA-Lösung beladen. Diese war zuvor mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer vermischt worden. Die Dauer der Elektrophorese betrug bei einer konstanten Spannung von 90 V 45 Minuten. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Dieses brachte das Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert zum fluoreszieren. Die Banden wurden mit einer Digitalkamera fotografiert.

### **2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurde Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab durchgeführt. Dabei wurden für die Herstellung des Gels 0,6 g *Low Melting Point Agarose* und 60 mL TAE-Puffer zusammen erhitzt. Zur handwarm abgekühlten Lösung wurden 1/10.000 Volumen 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung gegeben. Das Gemisch wurde

anschließend in eine Gelkammer gegossen, die mit etwa 2 cm breiten Taschen versehen war. In diese Taschen wurde die gesamte Reaktionsmischung (bis zu 50  $\mu\text{L}$ ) aus DNA und Restriktionsenzym bzw. der gesamte PCR-Ansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer gefüllt. Mit einer konstanten Spannung von 70 V wurden die DNA-Fragmente für etwa 90 Minuten entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Da die DNA noch weiter verwendet wurde, wurde die Detektion bei verminderter UV-Intensität durchgeführt, um Strahlenschäden zu verringern. Die DNA-Bande mit dem gewünschten Fragment wurde mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen von der Agarose gereinigt. Dabei wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren und die Agarose zunächst verflüssigt. Entsprechend wurde die DNA im nächsten Schritt vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20  $\mu\text{L}$  TE-Puffer eluiert. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine analytische Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration mit Hilfe der DNA-Größenstandards abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

### 2.2.5.1 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden (*Blunt Ends*) eingesetzt. Dabei verhinderten die Dephosphorylierung des Vektorfragments und die Phosphorylierung des zu inserierenden PCR-Fragments die intramolekulare Rezirkularisierung und die Bildung von Konkatameren. Für die Dephosphorylierung wurde die Alkalische Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) verwendet. Der Vorteil dieses Enzyms ist die leichte Inaktivierung durch Hitze. Der Reaktionsansatz enthielt etwa 5  $\mu\text{g}$  eines geschnittenen Fragments und 5 U Enzym und wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte für 15 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$ . Die Isolierung des dephosphorylierten Vektorfragments erfolgte durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.2).

Die Dephosphorylierung des zu inserierenden PCR-Fragments erfolgte durch die T4-Polynukleotid-Kinase. Folgender Reaktionsansatz wurde dabei verwendet: 200 pmol Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente, 3  $\mu\text{L}$  10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (500 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM Dithiothreitol, DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM

EDTA), 1,3  $\mu\text{L}$  10 mM ATP und 0,5  $\mu\text{L}$  (5 u) T4 Polynukleotidkinase. Die insgesamt 30  $\mu\text{L}$  wurden für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Polynukleotidkinase erfolgte für bei 65°C für 10 Minuten. Der Teil des phosphorylierten Oligonukleotides bzw. PCR-Fragments, der nicht sofort für die Ligierung eingesetzt wurde, wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.2.5.2 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Restriktionsanalyse (Sambrook, 1989) von Plasmiden und zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Der Reaktionsansatz bestand dabei aus dem Plasmid bzw. den DNA-Fragmenten, der Restriktionsendonuklease und dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem. Falls erforderlich, wurde zusätzlich eine BSA-Konzentration von 0,1 mg/mL in der Reaktionslösung eingestellt. Er wurde bei der jeweils für das entsprechende Enzym angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Für einen Reaktionsansatz mit mehreren Restriktionsenzymen wurde der Puffer gewählt, bei dem alle Enzyme maximale Aktivität besaßen. Wenn jedoch unterschiedliche Puffer benötigt wurden, wurden die Reaktionen nacheinander durchgeführt. Dabei wurden das Restriktionsenzym und die Puffersalze durch Reinigung mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Quiagen) nach Herstellerangaben entfernt. Spaltungen mit mehreren Restriktionsenzymen, die unterschiedliche Reaktionstemperaturen benötigen, wurden schrittweise durchgeführt. Zunächst wurde mit dem entsprechenden Enzym bei der höheren Temperatur inkubiert, der Ansatz dann kurz auf Eis abgekühlt, mit dem nächsten Enzym versetzt und bei dessen Reaktionstemperatur weiterinkubiert. Im analytischen Maßstab enthielt der Reaktionsansatz typischerweise ca. 0,2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 2 U der Restriktionsendonuklease. Die 10  $\mu\text{L}$  Lösung wurde für eine Stunde inkubiert. Im präparativen Maßstab enthielt der Reaktionsansatz typischerweise 2-10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und 20 U eines jeden Restriktionsenzymen. Die insgesamt 50  $\mu\text{L}$  wurden für 1-2 Stunden inkubiert. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.4.2) isoliert.

### **2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von DNA**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurden Amplifizierungen spezifischer Sequenzen aus passenden DNA-Matrizen durchgeführt (Saiki

*et al.*, 1988). Dabei wurden Oligodesoxynukleotide als *Primer* eingesetzt. Sie enthielten am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Durch die terminalen Überhänge der Primerpaare konnten neue Restriktionsschnittstellen für den Transfer in das gewünschte Vektorsystem (Plasmid) in die flankierenden Regionen eingeführt werden. Auch Affinitätstags konnten auf diese Weise eingeführt werden.

Zur Durchführung der PCR wurde entweder die *Taq* oder die *Pfu* DNA-Polymerase eingesetzt. Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR bestand aus 50  $\mu$ L mit folgenden Inhalten: 0,01-1  $\mu$ g Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*, 5  $\mu$ L 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100) oder *Pfu*-Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/mL BSA), 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (nicht bei Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase), 4  $\mu$ L dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Mit H<sub>2</sub>O wurde auf 50  $\mu$ L aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im Thermozykler, wobei zunächst die DNA durch ein zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert wurde. Anschließend wurde die PCR in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 45 bis 65 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für die entsprechende Zeit, je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz (Polymerase-Reaktion). Es wurden in der Regel 25 bis 30 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurde der Ansatz zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 10 min bei 72 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

#### 2.2.5.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wurden die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten oder durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente kovalent verknüpft, um neue Plasmide zu konstruieren. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 15  $\mu$ L und bestand aus folgenden Komponenten: 1,5  $\mu$ L 10x Ligase-Puffer (400 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP; Fermentas), 0,5  $\mu$ L T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/ $\mu$ L; Fermentas) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei 20 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz ohne Zugabe der zu inserierenden DNA. Für die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 5  $\mu$ L des Ligierungsansatzes verwendet.

### 2.2.5.5 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Sequenzierungen wurden in der Regel für durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte durchgeführt. Die verwendete Methode basierte auf dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) für zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985). Dabei wurden das ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Durch Zugabe von mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelten Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) wird die naszierende DNA-Kette einer PCR abgebrochen und die entstehenden Fragmente gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert (Rosenblum & Yager, 1997). Die entstehende Lösung aus terminierten DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des ABI PRISM 310-Sequenzierautomaten analysiert. Dieser Automat führt mittels einer Kapillar-Elektrophorese eine Trennung der markierten DNA-Einzelstränge mit anschließender Detektion der Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers durch. Die emittierte Fluoreszenz wurde von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera erfasst und als digitales Signal an einen Computer weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der Software ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.3 interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

## 2.3 Gentechnische Methoden

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

Heterologe Proteine wurden, je nach verwendetem Expressionssystem, im Cytosol oder im periplasmatischen Raum von *E. coli* überproduziert. Die produzierten Anticaline wurden immer im Schüttelkolben periplasmatisch produziert. Die Liganden VEGF und IL4-BP wurden cytoplasmatisch als Einschlusskörper produziert.

#### 2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben

Standardmäßig erfolgte die Proteinproduktion in Schüttelkulturen mit einem Volumen von 2 L. Dazu wurden 50 mL LB-Medium, das mit 100 mg/L Ampicillin versetzt worden war, mit einer Einzelkolonie eines mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler mit 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde verwendet, um die Produktionskultur, die aus 2 L LB-Medium mit 100 mg/L

Ampicillin bestand, im Verhältnis 1:50 anzuimpfen. Diese Produktionskultur wurde bei 22 °C bis zu einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  im Schüttler mit 180 rpm kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von aTc zu einer Endkonzentration von 200 µg/L induziert (Skerra, 1994b). Anschließend wurden die Bakterien für weitere 2,5 bis 3 h im Schüttler kultiviert.

### **2.3.1.2 Periplasmatische Produktion von Proteinen im Schüttelkolben**

Zur periplasmatischen Produktion wurde eine bakterielle Signalsequenz (OmpA) an das Strukturgen des zu produzierenden Proteins fusioniert. Diese Signalsequenz führte zu einer Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum der Zelle (Skerra & Plückthun, 1988). Nach Induktion der Genexpression und Produktion des Proteins wurde die äußere Membran selektiv permeabilisiert, wodurch sich die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewinnen ließ. Standardmäßig erfolgte die Proteinproduktion in Schüttelkulturen mit einem Volumen von 2 L. Zur Präparation der periplasmatischen Zellfraktion wurde die Kultur zentrifugiert (SLA3000, 4200 g, 4 °C, 15 min), der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 20 mL eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Kunststoffröhrchen überführt und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Sphäroblasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K10, 4000 g, 4 °C, 15 min). Nach erneuter Zentrifugation (SS34, 40000 g, 4 °C, 15 min) und abschließender Sterilfiltration (0,45 µm) wurde der erhaltene periplasmatische Extrakt über Nacht gegen 2 L SA-Puffer dialysiert.

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurden Proben des Gesamtzellproteins wie folgt präpariert: 1 mL der Kultur wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 4 °C, 2 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µL Benzonase-Lösung (12,5 U/mL in Benzonasepuffer) resuspendiert. Die Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 20 µL 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE erreicht. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert. Danach wurde das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

### 2.3.1.3 Cytoplasmatische Produktion von Proteinen als Einschlusskörper

Die humanen Proteine VEGF und IL4-BP wurden in *E. coli* nicht korrekt gefaltet produziert. Daher bildeten sich Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) unter Ablagerung großer Mengen an unlöslichem, partiell ungefaltetem Protein. Zur Präparation der Einschlusskörper wurde die Kultur zentrifugiert (SLA3000, 4200 g, 4 °C, 15 min), der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 20 mL Puffer resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen aufgeschlossen und die Einschlusskörper isoliert.

### 2.3.2 Proteinproduktion mit Selenomethionin-Substitution

Proteine wurden mit Selenomethionin-Substitution produziert, um die Schweratome Selen in das Protein einzuführen. Dabei wurden die Schwefelatome im natürlich vorkommenden Methionin durch Selen ersetzt. Die entsprechende Aminosäure heißt Selenomethionin. Selen ermöglicht die Nutzung des wellenlängenabhängigen anomalen Signals zur Lösung des Phasenproblems in der Röntgenkristallographie (Hendrickson *et al.*, 1990).

Die Selenomethionin-Substitution erfolgte durch Kultivierung des für Methionin auxotrophen *E. coli*-Stammes B834 (DE3) in Gegenwart von Selenomethionin (Budisa *et al.*, 1995). Dabei wurde eine 5 mL Vorkultur in LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C für 10 Stunden angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten zentrifugiert (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 2 mL Mineralsalzmedium (Abschnitt 2.1.9) gewaschen und anschließend in 1 mL Mineralsalzmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde verwendet, um 2L „Neues Minimal Medium“ anzupflanzen. Dieses war ergänzt um 8 mL/L 50 % Glucose, 1 mL/L 1000x Spurenelementlösung, 1 mL/L 1000x Thiamin/Biotinlösung, 10 mL/L 100x Aminosäurelösung (ohne Met), 25 mg/L L-Selenomethionin und 1 mL/L Ampicillin. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 170 rpm über Nacht. Sobald die Kultur die stationäre Phase erreicht hatte ( $OD_{550} \approx 1,6$ ), erfolgte die Induktion mit 250 µg/L aTc für 14 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Kulturen unter Verwendung von je 30 mL Aufschlusspuffer, wie unter Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben, geerntet. Der periplasmatische Extrakt (ca. 30 mL) wurde zur Vorbereitung der Reinigung des rekombinanten Proteins über Nacht gegen das 100fache Volumen an Chromatographie-Puffer dialysiert und anschließend mittels Chromatographie gereinigt. In der Regel wurde eine Streptavidinaffinitätschromatographie gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.3).

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Rückfaltung von Proteinen aus Einschlusskörpern

#### 2.4.1.1 Rückfaltung von VEGF(8-109)

Die Rückfaltung von VEGF(8-109) erfolgte nach einer publizierten Vorschrift (Christinger *et al.*, 1996). Zunächst wurde VEGF in BL21 (DE3)-Zellen produziert. Die Zellen einer 2 L-Kultur wurden in 20 mL 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM EDTA resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen bei permanenter Kühlung 32 mal für 10 Sekunden einer Leistung von 20 % ausgesetzt und anschließend für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Die Zellfragmente und Einschlusskörper wurden in 2 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl resuspendiert und erneut 32-mal für 10 Sekunden einer Leistung von 20 % ausgesetzt und wieder für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Einschlusskörper in IB-Solubilisierungspuffer (7,5 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 4 mM DTT) resuspendiert. Zur Solubilisierung wurde diese Lösung für 2 Stunden auf dem Magnetrührer gerührt und im Anschluss daran für 15 min bei 40000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert (0,45 µM) und mit IB-Solubilisierungspuffer auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt. Die auf diese Weise solubilisierten Einschlusskörper wurden durch aufeinanderfolgende Dialyseschritte, bei denen der Harnstoff und das Reduktionsmittel entfernt wurden, rückgefaltet. Die erste Dialyse erfolgte gegen einen Puffer aus 20 mM Tris/HCl pH 8,4, 400 mM NaCl und 1 mM Cystein bei Raumtemperatur über Nacht. Bei der zweiten Dialyse, die ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur erfolgte, wurde in dem Dialysepuffer das NaCl weggelassen. Die letzten beiden Dialyseschritte erfolgten gegen einen Puffer, der nur noch aus 20 mM Tris/HCl pH 8,4 bestand, für 24 h bei 4 °C. Bei allen Dialyseschritten war darauf zu achten, nicht mehr als 300 mg Protein in 5 L Dialysepuffer einzusetzen. Nach den vier Dialyseschritten war das VEGF rückgefaltet und lag bereits in relativ reiner Form vor.

#### 2.4.1.2 Rückfaltung des IL4-Bindeproteins

Die Rückfaltung des IL4-Bindeproteins orientierte sich an einer publizierten Vorschrift (Shen *et al.*, 1996). Allerdings war es nicht möglich, mit Hilfe dieser Prozedur ausreichend Protein zu erhalten, so dass der Prozess wie folgt optimiert wurde:

IL4-BP wurde in JM83-Zellen produziert Die Zellen einer 2 L-Kultur wurden in 20 mL 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA resuspendiert und mit Hilfe der *French Press*

aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen bei permanenter Kühlung 3- bis 4-mal durch die *French Press* gegeben und anschließend für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Die Zellfragmente und Einschlusskörper wurden in 20 mL IB-Waschpuffer (2 M Gdn/HCl, 100 mM pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert, für eine Stunde bei Raumtemperatur weiterhin gerührt und für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in 20 mL IB-Waschpuffer wurde die Mischung erneut für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Die auf diese Weise gewaschenen Einschlusskörper wurden in 5 mL 4 M Gdn/HCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur solublisiert.

Die gewaschenen Einschlusskörper wurden durch Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Dazu wurden sie zunächst bei 4 °C gegen 7 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 9,0, 3 mM DTT dialysiert. Anschließend wurden sie über eine 5 mL Schleife auf eine 6 mL Resource Q-Chromatographiesäule gegeben, die in 7,5 M Harnstoff, 20 mM Tris/HCl pH 9,0, 3 mM DTT (Laufpuffer) äquilibriert war. Nachdem die Säule mit Laufpuffer gewaschen worden war, wurden die gebundenen Einschlusskörper über einen Gradienten eluiert. Der Elutionspuffer enthielt zusätzlich 1 M NaCl. Die Elution erfolgte über 60 mL mit einem Gradienten von 0 bis 250 mM NaCl. Dabei wurden 1 mL Fraktionen gesammelt. Die gesamte Anionenaustauschchromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 2 mL/min. Zur Analyse der Einschlusskörper wurden der Durchfluss und die Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie einer SDS-PAGE unterzogen. Die saubersten Fraktionen wurden vereint und auf eine Konzentration von 10-20 mg/mL gebracht.

Die gewaschenen, gereinigten und konzentrierten Einschlusskörper wurden durch Verdünnung rückgefaltet. Dazu wurden die Einschlusskörper von 24 L Medium (50-60 mg) vorsichtig nach und nach unter Rühren in 5 L Rückfaltungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Arginine, 1 mM EDTA, 2 mM oxidized  $\beta$ -Mercaptoethanol, 3 mM reduziertes  $\beta$ -Mercaptoethanol) getropft. Der Rückfaltungsansatz wurde 4 Tage bei 4 °C stehen gelassen und nach dieser Zeit mit 80-90 mg Ac3 versetzt. Dabei wurde der gegen SA-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt, der bereits sehr rein war, verwendet. Die Komplexbildung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die 5 L mit Hilfe einer *Cross-flow*-Apparatur auf ein Volumen von etwa 200 mL gebracht und über Nacht gegen SA-Puffer dialysiert. Im Folgenden wurde der Komplex mittels SA-Chromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt.

## 2.4.2 Chromatographische Verfahren

### 2.4.2.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose wurde durchgeführt um rekombinante Proteine von *E. coli*-Kulturen, die in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt & Skerra, 2007) produziert worden waren, zu isolieren. Zunächst wurde dazu die Periplasmafraktion (siehe Abschnitt 2.3.1.2) oder der Proteinkomplex der Rückfaltung (siehe Abschnitt 2.4.1) über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm), um Proteinaggregate zu entfernen. Das Protein wurde auf eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 („StrepTactin“ (Voss & Skerra, 1997)) - entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/mL - gegeben. Diese war zuvor durch spülen mit SA-Puffer bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (Absorption bei 280 nm,  $A_{280}$ ) äquilibriert worden. Es kamen, abhängig von der erwarteten Menge an rekombinantem Protein, Säulen mit Bettvolumina von 2 mL oder 15 mL zur Anwendung, die mit Flussraten von 20 mL/h bzw. 100 mL/h betrieben wurden.

Die Säule wurde mit SA-Puffer solange gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte, nachdem die Periplasmafraktion auf die Säule aufgetragen worden war. Die Elution des über das fusionierte *Strep*-tag II gebundenen rekombinanten Proteins erfolgte mit einer 2,5 mM Lösung an D-Desthiobiotin in SA-Puffer. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt. Die Regenerierung der Säule erfolgte über eine Spülung mit 5 mM HABA in SA-Puffer. Dabei wurde das gebundene D-Desthiobiotin herausgespült. Eine intensive Orangefärbung der Säule visualisierte die Bindung von HABA and das Säulenmaterial. Die Säule stand zur weiteren Verwendung bereit, nachdem das gebundene HABA durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung entfernt worden war.

Die Fraktionen wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm und SDS-PAGE untersucht, wobei diejenigen, die das gereinigte Protein enthielten, identifiziert wurden. Diese wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 2.4.2.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) wird zur Reinigung von Proteinen verwendet, die über funktionelle Gruppen auf der Proteinoberfläche - vor allem Histidin-Seitenketten - mit immobilisierten

Übergangsmetallionen wechselwirken. In der Regel werden dazu bei rekombinanten Proteinen Oligohistidin-Sequenzen eingeführt, die eine ausgeprägte Affinität zu chelatisierten Metallionen besitzen (Hochuli, 1988). In dieser Arbeit wurde als Säulenmaterial eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner verwendet. Auf diesem Säulenmaterial wurden  $Zn^{2+}$ -Ionen immobilisiert (Skerra, 1994a). Der His<sub>6</sub>-Tag befand sich am N- oder C-Terminus des rekombinanten Proteins. Es wurden stets Säulen mit einem Bettvolumen von 4 mL verwendet.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde das Protein zunächst gegen 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 mit 500 mM NaCl dialysiert und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm), um Proteinaggregate zu entfernen. Die Proteinlösung wurde durch eine peristaltische Pumpe mit einer Flussrate von 60 mL/h auf die Säule aufgetragen. Diese war zuvor vorbereitet worden, indem sie mit 40 mL Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült worden war, anschließend mit 20 mL 10 mM ZnSO<sub>4</sub> beladen worden war, mit 40 mL Wasser nachgespült und schließlich mit 40 mL des entsprechenden Laufpuffers äquilibriert worden war. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussfotometers bei 280 nm verfolgt. Die Säule wurde nach dem Auftragen des Proteins bis zum Erreichen der Basislinie mit Puffer nachgespült. Das gebundene Protein wurde durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 100 mL von 0 bis 300 mM Imidazol/HCl in entsprechendem Puffer eluiert. Mit Hilfe eines Fraktionensammlers wurden die Fraktionen des Eluats gesammelt. Dabei wurde zur Unterdrückung von metallinduzierter Aggregation des eluierten Proteins in jeder Fraktion eine EDTA-Konzentration von 5 mM eingestellt. Die Ermittlung von Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, erfolgte durch SDS-PAGE. Diese wurden vereinigt und zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Regenerierung der Säule erfolgte mit 40 mL Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und 40 mL Wasser.

#### **2.4.2.3 Größenausschlusschromatographie**

Die Größenausschlusschromatographie wurde zur Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Form verwendet. In der vorliegenden Arbeit war dies stets der letzte Schritt einer Proteinreinigung. Außerdem wurde sie im analytischen Maßstab für die Untersuchung von Protein-Protein-Komplexen verwendet.

Für die Chromatographie wurde ein ÄKTA-FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech (ÄKTA-Purifier; ÄKTA-Explorer) verwendet. Die für analytische Zwecke zur Verfügung stehenden Säulen waren die Superdex 75 HR 10/30 und die Superdex 200 HR 10/30 (24 mL Bettvolumen). Als präparative Säulen standen die Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade und die Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade (124 mL Bettvolumen) zur Verfügung. Das Superdex 75 Material besitzt einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa während das Superdex 200 Material einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa besitzt.

Zur Vorbereitung einer Chromatographie wurden die verwendeten Puffer sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 Minuten unter Rühren entgast. Die Äquilibration der analytischen Säulen erfolgte mit 40 mL Chromatographie-Puffer. Die Beladung mit maximal 500 µL Proteinlösung erfolgte durch eine Probenschleife. Zur Elution mit mindestens einem Säulenvolumen wurde eine Flussrate von 0,5 mL/min gewählt.

Entsprechend erfolgte die Äquilibration der präparativen Säulen mit 150 mL Chromatographie-Puffer. Auf diese Säulen wurden Proteinproben mit maximal 2 mL Volumen aufgetragen. Die Flussrate für präparative Säulen betrug 1 mL/min. Fraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionensammlers gesammelt und mit Hilfe von SDS-PAGE auf Proteingehalt und -reinheit analysiert.

Die Kalibrierung der Säulen erfolgte durch Proteine (Sigma Chemie GmbH, Reinheit > 95 %) mit bekannter Molekülgröße. Entsprechende Proteinlösungen von etwa 1 mg/mL wurden im Chromatographie-Puffer angesetzt und auf die Säule aufgetragen. Die Regeneration erfolgte durch Spülen mit einem Säulenvolumen an 0,5 M Natronlauge und mit Wasser. Die Säulen wurden in 20 % Ethanol gelagert.

#### **2.4.2.4 Ionenaustauschchromatographie**

Bei einer Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund unterschiedlicher Ionenladung und -verteilung. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Anionenaustauschchromatographien durchgeführt. Dafür wurden ResourceQ-Säulen mit einem Volumen von einem oder sechs mL verwendet.

Zur Durchführung der Chromatographie wurde ein ÄKTA-FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech (ÄKTA-Purifier; ÄKTA-Explorer) mit einem Gradientenmischer, basierend auf einem Zweipumpensystem, verwendet.

Zur Vorbereitung einer Chromatographie wurden die verwendeten Puffer sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 Minuten unter Rühren entgast. Die Proteinprobe wurde ebenfalls vor dem Auftragen zur Entfernung von Aggregaten sterilfiltriert (0,45 µm).

Bei der Durchführung der Chromatographie wurde das Protein mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die in 10 Säulenvolumen des Chromatographie-Puffers ohne Salz voräquilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Chromatographie-Puffer ohne Salz gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen, bis die Basislinie erreicht war. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min mit Hilfe eines Salzgradienten im Chromatographie-Puffer. Dabei wurden mit dem Fraktionensammler Fraktionen gesammelt und mit Hilfe von SDS-PAGE auf Proteingehalt und -reinheit analysiert. Die besten Fraktionen wurden vereint und bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde durch Spülen mit je 10 Säulenvolumen 0,5 M NaOH und Wasser regeneriert und in 20 % Ethanol gelagert.

### **2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde für die Analyse von Proteinen, Proteinmischungen und Protein-Protein-Komplexen verwendet. Dabei wurde ein spezielles Puffersystem (Fling & Gregerson, 1986) verwendet. Bei dieser Methode lagern sich SDS-Moleküle an das Protein und sorgen somit für eine negative Ladung. Die elektrophoretische Mobilität dieser Proteine wird daraufhin durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich somit annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins. Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau R250 sichtbar gemacht.

Für die Gelelektrophorese wurden Trenngele mit einer Größe von 8 x 5 cm und einer Dicke von 0,75 mm verwendet. Diese wurden erstellt, indem in eine Gelkammer aus Glasplatten mit Abstandhaltern und einer Gummidichtung 4,8 mL einer Trenngelmischung gefüllt wurden. Diese wurde mit 70 % Isopropanol überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 mL hatte folgende Zusammensetzung: 1,25 mL 4x Lower-Tris, 1,25 mL Wasser und 2,5 mL einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Diese Mischung wurde durch Zugabe von 4 µL TEMED und 40 µL 10 % (w/v) APS polymerisiert. Nach etwa 20 Minuten war die Reaktion abgeschlossen. Das 5 %ige Sammelgel mit einem Gesamtvolumen von 3 mL hatte folgende Zusammensetzung: 0,5 mL Acrylamid-Stammlösung, 0,75 mL 4x Upper-Tris und Wasser. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von TEMED und 10 % (w/v) APS (4 µL bzw. 40

µL) gestartet, woraufhin die Lösung auf das erstarrte Trenngel gegeben wurde. Ein Plastikstreifen mit Zähnen formte die Taschen des Gels. Das fertige gel wurde in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, nachdem die Gummidichtung entfernt worden war. Diese wurde daraufhin mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt.

Bevor die Proteinproben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden diese mit 5 µL 5x Auftragspuffer (reduzierend oder nicht reduzierend) versetzt, mit Wasser auf ein Volumen von 25 µL aufgefüllt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei 120 V und 30 mA durchgeführt. Ein Bromphenolblau-Marker im Auftragspuffer diente zum Nachverfolgen des Vortschritts der Elektrophorese. Nach etwa 2 Stunden hatte dieser die Unterkante des Gels erreicht. War dies geschehen, wurde die Gelkammer geöffnet, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel bis zur Trocknung in Aufbewahrungslösung gelagert.

#### 2.4.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm (nach Abzug der Eigenabsorption des verwendeten Puffers) durchgeführt. Dabei wurde das Lambert-Beerschen Gesetzes verwendet:

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

E: Extinktion

$\varepsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient

c: Konzentration (g/L)

d: Schichtdicke (cm) der Küvette

Zur Ermittlung der molaren Extinktionskoeffizienten wurde das *Online Tool* ProtParam des ExPASy-Servers (Gasteiger *et al.*, 2003) verwendet (siehe Tabelle 1). Bei diesem *Tool* werden die Extinktionskoeffizienten näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren der vollständig entfalteten Polypeptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989). Für Proteinkomplexe wurde die Summe der Extinktionskoeffizienten der Bestandteile des Komplexes verwendet.

Bei niedrigeren Proteinkonzentrationen und größeren Volumina wurde die Absorption in einer 500  $\mu\text{L}$  Quarzküvette im Ultrospec 2000 Spektralphotometer (Amersham Pharmacia) gemessen. Bei größeren Proteinkonzentrationen und kleineren Volumina erfolgte die Bestimmung der Absorption im NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

**Tabelle 1: Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm und Molmassen der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine.**

Protein	Molmasse [Da]	$\epsilon_{280}$ [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
Ac1	16.252	16.740
Ac1strepII	17.421	22.585
Ac1 $\Delta$ 148	15.235	17.085
Ac1 $\Delta$ 148strepII	16.332	22.243
strepIIAc1	17.350	22.585
strepIIAc1 $\Delta$ 148	16.333	22.585
Ac2	24.990	16.793
VEGF	12.187	22.960
VEGFstrepII	13.386	28.460

## 2.4.5 Konzentrierung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen wurde je nach Ausgangsvolumen der Probe eine der drei nachfolgend aufgeführten Methoden gewählt.

Bei allen drei Methoden wurde nach der Konzentrierung das Konzentrat filtriert (0,45  $\mu\text{m}$ , Einheit mit 4 mL oder 15 mL Gesamtvolumen) und durch Messung der Absorption bei 280 nm unter Verwendung des errechneten Extinktionskoeffizienten (siehe Tabelle 1) die exakte Proteinkonzentration bestimmt. Daraufhin wurde die Probe bei 4  $^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.5.1 Konzentrierung durch Ultrafiltration in der Zentrifuge

Für kleine Ausgangsvolumina (< 30 mL) wurde die Konzentrierung mittels Zentrifugation gewählt. Dazu wurde das Protein in einer Konzentratoreinheit (Millipore, Vivaspin) mit einer geeigneten Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die

Zentrifugation wurde zur Schonung des Proteins alle 7 min unterbrochen. Dabei wurde die Lösung mit einer Pipette gut durchmischt, um sehr hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden.

#### **2.4.5.2 Konzentrierung durch Ultrafiltration mit Druckluft**

Bei mittelgroßen Ausgangsvolumina (30-300 mL) wurde die Konzentrierung mittels Druckluft durchgeführt. Dazu wurde das Protein in die Amiconzelle gegeben, die daraufhin verschlossen, an die Stickstoffzufuhr angeschlossen und auf einen Magnetrührer gestellt wurde. Während der gesamten Konzentrierung, die bei 4 °C im Kühlraum erfolgte, wurde das Protein mit Hilfe des Magnetrührers und einer Rührvorrichtung in der Amiconzelle vorsichtig durchmischt.

#### **2.4.5.3 Konzentrierung durch Querstrom-Ultrafiltration**

Bei großen Ausgangsvolumina (> 300 mL) wurde das Protein mit Hilfe von Querstromfiltration konzentriert. Dazu wurde die Filtrationsapparatur im Kühlraum aufgebaut. In die zu konzentrierende Proteinlösung wurden zwei Schläuche gehängt. Durch den einen Schlauch wurde das Protein mit Hilfe einer Watson-Marlow-Pumpe (Watson-Marlow Pumps Group) durch einen Filter geleitet, der zwischen zwei Metallplatten gespannt war. In diesem Filter wurde das Protein durch Kapillare mit einer Membran, die eine Ausschlussgröße von 10 kDa hatte, geleitet. Durch eine Verengung des Schlauches hinter dem Filter wurde der Druck im Filter erhöht, so dass ein Teil der Flüssigkeit durch die Membranwand der Kapillare gelangte. Dieser Durchfluss wurde in ein separates Gefäß geleitet, während die restliche Flüssigkeit mit dem Protein zurück in das Vorratsgefäß geleitet wurde. Diese Apparatur wurde laufen gelassen, bis das gewünschte Volumen erreicht war.

#### **2.4.6 Western Blotting**

*Western Blotting* wurde zum Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch verwendet. Dabei wurde in drei Schritten vorgegangen. Zunächst wurde das Proteingemisch mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im zweiten Schritt wurde es durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt. Letztendlich wurde das gewünschte Protein auf der Membran in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben, durchgeführt, wobei jedoch das Trenngel nach erfolgter Elektrophorese für 20 min in Transferpuffer (20 % v/v Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt wurde. Für den Elektrotransfer wurden 4 Blätter in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektroblotapparatur gelegt. Als nächstes folgte das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Nitrocellulose-Membran sowie weitere 4 Blätter mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier. Auf diesen Stapel wurde die Graphit-Anodenplatte gesetzt. Der Elektrotransfer wurde für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Im Anschluss daran wurde die Nitrocellulose-Membran dreimal für jeweils 15 min in 10 mL PBS/T geschwenkt. Für den immunchemischen Nachweis über den *Strep*-Tag II wurden 10 µL eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats in 10 mL PBS/T gegeben und für 1 h zusammen mit der Membran geschwenkt. Ungebundenes Enzym wurde durch dreimaliges Waschen der Membran für 5 min mit je 10 mL PBS/T entfernt. Rekombinante Proteine wurden selektiv angefärbt, indem die Membran in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) getränkt wurde und in 20 mL AP-Puffer unter Zusatz von 10 µL NBT (75 mg/mL in 70 % DMF) und 60 µL BCIP (50 mg/mL in DMF) inkubiert wurde (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran schließlich zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

## 2.5 Biophysikalische Methoden

### 2.5.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Experimente mit dynamischer Lichtstreuung wurden durchgeführt, um die Homogenität und Dispersität von Proteinlösungen zu untersuchen (Nobmann *et al.*, 2007). Mit Hilfe dieser Methode kann die Verteilung von Partikelgrößen in Lösungen gemessen werden. Dabei lassen sich die hydrodynamischen Radien der in einer Lösung enthaltenen Teilchen aus dem Streuverhalten von eingestrahlttem Licht und der Fluktuation der Lichtintensität bei fixiertem Detektionswinkel errechnen, wenn die Viskosität bekannt ist. Dabei wird jedoch eine globuläre Struktur der Partikel angenommen, wodurch es zu Ungenauigkeiten kommen kann. Die Molekulargewichte der Proteine ließen sich mit Hilfe der Gerätesoftware und einer im Programm enthaltenen Datenbank aus den Partikelgrößen ermitteln.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Gerät Zetasizer Nano-S verwendet. Zur Vorbereitung der Messung wurden die Proteinproben sterilfiltriert (SpinX

Filter, 0,45  $\mu\text{m}$ ). Die Messung selbst erfolgte in einer 50  $\mu\text{l}$ -Quarzküvette, wobei jede Messung 10 Wiederholungen mit anschließender Mittelung der Resultate beinhaltete. Die Geräte-Software sorgte für eine Volumenkorrektur der gemessenen Partikelgrößenverteilung, was wichtig war, da größere Partikel größere Signalstärken erzeugen. Somit ließ sich der Reinheitsgrad von Proteinlösungen für die Kristallisation bestimmen. Für die Kristallisation sind monodisperse Lösungen erforderlich. Aggregate lassen sich anhand dieser Methode leicht identifizieren, da diese ein unverhältnismäßig großes Signal geben.

### 2.5.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie zur Bestimmung von Proteinmassen wurde mit einem ESI-Q-TOF-Massenspektrometer (ESI-Q-TOF = *Electron Spray Ionisation - Quadrupol - Time of Flight*) (Strupat, 2005) mit einer Micro-ESI-Quelle durchgeführt. Dabei wurde das Gerät freundlicherweise von Walter Stelzer am Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere, TU München bedient. Bei diesem Verfahren werden Proteinmoleküle in die Gasphase überführt und als Bestandteil der Analytlösung (mit Acetonitril als Lösungsmittel) unter Atmosphärendruck aus einer Kapillare kontinuierlich mit einer Flussrate von 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  in ein elektrisches Feld injiziert (*Spray*), wobei kleine geladene Tröpfchen entstehen. Es entstehen stark geladene Mikrotröpfchen, die statistisch nur noch je ein Proteinmolekül enthalten, da das Lösungsmittel stetig verdampft. Die Analyse der geladenen Proteinmoleküle erfolgt entsprechend ihres Molmasse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) im Hochvakuum eines Quadrupol-Flugzeitmassen-Spektrometers. Da sich eine Verteilung mehrfach geladener Ionen bildet, ist eine Rekonstruktion des einfach geladenen Molekülspektrums und die Ableitung der resultierenden Molekülmassen mit Hilfe des Computerprogramms (MassLynx Software 4.0, Waters S.A.S.) erforderlich.

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese auf eine Konzentration von 0,1 mg/mL eingestellt. Außerdem wurde die 100  $\mu\text{L}$  Probe zweimal gegen 1 l Massenspektrometrie-Puffer (20 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 6,6) dialysiert. Dazu wurden Mikrodialysiereinheiten (Millipore, 10 kDa MWCO) verwendet. Im letzten Schritt wurden die Proben 1:1 mit 100% Methanol verdünnt.

## 2.6 Proteinkristallographische Methoden

### 2.6.1 Kristallisation von Proteinen

#### 2.6.1.1 Suche nach Kristallisationsbedingungen

Zur Ermittlung geeigneter initialer Kristallisationsbedingungen für ein Protein oder einen Protein-Protein-Komplex wurde das Prinzip des *Sparse Matrix Sampling* (Jancarik *et al.*, 1991) angewandt. Dabei wurde entweder der *Basic Screen* oder der *Vector Screen* verwendet. Beide *Screens* bestehen aus 480 Bedingungen, die am Lehrstuhl für Biologische Chemie zusammengestellt wurden.

Beim *Basic Screen* setzen sich diese aus verschiedenen kommerziell erhältlichen *Screens*, wie dem *Index Screen*, dem *PEG/Ion Screen* oder dem *Crystal Screen* von Hampton Research, zusammen. Auf diese Weise kommt es zum Teil zu redundanten Bedingungen. Der *Vector Screen* ist fortschrittlicher, da er redundante Bedingungen vermeidet und in Bezug auf Kristallisationserfolg optimiert wurde. Als Grundlage diente die BDP, eine Datenbank aller Kristallisationsbedingungen der Kristalle, deren Strukturen in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt sind (Peat *et al.*, 2005). Es wurde angenommen, dass eine Bedingung, die häufiger in der BDP vorkommt, auch erfolgreicher ist. Die Bedingungen wurden nach Ähnlichkeit überprüft und mit Bedingungen aus kommerziellen *Screens* verglichen, die daraufhin in den *Vector Screen* aufgenommen wurden. Die erfolgreicheren Bedingungen, also die Bedingungen mit mehr Treffern in der BDP, kamen auf Platte 1 des *Vector Screens*. Mit abnehmendem Erfolg der Bedingungen wurden diese auf die übrigen Platten des *Vector Screens* verteilt. Auf diese Weise gab es keine redundanten Bedingungen und alle Bedingungen haben sich bereits in der Vergangenheit als erfolgreich erwiesen.

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen in 96well CrystalQuick-Platten der Firma Greiner BioOne durchgeführt. Dazu wurden mit Hilfe eines Kristallisationsroboters (FreedomEvo) 0,1-0,2  $\mu\text{L}$  einer konzentrierten Proteinlösung mit 0,1  $\mu\text{L}$  des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 100  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung äquilibriert. Die Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear) verschlossen und der Kristallisationsverlauf mit Hilfe eines RockImagers über mehrere Monate bei 20 °C oder bei 4°C verfolgt.

### 2.6.1.2 Optimierung von Kristallisationsbedingungen

In dem Fall, dass im initialen *Sparse- Matrix- Screen* erfolgsversprechende Bedingungen identifiziert werden konnten, wurden diese in *Fine- Screens* optimiert. Diese erfolgten auf 24well CrysChem Platten durch Mischen von 1-2  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 1-2  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung und Äquilibrierung gegen 1 mL Reservoirvolumen. Bei den *fine-screens* wurde ausschließlich mit der Dampfdiffusionsmethode mit hängenden Tropfen gearbeitet. Dabei wurden die Tropfen auf einem silanisierten Deckgläschen gemischt, dieses umgedreht auf dem Reservoir platziert und mit einer Öl/Vaseline-Mischung abgedichtet. Die initialen Bedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Proteinkonzentration; Konzentration des Fällungsmittels; pH-Wert; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur) optimiert. Unter Umständen war eine zusätzliche Suche nach einem geeigneten Additiv und dessen optimaler Konzentration erforderlich. In diesem Fall wurden 0,5-1  $\mu\text{L}$  Additiv (*Additive Screen*, Hampton Research) direkt zum Proteintropfen hinzugegeben.

### 2.6.2 Kryokristallographie

Kryokristallographie wurde zur Verringerung von Strahlenschäden des Kristalls durch die hochenergetische Röntgenstrahlung eingesetzt. Dazu wurden Diffraktionsdaten stets bei einer Temperatur von 100 K gesammelt. Damit das geordnete Kristallgitter beim Einfriervorgang nicht durch die Bildung von Eis zerstört wird, musste ein geeignetes Gefrierschutzmittel wie Glycerin, PEG200 oder Ethylenglycol ermittelt werden. Dazu wurde die Reservoirlösung der entsprechenden Kristallisationsbedingung mit steigenden Konzentrationen des Gefrierschutzmittels versetzt. Ein „*Cryo-Loop*“ mit diesem Gemisch wurde sodann im Röntgenstrahl auf die Bildung von Eiskristallen untersucht. Diese ergeben ein sehr charakteristisches Beugungsbild und sind somit leicht zu erkennen. Die niedrigste noch eisfreie Konzentration an Gefrierschutzmittel wurde für die Röntgenbeugungsexperimente verwendet.

Beim Einfriervorgang wurde der Kristall mit Hilfe eines „*Cryo-Loops*“, der aus einem magnetischen Halter und einer kleinen Schlaufe aus synthetischer Faser besteht, aus dem Kristallisationstropfen geholt und in einen Tropfen aus Reservoirlösung und Gefrierschutzmittel überführt. Alternativ wurde das Gefrierschutzmittel direkt zum Kristallisationstropfen hinzugegeben. Anschließend wurde der Kristall im „*Cryo-Loop*“ entweder direkt auf dem Goniometerkopf der Röntgenapparatur befestigt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Beim Befestigen auf dem Goniometerkopf wurde der Stickstoffstrom

des Stickstoff-Kühlaggregates, der den Kristall während der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen auf 100 K hält, mit einer Karte unterbrochen und nach dem Befestigen schnell wieder freigegeben, so dass der Kristall schockartig eingefroren wurde. Entsprechend wurde der Kristall beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff durch ein schnelles Überführen in diesen schockartig eingefroren.

### 2.6.3 Sammlung von Röntgenbeugungsdatensätzen

Röntgenbeugungsbilder wurden entweder am Röntgendiffraktometer im Lehrstuhl für Biologische Chemie oder am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY) in Berlin aufgenommen. Die Messungen am Lehrstuhl erfolgten mit monochromatisierter  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) eines Drehanodengenerators. Beugungsreflexe wurden auf einer mar345 Imaging Plate detektiert. Da aufgrund einer geringeren Intensität der Röntgenstrahlung die Auflösung der aufgenommenen Bilder nicht so groß ist, wurde diese Röntgenquelle hauptsächlich verwendet, um geeignete Gefrierschutzbedingungen zu identifizieren und um die Qualität der Kristalle zu überprüfen. Hochaufgelöste Datensätze wurden hingegen am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY) aufgenommen.

Die Kristallorientierung, Mosaizität und die Raumgruppe wurden vor der Aufnahme eines Datensatzes anhand mehrerer bei verschiedenen Winkeln aufgenommener Einzelbilder bestimmt. Anhand dieser Informationen konnte dann die optimale Strategie für die Aufnahme des Datensatzes bestimmt werden. Bei der Strategie wurde darauf geachtet, dass eine größtmögliche Vollständigkeit der zu sammelnden Reflexe erreicht wurde.

Am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung war es möglich, die Wellenlänge der Röntgenstrahlung einzustellen. Standardmäßig wurde bei einer Wellenlänge von  $0,9184 \text{ \AA}$  gemessen, da hier die Röntgenstrahlung die größte Intensität hat. Für Phasierung mittels Schwefel-SAD wurde eine Wellenlänge von  $1,8$  oder  $2,0 \text{ \AA}$  gewählt, um ein stärkeres Signal für den Schwefel zu erhalten.

Um spezifische UV-induzierte Strahlenschäden für die Phasierung auszunutzen (UV-RIP (Nanao & Ravelli, 2006)), wurde nach Aufnahme eines Datensatzes an der Messstation 14.1 am BESSY, Berlin der Kristall im Stickstoffstrom für fünf Minuten mit einem UV-Laser ( $266 \text{ nm}$ ,  $6 \text{ kHz}$ ,  $2 \text{ mW}$ , microchip LASER, TEEM Photonics, Grenoble) bestrahlt und anschließend ein weiterer Datensatz aufgenommen. Zur Verminderung zusätzlicher röntgen-

induzierter Strahlenschäden wurde dabei jeweils eine möglichst geringe Intensität der Röntgenstrahlung verwendet.

## 2.6.4 Datenauswertung

Die Kristallorientierung der Elementarzelle und die Raumgruppe wurde mit Hilfe der Programme MOSFLM (Leslie, 1992) oder XDS (Kabsch, 1993) bestimmt. Diese Programme wurden auch zur Integration der Reflexintensitäten verwendet. Für die weitere Analyse der Daten wurden die Programme des CCP4 Programmpakets (Bailey, 1994) verwendet. In einigen Fällen wurde das *Online-tool* Auto-Rickshaw (Panjikar *et al.*, 2005) für die Lösung der Struktur verwendet. Dieses *tool* verwendet die prozessierten und skalierten Daten, um mit Hilfe von unterschiedlichen Programmen die Struktur zu lösen und bereits einen Teil des Modells zu bauen.

## 2.6.5 Phasenbestimmung

### 2.6.5.1 Phasierung mittels Molekularem Ersatz

Die Phasen des Hecpidin-bindenden Anticalins Ac3 konnten mit Hilfe von Molekularem Ersatz bestimmt werden. Bei der Phasierung des VEGF-bindenden Anticalins Ac1 wurde diese Methode ohne Erfolg ausprobiert. Generell wurden bei der Phasierung gesammelter Beugungsdaten mit Hilfe von Molekularem Ersatz die Programme Molrep (Murshudov *et al.*, 1997) und PHASER (McCoy, 2007) verwendet. Dabei wurde zunächst die benötigte Anzahl an Suchmolekülen ermittelt, indem die Zahl der Moleküle pro Einheitszelle mit Hilfe des Matthews-Koeffizienten bestimmt wurde. Dieser Koeffizient beschreibt das Verhältnis von Zellvolumen zur Masse in der Zelle und liegt typischerweise im Rahmen von 1,6-3,6 Å<sup>3</sup> / Dalton (Matthews, 1968). Die entsprechende Anzahl an Suchmolekülen wurde dann verwendet, um mit den Programmen mehrere Rotations- und Translationssuchen im Patterson-Raum gegen die integrierten und skalierten Daten durchzuführen (McCoy *et al.*, 2005). Anhand der vom Programm berechneten *z-Scores* und LL-gains hoben sich die relevanten Lösungen deutlich vom Hintergrund ab.

Die Struktur des Anticalins Ac3 in Komplex mit Hecpidin konnte mit Hilfe der Struktur des Wildtyp-Lcn2 (PDB ID code: 1DFV chain B) als Modell phasiert werden. Diese Methode der Phasierung wurde auch für den Komplex aus Ac1 und VEGF versucht. Dabei wurden unterschiedliche Modelle und Kombinationen von Modellen ausprobiert. Als Modell für

VEGF wurde ausschließlich die VEGF(8-109)-Struktur mit der PDB-ID 1BJ1 verwendet, welche auch gefunden wurde. Die Phasen dieser Teilstruktur reichten jedoch nicht aus, um die komplette Struktur zu lösen. Für das Anticalin wurden die beiden in der Proteindatenbank hinterlegten Lcn1-Strukturen (PDB ID code 1XKI und 3EYC) als Modelle verwendet. Des Weiteren wurden alle in der Proteindatenbank hinterlegten Anticalinstrukturen für den Molekularen Ersatz herangezogen. Zusätzlich wurden auch Überlagerungen von Lcn1-Strukturen und Anticalinstrukturen durchgeführt. Dabei wurden dann die überlagernden Bereiche für den Molekularen Ersatz verwendet, während die variierenden Bereiche aus der Struktur herausgeschnitten wurden. Um die Anzahl an Ergebnissen zu minimieren, wurde der erlaubte Abstand der erhaltenen Lösungen vom Hintergrund variiert. Die Zulassung einer bestimmten Anzahl an Struktur-Überlagerungen (*Clashes*) erlaubte Lösungen, bei denen sehr flexible Bereiche einer Umlagerung im Kristall unterliegen und somit mehrere Moleküle des verwendeten Suchmodells miteinander „kollidieren“. Beim Programm Phaser wurde zusätzlich der Wert für die Sequenzidentität zwischen Modell und Zielstruktur variiert (Modulierung der Stringenz bei Rotations- und Translationssuche).

#### **2.6.5.2 Phasierung mittels Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel *Single-Wavelength Anomalous Diffraction* (MRSAD)**

Bei der Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel *Single-Wavelength Anomalous Diffraction* (MRSAD) werden die Informationen aus dem Suchmodell verwendet, um die Schwefelpositionen zu lokalisieren. Die Phasen ergeben sich dann ausschließlich aus dem anomalen Signal der Schwefelatome. Beim herkömmlichen SAD besteht die Problematik, dass das anomale Signal des Schwefels sehr schwach ist. Somit müssen die Daten mit einer sehr großen Multiplizität aufgenommen werden. Dennoch kann es bei der Phasierung zu Problemen kommen, wenn die Schwefelpositionen nicht gefunden werden. Daher ist es sinnvoll, jegliche Information über die Struktur zu nutzen. Bei der Struktur des Ac1/VEGF-Komplexes war es nicht möglich, die Phasen ausschließlich mit Molekularem Ersatz zu bestimmen. Hier war es nötig, die Struktur eines VEGF-Dimers für das MRSAD zu verwenden, um zumindest einen Teil der Schwefelpositionen vorzugeben. Aus Vorversuchen war bekannt, dass das VEGF-Dimer beim Molekularen Ersatz gefunden wird.

Ein Vorteil von MRSAD liegt auch darin, dass die resultierende Struktur nicht weiter vom Suchmodell beeinflusst wird. Daher wurde die Struktur des Ac3/Hepcidin-Komplexes mit Hilfe dieser Methode gelöst, obwohl die Phasierung auch mit Molekularem Ersatz allein

möglich war. Für die Phasierung mittels MRSAD wurden die Beugungsdaten bei einer Wellenlänge von 1,8 oder 2,0 Å gemessen, um ein stärkeres Signal für den Schwefel zu erhalten. Die prozessierten und skalierten Daten wurden dann über die MRSAD-Funktion von AutoRickshaw (Panjikar *et al.*, 2009) ausgewertet und somit die Struktur gelöst.

### 2.6.5.3 Phasierung mittels UV-induzierter Strahlenschäden (UV-RIP)

Die Phasierung des Datensatzes für den Ac1/VEGF-Komplex wurde zusätzlich mit freundlicher Unterstützung von Dr. Uwe Müller (BESSY, Berlin) mit der neuartigen UV-RIP-Methode (Nanao & Ravelli, 2006) durchgeführt.

## 2.6.6 Modellbau und Verfeinerung

War die Phasierung erfolgreich (Abschnitt 2.6.5), konnte eine erste Elektronendichte berechnet werden. In diese wurde das Atommodell mit Hilfe des Programms COOT (Emsley & Cowtan, 2004) eingepasst. War dies geschehen, wurde das Modell verfeinert. Im Verlauf dieses Schrittes wurde eine Energieminimierung, „*Simulated Annealing*“ und Temperaturfaktor-Optimierung mit Hilfe des Programms REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) durchgeführt. Dabei wurde nach jeder dieser Verfeinerungsrunden mit REFMAC5 das neue Modell visuell in COOT inspiziert und manuell optimiert. Ziel dieser Verfeinerung war die Minimierung des kristallographischen R-Faktors (2). Dieser Wert diente zugleich zur Fortschrittskontrolle der Verfeinerung.

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|} \quad (2)$$

Ein Test-Satz, bestehend aus 5% der Reflexe, wurde bei der Verfeinerung nicht berücksichtigt. Diese Reflexe, die vor Beginn des Prozesses ausgewählt worden waren, ermöglichten die Brechung des sogenannten freien R-Faktors (Brunger, 1992), der nicht mehr als 5 % größer als der kristallographische R-Faktor sein sollte. Durch diesen Wert kann auch eine Überanpassung des Modells an die gemessenen Daten erkannt werden.

Konnte der R-Faktor in den Verfeinerungsrunden nicht weiter gesenkt werden, wurden mit Hilfe von REFMAC5 Wassermoleküle in die Elektronendichte eingebaut. Daraufhin wurde das Modell inklusive der Wassermoleküle weiter bis zur Konvergenz verfeinert. Dabei

wurden unter Umständen manuell Wassermoleküle entfernt oder hinzugefügt. Außerdem wurden individuelle Temperaturfaktoren verfeinert.

### 2.6.7 Strukturanalyse und graphische Darstellung

Die Qualitätskontrolle der modellierten Strukturen erfolgt mit Hilfe der Programme PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und Molprobrity (Chen *et al.*, 2010). Diese Programme gaben Qualitätskriterien wie Bindungslängen und  $\omega$ -winkel (z.B.  $\phi/\psi$ -Winkel, Planarität von aromatischen Ringen) wieder. Wichen diese Parameter von Standardwerten ab, wurden entsprechende Aminosäuren anhand der Elektronendichte nochmals überprüft und gegebenenfalls mit Coot nachbearbeitet.

Die in dieser Arbeit dargestellten Grafiken von Proteinstrukturen wurden mit Hilfe des Programms PyMOL (DeLano, 2002) erstellt. Sekundärstrukturelementen wurden jedoch mit Hilfe des Programms DSSP (Kabsch & Sander, 1983) zugeordnet. Überlagerungen von Proteinstrukturen – in der Regel anhand definierter  $c_{\alpha}$ -Atompositionen – erfolgten mit Hilfe der „*pair\_fit*“-Funktion in PyMOL. Interaktionsflächen wurden mit Hilfe von Contact im CCP4 Programmpaket (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) oder vom PISA-Internetdienst (Krissinel & Henrick, 2007) ermittelt. Elektrostatische Oberflächen wurden mit Hilfe des PyMOL *plugins* APBS (Baker *et al.*, 2001) berechnet und anschließend mit PyMOL dargestellt. Zur Nachbearbeitung und Beschriftung von Abbildungen und deren Konvertierung kamen die Programme Adobe Illustrator und Adobe Photoshop zur Anwendung. Topologiediagramme wurden mittels PDBsum (Laskowski *et al.*, 2005) erstellt mit TopDraw (Bond, 2003) und Adobe Photoshop überarbeitet.

## 2.7 Computerprogramme und Datenbanken

DNA- und Proteinsequenz-Analyse sowie Planung von Oligo-desoxynukleotiden für die PCR erfolgte mit Hilfe der Programme MATCHER, PRIMERSEARCH, REMAP, RESTRICT, SHOWSEQ und TRANSEQ aus dem EMBOSS-Programmpaket (Rice *et al.*, 2000) (Tabelle 2).

Gele aus der SDS-PAGE wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) digitalisiert und das erhaltene Bild nur hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Für die Strukturaufklärung wurden die Programme XDS, SHARP, Phaser, Mosflm und das Programmpaket CCP4 verwendet. Der Modellbau erfolgte stets mit Hilfe von Coot. Die grafischen Abbildungen der Proteinstrukturen wurden mit PyMOL erstellt.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete kristallographische Software.**

Programm	Version	Referenz
CCP4	5.0.1	(Bailey, 1994)
Coot	0.5.2	(Emsley & Cowtan, 2004)
DSSP	-	(Kabsch & Sander, 1983)
Molrep	9.2	(Vagin & Teplyakov, 1997)
Mosflm	7.0.7	(Leslie, 1992)
Phaser	1.3.3	(McCoy, 2007)
PyMOL	0.99rc6	(DeLano, 2002)
Refmac	5.5.0072	(Bailey, 1994)
SHARP	BESSY, Berlin	(de La Fortelle & Bricogne, 1997)
SHELXD	BESSY, Berlin	(Sheldrick <i>et al.</i> , 1993)
XDS	BESSY, Berlin	(Kabsch, 1993)

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden aus folgenden im Internet zugänglichen Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">http://www.rcsb.org/pdb</a>
PISA	<a href="http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver">http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver</a>
PDBsum	<a href="http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/">http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/</a>
ExPASy Server	<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>
CLUSTAL W	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr">http://npsa-pbil.ibcp.fr</a>
Restriktionsanalysen	<a href="http://www.fermentas.com/en/home">http://www.fermentas.com/en/home</a> <a href="http://www.neb.com/nebecomm/default.asp">http://www.neb.com/nebecomm/default.asp</a>

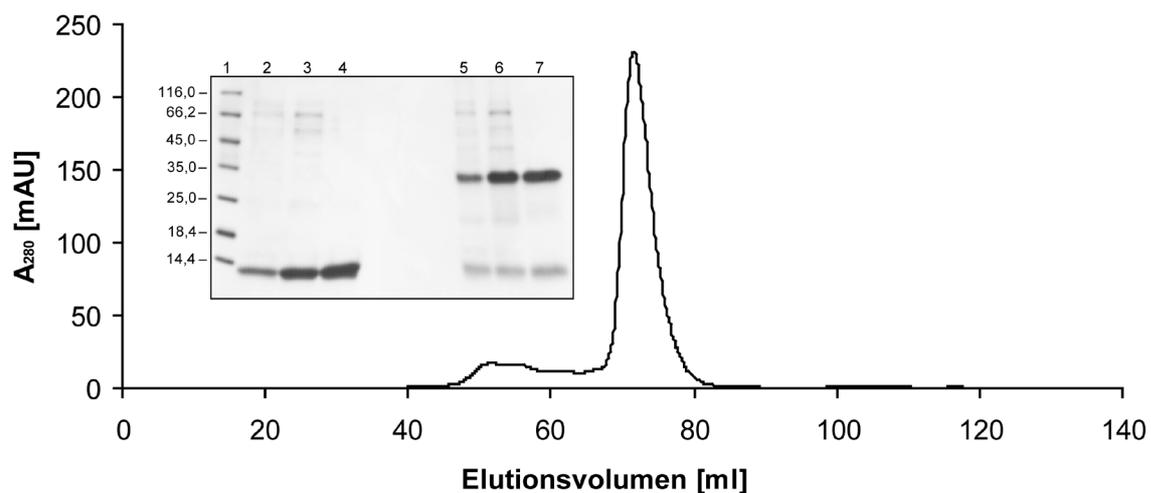
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Strukturanalyse des Ac1/VEGF-Komplexes

##### 3.1.1 Bakterielle Produktion, Rückfaltung und Reinigung des humanen VEGF

###### 3.1.1.1 VEGF(8-109)

Für die bakterielle Produktion und Rückfaltung des verkürzten Fragments VEGF(8-109) wurde ein publiziertes Protokoll verwendet, das schon für die Kristallisation und Strukturanalyse des rekombinanten VEGFs verwendet wurde (Christinger *et al.*, 1996). Dabei wird das VEGF-Fragment durch Dialyse bzw. schrittweises Entfernen von Harnstoff rückgefaltet. Das in den ersten beiden Dialyseschritten enthaltene Cystein verhindert eine zu frühe Ausbildung der Disulfidbrücken, die eine korrekte Faltung verhindert hätten.



**Abbildung 3: Rückfaltung und Reinigung des VEGF(8-109).** Größenausschlusschromatographie von VEGF(8-109) (Superdex 75 HiLoad 16/60) mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer und Analyse durch reduzierende 12 % SDS-PAGE; Spur 1: Proteinmarker, Größen in kDa; Spuren 2 und 5: 7 µg VEGF(8-109) nach der Rückfaltung; Spuren 3 und 6: 7 µg VEGF(8-109) nach der Anionenaustauschchromatographie; Spuren 4 und 7: 7 µg VEGF(8-109) nach der Gelfiltration; Die Spuren 2-4 sind unter reduzierenden Bedingungen und die Spuren 5-7 unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen.

Die Ausbeuten dieses Verfahrens waren mit etwa 225 mg rückgefaltetem Protein von etwa einem Gramm ungefaltetem Protein pro Liter Bakterienkultur sehr groß, und das rückgefaltete Protein war bereits relativ rein (Abbildung 3). Sowohl Anionenaustauschchromatographie als

auch Gelfiltration entfernten Verunreinigungen mit kleinerem und größerem Molekulargewicht. Nach diesen beiden Reinigungsschritten betrug die Ausbeute 15,7 mg VEGF(8-109) pro Liter Bakterienkultur.

Durch reduzierende Bedingungen in der SDS-PAGE erhält man eine Bande für das gewünschte Protein mit einer Größe von 12,20 kDa ohne Verunreinigungen (Abbildung 2). Führt man jedoch eine SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen durch, so erhält man eine Hauptbande zwischen 25 und 35 kDa, obwohl das Homodimer eine Größe von 24,40 kDa hat. Die Abweichung ist wahrscheinlich auf Geleffekte zurückzuführen. Da das VEGF-Dimer ein längliches Protein ist, wandert es nicht so weit wie runde Proteine mit gleichem Molekulargewicht. Zudem war auch eine schwache Bande auf Höhe des monomeren Proteins zu erkennen. Da dieses Protein zusammen mit dem Homodimer in einem *Peak* von der Gelfiltrationssäule eluierte, deutete es darauf hin, dass sich bei einem Teil der VEGF-Dimere die intermolekularen Disulfidbrücken nicht ausgebildet haben, so dass es sich um nichtkovalente Dimere handelt.

### 3.1.1.2 VEGF(8-109)strepII

Zur leichteren Reinigung des humanen VEGF(8-109) wurde es mit einem C-terminalen *Strep*-tag II produziert. Die Sequenz für das Protein lag im Plasmid pET11c vor (Studier *et al.*, 1990). Die bakterielle Produktion und Rückfaltung mit C-terminalem *Strep*-tag II (Voss & Skerra, 1997) erfolgte wie die Produktion und Rückfaltung der Version ohne Affinitätsanhängsel (Abschnitt 3.1.1.1). Diese Version wurde produziert, um den Komplex aus Anticalin und VEGF mit Hilfe des Affinitätsanhängsels unter schonenden Bedingungen zu reinigen. Das rückgefaltete VEGF<sub>(8-109)</sub>strepII wurde zunächst durch Anionenaustauschchromatographie vorgereinigt und dann direkt mit dem Periplasmaextrakt des Ac1 ohne Affinitätsanhängsel (A) vermischt (Abschnitt 3.1.2). Der entstandene Komplex wurde schließlich durch SA-Chromatographie und Gelfiltration isoliert (Abschnitt 2.4.2.1 und 2.4.2.3).



Affinitätsanhängsels sowohl die Fähigkeit, Kristalle zu bilden, beeinflusst, als auch deren Vermögen, Röntgenstrahlen zu beugen (Bucher *et al.*, 2002). Außerdem wurden Anticalinversionen mit unterschiedlichen N- und C-terminalen Deletionen konstruiert, um flexible Bereiche zu eliminieren (Abbildung 4). Dazu wurden die Kristallstrukturen des Wildtyp Lcn1 herangezogen (Breustedt *et al.*, 2009; Breustedt *et al.*, 2005). Bereiche, die in diesen Strukturen nicht sichtbar sind, galten als flexibel.

Alle Anticalinversionen mit einem C-terminalen Tag wurden auf pASK75 kloniert, während alle Anticalinversionen mit N-terminalem Tag auf pASK-IBA4 (IBA GmbH, Göttingen) kloniert wurden. Zudem wurde Ac1 auch gänzlich ohne Affinitätsanhängsel produziert. In diesem Fall wurde das Anticalin mit VEGF(8-109)strepII komplexiert und als Komplex gereinigt, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

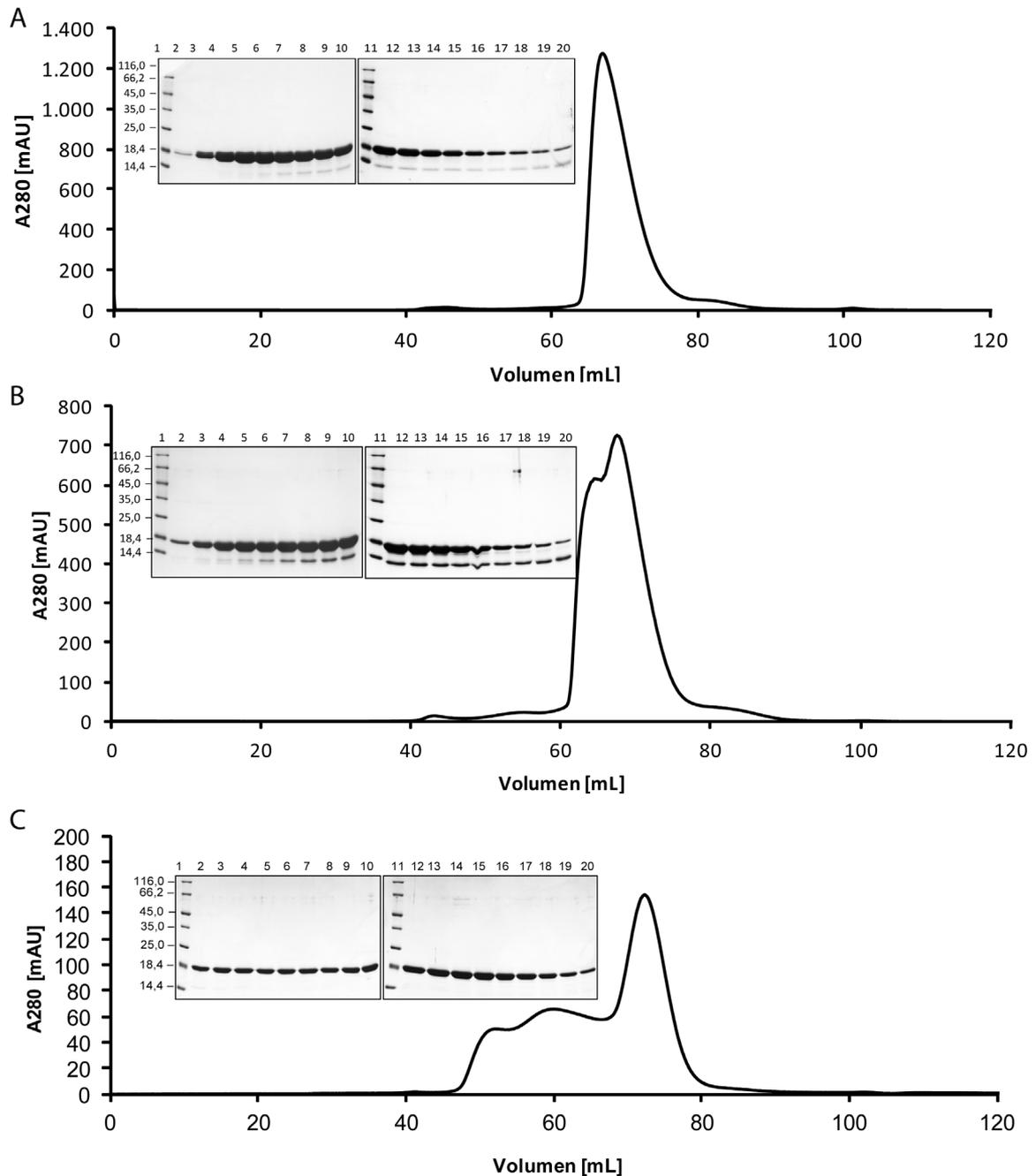
**Tabelle 3: In dieser Arbeit konstruierte und verwendete Versionen von Ac1.** Die Nomenklatur ist wie folgt: Ac1 hat 166 Aminosäuren, wobei in dieser Arbeit standardmäßig die ersten 4 und die letzten 10 fehlen. Ac1 umfasst also die Aminosäuren 5-156. Befindet sich rechts vom Ac1 ein  $\Delta$  mit einer Zahl, so sind alle Aminosäuren am C-Terminus ab dieser Zahl deletiert.  $\Delta 148$  bedeutet, dass alle Aminosäuren ab Position 148 deletiert sind. Es fehlen also gegenüber der Standardversion 9 Aminosäuren am C-Terminus. Befindet sich links vom Ac1 ein  $\Delta$  mit einer Zahl, so ist die entsprechende Anzahl an Aminosäuren am N-Terminus gegenüber der Standardversion deletiert.  $\Delta 2$  bedeutet also, dass die ersten 6 Aminosäuren fehlen.

Anticalin	Beschreibung (Aminosäuren)
Ac1	5-157
Ac1 $\Delta 148$	5-147
Ac1strepII	5-157 + C-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepIIAc1	5-157 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepIIAc1 $\Delta 148$	5-147 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepII $\Delta 2$ Ac1	7-157 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepII $\Delta 2$ Ac1 $\Delta 148$	7-147 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepII $\Delta 7$ Ac1	12-157 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
strepII $\Delta 7$ Ac1 $\Delta 148$	12-147 + N-terminaler <i>Strep</i> -tag II
His <sub>6</sub> $\Delta 1$ Ac1	6-157 + N-terminaler His <sub>6</sub> Tag
His <sub>6</sub> $\Delta 1$ Ac1 $\Delta 148$	6-147 + N-terminaler His <sub>6</sub> Tag
Ac1His <sub>6</sub>	5-157 + C-terminaler His <sub>6</sub> Tag

### 3.1.2.2 Reinigung der verschiedenen Ac1-Versionen

Tabelle 3 zeigt die in dieser Arbeit eingesetzten Ac1-Versionen. Bei der Reinigung wurden drei Gruppen von Ac1-Versionen unterschieden: Versionen mit *Strep*-tag II, Versionen mit His<sub>6</sub>-Tag und Versionen ohne Affinitätsanhängsel. Versionen mit dem *Strep*-tag II wurden im ersten Schritt durch SA-Chromatographie gereinigt, während Versionen mit dem His<sub>6</sub>-Tag im ersten Schritt durch IMAC gereinigt wurden. Der zweite und abschließende Reinigungsschritt war in beiden Fällen eine Gelfiltration. Auf diese Weise konnten die Versionen strepIIAc1, strepIIAc1Δ148 und His<sub>6</sub>Δ1Ac1 gereinigt werden. Abbildung 5 zeigt die entsprechenden Chromatogramme der Gelfiltrationen sowie die SDS-Polyacrylamidgele. Die Version strepIIAc1 eluierte als einzelner nicht ganz symmetrischer *Peak* von der Gelfiltrationssäule. Die SDS-PAGE zeigt außer der Hauptbande für das Protein, das eine Größe von 17,4 kDa hat, eine zweite Bande für ein kleineres Protein. Die SDS-PAGE der Version strepIIAc1Δ148, die ein Molekulargewicht von 16,3 kDa hat und als Doppelpeak von der Gelfiltrationssäule eluierte, weist eine ähnliche Verunreinigung auf. Die Verunreinigung bei diesen beiden Versionen wurde nicht weiter berücksichtigt, da das Anticalin anschließend mit VEGF(8-109) komplexiert wurde und in Form des Komplexes erneut durch Gelfiltration gereinigt wurde. Dabei reichte der Größenunterschied zwischen Komplex und Verunreinigung aus, um beide voneinander zu trennen.

His<sub>6</sub>Δ1Ac1 eluierte als symmetrischer *Peak* von der Gelfiltrationssäule. Allerdings eluierte auch eine relativ große Menge an Verunreinigungen mit verringerter Retentionszeit von der Säule. Deren *Peaks* überlagerten sogar mit dem *Peak* von His<sub>6</sub>Δ1Ac1. In der SDS-PAGE waren jedoch keine Verunreinigungen zu erkennen. Die einzige Bande entspricht der 17,0 kDa Version His<sub>6</sub>Δ1Ac1. Die Verunreinigung durch die Überlagerung der *Peaks* in der Gelfiltration war somit so gering, dass sie in der SDS-PAGE nicht nachweisbar war. Versionen ohne Affinitätsanhängsel (Ac1 und Ac1Δ148) wurden in Komplex mit VEGF(8-109) mit C-terminalem *Strep*-tag II gereinigt (Abschnitt 3.1.2.3).



**Abbildung 5: Reinigung der Anticaline strepIIAcI (A), strepIIAcIΔ148 (B) und His<sub>6</sub>Δ1AcI (C).** Dargestellt sind die Chromatogramme der abschließenden Gelfiltration (Superdex 75 HiLoad 16/60, 120 mL Bettvolumen) mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer sowie die Analyse durch reduzierende 12 % SDS-PAGE. Bei den Gelen sind die Beschriftungen der Markerbanden in kDa. Das Protein wurde in 1 mL-Fractionen gesammelt. Die Spuren sind wie folgt belegt: (A) Spur 1 und 11: Proteinmarker, Spuen 2-10 und 12-20: 63 mL bis 81 mL; (B) Spur 1 und 11: Proteinmarker, Spuren 2-10 und 12-20: 60 mL bis 78 mL; (C) Spur 1 und 11: Proteinmarker, Spuren 2-10 und 12-20: 61 mL bis 79 mL.

### 3.1.2.3 Komplexbildung mit VEGF und Reinigung des Komplexes

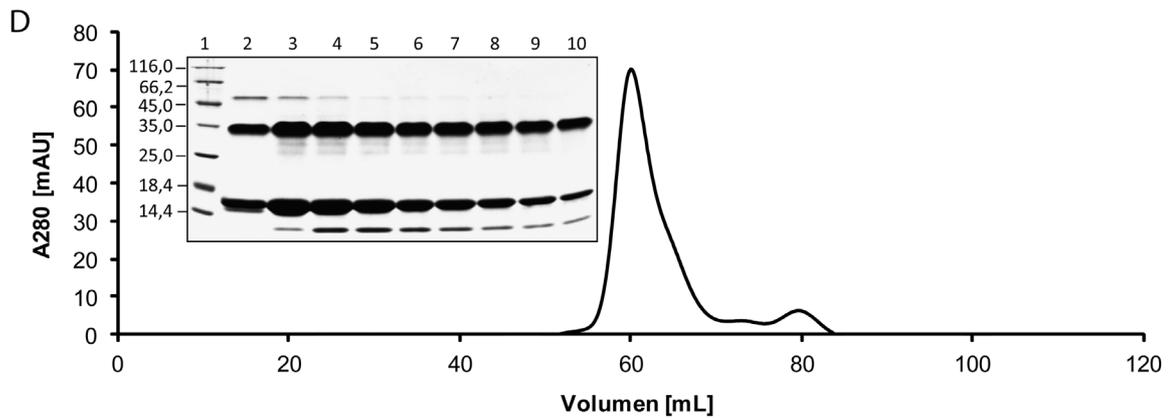
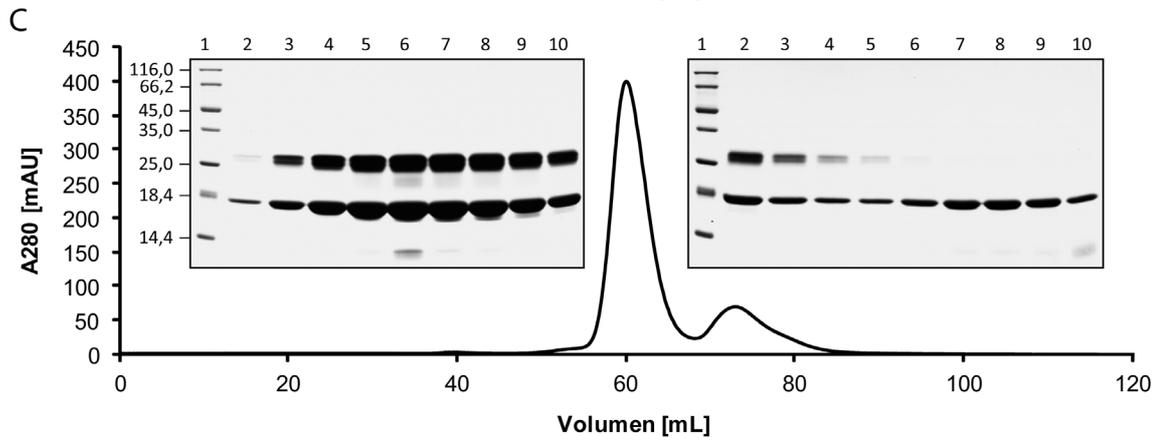
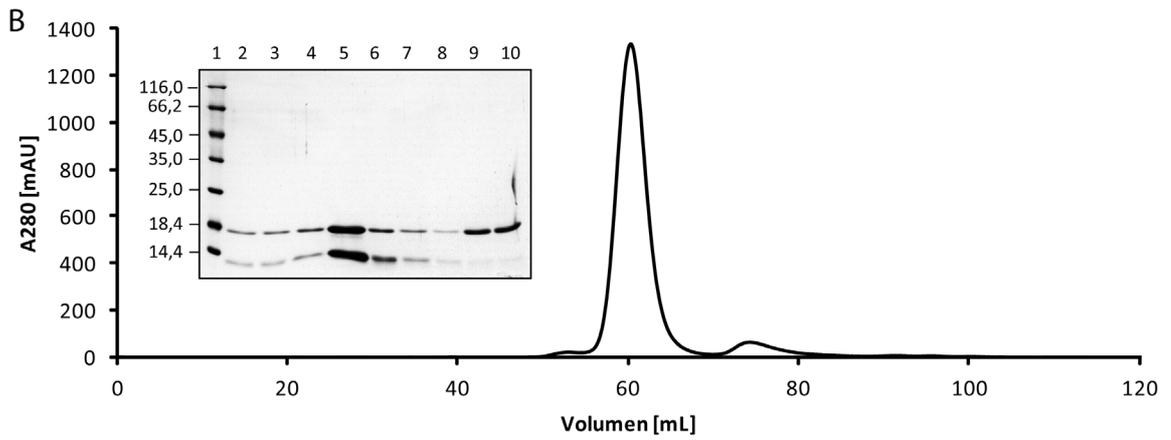
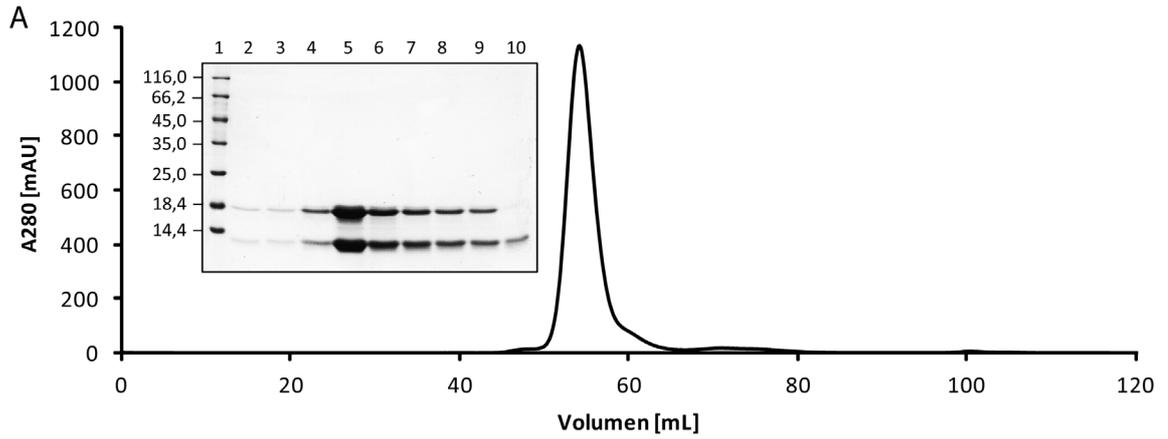
Im Fall der Anticalinvarianten strepIIAc1, strepIIAc1 $\Delta$ 148 und His<sub>6</sub> $\Delta$ 1Ac1 wurde das gereinigte Protein mit VEGF(8-109) komplexiert. Dazu wurden die beiden Komponenten in äquimolarem Verhältnis gemischt und der gebildete Komplex durch Gelfiltration isoliert.

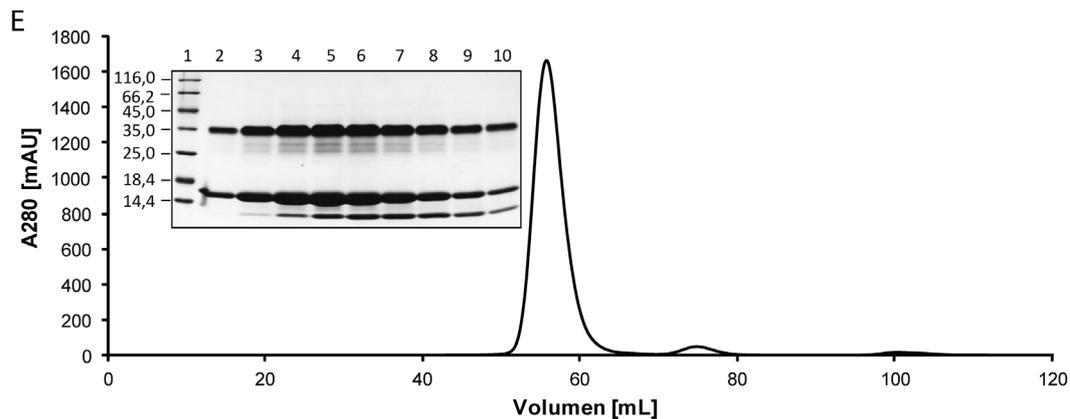
Die Versionen Ac1 und Ac1 $\Delta$ 148 wurden dagegen direkt in Form des Periplasmaextraktes mit dem gereinigten Targetprotein VEGF(8-109)-strepII komplexiert, indem beide Komponenten annähernd äquimolar gemischt wurden. Daraufhin wurde der Komplex zunächst durch SA-Chromatographie und abschließend ebenfalls durch Gelfiltration gereinigt.

Abbildung 6 zeigt die Gelfiltrationschromatogramme und SDS-Polyacrylamidgele der Komplexe aus den Anticalinversionen strepIIAc1, strepIIAc1 $\Delta$ 148, His<sub>6</sub> $\Delta$ 1Ac1, Ac1 sowie Ac1 $\Delta$ 148 und dem Targetprotein VEGF(8-109) oder VEGF(8-109)strepII. Der Komplex aus strepIIAc1 und VEGF(8-109) eluierte als einzelner symmetrischer *Peak* von der Gelfiltrationssäule, und in der reduzierenden SDS-PAGE waren außer den Banden für strepIIAc1 bei 17,4 kDa und VEGF(8-109) bei 12,2 kDa kaum Verunreinigungen zu erkennen. Nur bei dem Anticalin war eine schwache Doppelbande sichtbar. Die Tatsache, dass im Chromatogramm nur ein homogener *Peak* zu sehen ist, zeigt, dass bei der Komplexbildung ein ideales Mischungsverhältnis der beiden Komponenten eingesetzt wurde.

Im Gegensatz dazu war im Chromatogramm des Komplexes aus strepIIAc1 $\Delta$ 148 und VEGF(8-109) (Abbildung 6B) ein zweiter kleinerer *Peak* zu erkennen und das SDS-Polyacrylamidgel zeigte, dass es sich dabei um überschüssiges Anticalin (16,3 kDa) handelt. Da das überschüssige Anticalin aber einen separaten *Peak* bildete, konnte es gut vom Komplex getrennt werden. Auch beim Chromatogramm des Komplexes aus His<sub>6</sub> $\Delta$ 1Ac1 und VEGF(8-109) war ein zweiter *Peak* für überschüssiges Anticalin nachzuweisen und auf dem reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel waren sehr deutlich die Banden für das Anticalin (bei 17,0 kDa) und das dimere VEGF(8-109) (bei 24,40 kDa) sichtbar. Allerdings waren nur bei der höchsten Konzentration des Komplexes einige Verunreinigungen sichtbar.

Schließlich wurden auch für die Komplexe aus Ac1 (16,3 kDa) und Ac1 $\Delta$ 148 (15,2 kDa) mit VEGF(8-109)strepII die eluierten Fraktionen der Gelfiltrationen auf nicht reduzierende SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Hier wurde deutlich, dass in beiden Fällen monomeres VEGF(8-109)strepII (mit einer Größe von 13,4 kDa) zusammen mit dem Komplex eluierte. Da diese Proteinspezies wesentlich kleiner als der Komplex ist und somit durch die Gelfiltration hätte abgetrennt werden müssen, ist dieses Protein wahrscheinlich mit dem Komplex assoziiert oder steht im Gleichgewicht mit dem dimeren VEGF(8-109)strepII.





**Abbildung 6: Reinigung der Komplexe aus den Anticalinen strepIIAc1 (A), strepIIAc1Δ148 (B) und His<sub>6</sub>Δ1Ac1 (C) mit VEGF(8-109), sowie der Komplexe aus Ac1 (D) und Ac1Δ148 (E) mit VEGF(8-109)strepII.** Dargestellt sind die Chromatogramme der abschließenden Gelfiltration (Superdex 75 HiLoad 16/60, 120 mL Bettvolumen) mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer sowie die Analyse durch reduzierende (A und B) und nicht reduzierende (C-E) 12 % SDS-PAGE. Bei den Gelen sind die Beschriftungen der Markerbanden in kDa. Das Protein wurde in 1 mL-Fractionen gesammelt. Die Spuren sind wie folgt belegt: (A) Spur 1: Proteinmarker, Spuren 2-4: 48 mL bis 51 mL, Spur 5: 52 mL bis 59 mL, Spuren 6-9: 60 mL bis 63 mL, Spur 10: 73 mL; (B) Spur 1: Proteinmarker, Spuren 2-4: 54 mL bis 56 mL, Spur 5: 57 mL bis 66 mL, Spuren 6-8: 67 mL bis 69 mL, Spuren 9 und 10: 74 mL und 75 mL; (C) Spuren 1 und 10: Proteinmarker, Spuren 1-9 und 12-15: 55 mL bis 67 mL, Spuren 16-20: 69, 71, 72, 74 und 76 mL, (D) Spur 1: Proteinmarker, Spuren 2-4: 56, 58 und 60 mL, Spuren 5-9: 61 mL bis 65 mL; (E) Spur 1: Proteinmarker, Spuren 2-10: 52 mL bis 60 mL.

Die Komplexe aus den beiden Anticalinen Ac1 und Ac1Δ148 und VEGF(8-109)strepII wiesen leichte Verunreinigungen auf, die unterhalb der Bande des VEGF(8-109)strepII-Dimers sichtbar waren. Allerdings eluierte der Komplex aus Ac1Δ148 und VEGF(8-109)strepII in einem homogenen symmetrischen *Peak* von der Gelfiltrationssäule, während der *Peak* für den Komplex aus Ac1 und VEGF(8-109)strepII eine Schulter aufwies, wobei zusätzlich eine Verunreinigung auftrat, die größer war als das dimere VEGF(8-109)strepII. Die zusätzliche Verunreinigung scheint nicht die Ursache für die Schulter zu sein, da sie vorher eluiert. Insgesamt verläuft die Reinigung des Komplexes aus Ac1Δ148 und VEGF(8-109)strepII unproblematischer als die des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109)strepII, da weder die zusätzliche Verunreinigung noch die Schulter auftritt.

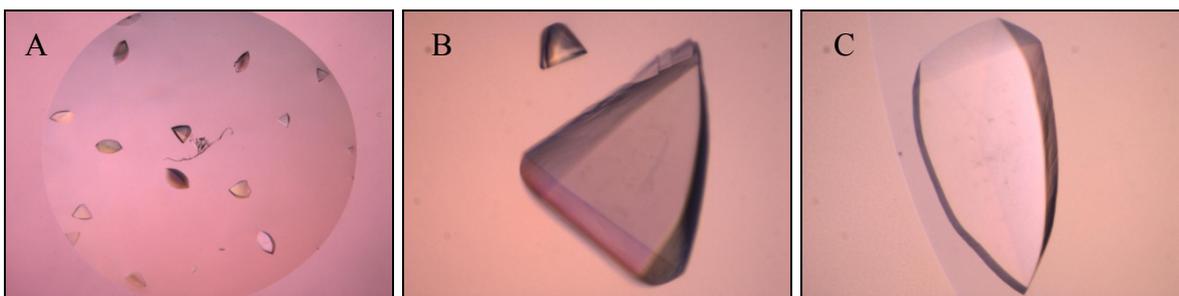
### 3.1.3 Kristallisation der Ac1-Versionen in Komplex mit VEGF(8-109)

Nachdem die ersten Kristallisations-*Screens* mit den Komplexen Ac1strepII/VEGF(8-109) und Ac1His<sub>6</sub>/VEGF(8-109) (von Dorian Schönfeld durchgeführt) ohne Erfolg geblieben waren, wurde die Kristallisation der Komplexe strepIIAc1/VEGF(8-109) und strepIIAc1Δ148/VEGF(8-109) versucht, wobei der *Basic Screen* 1-5 eingesetzt wurde. Für beide Komplexe konnten unter verschiedenen Bedingungen Kristalle identifiziert werden (Tabelle 4). Bei strepIIAc1Δ148/VEGF(8-109) war die Anzahl der positiven Bedingungen sogar noch größer als bei strepIIAc1/VEGF(8-109).

**Tabelle 4: Bedingungen, bei denen sich im *Basic Screen* mit den Komplexen strepIIAc1/VEGF(8-109) und strepIIAc1Δ148/VEGF(8-109) Kristalle bildeten.** (S) bedeutet, dass es sich um Salzkristalle handelt. (V) steht für VEGF(8-109)-Kristalle, wohingegen (K) Kristalle des Komplexes bezeichnet. Die Kristallzucht erfolgte bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von etwa 10 mg/mL in 0,2 µL-Tropfen.

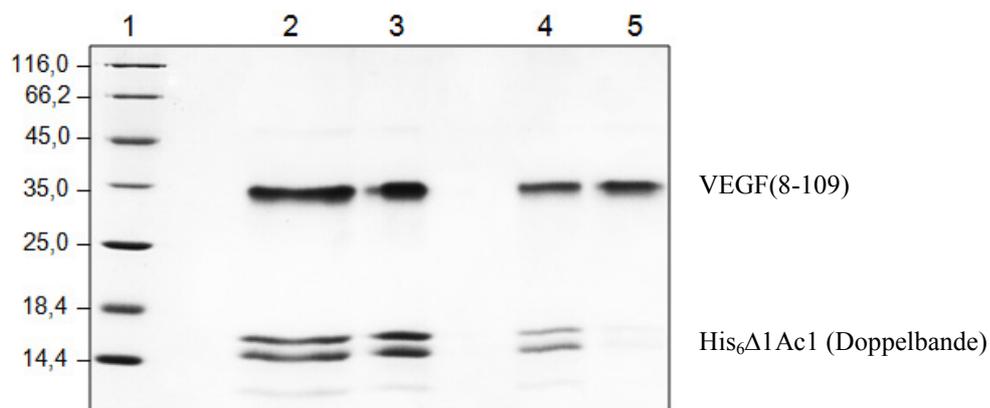
strepIIAc1/VEGF(8-109)	strepIIAc1Δ148/VEGF(8-109)
- 0,1 M Tris/HCl pH 8,5; 0,2 M Lithiumsulfat; 25 % w/v PEG 3350 (S)	- 0,1 M Tris/HCl pH 8,5; 35 % v/v 2-Propanol (S)
- 0,1 M Magnesiumformiat; 15 % PEG 3350 (S)	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumacetat (V)
- 0,05 M Zinkacetat; 20 % PEG (S)	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumchlorid (V)
- 0,1 M Bis-Tris pH 5,5; 0,2 M Calciumchlorid; 45 % MPD (V)	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumfluorid (V)
- 0,1 M Natriumacetat pH 4,5; 2,5 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat (K)	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumformiat (V)
	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Natriumnitrat (V)
	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Zinkacetat (V)
	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumiodid (V)
	- 20 % w/v PEG 3350; 0,2 M Kaliumnitrat (V)

Alle positiven Bedingungen wurden zunächst mit einem Farbstoff (Izit Crystal Dye) auf Salzkristalle untersucht. Die Bedingungen mit Proteinkristallen wurden dann in 2  $\mu\text{L}$ -Tropfen reproduziert. Waren genügend Kristalle vorhanden, wurden diese geerntet, gewaschen und auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dabei stellte sich heraus, dass fast alle zuvor identifizierten Bedingungen für den strepIIAc1 $\Delta$ 148/VEGF(8-109)-Komplex in Kristallen resultierten, die bloß VEGF(8-109) enthielten. Diese Bedingungen enthielten auffälligerweise alle 20 % w/v PEG 3350 als Fällungsmittel neben 200 mM eines Salzes. Die einzige Bedingung, die von diesem Muster abwich, enthielt Salzkristalle. Demgegenüber ergaben drei positive Bedingungen für den strepIIAc1/VEGF(8-109)-Komplex ebenfalls Salzkristalle, während eine Bedingung in Kristallen resultierte, die ausschließlich VEGF(8-109) enthielten. Sowohl diese Kristalle als auch die VEGF(8-109)-Kristalle, die sich beim *Screen* des strepIIAc1 $\Delta$ 148/VEGF(8-109)-Komplexes gebildet hatten, waren alle relativ klein und stark verwachsen. Im Gegensatz dazu fand sich bei der Bedingung mit 0,1 M Natriumacetat pH 4,5, 2,5 M Natriumchlorid und 0,2 M Lithiumsulfat bei dem *Screen* mit dem strepIIAc1/VEGF(8-109)-Komplex ein einzelner freiliegender Kristall. Die Analyse durch SDS-PAGE von Kristallen, die unter dieser Bedingung reproduziert wurden, zeigte, dass diese den Komplex aus strepIIAc1 und VEGF(8-109) enthielten. Durch Optimierung der Bedingung ließen sich Kristalle produzieren, die Abmessungen bis zu 400 x 600  $\mu\text{M}$  hatten (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Kristalle des strepIIAc1/VEGF(8-109)-Komplexes.** (A) 0,1 M Natriumacetat pH 4,0; 1,0 M Natriumchlorid; 0,12 M Lithiumsulfat; (B) 0,1 M Natriumacetat pH 4,0; 1,0 M Natriumchlorid; 0,09 M Lithiumsulfat; (C) 0,1 M Natriumacetat pH 4,0; 1,0 M Natriumchlorid; 0,10 M Lithiumsulfat. Alle Bedingungen enthielten im 1  $\mu\text{L}$ -Tropfen 13 mg/mL Proteinkomplex und 0,5 mM Nonaethylenglycol-mono-n-dodecylether und wurden bei 20 °C inkubiert. (A) zeigt die Gesamtansicht eines Tropfens, während (B) und (C) jeweils einen stark vergrößerten Kristall wiedergeben. In (B) misst die längste Achse des Kristalls etwa 600  $\mu\text{m}$ . In (C) sind es etwa 650  $\mu\text{m}$ .

Die so erhaltenen Kristalle des Komplexes aus strepIIAc1 und VEGF(8-109) waren die ersten dieser Art. Es stellte sich jedoch heraus, dass sie die Röntgenstrahlen nur schwach beugen (Abschnitt 3.1.4). Aus diesem Grund wurden weitere Kristallisations-Screens (*Basic Screens* 1-5) mit folgenden Komplexen angesetzt: His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109), Ac1/VEGF(8-109)strepII und Ac1Δ148/VEGF(8-109)strepII. Ac1Δ148/VEGF(8-109)strepII lieferte ausschließlich Salzkristalle und Kristalle, die bloß VEGF(8-109)strepII enthielten. Zusätzlich entstanden bei den Screens mit Ac1/VEGF(8-109)strepII und auch mit His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109) Kristalle unter der oben beschriebenen Bedingung, die die Komplexkristalle für strepIIAc1/VEGF(8-109) geliefert hatte.

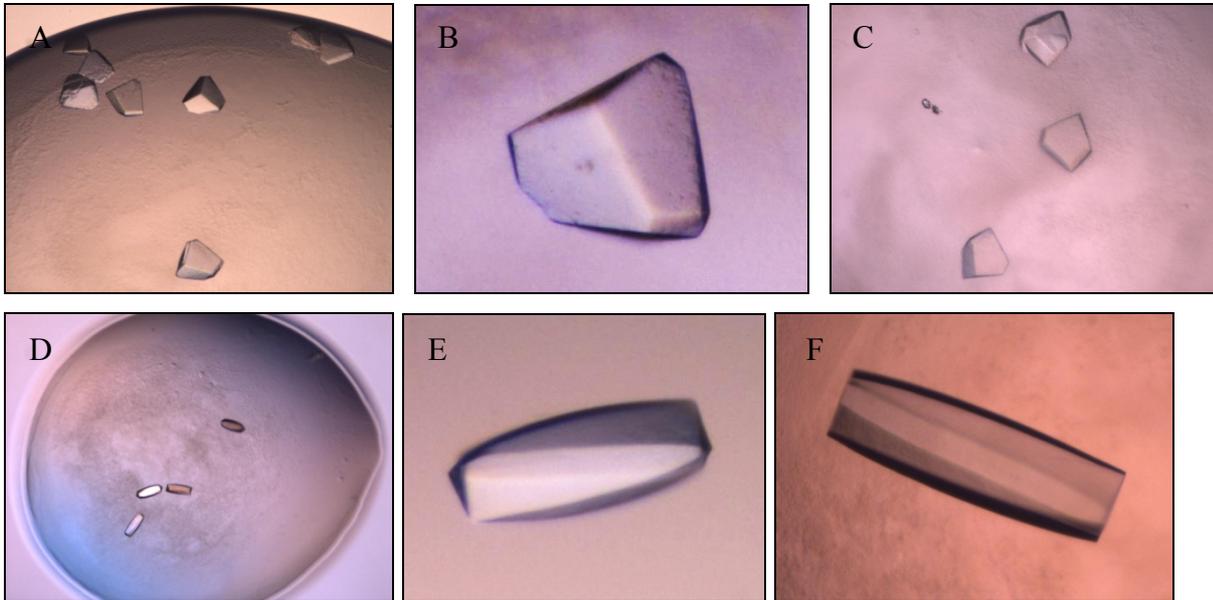


**Abbildung 8: SDS-PAGE zum Nachweis des Komplexes von His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109) im Kristall.** Nicht reduzierendes 12 % SDS-Polyacrylamidgel. Spur 1: Proteinmarker; Spur 2: vollständiger Kristallisationstropfen mit folgender Zusammensetzung: 0,1 M Natriumacetat pH 3,6; 1,6 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat; 25 mM Magnesiumchlorid mit 13 mg/mL Protein. Spur 3: in Puffer gewaschene und in Wasser aufgelöste Kristalle, die unter der Bedingung wie in Spur 2 gewachsen waren. Spur 4: vollständiger Kristallisationstropfen mit folgender Zusammensetzung: 0,1 M Phosphat Citrat pH 4,2; 31 % MPD mit 13 mg/mL Protein. Spur 5: in Puffer gewaschene und in Wasser aufgelöste Kristalle, die unter der Bedingung wie in Spur 4 erhalten wurden.

Bei der Kristallisationsbedingung der Spuren 2 und 3 sieht man, dass die Kristalle den Komplex enthalten, da die gewaschenen Kristalle das gleiche Bild ergeben, wie der komplette Tropfen. Dahingegen resultieren aus der Kristallisationsbedingung der Spuren 4 und 5 Kristalle, die bloß VEGF(8-109) enthalten, da das Anticalin beim Waschen der Kristalle entfernt werden konnte.

Es zeigte sich, dass es sich bei den neuen Kristallen ebenfalls um Komplexkristalle handelte (Abbildung 8). Abbildung 9 zeigt optimierte Kristalle der Komplexe aus His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109) und Ac1/VEGF(8-109)strepII. Beide Kristallformen unterscheiden sich morphologisch von den Kristallen, die der Komplex strepIIAc1/VEGF(8-109) unter der gleichen Bedingung bildete. Die Kristalle von His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109) sind kompakter und

haben schärfere Kanten. Dahingegen sind die Kristalle des Komplexes Ac1/VEGF(8-109)strepII eher länglich mit abgerundeten Kanten.



**Abbildung 9: Kristalle des His<sub>6</sub>Δ1Ac1/VEGF(8-109)-Komplexes (A-C) und des Ac1/VEGF(8-109)strepII-Komplexes (D-F).** (A) 0,1 M Natriumacetat pH 3,6; 1,6 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat mit 13 mg/mL Proteinkomplex und 25 mM Magnesiumchlorid als Additiv. (B) vergrößerter Ausschnitt aus A. Der Kristall hat eine Kantenlänge von etwa 150  $\mu\text{m}$ . (C) 0,1 M Natriumacetat pH 3,6; 0,7 M Natriumchlorid; 0,20 M Lithiumsulfat mit 13 mg/mL Proteinkomplex. (D) 0,1 M Natriumacetat pH 3,6; 1,6 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat mit 13 mg/mL Proteinkomplex und 250 mM Lithiumchlorid als Additiv. (E) 0,1 M Natriumacetat pH 3,5; 1,0 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat mit 13 mg/mL Proteinkomplex und 7,5 % Dextransulfat als Additiv. Der Kristall hat in der Längsachse eine Länge von etwa 100  $\mu\text{m}$ . F: 0,1 M Natriumacetat pH 3,6; 0,9 M Natriumchlorid; 0,2 M Lithiumsulfat mit 13 mg/mL Proteinkomplex und 7,5 % Dextransulfat als Additiv. Der Kristall hat in der Längsachse eine Länge von etwa 250  $\mu\text{m}$ . Alle Bedingungen wurden bei 20 °C inkubiert.

### 3.1.4 Sammlung von Röntgen-Beugungsdatensätzen am Synchrotron

Die besten Kristalle aller Protein-Komplexe wurden am Berliner Synchrotron (BESSY) auf ihre Beugungsfähigkeit für Röntgenstrahlen geprüft. Die zunächst untersuchten Kristalle des Komplexes aus strepIIAc1 und VEGF(8-109) beugten die Röntgenstrahlen aber nur bis zu einer Auflösung von etwa 4 Å. Mit Hilfe verschiedener Techniken wie Dehydrierung und *Reannealing* wurde versucht, die Auflösung zu verbessern (Heras & Martin, 2005).

Bei der Dehydrierung wurde der Kristallisationstropfen vor dem Einfrieren der Kristalle leicht an der Luft angetrocknet. Die Reduktion des Wassergehalts führt in der Regel zu einem dichter gepackten und besser geordneten Kristallgitter und somit auch zu einer höheren

Auflösung der Röntgenbeugungsbilder (Frey, 1994; Salunke *et al.*, 1985). Beispiele aus der Literatur belegen die Wirksamkeit dieser Methode (Abergel, 2004; Heras *et al.*, 2003).

**Tabelle 5: Statistiken der Datensätze, die zur Strukturbestimmung des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109)-strepII dienen.**

Wellenlänge [Å]	1.800	0.9184
Gesamter Rotationsbereich [°]	2 x 200°	94°
Rotationsintervall [°]	1	1
Auflösungsbereich [Å] <sup>a</sup>	35.0-2.3 (2.4-2.3)	35.0-1.8 (1.9-1.8)
Reflexe gesamt	494.705	250.459
Unabhängige Reflexe	40.624	43.547
Vollständigkeit [%]	100 (100)	99.8 (99.9)
Redundanz	12.2 (11.6)	5.8 (5.8)
<I / σ(I)>	23.7 (5.5)	23.6 (4.7)
R <sub>meas</sub> [%] <sup>b</sup>	8.0 (57.8)	4.6 (39.9)
R <sub>mrgd-F</sub> [%] <sup>c</sup>	6.1 (28.8)	6.3 (38.2)
Mosaizität [°]	0.29	0.27
Raumgruppe	P3 <sub>2</sub> 21	P3 <sub>2</sub> 21
Dimensionen der Einheitszelle [Å]	a = b = 88.6 c = 104.1	a = b = 88.2 c = 103.4
Komplexe pro Einheitszelle	1	1

<sup>a</sup> In Klammern sind die Werte für die äußere Auflösungsschale angegeben.

$${}^b R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1} \sum_{j=1}^n |I_{hklj} - (I_{hkl})|}}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl}}$$

$${}^c R_{mrgd-F} = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl,P} - I_{hkl,Q}|}{0,5 \cdot \sum_{hkl} I_{hkl,P} + I_{hkl,Q}} \quad (\text{Diederichs \& Karplus, 1997})$$

Das *Reannealing* beruht auf dem Effekt, dass beim Einfrieren das Kristallgitter gestört werden kann, was zu einer erhöhten Mosaizität und einer reduzierten Auflösung führt (Rodgers, 1994). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in einem ungleichmäßigen Abkühlen des Kristalls und einer damit verbundenen ungleichmäßigen Ausdehnung des Wassers und Kristallgitters (Juers & Matthews, 2001; Kriminski *et al.*, 2002). Um die Störungen im

Kristallgitter zu beheben, wird beim *Reannealing* der eingefrorene Kristall auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend wieder schockartig eingefroren (Harp *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde der Kristall erwärmt, indem der Cryostrahl, der den Kristall auf dem Goniometerkopf während der Messung kühlt, für 2-3 Sekunden bei abgeschaltetem Synchrotronstrahl unterbrochen wurde. Dies wurde 3-4-mal wiederholt mit jeweils 6 Sekunden Pause (Yeh & Hol, 1998). Beide Methoden zur Verbesserung der Auflösung zeigten jedoch keine Wirkung.

Die Auswertung des erhaltenen Datensatzes mit 4 Å Auflösung zeigte, dass die Kristalle die trigonale Raumgruppe R3 oder R32 hatten. Die Auflösung reichte jedoch nicht aus, um die Struktur zu lösen. Der Komplex aus His<sub>6</sub>Δ1Ac1 und VEGF(8-109) beugte die Röntgenstrahlung ebenfalls nur bis zu einer Auflösung von etwa 4 Å und kristallisierte in der gleichen Raumgruppe wie strepIIAc1/VEGF(8-109). Dahingegen bildete der Komplex aus Ac1 und VEGF(8-109) Kristalle in der hexagonalen Raumgruppe P3<sub>2</sub>21. Diese Kristalle beugten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 1,8 Å und somit deutlich besser als die Kristalle der anderen Komplexe. Diese Auflösung ermöglichte im Prinzip die Lösung der Kristallstruktur.

Da die Phasenbestimmung zunächst jedoch weder mittels Molekularem Ersatz noch mittels *Multiple-Wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) gelang, wurde auch ein Datensatz bei einer längeren Wellenlänge aufgenommen, um das anomale Signal der Schwefelatome zu messen. Tabelle 5 zeigt die Statistiken des Datensatzes, der bei der Wellenlänge von 1,8 Å aufgenommen wurde und des vorangegangenen Datensatzes, der bei der üblichen Synchrotron-Wellenlänge von 0,9184 Å aufgenommen wurde. Der erstgenannte Datensatz wurde zur Phasenbestimmung mittels MRSAD verwendet (Abschnitt 3.1.6.1). Da das hierbei verwendete Schwefelsignal selbst bei der längeren Wellenlänge generell relativ schwach ist, war es notwendig, eine größtmögliche Redundanz zu erzielen. Dazu wurden bei zwei unterschiedlichen κ-Winkeln (0° und 30°) 200 Bilder mit einem Rotationsintervall von 1° aufgenommen. Der andere Datensatz in Tabelle 5 hatte die beste Auflösung und diente der Verfeinerung des Modells.

### 3.1.5 Versuche zur Phasenbestimmung

#### 3.1.5.1 Versuche zur Phasenbestimmung durch Molekularen Ersatz

Da sowohl die Struktur von VEGF(8-109) als auch die des Wildtyp-Lipocalins (Lcn1), das das Gerüst von Ac1 bildet, bekannt ist, wurde zuerst die Phasenbestimmung durch Molekularen Ersatz (McCoy *et al.*, 2005) versucht. Bei dieser Methode geht man von einer bekannten Kristallstruktur mit starker Ähnlichkeit zu dem gesuchten Modell aus. Die bekannte Kristallstruktur wird durch Rotation und Translation hinsichtlich der gemessenen Beugungsdaten in der Gitterzelle korrekt positioniert. Hierzu wird die Patterson-Funktion (3) verwendet, mit dessen Hilfe man die getrennte Variation von Rotations- und Translationsfreiheitsgraden zur Positionierung des Modells durchführen kann:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\vec{F}_{hkl}|^2 \cdot \cos(2\pi \cdot (hx + ky + lz)) \quad (3)$$

Die Maxima dieser Funktion stellen die interatomaren Distanzvektoren dar. Für die Rotation werden aus dem Suchmodell die Strukturfaktoren ( $F_{\text{calc}}$ ) und daraus wiederum die Patterson-Funktion berechnet. Diese wird mit der Patterson-Funktion des gemessenen Datensatzes verglichen und auf Übereinstimmung anhand des Korrelationskoeffizienten überprüft. Dabei entscheidet die maximale Überlappung der intramolekularen Differenzvektoren, hauptsächlich Patterson-Vektoren im Bereich der erwarteten Molekülgröße, über die korrekte Orientierung (Rotationslösung) des Modells. Für die anschließende Translation wird eine Übereinstimmung sowohl anhand des Korrelationskoeffizienten als auch des kristallographischen R-Faktors gesucht (Translationslösung).

Als Suchmodell für das dimere VEGF(8-109) wurden die Ketten V und W der Struktur mit der PDB-ID 1BJ1 (Muller *et al.*, 1998) verwendet. Wurde der Molekulare Ersatz ausschließlich mit diesem Modell durchgeführt, konnte eine Lösung gefunden werden. Die resultierende Elektronendichtekarte ( $2F_o - F_c$ ) wies jedoch nur im Bereich des VEGF(8-109) Elektronendichte auf, die sich gut interpretieren ließ. In den Bereichen, in denen das Anticalin vermutet wurde, war die Elektronendichte schwach ausgeprägt und sehr schwer zu interpretieren. Versuche, in diesem Bereich näherungsweise ein molekulares Modell zu bauen und anhand dessen (als Phaseninformation) die Elektronendichte neu zu berechnen, führten nicht zum Ziel. Es war nicht möglich, den kristallographischen R-Faktor unter 45 % zu senken.

Beim nächsten Versuch zum Molekularen Ersatz wurden daher zusätzlich zum VEGF Modelle für das Anticalin eingesetzt. Zunächst wurden die beiden in der Proteindatenbank hinterlegten humanen Lcn1-Strukturen (PDB ID code 1XKI und 3EYC) verwendet (Breustedt *et al.*, 2009; Breustedt *et al.*, 2005). Sie wurden sowohl vollständig mit allen Seitenketten als auch als Polyalanin-Modell eingesetzt. Da für den erfolgreichen Molekularen Ersatz eine größtmögliche strukturelle Ähnlichkeit zwischen Modell und Zielstruktur vorliegen muss, sind flexible Bereiche einer Proteinstruktur, also insbesondere *Loops*, nicht vorteilhaft. Die Lipocalinstruktur besitzt mehrere dieser flexiblen *Loops*, welche die  $\beta$ -Faltblattstränge verbinden. Daher wurde der Molekulare Ersatz auch mit Modellen versucht, bei denen entweder alle *Loops* oder nur diejenigen in der Nähe der Bindungstasche entfernt waren. Bei keinem dieser Versuche konnte allerdings eine Lösung gefunden werden. Auch das Zerlegen der Lcn1-Modelle in Fragmente führte zu keiner Lösung.

### 3.1.5.2 Versuche zur Phasenbestimmung durch *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*

Bei der Phasenbestimmung durch *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion* (MAD) macht man sich die Eigenschaft von Schweratomen als anomale Streuzentren in Proteinkristallen zu Nutze. Normalerweise wird eine elastische Streuung an freien Elektronen angenommen. Dies gilt jedoch nicht mehr, wenn die Wellenlänge der Röntgenstrahlung nahe der Absorptionskante des Elements liegt. Bei Schweratomen liegt diese Absorptionskante im Bereich der Röntgenstrahlung. Die Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit dem Atomkern in diesem Wellenlängenbereich bewirkt eine Phasenverschiebung (anomale Streuung oder Dispersion), die sich von der Phasenverschiebung elastischer Streuung ( $180^\circ$ ) unterscheidet. Der Atomfaktor  $f_{anom}$  wird dann eine komplexe Zahl und setzt sich aus einem von der Wellenlänge unabhängigen Anteil  $f_0$  und einem von der von der Wellenlänge abhängigen Anteil  $f(\lambda)$  zusammen:

$$f_{anom} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + i \cdot f''(\lambda) \quad (4)$$

Aufgrund der Absorptionseffekte führt der wellenlängenabhängige Anteil zu einer Verringerung der Streukraft  $f'(\lambda)$  und zu einer Phasenverschiebung  $i \cdot f''(\lambda)$  um  $\pi/2$ .

Bei dieser Methode wird also sowohl die dispersive Differenz, die eine Änderung des realen Streubeitrags darstellt, als auch die anomale Differenz, die durch Phasenverschiebung entsteht, ausgenutzt. Während die dispersive Differenz auf den unterschiedlichen Werten von

$f(\lambda)$  beruht, hebt die anomale Differenz die Friedelsymmetrie innerhalb eines Datensatzes in Abhängigkeit von der Größe  $i \cdot f'(\lambda)$  auf. Beide Differenzen sind unabhängig voneinander und proportional zu den Strukturfaktoramplituden der Schweratomsstruktur. Sie werden durch die Messung bei drei verschiedenen Wellenlängen optimiert. Eine Messung erfolgt beim Absorptionsmaximum (maximales  $f'$ ), eine weitere Messung erfolgt beim Wendepunkt zwischen Absorptionsminimum und -maximum (minimales  $f'$ ). Die letzte Messung erfolgt bei einer Wellenlänge, die weit entfernt vom Absorptionsmaximum ist ( $f'$  nahe 0).

Die Amplitudendifferenzen (Bijovet-Differenzen) der gemessenen Reflexe ermöglichen eine Patterson-Synthese, aus der sich ein Modell der Substruktur aller bei einer bestimmten Wellenlänge anomal streuenden Atome erstellen lässt. Die Phasen dieser Substruktur entsprechen näherungsweise den Phasen der gesamten Struktur.

Ac1 besitzt an den Positionen 22 und 55 Methionin-Reste. Eine sehr selektive Methode zur Einführung eines Schweratoms ist die Substitution dieser Methionine durch Selenomethionin (Budisa *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 1990). Dies wurde wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben durchgeführt. Das so substituierte Anticalin Ac1 wurde mit VEGF(8-109)-strepII komplexiert und der Komplex durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Eine mit Ac1 assoziierte Verunreinigung konnte dabei jedoch nicht vollständig entfernt werden. Als Ausgangspunkt für die Kristallisation diente die Bedingung, bei der Kristalle des Komplexes aus dem nicht derivatisierten Ac1 und VEGF(8-109)-strepII erhalten worden waren. *Screening*-Versuche mit *24-Well Hanging-Drop*-Platten führten jedoch zu keinen Kristallen.

Eine weitere, weniger spezifische Methode, um Schweratome in das Kristallgitter einzuführen, ist das Versetzen der Kristallisationstropfen, die die Kristalle enthalten, mit Schwermetallsalzen. Die Schwermetallionen sind unter Umständen in der Lage, sich isomorph im Gitter eines Proteinkristalls anzulagern. Folgende Schwermetallsalze wurden eingesetzt:  $\text{Sm}(\text{Ac})_3$ ,  $\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$  (Thiomersal),  $\text{HgI}_2$ ,  $\text{HgBr}$ ,  $\text{Pb}(\text{Ac})_2$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ .

Nach der Zugabe der Schwermetallsalze wurden die Kristalle für 5 min bis 24 h inkubiert. Anschließend wurden einige der Kristalle direkt eingefroren, während andere vor dem Einfrieren in Kristallisationspuffer gewaschen wurden. Dies hatte zum Zweck, unspezifisch gebundene Schweratomverbindungen zu entfernen, wobei allerdings auch ein Auswaschen stattfinden konnte. Daher wurden einige Kristalle nicht gewaschen. In beiden Fällen wurden die Kristalle vor dem Einfrieren natürlich mit Frostschutzmittel versehen. Am Synchrotron wurden die Kristalle auf anomale Signale überprüft, indem, wie oben beschrieben, Datensätze

bei jeweils drei Wellenlängen aufgenommen wurden. Im Fall von HgI<sub>2</sub> wurden keine Datensätze aufgenommen, da diese Kristalle keine Röntgen-Beugung zeigten. In allen anderen Fällen beugten die Kristalle die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 2,2 bis 2,9 Å. Allerdings konnte in keinem Fall ein anomales Signal festgestellt werden. Das bedeutet, dass kein Schweratom selektiv an das Protein im Kristall gebunden hat.

### 3.1.6 Phasenbestimmung

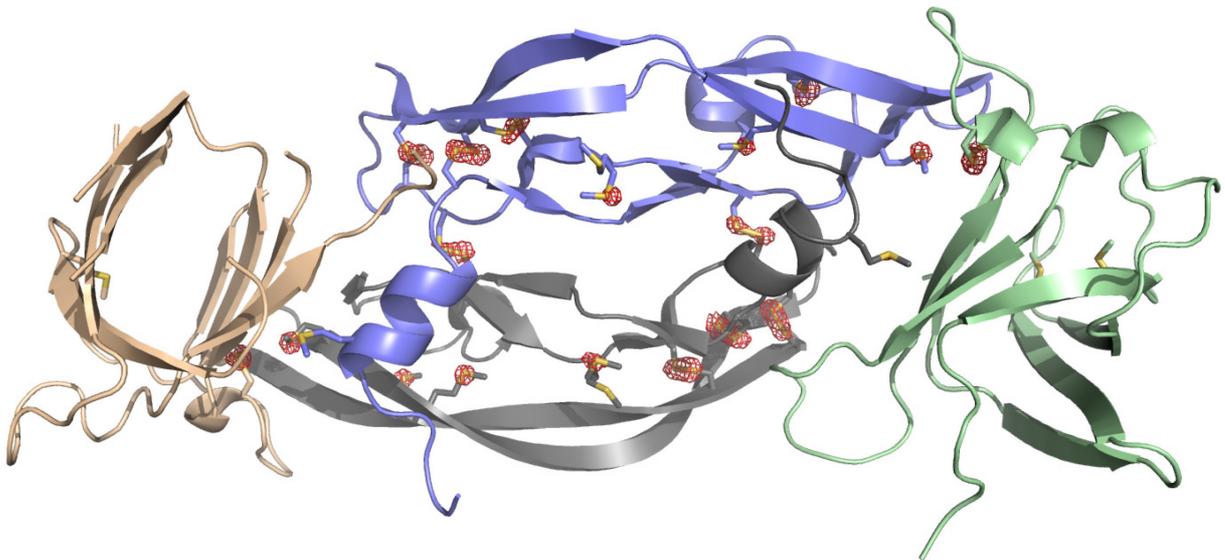
#### 3.1.6.1 Phasenbestimmung mit Kombination aus Molekularem Ersatz und *Single Wavelength Anomalous Diffraction* (MRSAD)

Ein Dimer des VEGF(8-109)-strepII enthält 8 Disulfidbrücken und 10 Methioninreste. Die zwei Ac1-Moleküle in einer Einheitszelle tragen weitere 2 Disulfidbrücken und 4 Methioninreste bei. Das ergibt insgesamt 34 Schwefelatome in der Einheitszelle. Diese können für die Methode des *Single Wavelength Anomalous Diffraction* (SAD) verwendet werden, da Schwefel mit 16 Elektronen das oben beschriebene Schweratomverhalten zeigt (Ramagopal *et al.*, 2003). Die Absorptionskante von Schwefel liegt bei etwa 5 Å. Weil die Absorption der Röntgenstrahlen durch Luft bei dieser Wellenlänge sehr hoch und die Auflösung der Daten bei längeren Wellenlängen zudem stark reduziert ist, können bei dieser Wellenlänge keine Beugungsdaten aufgenommen werden. Im Fall von Ac1/VEGF(8-109)-strepII wurde daher eine Wellenlänge von 1,8 Å gewählt.

Durch die Aufnahme von 2 x 200 Bildern mit jeweils einem Rotationswinkel von einem Grad bei zwei verschiedenen  $\kappa$ -Winkeln wurde eine Redundanz der Beugungsreflexe von 12,2 erzielt. Diese große Redundanz zusammen mit einem qualitativ hochwertigen Datensatz ist notwendig, da bei der verwendeten Wellenlänge das anomale Signal unter 1 % liegt. Nach Integration und Skalierung mit dem Programms XDS wurde versucht, mit Hilfe des Programms SHELXD (Sheldrick *et al.*, 1993) die Lage der Schwefelatome zu bestimmen. Hierzu wurden dem Programm deren erwartete Anzahl sowie die Anwesenheit von 10 Disulfidbrücken vorgegeben. Klare Signale für 34 Schwefelpositionen waren mit dieser Methode jedoch nicht zu erhalten. Da schon bekannt war, dass sich ein Modell für VEGF(8-109) (PDB-ID 1BJ1) durch Molekularen Ersatz finden lässt (Abschnitt 3.1.5.1), wurde die Information aus dem Molekularen Ersatz genutzt, um zumindest die Schwefelpositionen im VEGF(8-109)-Dimer zuzuordnen.

Dazu wurde die MRSAD-Funktion des Auto-Rickshaw-Servers (Panjikar *et al.*, 2009) verwendet, wobei zunächst ein Molekularer Ersatz mit VEGF(8-109) (PDB-ID 1BJ1) als

Suchmodell durchgeführt wurde. Dabei fand zusätzlich das Programm MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997) Anwendung. Zur Verfeinerung der erhaltenen Struktur wurden mit Auto-Rickshaw zudem die Programme CNS (Brunger *et al.*, 1998) und REFMAC5 (Bailey, 1994) eingesetzt. Auf diese Weise konnte der kristallographische R-Faktor auf 41 % und der freie R-Faktor auf 45 % reduziert werden. Im nächsten Schritt wurde mit Auto-Rickshaw das Programm Phaser (McCoy, 2007) eingesetzt, um eine anomale Differenz-Fourier-Karte aus den Phasen des Molekularen Ersatzes und den gemessenen anomalen Differenzen zu berechnen. Das Programm Mlphare (Bailey, 1994) wurde verwendet, um die Substruktur der Schwefelatome anhand der *Peaks* in der anomalen Differenz-Fourier-Karte zu ermitteln (Tabelle 6). Anschließend wurden die Phasen aus dem Molekularen Ersatz und der SAD-Messung mit Hilfe des Programms sigmaA (Bailey, 1994) kombiniert. Nicht-kristallographische Symmetrie wurde mit dem Programm RESOLVE (Terwilliger, 2000) ermittelt, bevor mit dem Programm DM (Bailey, 1994) eine Dichtemodifikation durchgeführt wurde. Abschließend wurde mit Auto-Rickshaw das Programm ARP/WARP (Perrakis *et al.*, 1999) eingesetzt, um das Molekül-Modell zu bauen.



**Abbildung 10: Struktur des Ac1/VEGF(8-109)-Komplexes mit anomaler Differenz-Fourier-Karte.** Die Proteine des Komplexes sind als *Cartoon* dargestellt. Cystein- und Methioninreste-Seitenketten sind als Sticks hervorgehoben, wobei die Schwefelatome gelb gefärbt sind. Das VEGF(8-109)-Dimer ist in grau (Kette C) und blau (Kette D) dargestellt, während die Anticaline grün (Kette A) und orange (Kette B) dargestellt sind. Die anomale Differenz-Fourier-Karte ist bei  $5 \sigma$  konturiert und in Form eines roten Gitters wiedergegeben. Die anomale Differenz des Methionins 22 der Kette A wies nur eine ein  $\sigma$  von 4,02 auf. Daher ist Methionin 22 hier nicht markiert. Die einzigen anomalen Differenzdichten, die für das Anticalin dargestellt sind, sind die der Disulfidbrücke. Dahingegen weisen alle Schwefelatome des VEGF(8-109) anomale Differenzdichten auf. Einige *Peaks* der anomalen Differenz-Fourier-Karte korrespondieren nicht mit Schwefelatomen von Cystein- oder Methioninresten. An diesen Positionen befinden sich Sulfationen, die aus dem Lithiumsulfat der Kristallisationslösung stammen.

**Tabelle 6: Peaks der initialen anomalen Differenz-Fourier-Karte einschließlich deren Signalhöhe und Zuordnung zu einer anomal streuenden Molekül-Gruppe.**

Rang	Signalhöhe ( $\sigma$ )	Anomal streuende Gruppe
1	17,24	Cys C61 – Cys C104
2	15,39	Cys C57 – Cys C102
3	14,77	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
4	14,75	Met D94
5	14,62	Cys C26 – Cys C68
6	14,00	Cys D61 – Cys D104
7	13,87	Cys B31 – Cys B104
8	13,23	Cys A31 – Cys A104
9	12,82	Met C78
10	12,72	Met C81
11	12,48	Cys D26 – Cys D68
12	12,05	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
13	11,88	Met D81
14	11,50	Cys D57 – Cys D102
15	11,37	Met C94
16	10,96	Met D78
17	10,83	Cys D51
18	10,41	Cys C51
19	10,29	Cys C60
20	10,27	Met C55
21	8,56	Met D55
22	8,04	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
23	8,02	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
24	7,55	Cys D60
25	6,17	Met C18
26	4,02	Met A

Die Schritte von der Berechnung der anomalen Differenz-Fourier-Karte bis zum Modellbau wurden von Auto-Rickshaw iterativ wiederholt, bis sich die Elektronendichte nicht mehr verbesserte. Im Verlauf dieses Prozesses wurde auch die Schwefelsubstruktur optimiert. Nur

ein weiteres Schwefelatom, das im Verlauf dieser Prozedur zusätzlich identifiziert werden konnte und das in die Schwefelsubstruktur mit aufgenommen wurde, gehörte zu Methionin 22 der Kette A des Anticalins (Ketten A und B entsprechen den beiden Anticalinen der asymmetrischen Einheitszelle, während die Ketten C und D das VEGF(8-109)-Dimer bilden). Die Elektronendichte der Kette A war deutlich besser definiert als die Elektronendichte von Kette B (Abschnitt 3.1.7 und 3.1.8.3). Insgesamt konnten so also 22 der 24 anomal streuenden Molekülgruppen identifiziert werden (Tabelle 6 und Abbildung 10).

### 3.1.6.2 Phasenbestimmung mit UV-RIP

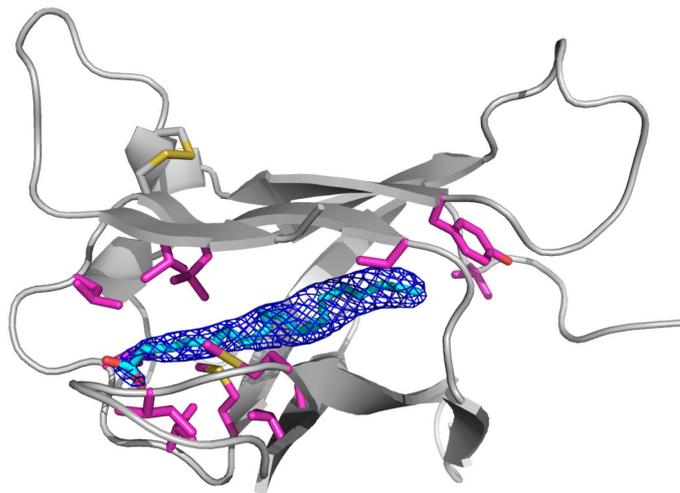
Zusätzlich zur Phasenbestimmung durch MRSAD gelang auch die Phasenbestimmung mit Hilfe von UV-RIP (Nanao & Ravelli, 2006). Bei dieser Methode werden durch einen UV-Laser spezifisch Strahlenschäden im Kristall eingeführt. Eine bestimmte Wellenlänge führt zu einer selektiven Spaltung der Disulfidbrücken im Proteinkristall. Die veränderten Schwefelpositionen können dann für die Phasenbestimmung verwendet werden (Schönfeld *et al.*, 2008). Von einem Ac1/VEGF(8-109)-strepII-Kristall wurde jeweils ein Datensatz vor und nach der Bestrahlung aufgenommen. Die anschließende Phasenbestimmung wurde von Dr. Uwe Müller (BESSY, Berlin) durchgeführt. Die Daten wurden jedoch nicht weiter verwendet.

### 3.1.7 Modellbau

Das initiale Strukturmodell des Komplexes, das aus der Anwendung des Programms ARP/WARP resultierte, enthielt das vollständige VEGF(8-109)-Dimer. Für eines der beiden Anticalinmoleküle in der Einheitszelle (Kette A) wurden einzelne Rückgratsegmente (Polyalanin) erhalten. Bei dem zweiten Anticalinmolekül waren nur zwei relativ kurze Polyalaninketten von ARP/WARP zugeordnet worden, da die Elektronendichte in diesem Bereich sehr schlecht definiert war. Dementsprechend wurde zunächst das besser definierte Anticalinmolekül manuell mit Hilfe des interaktiven Grafikprogramms Coot gebaut (Kette A). Die Elektronendichten in den Bereichen der bereits zugeordneten Polyalaninketten waren zum Teil gut interpretierbar, so dass die meisten der Seitenketten entsprechend der Sequenz modelliert werden konnten. Auf Basis der Sequenz dieser Peptide konnte man auch die Aminosäuren der Nummerierung des Anticalins zuordnen. Nachdem die interpretierbare Elektronendichte so gut wie möglich modelliert worden war, wurde die Struktur mit Hilfe von REFMAC5 verfeinert und anschließend die Elektronendichte neu berechnet. Auf diese Weise

wurden iterativ zunehmende Bereiche der Elektronendichte interpretierbar. Erste Versuche, die einzelnen Peptidfragmente der Kette A zusammenzufügen, schlugen fehl, da von einer herkömmlichen Lipocalintopologie ausgegangen wurde.

Aus diesem Grund wurden die Peptide nur aufgrund der interpretierbaren Elektronendichte und anhand der Aminosäuresequenz des Anticalins verbunden. Dies führte zu einer Proteinstruktur, deren Topologie von der des Wildtyp-Lcn1 abwich (Abschnitt 3.1.8.3). Mit Hilfe von nicht-kristallographischer Symmetrie in Zusammenhang mit dem homodimeren VEGF(8-109) wurde in der Einheitszelle Kette B gebaut. Das so erhaltene Modell des Komplexes wurde anschließend gegen den Datensatz mit besserer Auflösung (1,8 Å) verfeinert, der bei einer Wellenlänge von 0,9184 aufgenommen worden war. In mehreren Verfeinerungszyklen wurde das Modell zunehmend komplettiert, und gegen Ende des Verfeinerungsprozesses wurden Wassermoleküle sowie Sulfationen in die Elektronendichte eingepasst.



**Abbildung 11: Struktur des Ac1-Moleküls (Kette A) mit Elektronendichte für die vermutete Fettsäure im Inneren.** Das Anticalin ist grau als *Cartoon* dargestellt. Die gebundene Stearinsäure ist als Stabmodell in Cyan mit roten Sauerstoffatomen dargestellt. Die  $2F_o-F_c$ -Karte der Fettsäure in Form eines blauen Gitters ist bei  $2\sigma$  konturiert. Alle mit der Lactobacillsäure interagierenden Seitenketten des Anticalins bis zu einem Abstand von 4 Å sind als pinkfarbene Stabmodelle hervorgehoben. Die Disulfidbrücke ist zur Orientierung ebenfalls dargestellt (Schwefelatome gelb).

Beide Anticaline zeigten im Inneren des  $\beta$ -Barrels eine längliche Elektronendichte, die zunächst nicht zugeordnet werden konnte (Abbildung 11). Die Umgebung dieser Elektronendichte wird in erster Linie von hydrophoben Seitenketten gebildet. Es lag daher nahe, dass es sich um eine Fettsäure handelt, die aus dem Expressionsorganismus stammt und

das hydrophobe Innere des Anticalins ausfüllt. Die Länge der Elektronendichte entspricht der der Stearinsäure. Außerdem weist die Elektronendichte eine Wölbung auf, die auf eine Cyclopropangruppe hindeutet. Daher wurde Lactobacillsäure in der Elektronendichte platziert.

Durch die Verfeinerung der Struktur wurde ein kristallographischer R-Faktor von 20,9 % und ein freier R-Faktor von 24,9 % erreicht (Tabelle 7). Die finale Elektronendichte wies allerdings noch Lücken auf, in denen die Aminosäuresequenz nicht definiert war. In Kette A sind die Aminosäuren 8 bis 116 definiert, wobei jedoch eine Schleife aus 7 Aminosäuren von Position 55 bis 61 fehlt. Die Aminosäuren dieser Schleife wurden ohne signifikante Elektronendichte mit einer Besetzungszahl von 0 modelliert. Insgesamt sind in Kette A also nur 102 der 154 Aminosäuren strukturell definiert. Bei dem zweiten Anticalin in der Einheitszelle, der Kette B, sind noch mehr Bereiche in der Elektronendichte nicht definiert. Dieses Anticalin wurde hauptsächlich mit Hilfe von nicht-kristallographischer Symmetrie gebaut.

**Tabelle 7: Verfeinerungsstatistik des Ac1/VEGF(8-109)-streptII-Komplexes.**

Auflösungsgrenzen [Å]	35,0 – 1,8
$R_{\text{cryst}} / R_{\text{free}}$ [%] <sup>a</sup>	20,3 / 24,2
Mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	33,7
RMSD:	
Bindungslängen [Å]	0,021
Bindungswinkel [°]	2,2
Ramachandran-Analyse:	
Favorisiert [%]	95,5
Erlaubt [%]	3,7
Nicht erlaubt [%]	0,8

$$^a R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|},$$

$R_{\text{free}}$  entspricht  $R_{\text{cryst}}$ , wobei 5 % der Reflexe von der Verfeinerung ausgeschlossen und zur Berechnung verwendet wurden.

### 3.1.8 Die Kristallstruktur des Ac1/VEGF-Komplexes

#### 3.1.8.1 Gesamtstruktur

Abbildung 10 zeigt die komplette Struktur des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109). In grau und hellblau ist das längliche VEGF-Dimer zu erkennen, das auf beiden Seiten von jeweils einem Anticalin gebunden wird. Auf den ersten Blick weist das Anticalin die typische Struktur eines Lipocalins mit einem *Sandwich* aus  $\beta$ -Sheets auf. Allerdings hat das Anticalin eine andere Topologie (Abschnitt 3.1.8.3). Anders als die Strukturen der früher publizierten Anticaline (Kim *et al.*, 2009; Schönfeld *et al.*, 2009) bindet Ac1 das VEGF(8-109)-Dimer seitlich mit einem  $\beta$ -Sheet und nicht zentral mit seiner Schleifenregion.

#### 3.1.8.2 Struktur von VEGF(8-109)

Die Struktur des VEGF(8-109) entspricht der zuvor publizierten Struktur des unkomplexierten Proteins (Christinger *et al.*, 1996). Der RMSD über alle Atome beträgt 0,66 Å, während der entsprechende Wert nur für die C $\alpha$ -Atome 0,59 Å beträgt. Die größten strukturellen Abweichungen sind bei den Positionen 38-46 und 84-88 zu finden. Diese werden wahrscheinlich durch Kristallkontakte verursacht. Dabei interagieren die Reste 38-45 von einem VEGF-Molekül mit den Resten 84-88 der symmetrieverwandten Kette eines benachbarten VEGF-Moleküls. Außer durch hydrophobe Interaktionen wird diese Packungs-Wechselwirkung durch zwei Salzbrücken zwischen Lys 84 und Glu 44\* und zwischen Gln 87 und Asp 41\* stabilisiert. Durch die Bindung von Ac1 werden keine nennenswerten strukturellen Veränderungen in VEGF(8-109) ausgelöst.

#### 3.1.8.3 Struktur von Ac1

Wie bereits weiter oben beschrieben, ist die Struktur von Ac1 weniger gut definiert als die von VEGF(8-109). Dies wird auch durch den höheren durchschnittlichen B-Faktor für Ac1 verdeutlicht, der für Ac1 19,4 gegenüber 14,7 für VEGF(8-109) beträgt. Da die Kette A für Ac1 besser definiert ist als Kette B in der asymmetrischen Untereinheit, wird die erstere für die weitere Analyse herangezogen. Die Kette A zeigt eine definierte Elektronendichte von Rest 8 bis 116, wobei eine Schleife von 7 Resten im Bereich von Position 55 bis 61 fehlt.

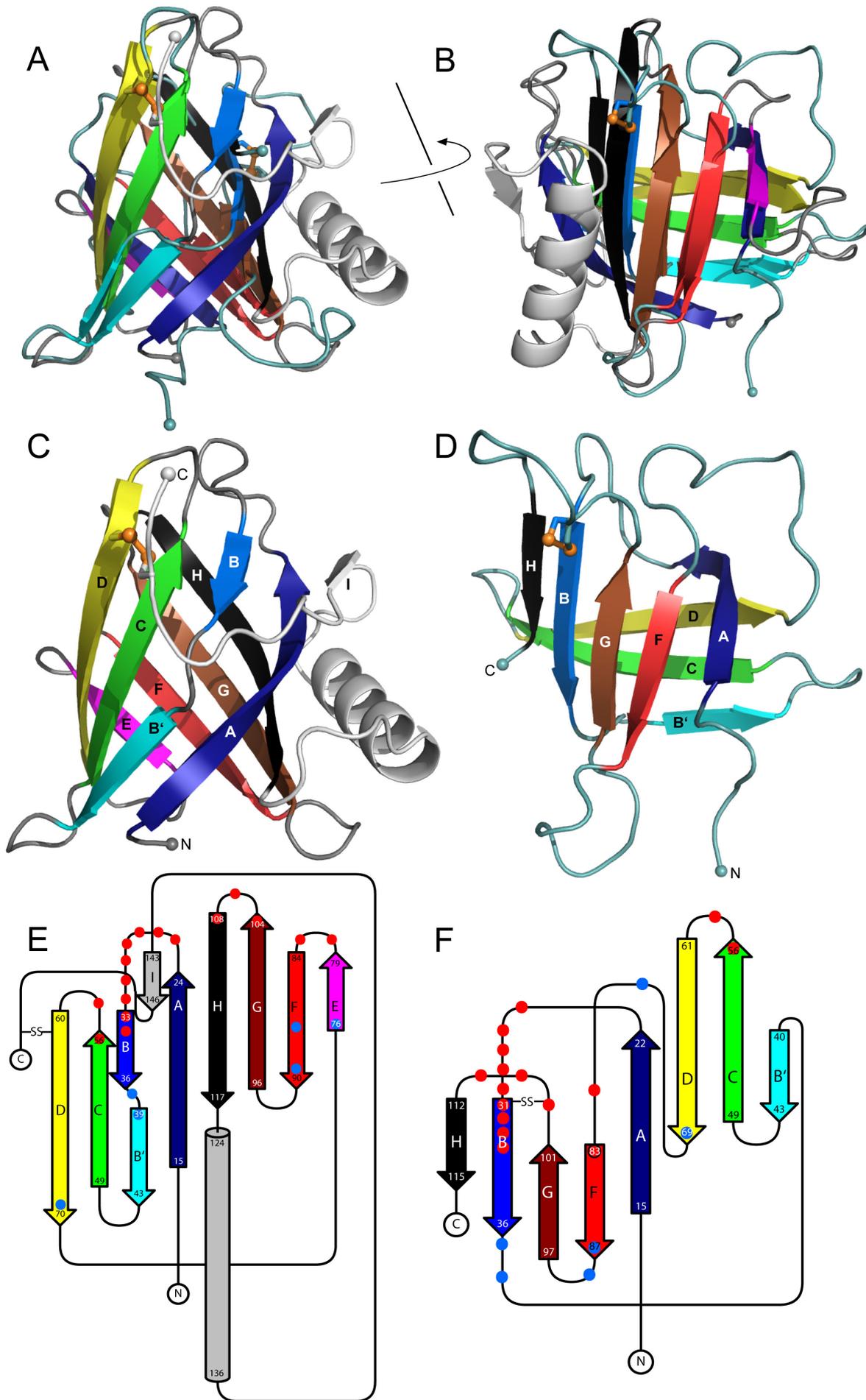
Eine Suche mit Hilfe des DALI-Servers (Holm & Rosenstrom, 2010) nach Proteinen, die eine ähnliche Struktur wie Ac1 haben, lieferte als ersten Treffer die Struktur des wtLcn1 (PDB-Code: 3EYC). Tatsächlich ähnelt die Struktur von Ac1 der Struktur des Wildtyp Lcn1. Die

Abbildungen 12A und B zeigen Überlagerungen der beiden Strukturen in zwei verschiedenen Orientierungen, wobei eine ähnliche Anordnung der  $\beta$ -Stränge deutlich wird. Die RMSD aller  $C\alpha$ -Atome ergab allerdings einen sehr hohen Wert von 8,0 Å. Betrachtet man nur die  $C\alpha$ -Atome der  $\beta$ -Strang-Regionen des wtLcn1 (Reste 39-43, 49-56, 60-70, 76-79, 84-90 und 96-104), liegt die RMSD niedriger mit 4,8 Å. Auch in der Abbildung ist zu erkennen, dass die *Loops* nicht so gut überlagern.

Betrachtet man jedoch die Topologie beider Strukturen (Abbildung 12E und F), stellt man einige gravierende Unterschiede fest. In der Struktur des Lcn1 liegen  $\beta$ -Stränge, die in der Primärstruktur aufeinander folgen, in Einklang mit der  $(x1)_7$ - $\beta$ -Barrel-Supersekundärstruktur, in der Tertiärstruktur ebenfalls nebeneinander. Dies ist nicht der Fall für die Struktur von Ac1. Während bei Lcn1 der  $\beta$ -Strang A zwischen den  $\beta$ -Strängen B und H bzw. I liegt, ist dieser  $\beta$ -Strang in Ac1 zwischen den  $\beta$ -Strängen D und F positioniert. Die entsprechende Position wird in Lcn1 von Strang E eingenommen, der in Ac1 fehlt. Im Gegensatz zur Lcn1-Struktur, in der der Strang B – B' zwischen den Strängen A und C positioniert ist, liegt in der Ac1-Struktur der Strang B zwischen den Strängen G und H, die ihrerseits durch einen  $\phi$ -*Loop* miteinander verbunden sind.

$\phi$ -*Loops* sind relativ selten und zeichnen sich durch zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge aus, zwischen denen sich ein weiterer  $\beta$ -Strang befindet, wobei die 3 Stränge zusammen ein  $\beta$ -Faltblatt bilden (Richardson, 1981; Tang *et al.*, 1978). Lässt man den  $\phi$ -*Loop* außer Acht, sind die  $\beta$ -Stränge F, G und H in Ac1 im Prinzip ähnlich angeordnet wie in Lcn1. Der  $\beta$ -Strang B' liegt in Ac1 wie in Lcn1 neben dem  $\beta$ -Strang C, so dass die Anordnung der  $\beta$ -Stränge B', C und D der in Lcn1 entspricht. Die Hauptunterschiede der beiden Strukturen liegen also in  $\beta$ -Strang A, der in Ac1 den fehlenden  $\beta$ -Strang E ersetzt und in  $\beta$ -Strang B, der am  $\phi$ -*Loop* zwischen den  $\beta$ -Strängen G und H beteiligt ist. Die grauen Strukturelemente in Abbildung 11E, zu denen eine  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Strang I gehören, sind in der Ac1-Struktur nicht sichtbar und vermutlich ungeordnet.

Lcn1 hat eine Disulfidbrücke zwischen den Resten 61 und 153. Diese Disulfidbrücke, die den C-Terminus des Lipocalins an dem  $\beta$ -Barrel fixiert, wurde in der Zufallsbibliothek, die für die Selektion von Ac1 verwendet wurde, entfernt. Ac1 weist dagegen eine neue Disulfidbrücke zwischen den Resten 31 und 104 auf, die den  $\phi$ -*Loop* stabilisiert.



**Abbildung 12: Vergleich der Ac1-Struktur (Kette A) mit der Struktur von wtLcn1.** Die jeweiligen  $\beta$ -Stränge sind in der gleichen Farbe dargestellt A: dunkelblau; B: blau; B': hellblau; C: grün; D: gelb; E: magenta; F: rot; G: braun; H: schwarz; I: grau. (A) und (B) Überlagerung von Ac1 und wtLcn1 in zwei verschiedenen Orientierungen. Bei der Überlagerung wurden nur C $\alpha$ -Atome berücksichtigt, deren Aminosäuren strukturell äquivalente  $\beta$ -Stränge bilden. (C) und (D) Individuelle Strukturen von Ac1 (C) und wtLcn1 (D). Die  $\beta$ -Stränge sind mit den jeweiligen Buchstaben beschriftet. (E) und (F) Topologiediagramme von Ac1 (E) und wtLcn1 (F).  $\beta$ -Stränge sind als Pfeile und  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Von jedem Sekundärstrukturelement ist die Nummer des ersten und des letzten Restes angegeben. Die grauen Bereiche im Topologiediagramm von wtLcn1 sind in der Ac1-Struktur nicht sichtbar. Mutierte Positionen sind als farbige Punkte dargestellt (rot: Reste, die in der ursprünglichen Bibliothek mutiert wurden; blau: Reste, die während der Affinitätsmaturierung mutiert wurden).

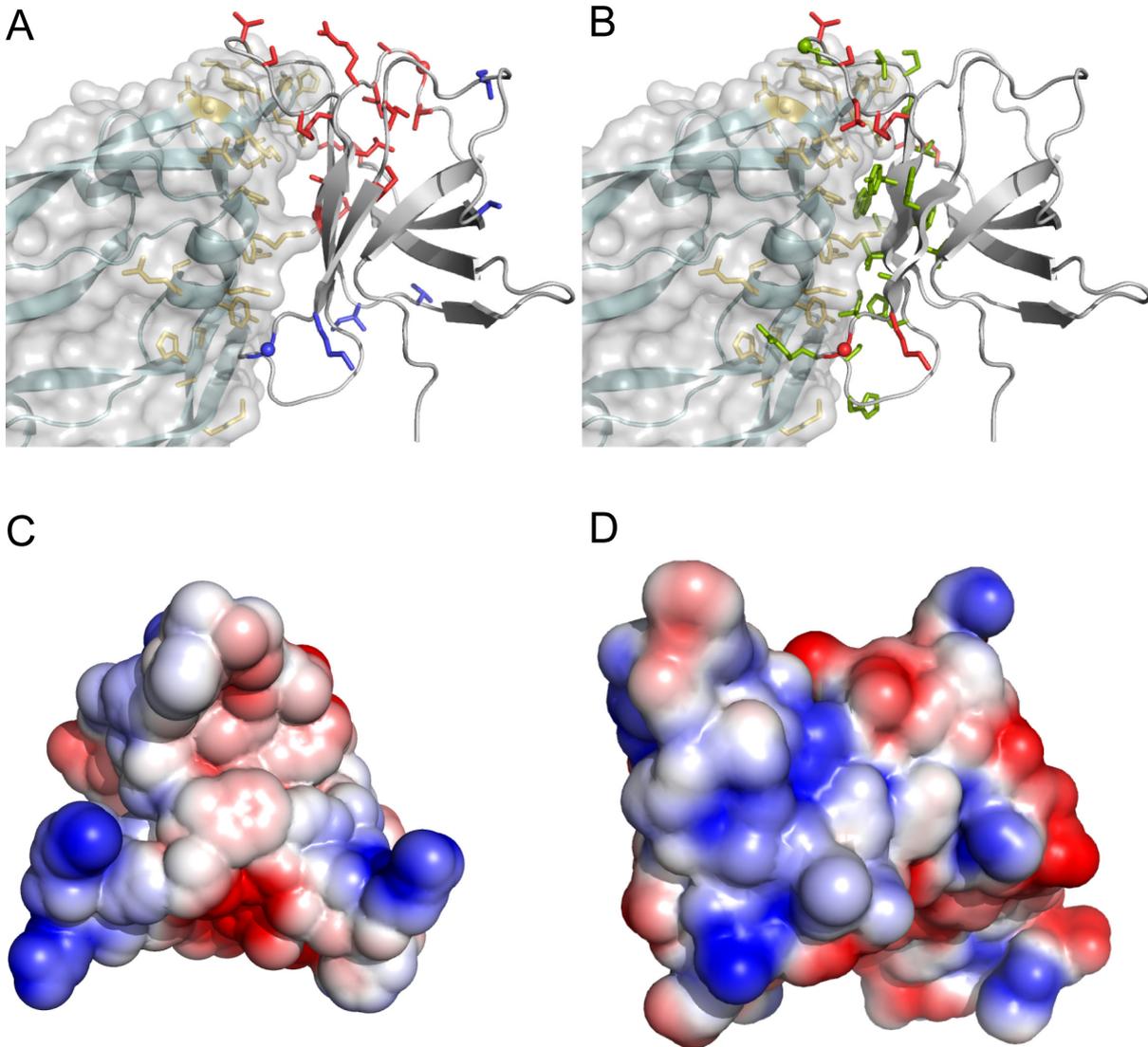
In den Topologiediagrammen von Ac1 und wtLcn1 (Abbildung 12E und F) sind die in Ac1 mutierten Positionen markiert. Bei wtLcn1 ist zu erkennen, dass die Positionen, die in der ursprünglichen Zufallsbibliothek mutiert wurden, vor allem in den vier oberen *Loops* liegen. Auffälligerweise befindet sich ein Großteil dieser Positionen im Topologiediagramm von Ac1 im Bereich des  $\phi$ -*Loops*. Die Positionen, die im Verlauf der nachfolgenden Affinitätsmaturierungen mutiert wurden, verteilen sich in beiden Fällen allerdings über die gesamte Struktur.

#### 3.1.8.4 Strukturelle Analyse der Bindung

Die Struktur des Ac1/VEGF-Komplexes zeigt einen unerwarteten Bindungsmodus für das Anticalin. Normalerweise binden Anticaline wie die natürlichen Lipocaline ihre Liganden in ihrer Bindungstasche, die sich im oberen Bereich des  $\beta$ -*Barrels* befindet. Ac1 hingegen bindet VEGF(8-109) seitlich mit den  $\beta$ -Strängen B, F, G und H (Abbildung 13); dabei klappt der  $\phi$ -*Loop* nach außen und passt sich somit der Struktur des VEGF(8-109) an. Ac1 besitzt noch immer eine hydrophobe Tasche im Innern des  $\beta$ -*Barrels*. Diese wird von einem hydrophoben Molekül, vermutlich einer Lactobacillsäure besetzt (Abbildung 11).

Aufgrund der ungewöhnlichen Bindung des Ac1 an VEGF(8-109) handelt es sich bei den meisten Aminosäuren, die an der Interaktion beteiligt sind, nicht um Reste, die im Selektionsprozess ursprünglich mutiert worden sind (Abbildung 13B und Tabelle 8). Tatsächlich interagieren nur 9 der insgesamt 22 mutierten Aminosäuren mit VEGF(8-109) (Abbildung 13A). Drei dieser neun mutierten interagierenden Reste wurden sogar erst im

Verlauf der zwei Affinitätsmaturierungsrunden mutiert (Lysin 87, Glycin 89 und Serin 106), wobei die Position 106 auch schon in der ursprünglichen Bibliothek mutiert worden war.



**Abbildung 13: Bindungswechselwirkung zwischen Ac1 und VEGF(8-109).** (A) und (B) Komplex zwischen Ac1 (grau) und VEGF(8-109) (blasses cyan mit halbtransparenter grauer Oberfläche). Die mutierten (A) bzw. interagierenden (B) Reste sind als *Sticks* hervorgehoben. In (A) wurden die roten Reste in der ursprünglichen Zufallsbibliothek und die blauen Reste im Verlauf der Affinitätsmaturierung mutiert. In (B) sind alle interagierenden Reste von Ac1, die mutiert wurden, rot dargestellt, während alle anderen interagierenden Seitenketten grün dargestellt sind. Interagierende Reste wurden mit Hilfe von PISA ermittelt (Krissinel & Henrick, 2007). Für VEGF(8-109) sind alle Seitenketten, die an der Bindung beteiligt sind, als gelbe *Sticks* dargestellt. (C) und (D) Elektrostatistische Oberfläche von Ac1 (C) und VEGF(8-109) (D) berechnet durch APBS (Baker *et al.*, 2001).

**Tabelle 8: Interaktionen in dem Ac1/VEGF(8-109)-Komplex.** Alle Reste von Ac1, die mit VEGF(8-109) interagieren, sind aufgeführt. Die mutierten Reste von Ac1 sind fett hervorgehoben. C und D bezeichnen die beiden Ketten des VEGF-Homodimers.

Ac1	Interagierende Reste	Begrabene Oberfläche [ $\text{\AA}^2$ ]	Wasserstoffbrücke (H) / Salzbrücke (S)
<b>Cys 31</b>	Met D81, Gln D89	28,5	H
<b>Ala 33</b>	Met D81, Gln D89	6,2	-
Ser 35	Tyr C21	9,9	-
Lys 58	His D86	4,2	-
His 84	Met C18	7,3	-
Val 85	Met C18	2,0	-
Ala 86	Met C18, Gln C22	31,8	-
<b>Lys 87</b>	Gln C22	11,5	H
Ile 88	Tyr C21, Tyr C25	48,9	-
<b>Gly 89</b>	Gln C22	6,9	-
Arg 90	Gln C22, Arg C23, Ser C24, Tyr C25, Cys C26, His C27, Lys C101, Cys C102	148,3	H
Ser 91	Tyr C25	10,8	-
His 92	Lys C101	32,7	-
His 96	Tyr C25	15,3	-
Ile 98	Phe C17, Met C18, Tyr C21	60,1	H
Phe 99	Met C18	0,9	-
Tyr 100	Phe C17, Met C18, Met D81, Ile D91	70,6	-
<b>Cys 104</b>	Met D81, His D90, Ile D91	31,0	H
<b>Leu 105</b>	Gln D79, Ile D91	53,4	-
<b>Ser 106</b>	His D90, Ile D91, Gly D92	24,9	H
Gly 107	His D90	12,6	-
<b>Val 108</b>	His D90	6,1	-
Pro 109	Tyr D45, Tyr D45, Lys D84, Gly D88, His D90	74,7	-
Val110	Gln D87, Gly D88, Gln D89	25,8	H
Pro 111	Gln D87, Gly D88, Gln D89	8,7	-
Gly 112	Gln D89	15,6	-
Val 113	Gln D89	6,5	H
Trp 114	Phe C17, Tyr C21, Lys D48, Met D81, Ile D83, Gln D89, Asn C62	131,4	H
Val 116	Asp C63	19,2	-

<sup>1</sup> definiert durch PISA (Krissinel & Henrick, 2007)

Die erste Affinitätsmaturierung verbesserte die Dissoziationskonstante von etwa 500 nM auf etwa 0,3 nM. Bei der zweiten Affinitätsmaturierung (*heuristic maturation*) wurde die Dissoziationskonstante auf einen Wert von etwa 0,12 nM verbessert. Bemerkenswerterweise interagiert keiner der drei in den Affinitätsmaturierungen mutierten Reste, die an der Bindung beteiligt sind, mit VEGF(8-109) mit seiner Seitenkette. Dies deutet darauf hin, dass die Ursache für die verbesserte Affinität nicht in einer optimierten Bindung, sondern in einer erhöhten konformationellen Stabilität des Ac1 liegt.

Insgesamt interagieren 29 Reste von Ac1 mit VEGF(8-109) (Tabelle 8). Zusammen bilden sie eine 938 Å<sup>2</sup> große Interaktionsfläche. Die Bindung wird durch neun Wasserstoffbrücken stabilisiert, von denen acht durch das Ac1-Rückgrats gebildet werden. Die neunte Wasserstoffbrücke hingegen wird zwischen der Seitenkette von Arginin 90 und dem Carbonylsauerstoff des Arginin 23 in VEGF(8-109) gebildet.

Die Interaktionsfläche von Ac1 ist insgesamt leicht negativ geladen und passt somit gut zu der leicht positiven Interaktionsfläche von VEGF(8-109) (Abbildung 13 C und D). Allerdings sind die direkt interagierenden Reste von Ac1 hauptsächlich hydrophob oder positiv geladen (Tabelle 8).

## 3.2 Bakterielle Produktion und Analyse des IL4-Bindungsproteins

Ac1 ist das erste auf Lcn1 basierende Anticalin, dessen Kristallstruktur gelöst wurde. Ac2, das die extrazelluläre Domäne des IL4-Rezeptors bindet (in löslicher Form auch IL4-Bindungsprotein genannt), basiert ebenfalls auf Lcn1. Zum Zweck der Strukturaufklärung des Komplexes aus Ac2 und dem IL4-Bindungsprotein wurde zunächst das IL4-Bindungsprotein produziert.

### 3.2.1 Versuche zur löslichen Produktion des IL4-Bindungsproteins

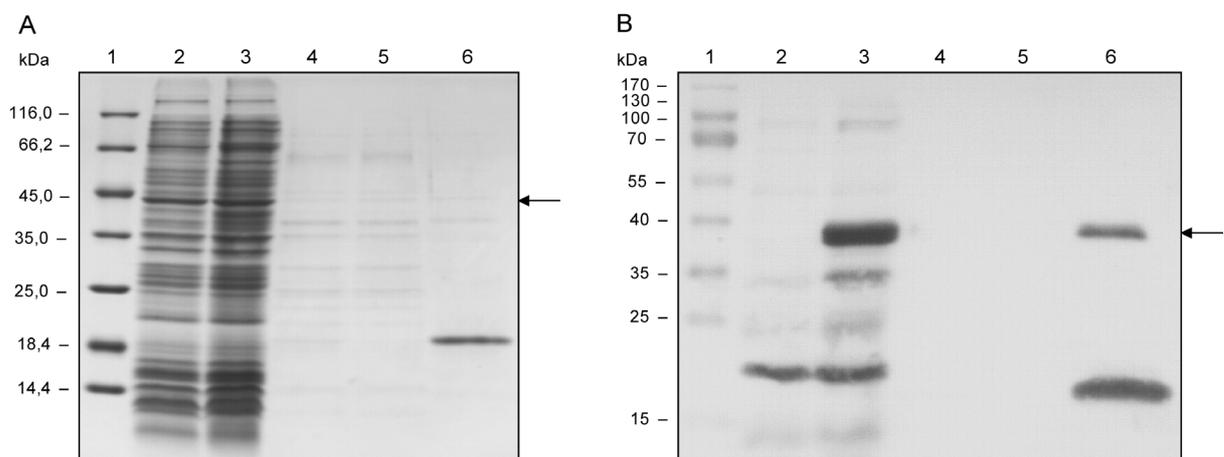
Die Kristallstruktur des IL4-Bindungsproteins in Komplex mit IL4 ist bereits bekannt (Hage *et al.*, 1999). Dazu wurde das IL4-Bindungsprotein zunächst als Einschlusskörper in *E. coli* produziert und dann zurückgefaltet (Shen *et al.*, 1996). Bei einem Vorversuch, das IL4-Bindungsprotein nach dem publizierten Protokoll herzustellen, wurden nur wenige µg gefaltetes Protein aus den Einschlusskörpern von 2 Liter Bakterienkultur erhalten. Dabei

wurde das Plasmid von der Pieris AG zur Verfügung gestellt. Es gelang nur der Nachweis auf einem *Western Blot*. Aufgrund dieser schlechten Ausbeute wurde versucht, das Protein in löslicher Form in *E. coli* zu produzieren. Dazu sollte das IL4-Bindungsprotein einerseits als Fusion mit dem *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) exprimiert und andererseits mit dem Anticalin Ac2 co-exprimiert werden. Die hierzu notwendigen Plasmide wurden von Dr. Michael Schneider zur Verfügung gestellt.

### 3.2.1.1 Versuch der Produktion als Fusionsprotein mit *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO)

SUMO-Proteine sind kleine Proteine mit etwa 100 Aminosäuren. In Zellen werden sie an andere Proteine angehängt und wieder entfernt, um deren Funktion zu modifizieren. Dabei handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation, die bei vielen Prozessen innerhalb einer Zelle eine wichtige Rolle übernimmt (van der Veen & Ploegh, 2012). Obwohl sich die Sequenzen von SUMO und Ubiquitin stark unterscheiden, haben diese beiden Proteine eine fast identische Struktur. Allerdings ist SUMO nicht an der Degradierung von Proteinen beteiligt (Hay, 2005).

Aufgrund der großen Stabilität und der guten Löslichkeit von SUMO wurde angenommen, dass es bei der Faltung von Fusionspartnern behilflich ist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass SUMO die Expression und Löslichkeit verschiedener Testproteine deutlich mehr fördert als andere Fusionsproteine wie das Maltosebindungsprotein, Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin, NUS-A und Ubiquitin (Marblestone *et al.*, 2006).



**Abbildung 14: Produktion und Reinigung von IL4BP-SUMOstrepII.** A: 12% SDS-Polyacrylamidgel; B: *Western Blot*, entwickelt mit Streptactin-AP. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Gesamtzellaufschluss vor der Induktion; Spur 3: Gesamtzellaufschluss nach der Induktion; Spur 4: Periplasmaextrakt; Spur 5: Durchlauf der Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie; Spur 6: Eluat der Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie.

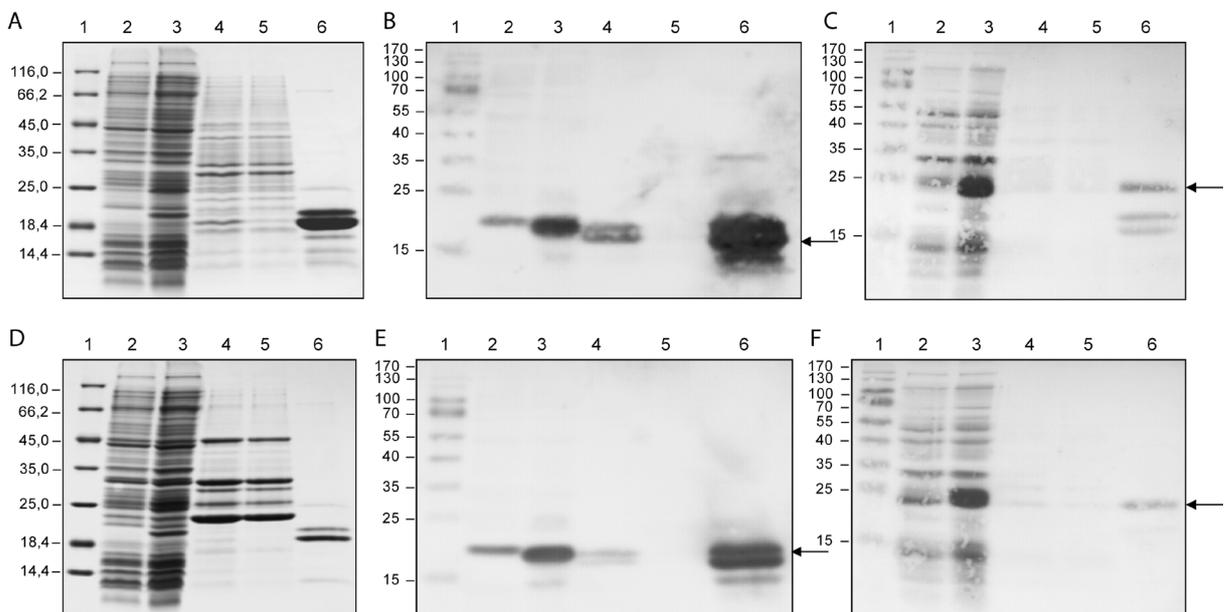
Das IL4-Bindungsprotein wurde daher mit SUMO als C-terminalem Fusionsprotein (IL4BP-SUMOstrepII) im 2 L Schüttelkolben in *E. coli* JM83 mit pIL4R-3(+E)-SUMO als Expressionsplasmid periplasmatisch produziert und anschließend durch Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Abbildung 14 zeigt ein SDS-Polyacrylamidgel und den dazugehörigen *Western Blot* der Expression und Reinigung. Beim Gesamtzellextrakt war weder vor noch nach Induktion eine auffällige Bande für IL4BP-SUMOstrepII (35 kDa) auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu erkennen. Auf dem *Western Blot* fällt jedoch beim Gesamtzellextrakt nach der Induktion eine relativ starke Bande bei etwas über 35 kDa auf. Diese Bande trat auch beim Eluat der SA-Chromatographie auf, so dass es sich dabei wahrscheinlich um IL4BP-SUMOstrepII handelt. Als Verunreinigung wurde zudem das 22,5 kDa große Biotin Carboxyl Carrier Protein von dem StrepTactin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat angefärbt. Angesichts der sehr geringen Ausbeute für das rekombinante Fusionsprotein wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

### 3.2.1.2 Versuch der Co-Produktion des IL4-Bindungsproteins mit Ac2

Bei der Co-Expression des IL4-Bindungsproteins mit Ac2 sollte das Anticalin quasi als Chaperon funktionieren, indem es während der Expression das korrekt gefaltete IL4-Bindungsprotein bindet und somit dieses stabilisiert und in Lösung hält. Die Gene beider Proteine wurden auf dem Plasmid pIL5R5-Tlc276 unter der gemeinsamen Kontrolle des Tetracyclin-Promotors cloniert. Dabei wurde das Gen für Ac2 von der Pieris AG zur Verfügung gestellt. Um beide Proteine unabhängig voneinander nachweisen zu können, wurde das IL4-Bindungsprotein mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag produziert, während Ac2 am C-Terminus das Strep-tagII trug.

Die periplasmatische Co-Expression fand im 2 L Schüttelkolben in *E. coli* JM83 statt. Es wurden zwei Ansätze durchgeführt, wobei die Zellen zusätzlich zu dem bicistronischen Plasmid auch mit dem Plasmid pTUM4 transformiert waren. Dieses Plasmid kodiert für vier periplasmatische Chaperone und Faltungshelfer: die Disulfidoxidoreduktasen DsbA und DsbC, die die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren, und die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen mit Chaperonaktivität FkpA und SurA (Schlapschy *et al.*, 2006). Aus dem periplasmatischen Zellextrakt wurde der Komplex durch SA-Chromatographie gereinigt, um das mit Ac2 komplexierte IL4-Bindungsprotein zu isolieren. Abbildung 15 zeigt die SDS-Polyacrylamidgele und die entsprechenden *Western Blots*.

Das IL4-Bindungsprotein mit His<sub>6</sub>-Tag (IL4BPHis<sub>6</sub>) hat eine Molmasse von 24 kDa, während das Anticalin mit *Strep*-tagII (Ac2strepII) eine Molmasse von 19 kDa hat. Sowohl im Fall der Produktion ohne pTUM4 (Abbildung 14A-C) als auch mit pTUM4 (Abbildung 15D-F) war nach der Induktion eine Bande auf Höhe des Anticalins auf dem SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Auf den entsprechenden *Western Blots* war erkennbar, dass in beiden Fällen das Anticalin bereits vor der Induktion produziert wurde. Dies war auch der Fall für das IL4-Bindungsprotein, wobei im Gesamtzellextrakt vor und nach der Induktion noch zahlreiche weitere Banden durch das Nickel-NTA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat auf dem *Western Blot* angefärbt wurden.



**Abbildung 15: Co-Produktion und Reinigung von IL4BP-His<sub>6</sub> und Ac2strepII.** A-C: Produktion ohne pTUM4; D-F: Produktion mit pTUM4; A und D: 12% SDS-Polyacrylamidgel; B und E: *Western Blot*, detektiert mit Streptactin-AP; C und F: *Western Blot*, detektiert mit Nickel-NTA-AP. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Gesamtzellaufschluss vor der Induktion; Spur 3: Gesamtzellaufschluss nach der Induktion; Spur 4: Periplasmaextrakt; Spur 5: Durchlauf der SA-Chromatographie; Spur 6: Eluat der SA-Chromatographie.

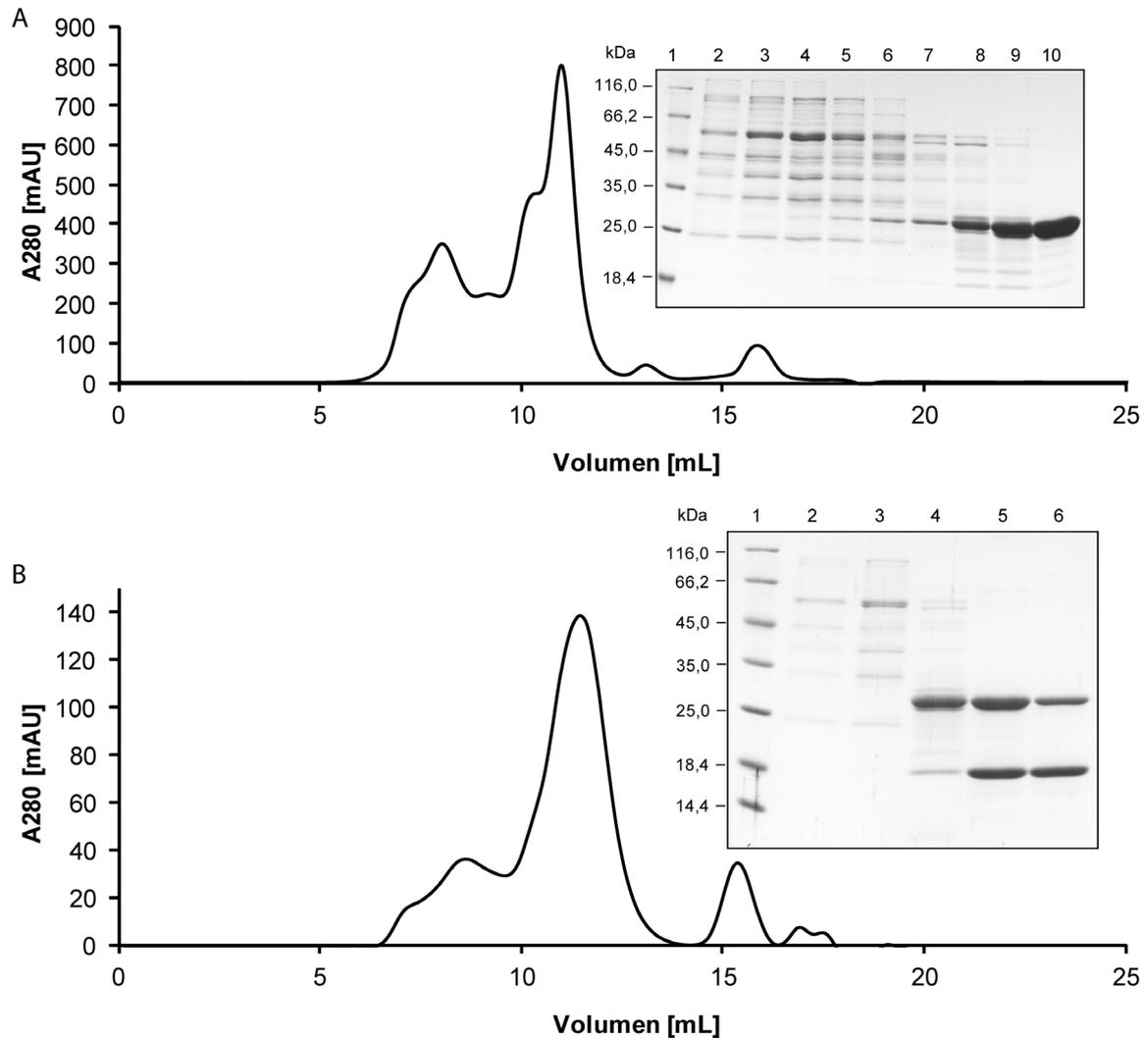
Im Periplasmaextrakt war auf dem SDS-Polyacrylamidgel weder für das IL4-Bindungsprotein noch für das Anticalin eine deutliche Bande zu erkennen; allerdings wurde für Ac2 eine Bande auf dem *Western Blot* sichtbar. Erst im Eluat der SA-Chromatographie zeigte sich auf dem SDS-Polyacrylamidgel eine schwache Bande für IL4BP, die auch im *Western Blot* angefärbt wurde. Im Fall der Produktion ohne pTUM4 war diese Bande etwas stärker als in Gegenwart von pTUM4. Dafür fanden sich im ersten Fall noch zwei zusätzliche Banden für

kleinere Proteine im Eluat der SA-Chromatographie. Auch für das Anticalin war im Fall der Produktion ohne pTUM4 die Bande stärker. Auffälligerweise eluierte in beiden Fällen eine ausgeprägte Doppelbande von der SA-Chromatographie. Die Ursache für die stärkeren Banden im Fall der Produktion des IL4-Bindungsproteins und des Anticalins ohne pTUM4 liegt in einem besseren Zellwachstum. Da das Plasmid pTUM4 ein zusätzliches Antibiotikaresistenzgen hat, müssen die Zellen mit zwei verschiedenen Antibiotika kultiviert werden, was zu einer stärkeren Belastung und somit zu einem langsameren Wachstum führt. Im Fall der Produktion mit pTUM4 waren auf dem SDS-Polyacrylamidgel im Periplasmaextrakt und im Durchlauf der SA-Chromatographie deutlich Banden der überexprimierten Chaperone und Faltungshelfer zu erkennen.

Um bei der Coexpression des IL4-Bindungsproteins mit Ac2 größere Mengen an Protein zu erhalten, wurde die Proteinproduktion im 8 L Fermenter durchgeführt. Der erhaltene Periplasmaextrakt wurde durch IMAC gereinigt, um den Komplex zu isolieren. Dabei eluierte das Protein früh im Imidazol-Konzentrationsgradienten zusammen mit den Wirtsproteinen. Ein Teil des gereinigten Proteins wurde durch Gelfiltration analysiert (Abbildung 16A). Dabei eluierte es bei 11 mL, was einer Größe von 36 kDa entspricht. Also handelte es sich nicht um den Komplex sondern um IL4BP-His<sub>6</sub> allein, was eine berechnete Masse von 24 kDa hat.

Schon bei der IMAC war aufgefallen, dass sich das gesamte Anticalin im Durchfluss befand. Dies deutete darauf hin, dass der Komplex instabil ist oder das coexprimierte Anticalin nicht bindungsaktiv ist. Das Anticalin konnte jedoch aus der Mischung durch SA-Chromatographie separat gereinigt werden. Um auszuschließen, dass die mangelnde Fähigkeit, das IL4-Bindungsprotein zu binden, an einer Fehlfaltung des Anticalins liegt, wurde Ac2, welches von der Pieris AG produziert worden war, mit einem Teil des Eluats der IMAC vermischt. Das Gemisch wurde anschließend durch Gelfiltration analysiert (Abbildung 16B). Der Hauptpeak der Gelfiltration eluierte bei 11,5 mL. Dies entspricht einer Größe von 33 kDa, was wiederum nicht mit der erwarteten Größe für den Komplex (43 kDa) in Einklang stand. Somit wird kein Komplex gebildet. Aufgrund des relativ geringen Unterschieds der molekularen Massen und der zu geringen Auflösung der Gelfiltrationssäule coeluierten die beiden Proteine zwar, tun dies jedoch unkomplexiert, da der gemeinsame *Peak* bei einer zu geringen Größe eluiert. Da das Anticalin der Pieris AG nicht an das IL4-Bindungsprotein band, konnte man schlussfolgern, dass entweder das IL4-Bindungsprotein nicht korrekt gefaltet war oder dass das Anticalin nur an glycosyliertes IL4-Bindungsprotein bindet. Glycosyliertes IL4-Bindungsprotein war für die Selektion des Anticalins verwendet worden. Daher war es

möglich, dass das Epitop des Anticalins eine Glycosylierungsstelle enthält. Um zu überprüfen, ob Ac2 auch an nicht-glycosyliertes IL4-Bindungsprotein bindet und somit die zweite Möglichkeit auszuschließen, wurde glycosyliertes IL4-Bindungsprotein mit Hilfe der PNGase deglycosyliert.



**Abbildung 16: Analyse der Co-Expression von IL4BP-His<sub>6</sub> und Ac2strepII im 8 L Fermenter.** A: Chromatogramm einer analytischen Gelfiltration (Superdex 75 HR 10/30) des durch IMAC vorgereinigten Proteins mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer. Die Fraktionen wurden auf einem 12 % SDS-PAGE analysiert. Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spuren 2-9: Fraktionen 7,5 mL bis 11,5 mL. B: Chromatogramm einer analytischen Gelfiltration (Superdex 75 HR 10/30) eines Gemisches aus IMAC-Eluat und Ac2 der Pieris AG in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl Laufpuffer. Die Fraktionen wurden auf einem 12 % SDS-PAGE analysiert. Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Fraktion 7 mL; Spur 3: Fraktion 8 mL; Spur 4: Fraktion 10 mL; Spur 5: Fraktion 11 mL; Spur 6: Fraktion 12 mL.

Dieses Protein wurde dann mit Ac2 vermischt und über analytische Gelfiltration analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das deglycosylierte IL4-Bindungsprotein als Komplex mit dem Anticalin bei 9,3 mL, was einem berechneten Molekulargewicht von 47 kDa entspricht, von der Gelfiltrationssäule eluierte. Somit konnte gezeigt werden, dass das Anticalin auch an unglycosyliertes IL4-Bindungsprotein bindet. Demzufolge band Ac2 nicht an das Co-produzierte IL4-Bindungsprotein, weil dieses nicht korrekt gefaltet war.

### **3.2.2 Produktion des IL4-Bindungsproteins als Einschlusskörper und Rückfaltung**

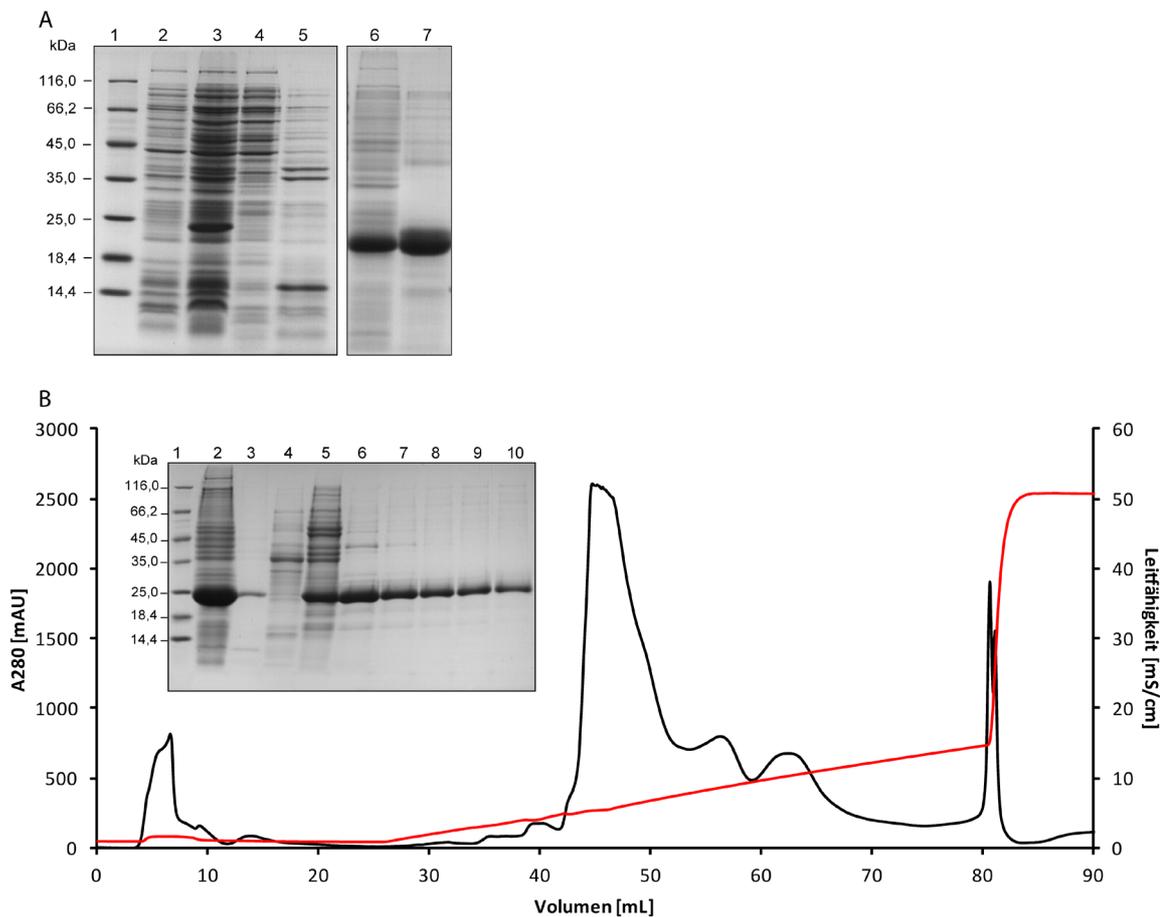
Da bei den Versuchen zur Produktion des IL4-Bindungsproteins entweder eine zu geringe Menge an löslichem Protein produziert wurde oder das Protein nicht korrekt gefaltet war, wurden Bedingungen zur Rückfaltung des IL4-Bindungsproteins optimiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass die Reinheit der Einschlusskörper einen positiven Effekt auf die Effizienz der Rückfaltung hat. Daher wurde im ersten Schritt die Isolierung und Reinigung der Einschlusskörper optimiert, bevor im zweiten Schritt die Rückfaltung selbst optimiert wurde.

#### **3.2.2.1 Produktion, Isolierung und Reinigung von Einschlusskörpern**

Im Originalprotokoll zur Rückfaltung des IL4-Bindungsproteins (Shen *et al.*, 1996) wurde das Protein mit Hilfe des temperaturregulierten Expressionsvektors pRpr9 fd mit  $\lambda$ -Promotor (Weigel *et al.*, 1989) in *E. coli* als Einschlusskörper produziert. Durch Waschen der Einschlusskörper mit 2 M Gdn/HCl; 1 mM EDTA; 0,1 M Tris HCl pH 8,0 wurden dabei einige Verunreinigungen entfernt. Im gleichen Puffer, aber mit einer erhöhten Gdn/HCl-Konzentration von 4 M, wurden die Einschlusskörper solubilisiert und daraufhin durch Gelfiltration an einer Sephacryl S300-Säule in 6 M Gdn/HCl gereinigt.

Bei der im Rahmen von Vorarbeiten am Lehrstuhl für Biologische Chemie von Magrit Winkler durchgeführten Produktion und Rückfaltung des IL4-Bindungsproteins wurde auf die Reinigung durch Gelfiltration verzichtet, wobei bloß eine geringe Ausbeute der Rückfaltung erhalten wurde, was auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Es wurde geschlussfolgert, dass eine höhere Reinheit des Einschlusskörperproteins essentiell ist für eine effiziente Rückfaltung. Daher wurde die Reinigung des solubilierten Proteins durch Gelfiltration (Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade) und

Anionenaustauschchromatographie versucht. Solubilisierung der Einschlusskörper und beide Chromatographien fanden in 7,5 M Harnstoff statt. Der Wechsel von Gdn/HCl zu Harnstoff als chaotrope Substanz erfolgte, da die hohe Ionenstärke des Salzes Gdn/HCl bei der Anionenaustauschchromatographie störte.



**Abbildung 17: Produktion und Reinigung von IL4-BP aus Einschlusskörpern.** A: 12 % SDS-PAGE. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Gesamtzellaufschluss der *E. coli* JM83-Zellen mit pIL4R-2 vor der Induktion; Spur 3 Gesamtzellaufschluss nach der Induktion; Spur 4: löslicher Überstand des Gesamtzellaufschlusses; Spur 5: Überstand nach Waschen mit 2 M Gdn/HCl; Spur 6: Einschlusskörper vor der Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie; Spur 7: Einschlusskörper nach der Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie. B: Chromatogramm einer Anionenaustauschchromatographie von solubilisiertem IL4-BP. Die Fraktionen wurden durch 12 % SDS-PAGE analysiert. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: solubilisierte Einschlusskörper vor der Anionenaustauschchromatographie; Spur 3: Durchlauf der Anionenaustauschchromatographie; Spuren 4-10: Fraktionen 43-51 mL.

Bei diesen Versuchen wurde festgestellt, dass der Reinigungseffekt bei der Anionenaustauschchromatographie größer war als bei der Gelfiltration. Allerdings erschienen die in Gdn/HCl solubilisierten Einschlusskörper hinsichtlich des Gehalts an IL4-BP reiner als

die in Harnstoff solubilisierten. Aus diesem Grund wurde die Wasch- und Solubilisierungsprozedur der Einschlusskörper mit 4 M Gdn/HCl beibehalten. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen einen Puffer aus 7,5 M Harnstoff; 1 mM EDTA; 20 mM Tris/HCl pH 9; 3 mM DTT dialysiert. Dabei wurde der pH mit einem Wert von 9 relativ hoch eingestellt, um die Bindung der Einschlusskörper an die Matrix der verwendeten Resource Q-Säule zu verbessern. Das DTT diente zum Reduzieren der Disulfidbrücken.

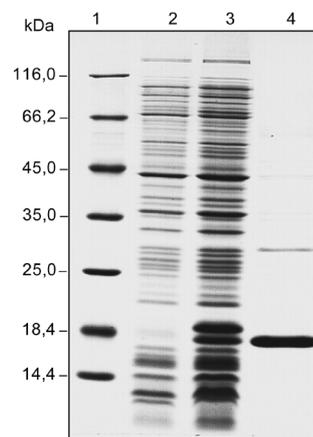
Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der optimierten Prozedur zur Gewinnung von solubiliertem IL4-Bindungsprotein als Ausgangsmaterial für die Rückfaltung. Es wird deutlich, dass das IL4-Bindungsprotein, das mit einem C-terminalem *Strep*-tagII produziert wurde (Abschnitt 3.2.2.4) und eine Größe von 23,7 kDa hat, in *E. coli* JM83 gut überproduziert wird. Des Weiteren kann man erkennen, dass sich nach der rekombinanten Genexpression kein lösliches IL4-Bindungsprotein im Überstand des Zellaufschlusses befindet. Das Waschen der Einschlusskörper mit 2 M Gdn/HCl trägt wesentlich zur Reinheit der Einschlusskörper bei, da viele prominente Verunreinigungen entfernt werden. Tatsächlich wird das IL4-Bindungsprotein auch bei 2 M Gdn/HCl noch nicht solubilisiert.

Bei der Anionenaustauschchromatographie bei pH 9 bindet fast das gesamte IL4-Bindungsprotein an die Resource Q-Säule. Der Großteil des Proteins eluiert in einem ausgeprägten Peak bei relativ geringer Salzkonzentration. In dem recht flachen Gradienten (0-250 mM NaCl in 60 mL) eluierte das IL4-Bindungsprotein bereits bei einer Salzkonzentration von 150 mM, obwohl es einen verhältnismäßig niedrigen pI von 5,9 hat. Vor allem die späteren Elutionsfraktionen sind sehr sauber. Vergleicht man die denaturierte Proteinlösung vor und nach der Anionenaustauschchromatographie auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 17A), so stellt man fest, dass sie durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt erheblich an Reinheit gewonnen haben.

### 3.2.2.2 Rückfaltung, Komplexbildung und Reinigung des Komplexes

Nachdem die Reinigungsprozedur der Einschlusskörper optimiert worden war, wurde die Rückfaltungsprozedur verbessert. Hierfür wurde das IL4-Bindungsprotein mit C-terminalem *Strep*-tagII verwendet zusammen mit dem komplexierendem Anticalin Ac2 ohne Affinitätsanhängsel. In dem publizierten Protokoll zur Rückfaltung des IL4-Bindungsproteins (Shen *et al.*, 1996) wurden die gereinigten Einschlusskörper auf eine Konzentration von 10-20 mg/mL gebracht und anschließend in einem Rückfaltungspuffer auf 0,01 mg/mL verdünnt. Der dazu verwendete Rückfaltungspuffer enthielt 0,1 M MOPS als Puffer bei einem pH von

7,0 sowie 0,5 M Arginin als Faltungshelfer (Tsumoto *et al.*, 2004), 1 mM EDTA sowie einen Disulfid-Puffer aus 1 mM oxidiertem Glutathion und 3 mM reduziertem Glutathion. Nach drei Tagen Inkubation bei 4 °C wurde das rückgefaltete Protein gegen einen Puffer aus 25 mM Ammoniumacetat pH 5,0 dialysiert und durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Dieses Rückfaltungsprotokoll wurde bei den ersten Versuchen zur Reproduktion der Ergebnisse von Magrit Winkler befolgt. Die direkte Dialyse des Rückfaltungsansatzes erwies sich als schwierig, da man bei einer IL4-Bindungsproteinkonzentration von 0,01 mg/mL mit sehr großen Volumina arbeitet. Ein vorheriges Konzentrieren der Lösung war dagegen von Nachteil, da dies dazu führte, dass ein Großteil des Proteins ausfiel. Das Problem konnte in dieser Arbeit umgangen werden, indem das rückgefaltete IL4-Bindungsprotein zunächst mit Ac2 komplexiert wurde. Hierfür wurde direkt der Periplasmaextrakt des Anticalins verwendet, da dieser das rekombinante Protein bereits in hoher Reinheit enthielt (Abbildung 18). Der Komplex hatte eine deutlich höhere Stabilität in Lösung als das IL4-Bindungsprotein allein und konnte auf eine Konzentration von 15 mg/mL gebracht werden. Da das IL4-Bindungsprotein mit einem C-terminalen *Strep*-tag II produziert worden war, wurde der Komplex in SA-Puffer dialysiert und letztlich durch SA-Chromatographie und Gelfiltration gereinigt.



**Abbildung 18: Produktion von Ac2.** 12 % SDS-Polyacrylamidgel. Spur 1: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Gesamtzellaufschluss der *E. coli* JM83-Zellen mit pIL4R-2 vor der Induktion; Spur 3 Gesamtzellprotein nach der Induktion; Spur 4: Periplasmaextrakt.

Zur Optimierung der Rückfaltungsausbeuten wurden Komponenten im Rückfaltungsansatz variiert. Dabei wurde jeweils immer nur eine Variable verändert, während die anderen gleich blieben. Die Variante mit der größten Ausbeute wurde übernommen. Die Rückfaltungsansätze

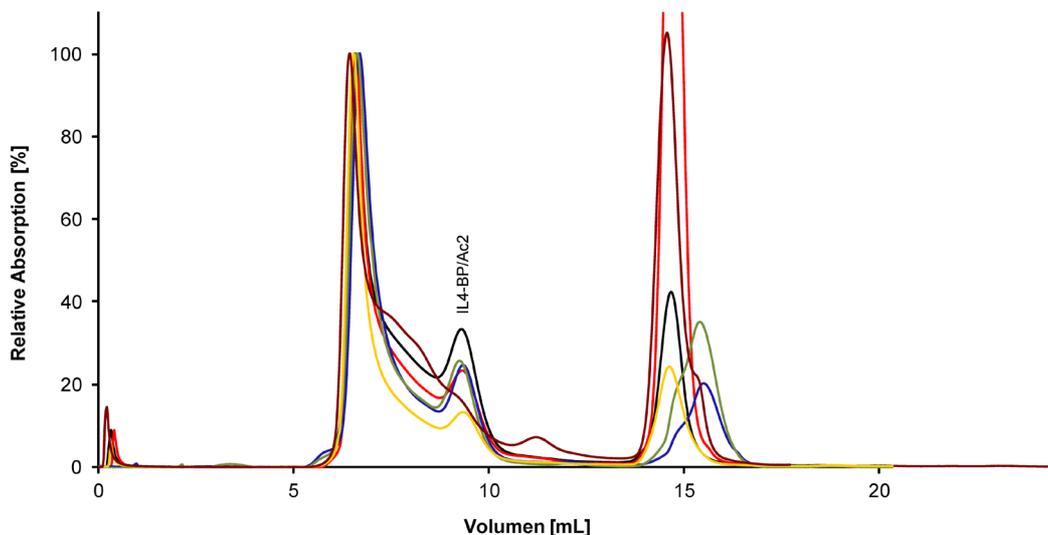
zur Optimierung erfolgten im 750 mL Maßstab, wobei 7,5 mg Einschlusskörperprotein mit einer Konzentration von 15 mg/mL in 750 mL Rückfaltungspuffer verdünnt wurden. Tabelle 9 zeigt alle durchgeführten Variationen.

**Tabelle 9: Optimierung der Rückfaltung.**

Variierter Parameter	Variationen
Puffer	MES/NaOH pH 6 MOPS/NaOH pH 7 Tris/HCl pH 8
Faltungshelfer	Arginin Saccharose Biotin
Disulfid-Puffer: Art	Glutathion $\beta$ -Mercaptoethanol
Disulfid-Puffer: Konzentrationsverhältnis	3 mM reduzierend : 3 mM oxidierend 3 mM reduzierend : 2 mM oxidierend 3 mM reduzierend : 1 mM oxidierend 3 mM reduzierend : 0,6 mM oxidierend 3 mM reduzierend : 0,3 mM oxidierend 0,3 mM reduzierend : 0,1 mM oxidierend
Zeitpunkt der Anticalin-Zugabe	am Anfang der Rückfaltung am Ende der Rückfaltung
Reinheit des Einschlusskörperproteins	ohne Anionenaustauschchromatographie mit Anionenaustauschchromatographie
Reduktion des Einschlusskörperproteins	3 mM DTT 50 mM DTT

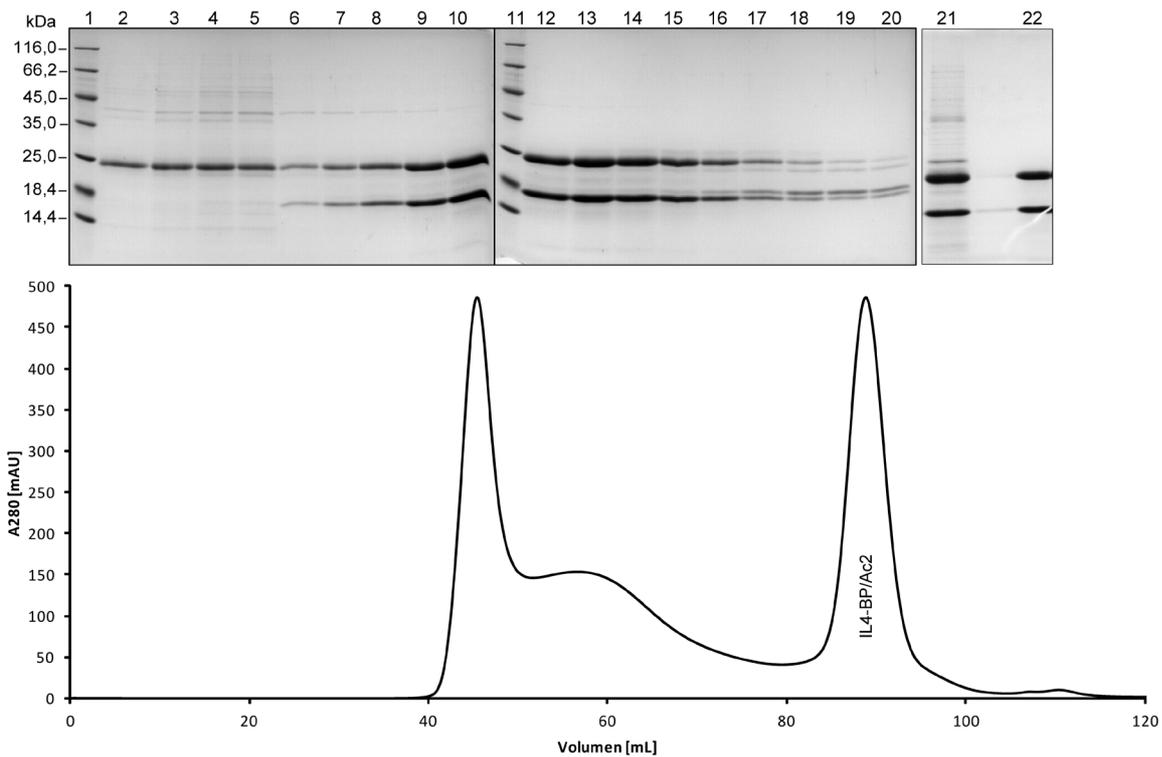
Die Variationen wurden nach der Rückfaltung und Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie anhand der abschließenden Gelfiltrationsprofile des Komplexes bewertet. Bei der Rückfaltung bildete sich zusätzlich zu unlöslichem aggregiertem IL4-Bindungsprotein eine Form von löslichem fehlgefaltetem IL4-Bindungsprotein, vermutlich als Mikroaggregat. Diese Mikroaggregate eluierten zusammen mit dem Komplex von der StrepTactin-Affinitätssäule und konnten erst durch Gelfiltration entfernt werden. Zur Bewertung der Rückfaltungseffizienz wurde das Verhältnis von Mikroaggregat zu Komplex

betrachtet. Dazu wurden die Chromatogramme der Gelfiltrationen auf das Maximum des Aggregats, welches beim Ausschlussvolumen der Säule eluierte, normiert. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die überlagerten Gelfiltrationsprofile aus der Optimierung des Disulfid-Puffersystems, bei dem alle anderen Parameter gleich gelassen wurden. Dabei wird deutlich, dass die im Originalprotokoll beschriebenen Konzentrationen von 1 mM oxidiertem  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol (gelbe Linie) die schlechteste Effizienz von allen getesteten Variationen zeigte. Die beste Bedingung, die dann auch präparativ angewandt wurde (schwarze Linie), enthielt 2 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol im Rückfaltungspuffer. In diesem Experiment wurde aus Kostengründen  $\beta$ -Mercaptoethanol statt Glutathion als Disulfid-Puffer verwendet, da in einem separaten Experiment gezeigt werden konnte, dass die Art der Thiolverbindung nicht entscheidend ist.



**Abbildung 19: Gelfiltrationschromatogramme zur Optimierung des Disulfid-Puffers.** Zur Analyse der Rückfaltungseffizienz wurde eine analytische Gelfiltration (Superdex 75 HR 10/30) mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer durchgeführt, nachdem die Rückfaltung durchgeführt worden war und der Komplex durch StrepTactin Affinitätschromatographie gereinigt worden war. Die einzelnen Chromatogramme wurden auf die Höhe des *Peaks* für das Aggregat normiert. Schwarz: 2 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol ; grün: 0,3 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,1 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol; blau: 3 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol; rot: 0,6 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol; braun: 0,3 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol; gelb: 1 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Da die Experimente relativ aufwändig sind, wurde jede Variation eines Parameters nur einfach getestet. Daher gilt zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der Optimierung einer experimentellen Schwankung unterliegen, wodurch es möglich ist, dass nicht in jedem Fall das Optimum gewählt wurde. Ziel war es jedoch nur, die bestehende Prozedur zu optimieren und nicht das absolute Optimum zu finden.



**Abbildung 20: Präparative Gelfiltration des Komplexes aus IL4-Bindungsprotein und Ac2.** Der Komplex stammte aus einem Ansatz, bei dem 50 mg IL4-BP-Einschlusskörper mit einer Konzentration von 15 mg/mL in 5 L Rückfaltungspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,0; 0,5 M Arginin; 1 mM EDTA; 2 mM oxidiertes  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertes  $\beta$ -Mercaptoethanol) verdünnt und drei Tage bei 4°C inkubiert wurde, bevor Periplasmaextrakt einer Ac2-Produktion hinzugegeben wurde. Der resultierende Komplex wurde durch StrepTactin Affinitätschromatographie gereinigt. Die abschließende Gelfiltration (Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade) wurde mit 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl als Laufpuffer durchgeführt. Es wurden 1 mL Fraktionen gesammelt, die auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert wurden. Spuren 1 und 11: Proteinmarker in kDa; Spur 2: Fraktion 50 mL; Spur 3: Fraktion 53 mL; Spur 4: Fraktion 57 mL; Spur 5: Fraktion 62 mL; Spuren 6-10: Fraktionen 82-86 mL; Spuren 12-20: Fraktionen 87-96 mL; Spur 21: Komplex vor der Gelfiltration; Spur 22: Komplex nach der Gelfiltration.

Durch die Optimierung wurde letztendlich eine verbesserte Rückfaltungsprozedur entwickelt. Dabei wurden durch Anionenaustauschchromatographie gereinigte Einschlusskörper verwendet, und das Anticalin wurde erst nach 3 Tagen Rückfaltung zum IL4-Bindungsprotein

hinzugegeben. Der Rückfaltungspuffer enthielt 0,1 M Tris/HCl als Puffer bei pH 8,0 sowie 0,5 M Arginin als Faltungshelfer, 1 mM EDTA sowie einen Disulfid-Puffer aus 2 mM oxidiertem  $\beta$ -Mercaptoethanol und 3 mM reduziertem  $\beta$ -Mercaptoethanol. Anhand dieses Protokolls wurden auch größere Ansätze durchgeführt, bei denen 50 mg Einschlusskörper in 5 L Rückfaltungspuffer verdünnt wurden. Dabei erfolgte vor der Dialyse in den Puffer für die Reinigung des Proteinkomplexes durch StrepTactin Affinitätschromatographie eine Konzentration der Proteinlösung mittels Cross-Flow-Filtration.

Aus den Einschlusskörpern von 24 L Zellkultur konnten auf diese Weise etwa 3,5 mg Proteinkomplex erhalten werden. Diese Ausbeute war immer noch verhältnismäßig gering. Sie reichte aber aus, um Ansätze zur Proteinkristallisation durchzuführen. Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm der abschließenden Gelfiltration eines präparativen Rückfaltungsansatzes.

### 3.2.2.3 Versuche zur Kristallisation des Ac2/IL4BP-Komplexes

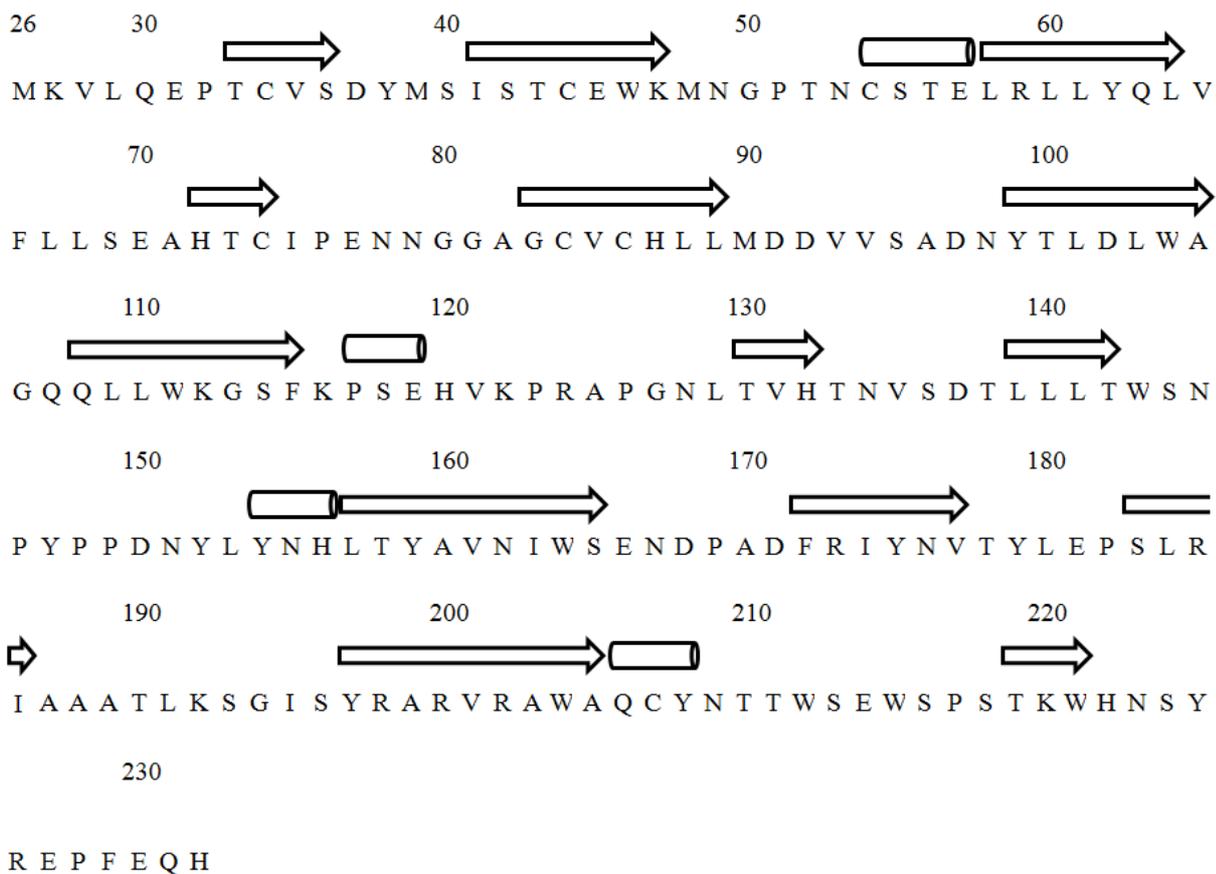
In den initialen Versuchsreihen wurde der *Vector Screen* eingesetzt (siehe Anhang). Dabei handelt es sich um einen *Random Factorial Screen* mit 480 Bedingungen, der am Lehrstuhl entwickelt wurde. Für die Entwicklung wurden die Kristallisationsbedingungen von kommerziellen *Screens* mit den Kristallisationsbedingungen verglichen, die zu Strukturen geführt haben, die in der Proteindatenbank hinterlegt sind. Die erfolgreichsten Bedingungen wurden in den *Vector Screen* übernommen, wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht zu ähnlich sind.

Der *Vector Screen* wurde sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C durchgeführt, wobei der Komplex bei einer Konzentration von 11 mg/mL für die Kristallisation eingesetzt wurde. Allerdings traten unter keiner Bedingung Kristalle auf. Daher wurde der *Vector Screen* erneut bei 20 °C angesetzt, wobei proteinstabilisierende Additive zugegeben wurden. Diese Substanzen waren Betain, Trehalose und Ectoin. Man geht davon aus, dass diese sogenannten kompatiblen Solute Proteine nach dem Modell des „Präferentiellen Ausschlusses“ stabilisieren (Arakawa & Timasheff, 1985). Nach diesem Modell bilden die kompatiblen Solute energetisch ungünstige Interaktionen, sogenannte osmophile Wechselwirkungen, mit dem Proteinerückgrat aus, was dazu führt, dass sie von der Hydrathülle des Proteins ausgeschlossen werden (Bolen & Baskakov, 2001). Die daraus folgende nicht-homogene Verteilung der kompatiblen Solute erzeugt eine thermodynamische Kraft, die das Protein in eine möglichst kompakte Form drängt und die native Struktur der Proteine stabilisiert (Jain &

Roy, 2010; Knapp *et al.*, 1999; Winzor *et al.*, 1992). Die Additive wurden jeweils auf eine Konzentration von 20 mM im Kristallisationstropfen eingestellt. Leider führte jedoch auch dieser Ansatz nicht zum Kristallisationserfolg.

### 3.2.2.4 Klonierung weiterer IL4-BP-Versionen

Schon bei Ac1 und seinem Liganden wurde erkannt, dass der Kristallisationserfolg erheblich von der Art wie auch Position des Affinitätsanhängsels und von etwaigen Deletionen an den N- oder C-Termini abhängig war. Die bisherigen Kristallisationsversuche mit IL4-BP wurden mit einem Komplex durchgeführt, dessen Anticalin (Ac2) kein Affinitätsanhängsel trug (Ac2 in Tabelle 10 entsprechend Ac1 in Tabelle 3). Der einzige Unterschied zwischen den betreffenden Anticalinen Ac2 und Ac1 waren die Mutationen in den spezifitätsbestimmenden variablen Schleifen, wohingegen das Proteinformat an den N- und C-Termini dasselbe war.



**Abbildung 21:** Sequenz des IL4-Bindungsproteins mit Nummerierung der Aminosäuren. Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder ( $\alpha$ -Helix) und Pfeile ( $\beta$ -Strang) dargestellt.

Das IL4-Bindungsprotein, das bisher für die Kristallisationsversuche eingesetzt wurde, trug am C-Terminus das *Strep*-tag II, mit einem zusätzlichen Alanin als Spacer (IL-

4BP(C182A) $\Delta$ 200A-strepII). Außerdem war der freie Cysteinrest an Position 182 zu Alanin mutiert, um eine unerwünschte Bildung von Disulfidbrücken zu vermeiden. Um weitere Variationen des Komplexes zu generieren, wurde die *Bst*XI-Kassette von Ac2, die alle variablen Schleifen enthält, in alle Varianten von Ac1 eingefügt (Tabelle 3 und 10). Auf diese Weise konnte die gleiche Vielfalt an Affinitätsanhängseln und Deletionen für Ac2 erhalten werden, die es bereits für Ac1 gab.

Für das IL4-Bindungsprotein wurden drei neue Versionen kloniert, die sich alle am C-Terminus unterschieden (Tabelle 10 und Abbildung 21). Die erste dieser Versionen war am C-Terminus ab Rest 223 (UniProt-Eintrag P24394) deletiert und trug kein Affinitätsanhängsel. Die zweite dieser Versionen war am C-Terminus ab Rest 223 deletiert und trug 5 zusätzliche Histidinreste, so dass sich am C-Terminus ein His<sub>6</sub>-Tag ergab. Die dritte Version umfasste die Reste 26 bis 232. Diese Version hatte ebenfalls kein Affinitätsanhängsel. Alle drei neu klonierten Versionen trugen die Mutation C207A.

**Tabelle 10: In dieser Arbeit konstruierte Anticalin- und IL4-BP-Versionen.** Die Nomenklatur ist wie folgt: Das Anticalin (Ac 2) hat 166 Aminosäuren, wobei in dieser Arbeit grundsätzlich die ersten 4 und die letzten 10 deletiert wurden. Ac2 umfasst also die Aminosäuren 5-156. Befindet sich rechts von Ac2 ein  $\Delta$  mit einer Zahl, so sind alle Aminosäuren am C-Terminus ab dieser Position deletiert. Befindet sich links vom Ac2 ein  $\Delta$  mit einer Zahl, so ist die entsprechende Anzahl an Aminosäuren am N-Terminus gegenüber der Standardversion deletiert.  $\Delta$ 2 bedeutet also, dass die ersten 6 Aminosäuren fehlen.

Anticalin	Ligand
Ac2	IL4-BP(C182A) $\Delta$ 200A-strepII
Ac2 $\Delta$ 148	IL4-BP(C182A) $\Delta$ 198
Ac2-strepII	IL4-BP(C182A) $\Delta$ 198-His <sub>5</sub>
strepII-Ac2	IL4-BP(C182A)207
strepII-Ac2 $\Delta$ 148	
strepII- $\Delta$ 2Ac2	
strepII- $\Delta$ 2Ac2 $\Delta$ 148	
strepII- $\Delta$ 7Ac2	
strepII- $\Delta$ 7Ac2 $\Delta$ 148	
His <sub>6</sub> - $\Delta$ 1Ac2	
His <sub>6</sub> - $\Delta$ 1Ac2 $\Delta$ 148	
Ac2-His <sub>6</sub>	

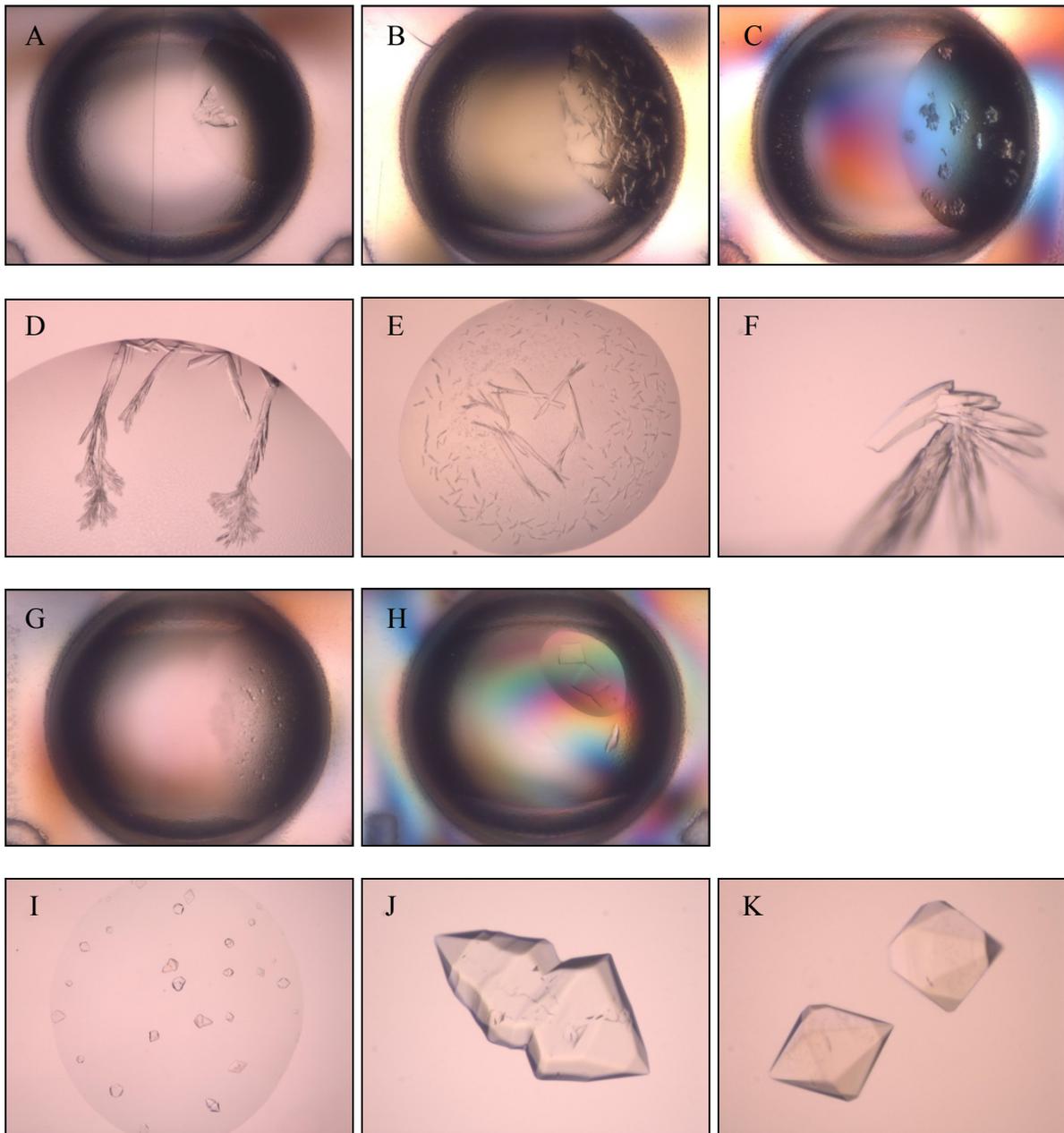
Bei der Generierung der neuen Versionen des IL4-Bindungsproteins wurde auf den C-Terminus fokussiert, da es in diesem Bereich zwei ungeordnete Schleifen gibt (Hage *et al.*, 1999). Daher könnte es sein, dass der C-Terminus ebenfalls flexibel ist, was der Kristallisation hinderlich ist. Für die Klonierung wurde eine PCR mit dem bestehenden Plasmid pIL4R-2, welches das Gen für IL-4BP(C182A) $\Delta$ 200AstrepII trägt, und den Primern MW18 als *Forward-Primer* und TGIL4BP1 bzw. TGIL4BP2 oder TGIL4BP3 als *Reverse-Primer* durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* geschnitten und wieder in das ursprüngliche Plasmid, bei dem das IL-4BP(C182A) $\Delta$ 200AstrepII-Gen mit Hilfe der gleichen Restriktionsendonukleasen entfernt worden war, eingefügt. Nachdem in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Rückfaltung des IL4-Bindungsproteins gelegt wurde, stehen diese neuen Expressionskonstrukte für künftige Kristallisationsversuche mit neuen Kombinationen aus Anticalin und Ligand zur Verfügung.

### 3.3 Strukturanalyse des Ac3/Hepcidin-Komplexes

Im Gegensatz zu den in den Abschnitten 3.1 und 3.2 beschriebenen Anticalinen basiert das Anticalin Ac3 auf dem humanen Lcn2. Dieses Proteingerüst ist sehr gut charakterisiert (siehe Abschnitt 1.4.3), da bereits zwei Anticalinstrukturen bekannt sind, die darauf basieren (Kim *et al.*, 2009; Schönfeld *et al.*, 2009). Auf deren Basis war es möglich, die Bibliothek der Anticaline weiter zu optimieren, so dass die Erfolgswahrscheinlichkeit steigt, Anticaline gegen neue Zielmoleküle zu selektieren (Gebauer *et al.*, 2013).

#### 3.3.1 Kristallisation des Ac3/Hepcidin-Komplexes

Zur Kristallisation mit dem Hepcidin-Peptid wurden Anticaline aus unterschiedlichen Stadien der Affinitätsmaturierung eingesetzt, die freundlicherweise von der Pieris AG zur Verfügung gestellt worden waren. Zunächst wurde dabei immer der *Vector Screen* (siehe Material und Methoden) verwendet. Ac3-1 war die Anticalin-Variante aus dem frühesten Stadium der Entwicklung, bei der die Kristallisation des Peptidkomplexes versucht wurde. Diese wurde mit dem C-terminalen *Strep*-tag II zur Kristallisation eingesetzt. Dabei wurden jedoch unter keiner der 480 Bedingungen des *Vector Screens* Kristalle erhalten. Ac3-2 war demgegenüber ein Anticalin mit höherer Affinität zu Hepcidin (Dissoziationskonstante  $\leq 1 \mu\text{M}$ ). Dieses wurde ebenfalls zunächst mit C-terminalem *Strep*-tag II eingesetzt, wobei jedoch wiederum keine Kristalle erhalten wurden. Im folgenden Versuch wurde bei der Kristallisation das Ac3-2 ohne Affinitätsanhängsel eingesetzt, wobei 67 Bedingungen Kristalle lieferten.



**Abbildung 22: Kristalle des Komplexes aus Ac3 und dem humanen Hecpidin-Peptid.** Bei allen Kristallisationsexperimenten wurde eine Proteinlösung eingesetzt, bei der eine Anticalinlösung (~14 mg/mL) in einem molaren Verhältnis von 1:1,2 mit gelöstem Hecpidin (20 mg/mL) vermischt worden war. A: Bedingung für das Anticalin Ac3-2 aus dem *Vector Screen* mit 20 % PEG3350 und 0,2 M Natriumformiat; B: Bedingung für Ac3-2 mit 25 % PEG3350 und 0,1 M Bis-Tris pH 5,5; C: Bedingung für Ac3-2 mit 25 % PEG3350, 0,1 M Bis-Tris und 0,2 M Natriumchlorid; D: Bedingung für Ac3-2 aus der Optimierung mit 27 % PEG3350, 0,1 M HEPES/NaOH pH 6,8 und 0,5 % Ethylacetat; E: Bedingung für Ac3-2 aus der Optimierung mit 30 % PEG3350, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,0 und 0,5 % Ethylacetat; F: Bedingung für Ac3-2 aus der Optimierung mit 18 % PEG3350, 0,1 M HEPES/NaOH pH 7,5 und 0,5 % Ethylacetat; G: Bedingung für Ac3-3strepII aus dem *Vector Screen* mit 65 % MPD und 0,1 M Tris/HCl pH 8,0; H: Bedingung für Ac3-3strepII mit 65 % MPD und 0,1 M MES/NaOH pH 6,0; I: Bedingung für Ac3-3strepII aus der Optimierung mit 48 % MPD und 0,1 M HEPES/NaOH pH 6,8; J: Bedingung für Ac3-3strepII aus der Optimierung mit 48 % MPD und 0,1 M HEPES/NaOH pH 6,8; K: Bedingung für Ac3-3strepII aus der Optimierung mit 47 % MPD und 0,1 M HEPES/NaOH pH 6,6.

Diese Kristalle waren allerdings stark verwachsen, sehr klein oder nadelförmig (Abbildung 22 A-C), wobei alle positiven Bedingungen PEG3350 als Fällungsmittel enthielten. Durch nachfolgende Optimierung dieser Kristallisationsbedingungen konnten Kristalle erhalten werden, die zumindest teilweise eine gute Morphologie aufwiesen (Abbildung 22 D-F).

Bei dem Anticalin Ac3-3 handelte es sich um eine Weiterentwicklung von Ac3-2 mit einer verbesserten Dissoziationskonstanten von 200-400 pM. Zur Kristallisation wurde es mit dem C-terminalen *Strep*-tag II eingesetzt. Dabei wurden im *Vector Screen* zwei Bedingungen mit relativ gut geformten Kristallen identifiziert (Abbildung 21 G und H). Beide Bedingungen enthielten MPD als Fällungsmittel. Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen lieferte relativ große (durchschnittlich ~250  $\mu\text{m}$ ) und regulär geformte Kristalle (Abbildung 22 I-K).

### 3.3.2 Sammlung von Röntgen-Beugungsdaten am Synchrotron

Die besten Kristalle des Komplexes aus Ac3 (Ac3-3 und Ac3-2) und Hepcidin wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Da der Kristallisationstropfen bereits über 50 % MPD enthielt, musste zum Einfrieren kein zusätzliches Frostschutzmittel verwendet werden, um Eiskristallbildung zu vermeiden. Sowohl von Ac3-2 als auch von Ac3-3 wurden Datensätze am Synchrotron in Berlin aufgenommen.

Der beste Datensatz eines Kristalls aus Ac3-3 und Hepcidin hatte eine Auflösung von 1,8 Å. Dieser Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von 0,9184 Å, also der Wellenlänge mit höchster Intensität, aufgenommen. Bei jedem der 580 Bilder wurde der Kristall um 0,3° gedreht. Trotz sorgfältiger Auswertung der Daten mit den Programmpaketen XDS und MOSFLM konnte keine Symmetrie identifiziert werden, so dass von der primitiven Raumgruppe P1 ausgegangen werden musste. Mit Hilfe dieses Datensatzes war es jedoch nicht möglich, die Struktur zu lösen.

Der beste Datensatz eines Kristalls aus Ac3 und Hepcidin hatte eine Auflösung von 2,1 Å (Tabelle 11). Die Raumgruppe wurde als P3<sub>1</sub>21 identifiziert. Mit Hilfe dieses Datensatzes konnte die Struktur des Komplexes aufgeklärt werden.

Tabelle 11: Statistiken des Datensatzes für den Komplex aus Ac3-3 und Hepcidin.

Wellenlänge [Å]	2,1
Gesamter Rotationsbereich [°]	360
Rotationsintervall [°]	1
Auflösungsbereich [Å] <sup>a</sup>	33,2-2,1 (2,2-2,1)
Reflexe gesamt	1684382
Unabhängige Reflexe	164426
Vollständigkeit [%]	99,8 (98,9)
Redundanz	10,2 (5,8)
$\langle I / \sigma(I) \rangle$	18,9 (3,1)
$R_{\text{meas}}$ [%] <sup>b</sup>	8,7 (70,2)
$R_{\text{mrgd-F}}$ [%] <sup>c</sup>	9,9 (62,9)
Mosaizität	0,27
Raumgruppe	P3 <sub>1</sub> 21
Dimensionen der Einheitszelle [Å]	a = b = 126,9 c = 156,7
Komplexe pro Einheitszelle	6

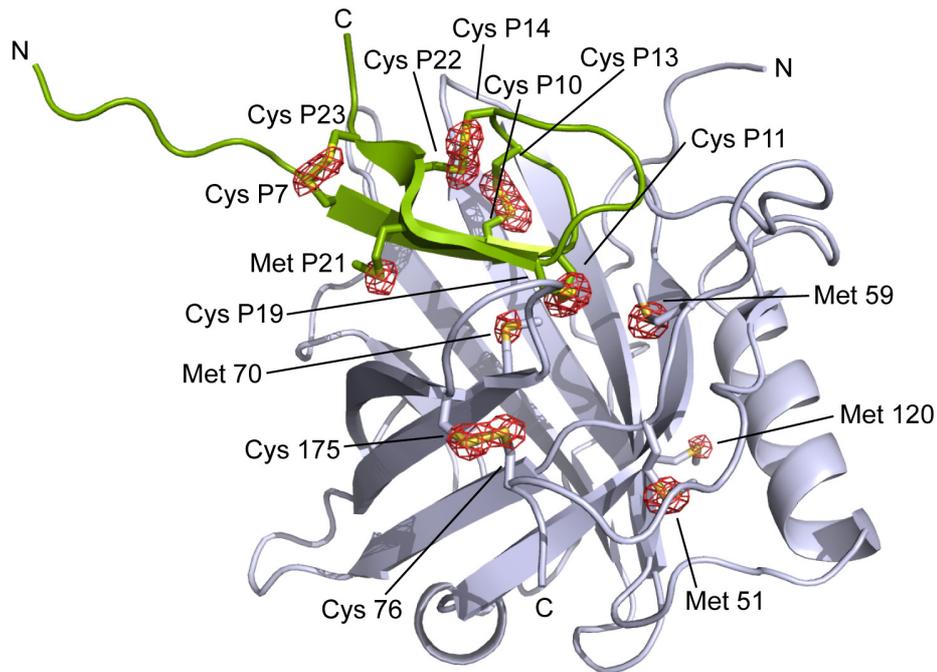
<sup>a</sup> In Klammern sind die Werte für die äußere Auflösungsschale angegeben.

$${}^b R_{\text{meas}} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n}{n-1} \sum_{j=1}^n |I_{hklj} - (I_{hkl})|}}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl}}$$

$${}^c R_{\text{mrgd}} - F = \frac{\sum_{hkl} |I_{hkl,P} - I_{hkl,Q}|}{0,5 \cdot \sum_{hkl} I_{hkl,P} + I_{hkl,Q}} \quad (\text{Diederichs \& Karplus, 1997})$$

### 3.3.3 Phasenbestimmung durch Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel-Single-Wavelength Anomalous Diffraction (MRSAD)

Zuvor waren zwei Strukturen von Anticalinen bekannt, die auf der Lcn2-Gerüststruktur beruhen (Kim *et al.*, 2009; Schönfeld *et al.*, 2009). Unter Verwendung beider Strukturen als Suchmodell konnten die Phasen durch Molekularen Ersatz (McCoy, 2007; Vagin & Teplyakov, 1997) ermittelt werden.



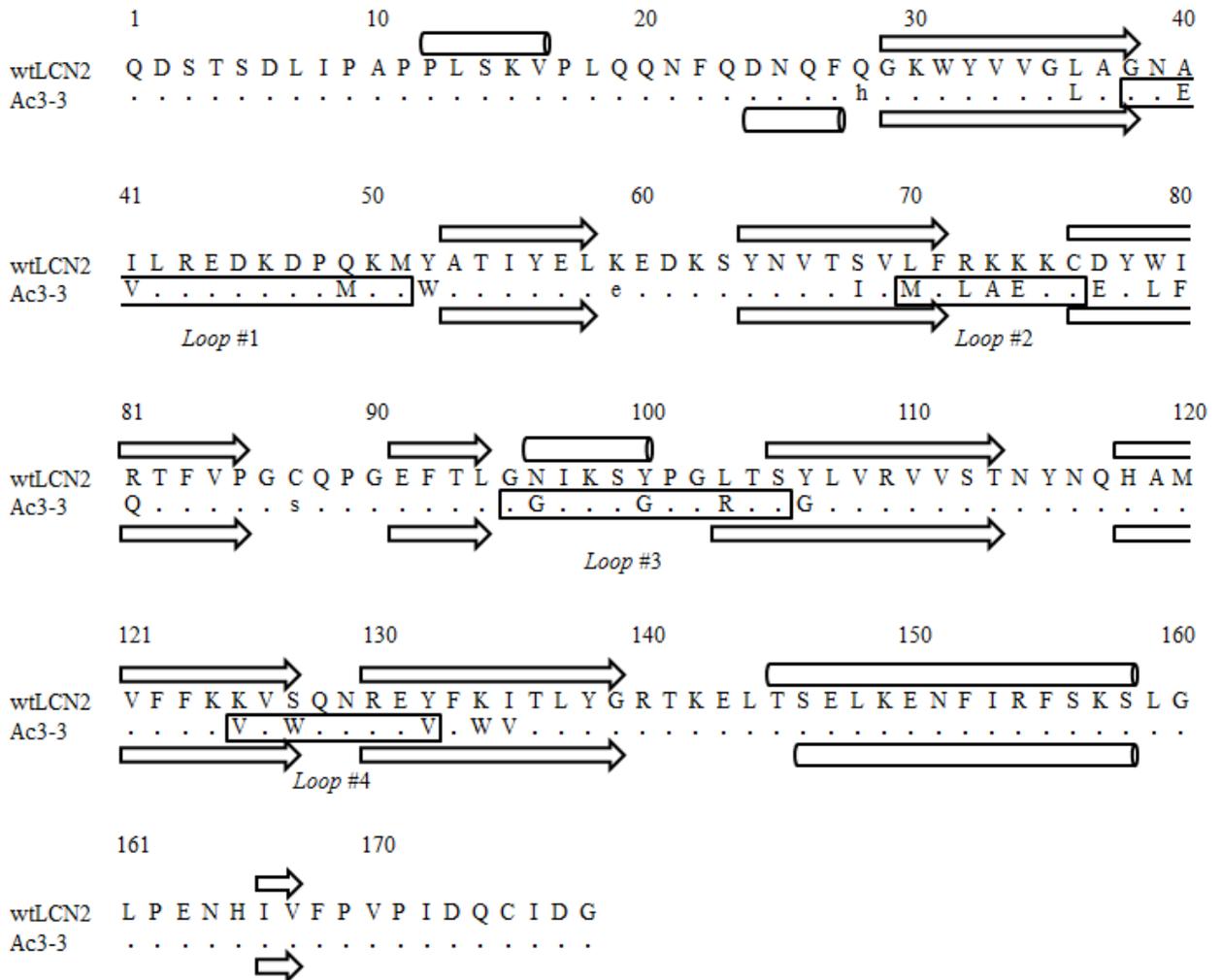
**Abbildung 23: Struktur des Ac3/Hepcidin-Komplexes mit anomaler Differenz-Fourier-Karte (Ketten A und P).** Die (Poly)-Peptidketten sind als *Cartoon* dargestellt. Das Hepcidin ist grün gefärbt, während das Anticalin grau dargestellt ist. Cystein- und Methionin- Seitenketten sind als Sticks hervorgehoben, wobei die Schwefelatome gelb dargestellt sind. Die anomale Differenz-Fourier-Karte ist bei  $5\sigma$  konturiert und in Form eines roten Gitters abgebildet.

Allerdings wurde die Phasierung, wie auch schon im Fall des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109) (Abschnitt 3.1.6.1), letztlich mit Hilfe einer Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel-Single-Wavelength Anomalous Diffraction durchgeführt (Panjekar *et al.*, 2009). Angesichts der großen Zahl an Disulfidbindungen in dem Hepcidin-Peptid bot sich diese Methode an, und auf diese Weise wurde der Einfluss der Modellstruktur auf die zu ermittelnde Kristall-Struktur reduziert.

Um das anomale Signal des Schwefels besser zu erfassen, wurde ein neuer Datensatz bei einer Wellenlänge von  $2\text{ \AA}$  aufgenommen, wobei mit 360 Bildern bei jeweils  $1^\circ$  Rotation eine Redundanz von 10,2 erhalten wurde. Diese hohe Redundanz zusammen mit einem qualitativ hochwertigen Datensatz ist notwendig, da bei der verwendeten Wellenlänge der Beitrag des anomalen Signals für Schwefel unter 1 % liegt. Die Auswertung des Datensatzes erfolgte wie in Abschnitt 3.1.6.1 beschrieben.

Abbildung 23 zeigt die Struktur des Komplexes aus Ac3 und Hepcidin mit der anomalen Differenzdichte der Schwefelatome. Für jedes der Schwefelatome war anomale Differenzdichte nachzuweisen. Ausgeprägte Differenzdichte zeigen die vier Disulfidbrücken

des Hepcidins. Weiterhin trägt Hepcidin einen Methioninrest (Met P21), während Ac3 eine Disulfidbrücke und 4 Methioninreste aufweist.



**Abbildung 24: Sequenzvergleich von wtLcn2 und Ac3.** Für Ac3-3 sind nur die mutierten Reste angegeben. Kleinbuchstaben stellen fixe Mutationen dar, die in der Bibliothek mutiert worden sind, um zum Beispiel eine *Bst*XI-Schnittstelle (His28) einzuführen und einen freien Cysteinrest zu entfernen (Ser87). Sekundärstrukturelemente sind als Zylinder ( $\alpha$ -Helix) und Pfeile ( $\beta$ -Strang) dargestellt. Die vier *Loops*, die den Eingang zur Bindungstasche bilden (Skerra, 2000), sind durch Boxen hervorgehoben. Die Sekundärstrukturelemente von wtLcn2 basieren auf der Struktur mit dem PDB-Code 1L6M (Goetz *et al.*, 2002).

### 3.3.4 Modellbau

Im Kristallgitter fanden sich 6 Komplexe aus Ac3 und Hepcidin in einer asymmetrischen Einheit. Ein initiales Modell wurde durch Arp/Warp als Bestandteil des AutoRickshaw-Paktets (Panjikar *et al.*, 2005) gebaut. Diese erste Version wurde anschließend verbessert. Dazu wurden abwechselnd Schritte der manuellen Überarbeitung mit Coot (Emsley &

Cowtan, 2004) und der Verfeinerung mit Refmac5 (Bailey, 1994) durchgeführt (Abschnitt 3.1.7). Dabei wurde die nichtkristallographische Symmetrie genutzt.

**Tabelle 12: Verfeinerungsstatistik für den Komplex aus Ac3 und Hecpidin.**

Auflösungsgrenzen [Å]	33,2-2,1
R <sub>cryst</sub> / R <sub>free</sub> [%] <sup>a</sup>	16,6 / 20,7
Mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	39,1
R.M.S.-Abweichung:	
Bindungslängen [Å]	0,013
Bindungswinkel [°]	1,6
Ramachandranalyse:	
Favorisiert [%]	96,9
Erlaubt [%]	3,1
Nicht erlaubt [%]	-

---


$${}^a R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|},$$

R<sub>free</sub> entspricht R<sub>cryst</sub> außer, dass 5 % der Daten von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

---

Insbesondere in Bereichen, die weniger gut definiert waren, führte dies zu besser definierter Elektronendichte. Die letzten beiden Verfeinerungszyklen wurden ohne Verwendung der nichtkristallographischen Symmetrie durchgeführt. Durch die iterative Verfeinerung der Struktur wurde letztlich ein kristallographischer R-Faktor von 19,1 % und ein freier R-Faktor von 23,2 % erzielt (Tabelle 11). In der finalen Elektronendichte war Ac3 in den Ketten B und E ab dem Rest 4 definiert, während es in den übrigen Ketten ab Rest 6 definiert war. In allen Ketten war die Elektronendichte bis Rest 177 definiert. Nur die Ketten A und B wiesen eine ununterbrochene Elektronendichte auf. Die Kette C war von Rest 96 bis 104 und die Kette D von Rest 94 bis 103 nicht definiert. Die Ketten E und F waren von Rest 96 bis 103 nicht definiert. Hecpidin war durchgehend von Rest 2 bis 25 definiert. Der durchschnittliche B-Faktor der 6 Anticaline in der asymmetrischen Untereinheit reicht von 40,2 bis 28,7, während

Werte für Hepcidin von 45,0 bis 33,1 reichen. Für die weitere Beschreibung wird der Komplex mit dem geringsten durchschnittlichen B-Faktor (Polypeptidkette A und Peptid P) herangezogen.

### 3.3.5 Die Kristallstruktur des Ac3/Hepcidin-Komplexes

#### 3.3.5.1 Gesamtstruktur

Wie schon in Abbildung 23 zu erkennen ist, weist Ac3 eine herkömmliche Lipocalinfaltung auf, wobei das Hepcidin in der Bindungstasche am oberen Ende des  $\beta$ -Barrels gebunden ist.

#### 3.3.5.2 Struktur des Hepcidins

Die Konformation des Hepcidin-Peptids entspricht im Prinzip der Struktur, wie sie zuvor mittels NMR-Spektroskopie des isolierten Peptids sowie durch Röntgen-Strukturanalyse im Komplex mit einem Fab-Fragment aufgeklärt worden ist (Jordan *et al.*, 2009). Sie besteht aus einem zweisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, bei dem der *Loop*, der die beiden  $\beta$ -Stränge miteinander verbindet und sich zurückkrümmt, über zwei der vier Disulfidbrücken mit dem  $\beta$ -Faltblatt verbunden ist. Die übrigen beiden Disulfidbrücken klammern das  $\beta$ -Faltblatt seitlich jeweils an seinen beiden Enden. Somit wird durch die hier ermittelte Struktur, die von Jordan *et al.* (Jordan *et al.*, 2009) ermittelte Disulfidkonnektivität (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>8</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>5</sup>-Cys<sup>7</sup>), die von der in älteren Veröffentlichungen (Hunter *et al.*, 2002; Lauth *et al.*, 2005) postulierten Disulfidkonnektivität (Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>8</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>7</sup>, Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>4</sup>-Cys<sup>5</sup>) abweicht, bestätigt.

#### 3.3.5.3 Struktur des Ac3

Obwohl das Anticalin Ac3 im Vergleich zu wtLcn2 insgesamt 23 mutierte Aminosäuren aufweist, bleibt bei diesem Anticalin die typische Lipocalinstruktur mit einem antiparallelen  $\beta$ -Barrel und einer  $\alpha$ -Helix, die an dessen Seite liegt, bestehen.

Die einzige größere Abweichung zur wtLcn2-Struktur war in *Loop* #3. Dieser *Loop* ist in Vergleich zu wtLcn2 in Ac3 nach außen verlagert und beinhaltet keine  $\alpha$ -Helix (Abbildung 29).

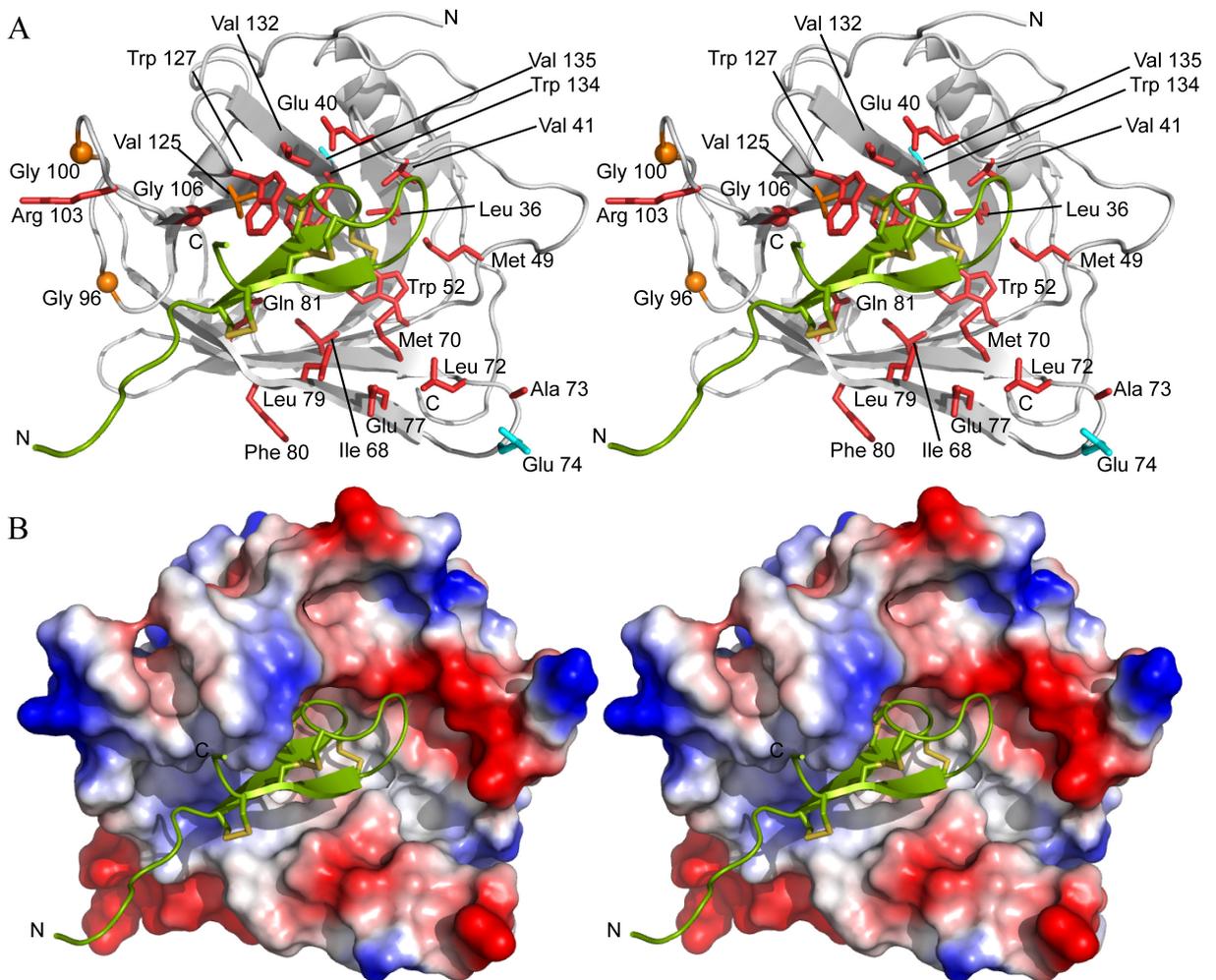
#### 3.3.5.4 Analyse der Bindung von Hecpidin durch Ac3

Hecpidin wird auf der Seite des Anticalins über eine  $852,5 \text{ \AA}^2$  große Kontaktfläche gebunden. Dabei ragen der N- und C-Terminus der länglichen Hecpidinstruktur seitlich aus der Bindungstasche von Ac3 heraus. Der nach außen gebogene *Loop* #3 ermöglicht diesen Bindungsmodus. In diesem *Loop* befinden sich zwei Positionen, Asn 96 und Tyr 100 in wtLcn2, die in Ac3 zu Glycin-Resten mutiert wurden (Abbildung 24 und 25). Diese fungieren möglicherweise als Scharniere, die dem *Loop* die nötige Rückgratflexibilität verleihen, um die Bindungstasche an dieser Stelle zu vergrößern. Insbesondere Gly 96 scheint für diese Flexibilität wichtig zu sein, da es mit  $83,8^\circ$  und  $24,1^\circ$  relativ ungewöhnliche  $\phi$  und  $\psi$ -Winkel aufweist und die Hauptkette an dieser Position signifikant ihre Richtung ändert. Außerdem verhindern die beiden Glycinreste die Ausbildung der kurzen  $\alpha$ -Helix, die von den Resten 96-100 in den Strukturen von sowohl wtLcn2 (PDB-Code: 1L6M) als auch dem Anticalin PRS-010#003 (PDB-Code: 3BX7 (Schönfeld *et al.*, 2009)) gebildet wird.

Die Kontaktfläche von Ac3 und Hecpidin wird durch 26 Reste des Anticalins gebildet, die in Kontakt zu 19 Resten des Peptidliganden stehen (Tabelle 13). Die Interaktion wird unter anderem durch 5 Wasserstoffbrücken und eine Salzbrücke stabilisiert. Letztere entsteht zwischen Lys P18 und Asp 47 auf Seiten des Ac3, wobei es sich um eine unmutierte Aminosäure handelt (Abbildung 26). Die Hydroxylgruppe von Ser P17, die Carboxylgruppe von Glu 40 und der Rückgratstickstoff von Leu 42 bilden ein Wasserstoffbrückennetzwerk. Der Rückgratstickstoff von Ser P17 bildet zudem eine Wasserstoffbrücke zum Rückgratsauerstoff von Glu 40, das an einem weiteren Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt ist. Die Carboxylgruppe von Glu 40 orientiert die Seitenkette von Arg 130 in der Weise, dass sie eine Wasserstoffbrücke zum Rückgratsauerstoff von Cys P13 ausbilden kann. Dabei bildet die Carboxylgruppe von Glu 40 selbst eine Wasserstoffbrücke zum Rückgratstickstoff von Cys P13 (Abbildung 26). Die Carboxamidgruppe von Gln 128 bildet eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Lys P24 und zur Hydroxylgruppe von Thr P25 und stabilisiert somit den gebundenen C-Terminus von Hecpidin.

Alle weiteren Interaktionen zwischen Ac3 und Hecpidin beruhen auf hydrophoben Kontakten. Der Boden der Bindungstasche des Anticalins wird in erster Linie durch hydrophobe Seitenketten gebildet: Trp 52, Ile 68, Met 70, Leu 79, Phe 80, Leu 94, Val 125 und Trp 139. Diese bilden hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Ile P8 und Phe P9 von Hecpidin. Insbesondere Phe P9 spielt eine entscheidende Rolle, da es eine vergrabene Oberfläche von  $128,6 \text{ \AA}^2$  hat, entsprechend 95,7 % der sonst zugänglichen Oberfläche, und da

es mit insgesamt acht hydrophoben Resten von Ac3 interagiert, die alle im Vergleich zu wtLcn1 mutiert sind. Die Disulfidbrücken des Hepcidins bilden ebenfalls hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäuren von Ac3.



**Abbildung 25: Bindungsmodus von Ac3 gegenüber von Hepcidin.** A: Stereobild des Komplexes, in dem das Anticalin als grauer *Cartoon* dargestellt ist. Seitenketten, die sich von Aminosäuren in wtLcn2 unterscheiden, sind als *Sticks* dargestellt, wobei im Fall von Glycin das  $\alpha$ -Atom jeweils als Kugel abgebildet ist. Reste, die in der Lcn2 Zufallsbibliothek randomisiert wurden, sind rot gefärbt. Gelb gefärbte Reste waren ebenfalls in der ursprünglichen Bibliothek randomisiert, wurden aber bei der Affinitätsmaturierung erneut mutiert. Reste, die erst im Verlauf der Affinitätsmaturierung mutiert wurden, sind cyan gefärbt. Das Hepcidin-Peptid ist grün dargestellt. Alle Disulfidbrücken sind als *Sticks* dargestellt, wobei die Schwefelatome gelb gefärbt sind. B: Elektrostatische Oberfläche von Ac3 berechnet in Abwesenheit von Hepcidin durch APBS (Baker *et al.*, 2001). Negativ geladene Regionen sind rot gefärbt, während positiv geladene Regionen blau gefärbt sind. Weiße Regionen sind neutrale Bereiche. Hepcidin ist grün als *Cartoon* eingeblendet.

**Tabelle 13: Interaktionen zwischen Hecpidin und Ac3.** Alle Reste von Ac3, die mit Hecpidin interagieren, definiert durch PISA (Krissinel & Henrick, 2007), sind aufgeführt. Die mutierten Reste sind fett hervorgehoben.

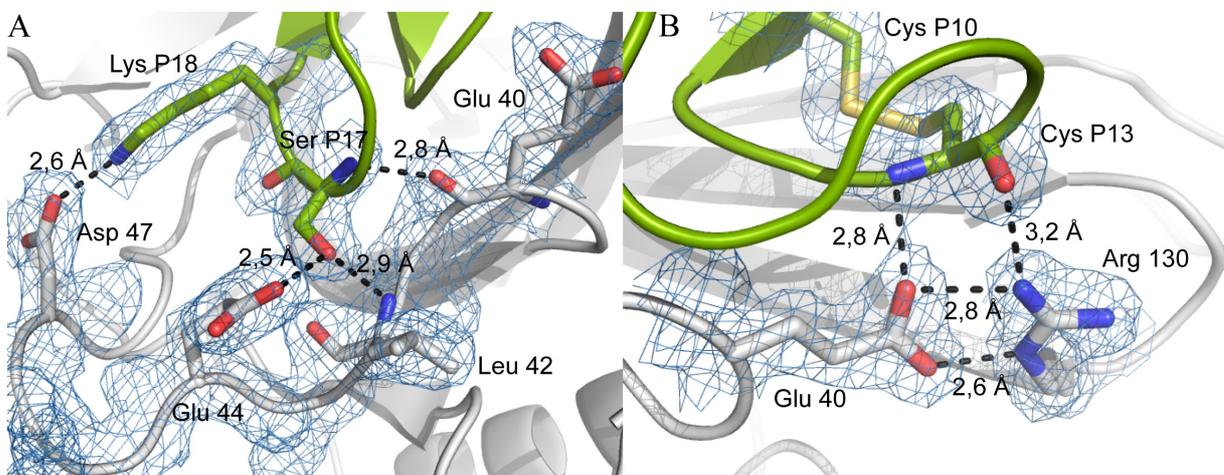
Hecpidin	Interagierende Reste	Begrabene Oberfläche [ $\text{\AA}^2$ ]	Wasserstoffbrücke (H) / Salzbrücke (S)
Asp P1	-	-	-
Thr P2	-	-	-
His P3	-	-	-
Phe P4	-	-	-
Pro P5	-	-	-
Ile P6	Thr 104, <b>Trp 127</b>	23,2	-
Cys P7	Thr 104, <b>Trp 127</b>	0,3	-
Ile P8	Leu 94, Thr 104, <b>Val 125</b> , Val 126, <b>Trp 127</b>	86,0	-
Phe P9	<b>Trp 52, Ile 68, Met 70, Leu 79, Phe 80, Gln 81, Val 125, Trp 134</b>	128,6	-
Cys P10	<b>Val 125, Val 132, Trp 134</b>	21,2	-
Cys P11	<b>Leu 36, Val 41, Trp 52, Val 132, Trp 134</b>	87,5	-
Gly P12	<b>Glu 40</b> , Val 132	14,2	-
Cys P13	<b>Glu 40, Trp 127</b> , Arg 130, <b>Val 132</b>	83,5	H
Cys P14	<b>Trp 127</b>	13,0	-
His P15	-	-	-
Arg P16	<b>Glu 40</b> , Leu 42	55,0	-
Ser P17	<b>Glu 40, Val 41</b> , Leu 42, Glu 44, <b>Met 49</b>	92,1	H
Lys P18	Asp 47	34,5	H / S
Cys P19	<b>Leu 36, Met 49, Trp 52, Met 70</b>	64,5	-
Gly P20	<b>Leu 79</b>	8,4	-
Met P21	<b>Leu 79</b>	44,0	-
Cys P22	<b>Trp 127, Phe 80</b>	9,9	-
Cys P23	<b>Trp 127</b>	8,1	-
Lys P24	Gly 102, Thr 104, <b>Trp 127</b> , Gln 128, Asn 129	79,2	H
Thr P25	<b>Trp 127</b> , Gln 128	20,4	H

Insbesondere die Disulfidbrücke, die von den Cystein-Resten Cys P11 und Cys P19 gebildet wird, ist tief in der Bindungstasche des Anticalins vergraben. Beide Reste haben vergrabene Oberflächen von  $87,2 \text{ \AA}^2$  und  $64,5 \text{ \AA}^2$ , was 100,0 % bzw. 83,4 % der insgesamt zugänglichen Oberfläche entspricht. Beide Cysteinreste interagieren ausschließlich mit hydrophoben Aminosäuren des Anticalins, wobei diese alle im Vergleich zu wtLcn1 mutiert sind (Tabelle 13). Auch die Disulfidbrücke, die durch Cys P10 und Cys P13 gebildet wird, ist intensiv an der Komplexbildung beteiligt mit begrabenen Oberflächen von  $21,2 \text{ \AA}^2$  und  $83,5 \text{ \AA}^2$  für die

beiden Cysteinreste, was 100,0 % und 87,7 % der insgesamt zugänglichen Proteinoberfläche entspricht. Cys P10 interagiert ausschließlich mit mutierten hydrophoben Resten, während Cys P13 neben Glu 40 auch mit dem unmutierten Rest Arg 130 interagiert, die beide (wie oben beschrieben) Wasserstoffbrücken zum Rückgrat von Cys P13 ausbilden.

Insgesamt ist die Kontaktfläche von Ac3 leicht negativ geladen (Abbildung 25) und passt somit gut zu der negativen Netto-Ladung des Hecpidins, das einen isoelektrischen Punkt von 8,2 aufweist. Der Bereich um *Loop* #1 ist deutlich negativ geladen und ist somit elektrostatisch komplementär zu Arg P16 und Lys P18, die in Richtung von *Loop* #1 zeigen.

Fast alle der mutierten Aminosäuren von Ac3 liegen innerhalb der Bindungstasche des Anticalins (Abbildung 25A). 14 der 21 Reste (67 %), die in der ursprünglichen Bibliothek randomisiert wurden (Gebauer *et al.*, 2013), interagieren mit Hecpidin. Diese Reste machen 54 % aller Reste aus, die mit Hecpidin wechselwirken. 11 Seitenketten und somit 79 % der interagierenden mutierten Reste sind hydrophob. Die Selektion auf Bindungsaktivität für Hecpidin hat somit den zum Hecpidin kompatiblen hydrophoben Boden der Bindungstasche in dem Anticalin hervorgebracht.



**Abbildung 26: Relevante Interaktionen zwischen Hecpidin (grün) und Ac3.** Die interagierenden Reste sind als *Sticks* dargestellt, wobei die 2Fo-Fc-Karte konturiert bei  $1 \sigma$  für diese Reste (und teilweise benachbarte Regionen) ebenfalls dargestellt ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss des Affinitätsanhängsels auf die Kristallisation von Anticalin-Ligandkomplexen

Wie in Absatz 3.1.3 beschrieben, hing das Kristallisationsverhalten des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109) stark von der Position des Affinitätsanhängsels ab. Kristallisationsansätze in Gegenwart eines C-terminalen Affinitätsanhängsels an Ac1 ergaben entweder keine Kristalle oder bloß solche, die ausschließlich VEGF(8-109) enthielten. Wurden hingegen das *Strep*-tag II oder His<sub>6</sub>-Tag N-terminal platziert, bildeten sich Kristalle des Komplexes, wobei die Art des Affinitätsanhängsels auf die Kristallisation wenig Einfluss hatte. Die entstandenen Kristalle hatten bemerkenswerterweise bei beiden Affinitätsanhängseln die gleiche trigonale Raumgruppe R3 oder R32, was darauf hindeutet, dass der N-Terminus nicht signifikant an einem Kristallkontakt beteiligt ist.

Wurde der Komplex mit Hilfe des *Strep*-tag II am C-Terminus von VEGF(8-109) gereinigt, ohne dass Ac1 ein Affinitätsanhängsel trug, bildeten sich ebenfalls Kristalle unter den Bedingungen, bei denen auch schon die oben erwähnten Komplexkristalle erhalten wurden. Diese Kristalle hatten jedoch die hexagonale Raumgruppe P3<sub>2</sub>21 und beugten Röntgenstrahlen stärker, was ein weiterer Indikator für die Bedeutung der Position des Affinitätsanhängsels im Komplex aus VEGF(8-109) und Ac1 und auf dessen Kristallisationsverhalten ist.

In der Kristallpackung (Abbildung 27) erkennt man, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus des Anticalins ausreichend Platz haben und an keinerlei Kristallkontakten beteiligt sind. Der nächste Kontakt vom N-Terminus ist mit 17,2 Å Entfernung der N-Terminus eines im Kristall benachbarten Ac1-Moleküls. Der nächste Kristallkontakt vom C-Terminus ist mit 20,7 Å Entfernung der C-Terminus eines VEGF(8-109)-Moleküls. Hier gilt zu bedenken, dass am C-Terminus von Ac1 insgesamt 42 flexible Reste einschließlich des Affinitätsanhängsels in der Elektronendichte nicht sichtbar sind. Am C-Terminus von VEGF befindet sich der in der Kristallstruktur nicht sichtbare *Strep*-tag II. Für diese nicht abgebildeten Reste ist jedoch ausreichend Platz vorhanden, da sich in diesem Bereich ein großer Hohlraum in der Kristallstruktur befindet. Interessanterweise lieferte eine Version von Ac1, die neben dem N-terminalen *Strep*-tag II eine Deletion am C-Terminus aufwies, im Gegensatz zur Version mit intaktem C-Terminus keine Komplexkristalle. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese,

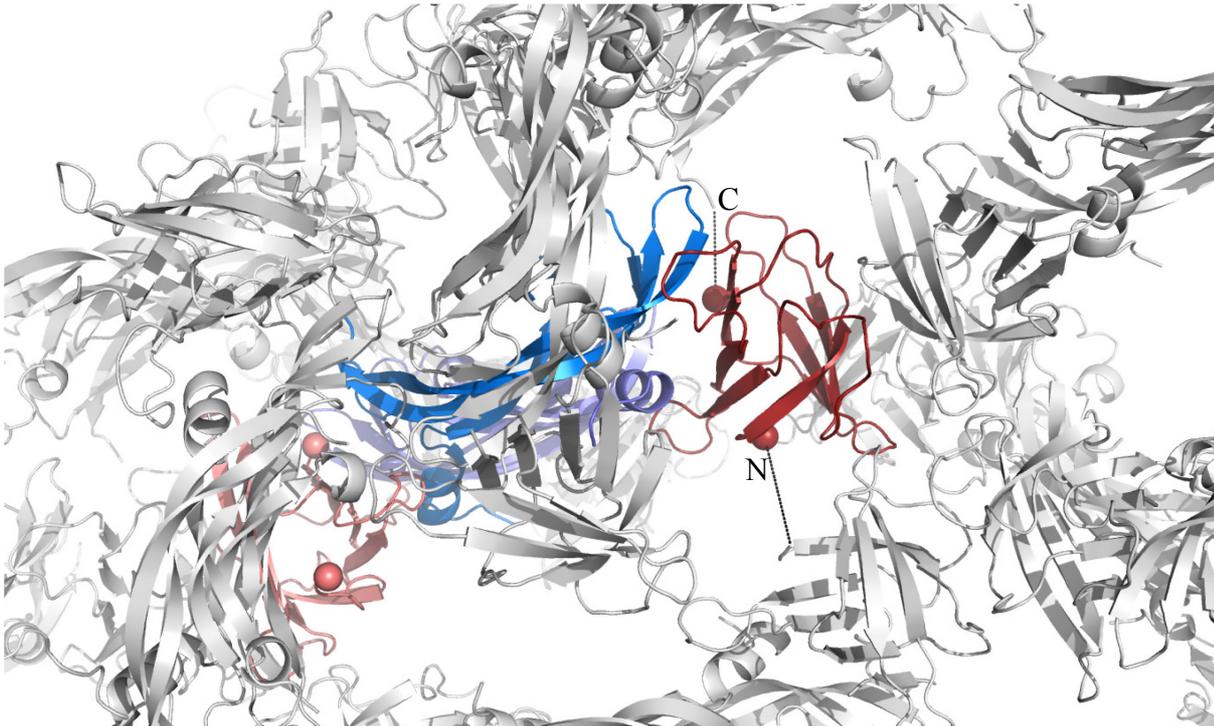
dass in erster Linie der N- und der C-Terminus von Ac1 für das Kristallisationsverhalten des Komplexes verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu dem Anticalin Ac1, das auf dem Lcn1-Gerüst basiert, zeigten Anticaline, die auf dem Lcn2-Gerüst basieren, wie Ac3 und PRS-010#003, bei der Kristallisation keine starke Abhängigkeit von der Position des Affinitätsanhängsels, sondern kristallisieren auch mit C-terminalem *Step*-tag II. Die Ursache für die beschriebenen Eigenschaften von Ac1 könnte in der neuen Topologie liegen, bei der der C-Terminus von Ac1 sehr flexibel und somit bei der Kristallisation eher hinderlich ist, da diese eine regelmäßige Anordnung der Moleküle erfordert; also wird der flexible Bereich durch ein Affinitätsanhängsel am C-Terminus weiter vergrößert. Obwohl durch einen N-terminalen Affinitätsanhängsel ein flexibler Abschnitt zum weniger flexiblen N-Terminus hinzugefügt wird, bildeten sich Kristalle mit dieser Version des Ac1. Für eine erfolgreiche Kristallisation scheint jedoch der C-Terminus trotz seiner Flexibilität in voller Länge erforderlich zu sein, da die Version, die neben dem N-terminalen Affinitätsanhängsel neun Reste am C-Terminus deletiert hat, keine Komplexkristalle bildet (s.o.).

Es besteht die Möglichkeit, dass das Anticalin Ac2 mit seiner Spezifität für den IL4-Rezeptor ein ähnliches Kristallisationsverhalten wie Ac1 aufweist, da beide Anticaline aus der gleichen Bibliothek selektiert wurden, in der die natürliche Disulfidbrücke von Lcn1 (Breustedt *et al.*, 2005) entfernt wurde, was die neue Topologie wahrscheinlich begünstigt. Aus diesem Grund wurden die ersten Kristallisationsexperimente dieses Proteins mit einem analogen Molekülformat durchgeführt, welches auch schon bei der Kristallisation von Ac1 und VEGF(8-109) zum Erfolg geführt hatte. Bei dieser Version wurde das Anticalin in Volllänge ohne Affinitätsanhängsel eingesetzt, während der Ligand IL4-BP einen C-terminalen *Strep*-tag II trug. Allerdings wurden mit dieser Version keine Kristalle erhalten, so dass weitere Versionen mit unterschiedlichen Affinitätsanhängseln und -positionen ausprobiert werden müssen. Aufgrund der aufwändigen Produktion des IL4-Bindeproteins ist dies jedoch ein relativ langwieriger Prozess.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich des Einflusses der Affinitätsanhängsel auf die Kristallisationseigenschaften der Proteine zeigte eine Untersuchung von mehr als 100 Strukturen mit His<sub>6</sub>-Tag in der Proteindatenbank, dass dieser kaum Einfluss auf die finale Struktur hat. Allerdings hatten Strukturen mit His<sub>6</sub>-Tag etwas höhere B-Faktoren und einen größeren Wassergehalt, wohingegen weder die Auflösung noch die R-Faktoren beeinflusst wurden (Carson *et al.*, 2007). Zu bedenken gilt hierbei jedoch, dass diese

Studie nur Proteine berücksichtigte, bei denen die Struktur mit His<sub>6</sub>-Tag gelöst worden war. Nicht berücksichtigt wurde hingegen der Einfluss der Affinitätsanhängsel auf die Fähigkeit, überhaupt Kristalle zu bilden. Auch gibt es keine Hinweise auf die Relevanz der Position des Affinitätsanhängsels. Eine Studie an Membranproteinen (Backmark *et al.*, 2008) zeigte hingegen, dass ein His<sub>6</sub>-Tag die Auflösung der Kristallstrukturen verschlechterte aber meroedrisches *Twinning* verminderte.



**Abbildung 27: Kristallpackung des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109).** Der eigentliche Komplex ist farbig (Ac1: rot; VEGF(8-109): blau), während die symmetrieverwandten Komplexe grau dargestellt sind. Der N- und C-Terminus von Ac1 ist als *Ball* hervorgehoben und die nächsten Kontakte sind als schwarze Linien dargestellt. Der nächste Kontakt vom N-Terminus des Anticalins ist der N-Terminus eines anderen Ac1-Moleküls (17,2 Å). Der nächste Kontakt vom C-Terminus ist dagegen der C-Terminus eines VEGF-Moleküls (20,7 Å).

## 4.2 Strukturelle Besonderheiten des Ac1

Der ungewöhnliche Bindungsmodus von Ac1 eröffnet einen neuen Blickwinkel auf die Fähigkeit des Lipocalingerüsts, sich an Liganden mit unterschiedlicher Form anzupassen. Bislang war bekannt, dass die Struktur von wtLcn1 relativ flexibel ist (Breustedt *et al.*, 2009; Breustedt *et al.*, 2005), wobei es sich bei den bisher beschriebenen strukturellen Variationen der beiden unterschiedlichen Kristallstrukturen bloß um kleinere Abweichungen handelte, wie

leicht veränderte Konformationen von einzelnen  $\beta$ -Strängen und *Loops*, was Änderungen in Größe und Form der Bindungstasche zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu weist die Struktur von Ac1 jedoch eine deutlich andere Topologie auf, auch wenn die grobe Struktur des  $\beta$ -*Barrels* erhalten geblieben ist.

Ac1 hat nicht nur eine andere Topologie als wtLcn1 (Abbildung 12), es bindet auch seinen Liganden VEGF in für Lipocaline bzw. Anticaline untypischer Weise seitlich mit dem  $\beta$ -*Barrel* anstatt zentral in der Bindungstasche aus den vier variablen Schleifen (Abbildung 13). Der Vorteil der Bindung von Liganden in der harmonischen Bindungstasche liegt in der dadurch verursachten großen Interaktionsfläche. Dies ist beispielsweise der Fall bei der Bindung von CTLA-4 durch PRS-010#003 (Schönfeld *et al.*, 2009), ein Anticalin, das auf dem Lcn2-Gerüst beruht und eine auf Seite des Anticalins 217 Å<sup>2</sup> größere Interaktionsfläche hat als die des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109).

Die eigentliche Ligandenkavität im Inneren des  $\beta$ -*Barrels* von Ac1 weist in der Kristallstruktur eine Elektronendichte auf, die darauf hindeutet, dass sie von einem hydrophoben Molekül besetzt ist (Abbildung 10). Länge und Form deuten auf Lactobacillsäure hin, die in *E. coli*, dem Organismus, der zur Produktion des Proteins diente, vorkommt (O'Leary, 1962; Marr & Ingraham, 1962). Es ist möglich, dass die Lactobacillsäure die Bindungstasche von Ac1 schon während der Selektion durch Phage Display besetzt hat und sogar eine Rolle für die Faltung bzw. Stabilität des Anticalins spielt.

38 Reste am C-Terminus von Ac1 sind in der Elektronendichte nicht sichtbar und somit flexibel. In wtLcn1 wird der C-Terminus durch eine Disulfidbrücke am  $\beta$ -*Barrel* fixiert (Breustedt *et al.*, 2009; Breustedt *et al.*, 2005). Diese war jedoch in der Bibliothek, die für die Selektion von Ac1 verwendet wurde, entfernt. Die fehlende Fixierung erklärt die erhöhte Flexibilität des Scaffolds und hat wahrscheinlich die neue Topologie von Ac1 ermöglicht. Diese wurde wiederum durch die im Verlauf der Selektion neu eingeführte Disulfidbindung zwischen Cys31 und Cys104 stabilisiert.

Die neue Topologie von Ac1 beinhaltet ein  $\phi$ -*Loop*-Motiv. Dabei handelt es sich um einen *Loop*, der zwei  $\beta$ -Stränge miteinander verbindet, die eine  $\beta$ -Faltblattstruktur mit einem dritten  $\beta$ -Strang bilden, welcher zwischen den beiden anderen  $\beta$ -Strängen liegt (Hutchinson & Thornton, 1996). Dieses Motiv ist unüblich in Proteinen, da seine Entstehung während der Faltung topologisch aufwändig ist. Es wurde erstmals in Aspartat-Proteinasen identifiziert, die ein doppeltes  $\phi$ -*Barrel* enthalten, das aus sechs durch vier ineinander verschachtelte  $\phi$ -

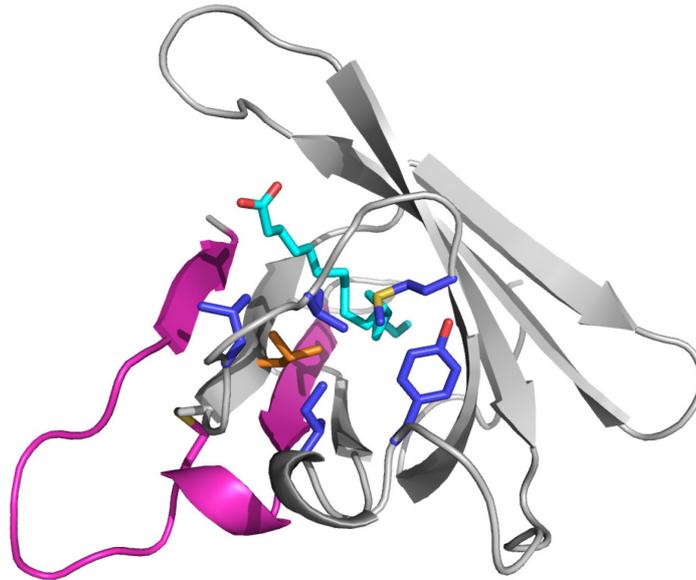
*Loop*-Motive verbundenen  $\beta$ -Strängen besteht (Subramanian *et al.*, 1977; Suguna *et al.*, 1987). Das doppelte  $\varphi$ -*Barrel* ist ein Strukturelement, das auch in den Proteinüberfamilien der Barwin-ähnlichen Endoglucanasen und der ADC-ähnlichen Proteine vorkommt (Castillo *et al.*, 1999). Zu den ADC-ähnlichen Proteinen wiederum gehören die Proteinfamilien der Aspartat-Decarboxylasen, Format/DMSO-Reduktasen sowie der Cdc48-N-terminal-Domäne ähnliche Proteine.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Proteinen mit doppeltem  $\varphi$ -*Barrel* besitzt Ac1 nur ein einzelnes  $\varphi$ -*Loop*-Motiv. Eine Suche nach Proteinen mit ähnlicher Struktur wie Ac1 mit Hilfe des DALI-Servers (Holm & Rosenstrom, 2010) resultierte ausschließlich in Proteinen mit typischer Lipocalin-Faltung (Flower, 1996a), d.h. mit wtLcn1 (PDB-Code: 3EYC (Breustedt *et al.*, 2009)) als ähnlichstem Protein, was darauf hindeutet, dass die Struktur von Ac1 trotz der neuen Topologie noch erkennbare Verwandtschaft zu seinem Ausgangsgerüst aufweist.

Ein Sequence Alignment von Proteinen mit doppeltem  $\varphi$ -*Barrel* (außer Ac1) ergab, dass einige konservierte Reste für die Stabilisierung des  $\varphi$ -*Loops* wichtig sind (Castillo *et al.*, 1999). Zu diesen Resten gehört eine hydrophobe Aminosäure am C-Terminus des mittleren  $\beta$ -Strangs in der Nähe des eigentlichen  $\varphi$ -*Loops*, deren Seitenkette im hydrophoben Kern des  $\beta$ -*Barrels* begraben ist. In Ac1 weist der mittlere  $\beta$ -Strang eine entgegengesetzte Richtung auf als in den doppelten  $\varphi$ -*Barrel*-Proteinen, so dass es sich bei der entsprechenden Position um Position 32 handelt, die sich am N-Terminus dieses  $\beta$ -Strangs befindet und ein Leucin beherbergt (im Gegensatz zu dem hydrophilen Asn in wtLcn1). Leu32 bildet einen hydrophoben Cluster mit Ile80, Leu29, Val26, Met22 und Tyr77, wobei es sich auch bei Ile80, Leu29 und Val26 um mutierte Reste handelt. Sogar die Fettsäure im Innern von Ac1 ist an dem hydrophoben Cluster beteiligt, der den  $\varphi$ -*Loop* stabilisiert (Abbildung 28).

Zusätzlich zu dem hydrophoben Cluster wird der  $\varphi$ -*Loop* durch die künstliche Disulfidbrücke zwischen den Resten 31 und 104 stabilisiert, die den  $\varphi$ -*Loop* mit dem mittleren  $\beta$ -Strang des  $\varphi$ -*Loop*-Motivs verbindet (Abbildung 12 und 28). In wtLcn1 würden sich diese Positionen in *Loop* #1 und #4 befinden, die die  $\beta$ -Stränge A und B bzw. G und H miteinander verbinden, wo sie 13,1 Å voneinander entfernt sind. Voraussetzung für die Bildung einer Disulfidbrücke ist demzufolge eine erhebliche Änderung der Lipocalinfaltung, die durch die große Anzahl an Mutationen im Bereich des  $\varphi$ -*Loops* erleichtert wird, wobei Mutationen in diesem Bereich 60 % aller Aminosäureaustausche ausmachen.

Aufgrund der Stabilität, der Zugänglichkeit und der Anordnung funktioneller Gruppen bildet in Proteinen mit doppeltem  $\phi$ -Barrel ein  $\phi$ -Loop das Gerüst für das aktive Zentrum des Enzyms (Castillo *et al.*, 1999). Dahingegen ist Ac1 kein Enzym sondern ein Bindeprotein, in dem der  $\phi$ -Loop ein Gerüst für die Bindung von VEGF(8-109) bildet. Das Motiv macht einen Großteil der Interaktionsfläche aus, und der  $\phi$ -Loop selbst nimmt eine Konformation an, die sich der Struktur von VEGF(8-109) quasi ideal anpasst.



**Abbildung 28:  $\phi$ -Loop-Motiv in Ac1.** Das  $\phi$ -Loop-Motiv ist magenta hervorgehoben. Leu 32 im mittleren b-Strang des  $\phi$ -Loop-Motivs, das an einem hydrophoben Cluster beteiligt ist, ist orange gefärbt. Die übrigen Seitenketten des hydrophoben Clusters sind als blaue Sticks dargestellt. Die Lactobacillsäure ist cyan dargestellt. Die Disulfidbrücke ist ebenfalls als Sticks hervorgehoben. Sauerstoff- und Schwefelatome sind rot bzw. gelb gefärbt.

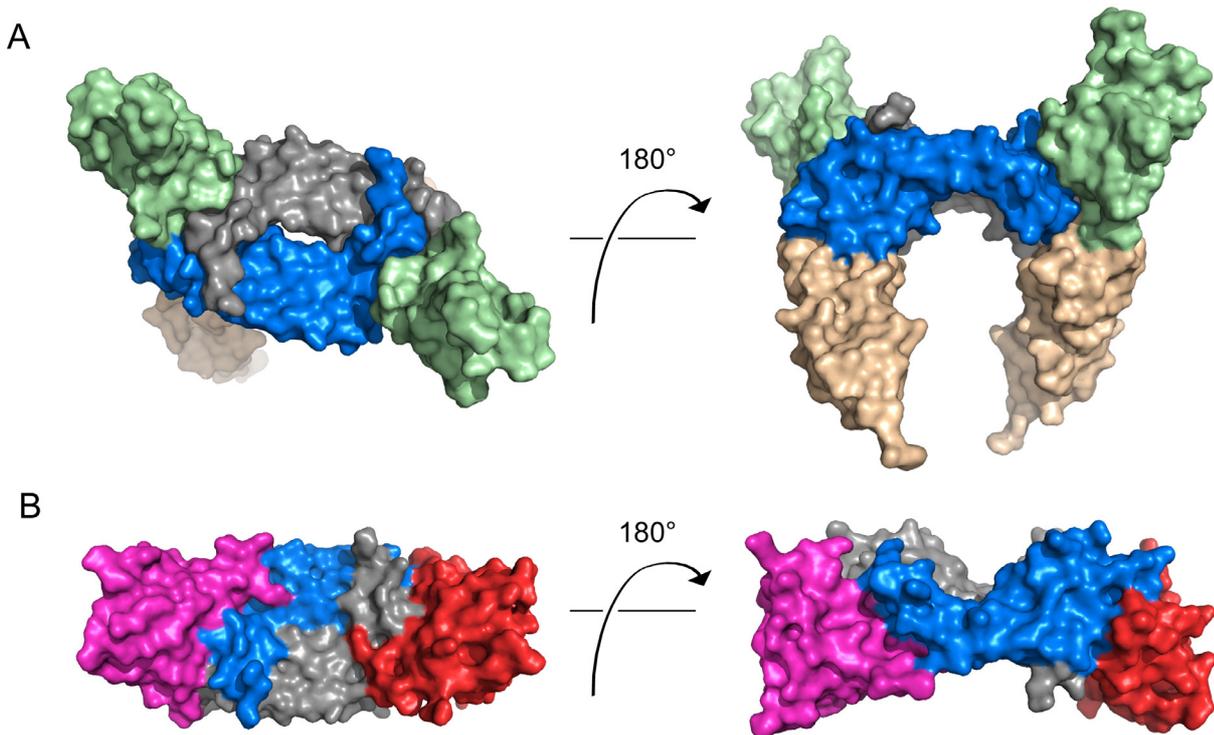
### 4.3 Vergleich der Epitope von verschiedenen VEGF(8-109)-Bindeproteinen

Das Ac1 zeigt bei der Bindung von VEGF(8-109) eine Interaktionsfläche von  $938 \text{ \AA}^2$ , was  $251 \text{ \AA}^2$  kleiner ist als die mit PISA (Krissinel & Henrick, 2007) berechnete Interaktionsfläche des natürlichen Bindungspartners VEGFR-2 (Brozzo *et al.*, 2011) (Tabelle 13). Allerdings ist die Größe der Interaktionsfläche vergleichbar mit der von Bevacizumab (Muller *et al.*, 1998) und Ranibizumab (Chen *et al.*, 1999), deren Werte nur 13 bzw.  $30 \text{ \AA}^2$  größer sind. Ranibizumab hat demnach mit  $968 \text{ \AA}^2$  die größte vergrabene Oberfläche. Zu beachten ist jedoch, dass Ac1 mit insgesamt 26 Resten die größte Anzahl an Kontakten mit VEGF(8-109) eingeht.

**Tabelle 13: Analyse der Epitope von verschiedenen VEGF(8-109)-bindenden Proteinen mittels PISA.** Die interagierenden Reste (Abstand  $\leq 4$  Å) von VEGF(8-109) sind aufgelistet. C und D beziehen sich auf die beiden Ketten von VEGF(8-109). Abgesehen von Ac1 sind die PDB-Codes der zugehörigen Komplexstrukturen angegeben. Die PDB-Codes sind äquivalent zu denen in Abbildung 29.

VEGF	Ac1	3V2A	1CZ8	1BJ1	2FJG	2FJH	1TZH	1TZI	1FLT	3BDY	4GLN	2QR0
Val14C			X	X								
Lys16C						X		X	X		X	
Phe17C	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X
Met18C	X	X	X		X	X		X	X		X	X
Asp19C						X						
Tyr21C	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X
Gln22C	X	X			X	X			X		X	
Arg23C	X					X						
Tyr25C	X	X			X	X			X		X	
Cys26C	X					X			X			
His27C	X					X			X			
Met55C						X						
Cys61C						X			X			
Asn62C	X	X			X	X	X		X		X	X
Asp63C	X	X			X		X	X	X			X
Glu64C		X			X		X					
Gly65C		X						X	X			
Leu66C		X				X		X	X			X
Asn100C						X						
Lys101C	X					X						
Cys102C	X											
Glu103C		X				X			X			
Cys104C		X				X		X	X			
Arg105C								X	X			
Pro106C								X	X			
Lys107C		X										
Phe36D		X										
Tyr39D			X									
Pro40D		X										
Asp41D		X										
Ile43D		X			X							
Glu44D		X			X							
Tyr45D	X	X	X	X			X			X		X
Ile46D		X					X	X	X			
Lys48D	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Gln79D	X		X	X			X	X	X	X	X	
Met81D	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Arg82D	X		X	X			X			X		X
Ile83D	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Lys84D	X		X	X	X		X	X		X		X
Pro85D		X	X	X	X		X	X	X	X		X
His86D	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X
Gln87D	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
Gly88D	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
Gln89D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
His90D	X		X	X	X		X	X		X	X	X
Ile91D	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Gly92D	X		X	X			X			X		
Glu93D			X	X			X			X		
Met94D			X	X								
<b><math>\Sigma</math></b>	<b>26</b>	<b>29</b>	<b>23</b>	<b>21</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>19</b>
<b>BSA</b>	<b>938</b>	<b>1189</b>	<b>968</b>	<b>951</b>	<b>871</b>	<b>803</b>	<b>715</b>	<b>666</b>	<b>933</b>	<b>746</b>	<b>721</b>	<b>762</b>

**Abbildung 29: Epitope von verschiedenen VEGF(8-109)-bindenden Proteinen.** Die Oberfläche der interagierenden Reste von VEGF(8-109) ist rot (Kette C) bzw. orange (Kette D) hervorgehoben. Die Oberfläche von Kette C ist grau, wohingegen die von Kette D blau dargestellt ist. 3V2A: Komplex aus VEGF(8-109) und VEGFR-2 (Brozzo *et al.*, 2011). 1CZ8: Komplex aus VEGF(8-109) und Ranibizumab (Chen *et al.*, 1999). 1BJ1: Komplex aus VEGF(8-109) und Bevacizumab (Muller *et al.*, 1998). 2FJG und 2FJH: Komplexe aus VEGF(8-109) und Fab-Fragmenten, die sowohl spezifisch für VEGF aus Mensch als auch aus Maus sind (Fuh *et al.*, 2006). 1TZH und 1TZI: Komplexe aus VEGF(8-109) und Fab-Fragmenten, die aus einer *Phage-Display*-Bibliothek mit eingeschränkter Vielfalt in den CDRs (Tyr, Ala, Asp, Ser als einzige erlaubte Aminosäuren) selektiert wurden (Fellouse *et al.*, 2004). 1FLT: Komplex aus VEGF(8-109) und Domäne 2 des FLT-1-Rezeptors (Wiesmann *et al.*, 1997). 3BDY: Komplex aus VEGF(8-109) und einem Fab-Fragment, das sowohl spezifisch für VEGF als auch HER2 ist (Bostrom *et al.*, 2009). 4GLN: Komplex aus VEGF(8-109) und einem D-Protein Antagonisten (Mandal *et al.*, 2012). 2QR0: Komplex aus VEGF(8-109) und einem Fab-Fragment, das nur Tyr und Ser in den CDRs trägt (Fellouse *et al.*, 2007).



**Abbildung 30: Vergleich von VEGFR-2 und Ac1 gebunden an VEGF(8-109).** Die Oberfläche von Kette C von VEGF(8-109) ist grau gefärbt, während die von Kette D blau gefärbt ist. A zeigt zwei unterschiedliche Orientierungen des Komplexes aus VEGFR-2 und VEGF(8-109). Die Oberfläche von Domäne 2 ist grün gefärbt und die Oberfläche von Domäne 3 ist gelb gefärbt. B zeigt unterschiedliche Orientierungen des Komplexes aus Ac1 und VEGF(8-109).

Diese Wechselwirkungen erfolgen in erster Linie über Rückgratkontakte und hydrophobe Seitenketten, insbesondere Ile98, Leu105, Val108, Val110, Val113, Trp114 und Val116. Arg90 ist der einzige Rest von Ac1, der über seine Seitenkette eine Wasserstoffbrücke zu VEGF(8-109) ausbildet, wohingegen die übrigen acht Wasserstoffbrücken zwischen Ac1 und VEGF(8-109) von Rückgratgruppen des Ac1 ausgehen. Im Gegensatz dazu werden sieben der fünfzehn Wasserstoffbrücken zwischen Bevacizumab und VEGF(8-109) von Seitenketten des Bevacizumab ausgebildet.

Die Reste, die das Epitop von Ac1 ausmachen, sind wie auch im Fall des Bindungspartners VEGFR-2 gleichmäßig über die beiden Ketten (C und D) des homodimeren VEGF(8-109) verteilt (Tabelle 13 und Abbildung 29). Somit zeigen diese beiden Moleküle sehr ähnliche Epitope (Abbildung 29), was die hohe antagonistische Aktivität des Anticalins erklärt. Im Unterschied dazu binden Bevacizumab und Ranibizumab hauptsächlich an eine der beiden Ketten von VEGF(8-109). Das Fab-Fragment, das aus einer *Phage-Display*-Bibliothek mit

eingeschränkter Vielfalt in den CDRs selektiert wurde (PDB-ID: 1TZH (Fellouse *et al.*, 2004)) und das Fab-Fragment mit Spezifität für VEGF und HER2 (PDB-ID: 3BDY (Bostrom *et al.*, 2009)) weisen ähnliche Epitope wie Bevacizumab und Ranibizumab auf.

Das Fab-Fragment, das spezifisch für VEGF aus Mensch und Maus ist (PDB-ID: 2FJH (Fuh *et al.*, 2006)), ist das einzige Bindemolekül, das primär jeweils die zurückgelagerte Kette des spitzen Endes des länglichen Homodimers bindet. Die zurückgelagerte Position ist wahrscheinlich auch die Ursache dafür, dass sich das Epitop der meisten Bindeproteine auf die andere Kette konzentriert oder gleichmäßig beide Ketten mit einbezieht. Hervorzuheben ist, dass alle genannten Bindeproteine des VEGF(8-109) am spitzen Ende des länglichen Homodimers binden und somit ein überlappendes Epitop mit VEGFR-2 haben.

Abbildung 30 zeigt einen Vergleich des Komplexes aus VEGF(8-109) und VEGFR-2 mit dem aus VEGF(8-109) und Ac1. Dabei wird deutlich, dass Ac1 in sehr ähnlicher Weise an VEGF(8-109) bindet wie der Rezeptor, was dazu führt, dass Ac1 tatsächlich die komplette Bindestelle des Rezeptors auf VEGF(8-109) blockiert.

#### 4.4 Potenzial von Ac1 als Wirkstoff

Bevacizumab (Avastin) ist ein Blockbuster von Genentech/Roche, der im Jahr 2011 einen Umsatz von 6,66 Milliarden US \$ erzielt hat (Business Report Roche, 2011). Zusätzlich zur Therapie von verschiedenen Krebsarten wird Bevacizumab für die Behandlung von altersbedingter feuchter Makuladegeneration eingesetzt. Für diese Indikation ursprünglich zugelassen ist Ranibizumab (Lucentis), ein Fab-Fragment von Bevacizumab mit sechs zusätzlichen Mutationen, wovon sich vier in der Interaktionsfläche befinden. Das wesentlich teurere Medikament Lucentis wurde speziell für die Behandlung von altersbedingter feuchter Makuladegeneration entwickelt, wobei die im Vergleich zum intakten Antikörper Bevacizumab geringere Größe eine leichtere Penetration der Retina ermöglichen sollte.

Ac1 bereitet eine Alternative zu beiden Wirkstoffen. Es ist noch kleiner als Ranibizumab und sollte daher noch leichter in die Retina eindringen. Ergebnisse aus Studien in Mäusen deuten zudem darauf hin, dass ein Anticalin gegen VEGF noch wirksamer gegen Tumorangio-genese ist als Bevacizumab (Pieris, 2007). Die industrielle Herstellung des Anticalins ist vermutlich günstiger als die von Bevacizumab und Ranibizumab, da es nur eine Polypeptidkette besitzt und leicht in *E. coli* produziert werden kann. Allerdings muss das Anticalin für eine therapeutische Anwendung noch zwecks Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mit PEG

konjugiert werden (Pieris, 2011b), wobei mit der neuen Methode der PASylierung (Schlapschy *et al.*, 2013) sogar noch ein deutlich preiswerteres effektives Verfahren zur Verfügung steht. Ein Anticalin gegen VEGF hat bereits die erste Phase der klinischen Prüfung bei systemischer Applikation an 26 Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren erfolgreich absolviert (Mross *et al.*, 2013; Pieris, 2011b).

## 4.5 Faktoren für die Rückfaltung des IL4-Bindeproteins

Die in der Literatur beschriebene Rückfaltungsprozedur für das IL4-Bindeprotein (Shen *et al.*, 1996) ist aus zwei Gründen sehr aufwändig. Einerseits muss das aus Einschlusskörpern solubilisierte rekombinante Protein zunächst durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden, andererseits wird aufgrund der hohen Aggregationsneigung dessen Rückfaltung bei sehr hoher Verdünnung durchgeführt. Im darauffolgenden Schritt muss der Rückfaltungsansatz für die anschließende Chromatographie dialysiert werden, womit wiederum sehr große Volumina verbunden sind.

Angesichts dessen wurde in dieser Arbeit versucht, das Protein löslich zu produzieren, wobei jedoch beide angewandten Methoden, die Fusionierung mit einem Faltungshelfer (SUMO) und die Co-Expression mit dem Anticalin, scheiterten. Interessanterweise wurde bei der Co-Expression mit Ac2 eine relativ große Menge an löslichem IL4-Bindeprotein produziert, so dass es durch SDS-PAGE gut nachweisbar war. Obwohl gezeigt werden konnte, dass es sich nicht um Mikroaggregate handelt, da das Protein in der Gelfiltration bei der erwarteten Größe eluierte, wurde dieses Protein nicht von dem Anticalin gebunden. Da Glycosylierung nicht relevant für die Bindung des Anticalins ist, liegt der Grund dafür, dass das co-exprimierte IL4-Bindeprotein nicht durch Ac2 gebunden wurde, vermutlich in einer unphysiologischen Faltung.

Aus diesem Grund musste auf die Rückfaltung zurückgegriffen werden. Zur Vereinfachung der Prozedur wurde zunächst versucht, die Rückfaltung ohne vorherige Reinigung der Einschlusskörper durchzuführen, wobei sich jedoch zeigte, dass dieser Schritt entscheidend für den Rückfaltungserfolg ist. Generell ist möglichst reines Ausgangsmaterial förderlich für hohe Rückfaltungsausbeuten (Mohammadian-Mosaabadi *et al.*, 2007), da Verunreinigungen die Aggregation von Proteinen begünstigen. Dies ist besonders fatal bei Proteinen, die ohnehin schon eine starke Tendenz zur Aggregation haben, wie das IL4-BP.

Die ausgeprägte Neigung zur Aggregation war auch der Grund, weshalb die starke Verdünnung bei der Rückfaltung beibehalten werden musste. Von Vorteil erwies sich der Zusatz des Anticalins zu der verdünnten Rückfaltungslösung, weil hierdurch das Einengen der Lösung vor der Weiterverarbeitung ermöglicht wurde, da der Komplex offensichtlich eine größere Löslichkeit hat als das IL4-Bindeprotein allein.

Bei der Rückfaltung selbst wurden unterschiedliche Parameter gegenüber der publizierten Vorschrift (Shen *et al.*, 1996) verändert. Es zeigte sich, dass die Rückfaltung bei einem höheren pH-Wert besser verläuft. Mit seinen drei Disulfidbrücken, die korrekt ausgebildet werden müssen, hat das IL4-Bindeprotein eine relativ große Hürde bei der Rückfaltung; daher war der größte Hebel zur Steigerung der Rückfaltungsausbeute die Optimierung des Disulfid-*Shuttles*. Bemerkenswerterweise zeigte sich, dass die Art des Disulfid-*Shuttles* keine Auswirkung auf die Rückfaltungseffizienz hatte, wohingegen das Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Komponente eine große Auswirkung hatte. Bei den Experimenten stellte sich heraus, dass das publizierte Verhältnis das schlechteste Ergebnis lieferte. Allerdings ist es möglich, dass bei einem niedrigeren pH-Wert – vor der Optimierung des Puffers – ein anderes Verhältnis günstiger ist.

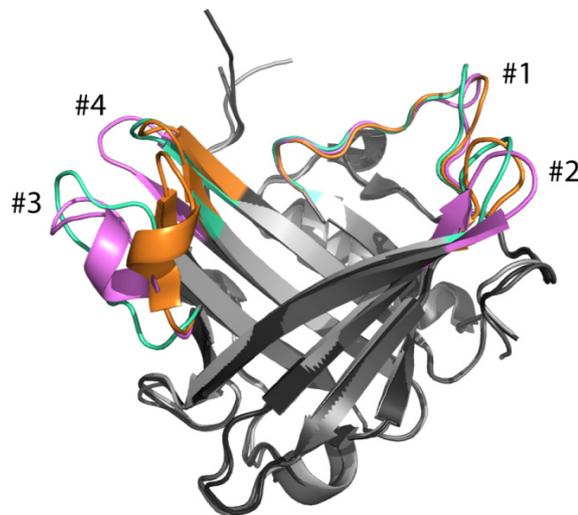
Durch die Optimierung der Rückfaltung war es letztendlich möglich, ausreichend Protein für Kristallisationsexperimente zu produzieren. Allerdings konnten bisher keine Kristalle des Komplexes erhalten werden. Die Bemühungen werden mit unterschiedlichen Konstrukten (verschiedene Arten und Positionen von Affinitätsanhängseln) fortgesetzt. Die Kristallstruktur von Ac2 in Komplex mit dem IL4-Bindeprotein ist von besonderem Interesse, da das Anticalin aus der gleichen Bibliothek wie Ac1 selektiert wurde und somit über eine ähnliche Topologie verfügen könnte.

## 4.6 Vergleich der Anticaline Ac3 und PRS-010 mit wtLcn1

Eine Strukturüberlagerung anhand von 58 konservierten C $\alpha$ -Positionen des  $\beta$ -*Barrels* (Skerra, 2000) von apo-wtLcn2 und liganden- gebundenem PRS-010#003 mit den entsprechenden Positionen von Ac3 führt zu einem RMSD von 0,33 bzw. 0,38 Å für das Rückgrat (Abbildung 31). Dabei handelt es sich bei PRS-010#003 um ein Anticalin gegen das menschliche cytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen-4 (CTLA-4). Die  $\beta$ -Stränge, die kurzen *Loops* auf der geschlossenen Seite des  $\beta$ -*Barrels* und die  $\alpha$ -Helix zeigten nahezu perfekte Übereinstimmung.

Interessanterweise entspricht die Konformation von *Loop #4* des Ac3, der immerhin 8 Mutationen trägt, fast komplett der Konformation des wtLcn2. Auch die Konformationen von *Loop #1* und *#2* wichen kaum von der Konformation des wtLcn2 ab. Dahingegen zeigte die Konformation von *Loop #3* starke Abweichungen von der des wt-Lcn2. Von den sechs Komplexen in der asymmetrischen Untereinheit hatten nur die Komplexe mit den Ketten A/P und B/Q einen definierten *Loop #3* in Ac1. In den übrigen 4 Komplexen war dieser *Loop* zumindest teilweise in der Elektronendichte nicht sichtbar und somit ungeordnet bzw. strukturell flexibel.

In dem gegen CTLA-4 gerichteten Anticalin PRS-010#003 weist *Loop 3* ebenfalls eine interessante Eigenheit auf, insofern, als dieses Segment unstrukturiert ist, wenn kein Ligand gebunden ist (Schönfeld *et al.*, 2009). In der ligandengebundenen Form (Abbildung 28) nimmt dieser *Loop* dagegen eine definierte Konformation an, die ähnlich wie bei Ac3 stark von der Konformation des wtLcn2 abweicht.



**Abbildung 31: Überlagerung von verschiedenen Lcn2-Varianten mit dem Original-Lipocalin.** Die vier *Loops* am offenen Ende des  $\beta$ -*Barrels* sind orange (apo-wtLcn2; PDB-Code: 1L6M), violett (PRS-010#003 in seiner ligandengebundenen Form; PDB-Code: 3BX7) und cyan (Ac3) gefärbt. Die übrigen Bereiche der Strukturen sind in Grautönen dargestellt. Für die Überlagerung der drei Strukturen wurden 58  $C\alpha$ -Positionen verwendet, die in der gesamten Lipocalinfamilie strukturell konserviert sind (Skerra, 2000).

Der natürliche Ligand von Lcn2,  $Fe^{III}$ -Enterobactin, ist relativ klein und kompakt, was eine weniger ausgedehnte Bindungstasche erforderlich macht. Dementsprechend nimmt *Loop #3* dort eine Konformation an, die sich leicht nach innen und somit zum Zentrum des  $\beta$ -*Barrels* neigt. Der Ligand von PRS-010#003 ist dahingegen ein makromolekulares Protein (die

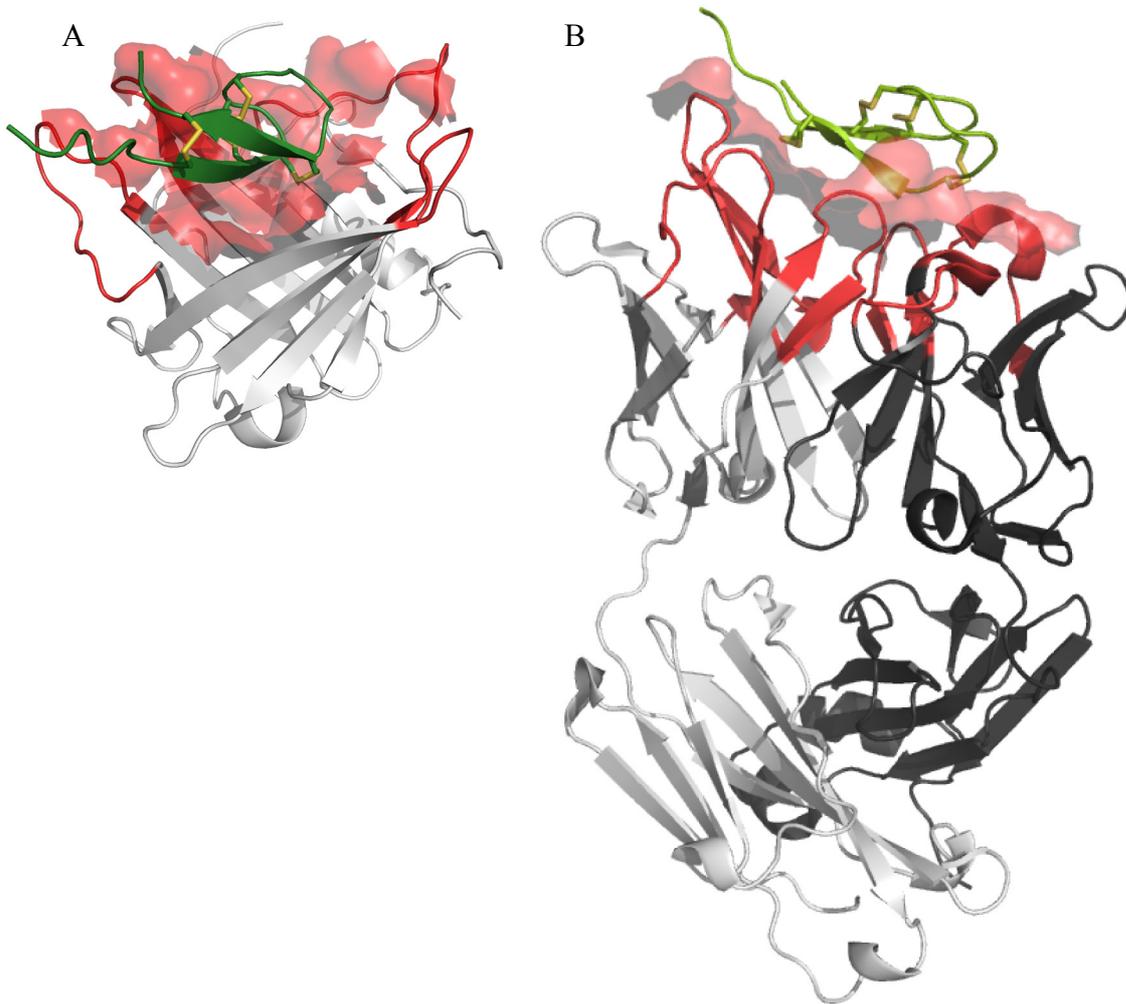
extrazelluläre Domäne des CTLA-4 Transmembranrezeptors) und benötigt daher eine deutlich größere Bindungstasche. Dies wird in diesem Anticalin realisiert, indem sich die *Loops* #3 und #4 bei der ligandengebundenen Form nach außen biegen. Heparin ist demgegenüber ein kurzes Peptid mit einer länglichen Struktur, das größer ist als Fe<sup>III</sup>-Enterobactin aber kleiner als CTLA-4. Zur Anpassung an dieses Target ist *Loop* #3 in Ac3 nach außen gebogen, so dass der N- und der C-Terminus des Liganden aus der Bindungstasche herausragen können, während die übrigen *Loops* am Eingang zur Bindungstasche die Konformation des Wildtyp-Lipocalins weitestgehend beibehalten.

Betrachtet man alle 3 Strukturen in der Überlagerung (Abbildung 31), stellt man fest, dass die größten Unterschiede in *Loop* #3 auftreten. Diese werden durch die unterschiedliche Größe des jeweiligen Liganden verursacht. Somit ist *Loop* #3 zumindest bei diesen Anticalinen auf der Grundlage von Lcn2 die entscheidende Stellschraube, die die Form und Größe der Bindungstasche an jene des Liganden anpasst. Festzuhalten ist, dass das Lcn2-Gerüst sowohl ein stabiles  $\beta$ -Barrel besitzt, das sich bei der Bindung von unterschiedlichen Liganden nicht verändert, als auch flexible *Loops*, die sich mit wenigen Aminosäureaustauschen an die Geometrie des Liganden anpassen können.

## 4.7 Vergleich von Ac3 mit dem hepcidinbindenden Fab-Fragment

Das tief in die Bindungstasche von Ac3 eingebettete Heparin hat eine Kontaktfläche, die mit 852.5 Å<sup>2</sup> um 15,9 % größer ist als die Kontaktfläche mit einem publizierten hepcidinbindenden Fab-Fragment (Jordan *et al.*, 2009). Abbildung 29 zeigt einen Vergleich der Bindungsverhältnisse von Heparin in Komplex mit Ac3 und mit diesem Fab-Fragment, wobei deutlich wird, dass die Kontaktfläche zwischen Heparin und dem Fab-Fragment im Vergleich zur Kontaktfläche zwischen Heparin und Ac3 sehr flach ist. Die Kontaktfläche von Ac1 ist 29,7 Å in der längsten und 19,9 Å in der kürzesten Dimension; dagegen ist die Kontaktfläche des Fab-Fragments 26,6 Å in der längsten und 11,5 Å in der kürzesten Dimension. Die größere Kontaktfläche von Ac1 führt dabei zu mehr interagierenden Resten. 26 Anticalinreste wechselwirken mit 19 Heparinresten (Tabelle 13), wohingegen nur 19 Reste des Fab-Fragments mit 17 Heparinresten interagieren. Allerdings bildet das Fab-Fragment eine zusätzliche Salzbrücke zu Heparin gegenüber Ac1, wohingegen Ac1 3 Wasserstoffbrücken mehr eingeht. Trotz der kleineren Kontaktfläche und der geringeren Anzahl von Wasserstoffbrücken zu Heparin ist die monovalente Affinität des Fab-Fragments mit einer K<sub>D</sub> von 70 pM um den Faktor 3 stärker als die des Anticalins mit 200 pM. Der

Vorteil von Ac1 besteht allerdings darin, dass es wesentlich kleiner ist als das Fab-Fragment und bloß aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht.



**Abbildung 32: Vergleich der Bindung von Heparin an (A) das engierte Lipocalin Ac3 und (B) an ein Fab-Fragment (PDB-ID: 3H0T (Jordan *et al.*, 2009)).** Bei Ac3 sind die vier variablen *Loops* rot gefärbt, während der Rest der Struktur grau dargestellt ist. Dementsprechend sind die sechs CDRs des Fab-Fragments ebenfalls rot gefärbt. Die leichte Kette ist dunkelgrau und die schwere Kette hellgrau dargestellt. Heparin ist grün gefärbt, wobei die Disulfidbrücken als *Sticks* mit gelben Schwefelatomen hervorgehoben sind. Die interagierende Oberfläche des jeweiligen Bindeproteins ist in einem transparenten Rot dargestellt, wobei die dafür relevanten Reste mit Hilfe von PISA ausgewählt wurden (Krissinel & Henrick, 2007).

## 4.8 Potenzial von Ac3 als Wirkstoff

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führen Antikörper, die Heparin binden, bei kombinierter Verabreichung mit Erythropoietin alpha zu stabilen Hämoglobinwerten bei Mäusen mit entzündungsbedingter Anämie (Sasu *et al.*, 2010). Daher sind Moleküle, die

Hepcin binden, interessante Wirkstoffkandidaten, insbesondere, da bisher noch keine erfolgreiche Therapie von entzündungsbedingter Anämie etabliert wurde.

Größe und biochemische Eigenschaften von Bindeproteinen sind von besonderer Bedeutung, wenn es um die Entwicklung eines Wirkstoffs für die therapeutische Anwendung geht. Im Hinblick auf Aspekte wie Gewebepenetration, Faltungstabilität, Immunogenität und Einfachheit der Produktion sind Anticaline Antikörpern und auch Fab-Fragmenten überlegen. Somit ist ein Anticalin gegen Heparin ein guter Kandidat als Wirkstoff für die Therapie von entzündungsbedingter Anämie und hat bessere Chancen, sich auf dem Markt zu etablieren als eventuell parallel entwickelte Antikörper und Fab-Fragmente.

Die Entwicklung eines Anticalins wird vom EUROCALIN-Konsortium gefördert. Dabei steht EUROCALIN für „EUROpean Consortium for AntiCALINS as next generation high-affinity protein therapeutics“. Ziel des aus zehn europäischen Firmen und Universitäten bestehenden Konsortiums ist das Vorantreiben neuer Anticaline durch die präklinischen Studien und durch die erste klinische Phase (Pieris, 2011a). Es wird zu einem großen Teil durch das „Seventh Framework“-Programm der Europäischen Kommission finanziert (FP7-Health.2011.1.4.3; grant agreement number 278408).

## **4.9 Betrachtung der Ergebnisse mit Blick auf das Design von Bibliotheken zur Selektion von Anticalinen**

Ac3 ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die Fortschrittlichkeit der Anticalintechnologie. Das Lcn2-Gerüst ist bereits gut etabliert und hat schon Bindeproteine mit hervorragender Affinität gegen verschiedene Zielmoleküle, wie einen Lanthanid(III)-Chelat-Komplex (Kim *et al.*, 2009), die extrazelluläre Rezeptordomäne des CTLA-4 (Schönfeld *et al.*, 2009), das  $\beta$ -Amyloid-Peptid (Rauth *et al.*) und die Extra-Domäne B (ED-B) (Gebauer *et al.*, 2013), hervorgebracht. Die dieser Arbeit vorangegangenen Protein-Engineering-Studien haben zu der auf Lcn2 basierenden neuen Bibliothek mit 20 randomisierten Resten geführt, aus der Ac3 hervorgegangen ist. Wie oben beschrieben, interagiert ein Großteil der randomisierten Reste mit dem Liganden, was ein Beleg für die ausgezeichnete Wahl der randomisierten Reste in der Anticalinbibliothek ist. Interessanterweise interagiert keiner der Reste, die in den Affinitätsmaturierungsrunden ausgetauscht wurden (Abbildung 24 und 25), direkt mit Heparin. Da diese Mutationen trotzdem die Affinität des Ac3 zu Heparin verbessern,

optimieren sie wahrscheinlich auf indirekte Weise die Protein/Protein-Wechselwirkung, indem sie die Struktur des Anticalins stabilisieren.

Trotz der neuen zur Verfügung stehenden hoch entwickelten Anticalin-Bibliotheken basierend auf dem Lcn2-Gerüst, ist es von Vorteil, weitere Anticalingerüste zur Auswahl zu haben, sowohl im Hinblick auf ggf. unterschiedliche Epitopspezifitäten als auch evtl. variierende Eigenschaften bei der Applikation in vivo. Das Lcn1-Gerüst ist im Hinblick auf Protein-*Engineering* weniger gut verstanden als das Lcn2-Gerüst. Dennoch wurden mit Ac1 und Ac2 bereits zwei Anticaline mit ausgezeichneten Eigenschaften entwickelt, die auf diesem Gerüst basieren. Allerdings weist Ac1 eine unübliche Topologie und einen ungewöhnlichen Bindungsmodus auf. Da dieser Bindungsmodus nicht vorhergesehen werden konnte, stehen viele Reste der ursprünglichen Bibliothek nicht in direktem Kontakt zum Liganden. Es wäre im Prinzip möglich, auf der Grundlage dieses Bindungsmodus eine neue Zufallsbibliothek zu konstruieren. Interessant dabei wäre, ob die neu eingeführte Disulfidbrücke und die Mutationen im  $\phi$ -Loop die neue Topologie so stabilisieren, dass diese auch bei anderen, analogen Anticalinen erhalten bleibt.

Durch die Etablierung einer Rückfaltungsprozedur mit akzeptablen Ausbeuten für den Liganden IL4-BP des Ac2 wurde in dieser Arbeit die Ausgangslage für die Strukturaufklärung des Komplexes geschaffen. Diese Struktur wäre von besonderem Interesse, da es die erste Struktur eines auf Lcn1 basierenden Anticalins sein könnte, das seinen Liganden in der erwarteten Art und Weise über die natürliche Bindungstasche bindet und seine Topologie vermutlich beibehalten hat.

## 5. Zusammenfassung

Anticaline sind künstliche Bindeproteine mit therapeutischem Anwendungspotential, die durch Protein-Engineering aus Lipocalinen hergestellt werden. Dabei werden durch Mutationen in den vier strukturell hypervariablen Schleifen dieses Proteingerüsts (*Scaffold*) künstlich geformte Bindungskavitäten erzeugt, die die Bindung von vorgegebenen Zielmolekülen erlauben. In dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von zwei Anticalinen, die von der Pieris AG in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Biologische Chemie zur Verfügung gestellt wurden, im Komplex mit ihrem jeweiligen Liganden aufgeklärt und analysiert.

Hepcidin ist ein durch vier Disulfidbrücken quervernetztes 25mer Peptid, dem eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Eisenmetabolismus zukommt und das an der Pathogenese von bestimmten Formen der Anämie beteiligt ist. Das Ac3, welches auf dem humanen Lipocalin Lcn2 basiert, bindet dieses Peptid mit einer Dissoziationskonstante von 14 pM und bietet damit einen potenten antagonistischen Wirkstoffkandidaten. Unter Kristallisationsbedingungen mit 47% MPD und 0,1 M HEPES/NaOH bei pH 6 bildete der Komplex aus dem Anticalin und dem synthetischen Peptid Kristalle mit der Raumgruppe P3<sub>1</sub>21 und 6 Komplexen in einer asymmetrischen Untereinheit. Die Kristallstruktur wurde unter Verwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung mit einer Auflösung von 2,1 Å gelöst. Diese zeigt die Bindung des Peptids in der hydrophoben Bindungstasche des Anticalins, wobei 14 der 21 Reste, die in der ursprünglichen Lipocalin-Zufallsbibliothek randomisiert wurden, tatsächlich mit Hepcidin interagieren. Dieser hohe Anteil ist ein Beleg für die vorteilhafte Wahl der randomisierten Reste in der neuen Lcn2-Bibliothek und für das zunehmende Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehungen der Lcn2-Gerüststruktur. Ein Vergleich mit zwei anderen Anticalinen mit bereits bekannter Kristallstruktur, welche ebenfalls auf diesem Gerüst basieren, ergab, dass vor allem *Loop* #3 große Konformationsunterschiede zeigt.

Der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor (VEGF) ist hauptverantwortlich für die Tumor-Angiogenese und somit ein relevantes Zielmolekül für die Entwicklung von Krebstherapeutika. Das Anticalin Ac1, welches auf dem humanen Lipocalin Lcn1 basiert, bindet dieses Protein mit einer Dissoziationskonstanten von 120 pM. Lcn1 ist als Gerüststruktur für die Generierung von Anticalinen weniger gut erforscht als Lcn2, da bisher noch keine andere Kristallstruktur publiziert worden ist. In dieser Arbeit wurden Kristalle mit der Raumgruppe P3<sub>2</sub>21 für den Komplex aus Ac1 und VEGF (verkürzte Form des

Homodimers mit den Resten 8–109) in Gegenwart von 1,0 M Natriumchlorid und 0,2 M Lithiumsulfat, 0,1 M Natriumacetat bei pH 3,5 erhalten. Die Kristallstruktur wurde mit Hilfe einer Kombination aus Molekularem Ersatz und Schwefel *Single Wavelength Anomalous Dispersion* (MRSAD) unter Verwendung von Synchrotron-Röntgenstrahlung gelöst. Die asymmetrische Untereinheit in dieser Kristallform enthielt einen Komplex aus dem dimeren VEGF mit zwei gebundenen Anticalinen. Interessanterweise zeigte die Struktur von Ac1 dabei eine unerwartete Topologie mit einer geänderten Anordnung der  $\beta$ -Strands gegenüber dem natürlichen Lcn1. Dies machte sich vor allem in der Ausbildung eines  $\phi$ -Loops bemerkbar, der durch eine im Verlauf der Zufallsmutagenese neu eingeführte Disulfidbrücke und einen Cluster von hydrophoben Seitenketten stabilisiert wurde. Auffällig ist auch der Bindungsmodus für das VEGF-Target, das seitlich an das Anticalin bindet, wobei der  $\phi$ -Loop eine zentrale Rolle spielt, indem er nach außen klappt und sich der Kontur des VEGF nahezu ideal anpasst. Trotz der neuartigen Topologie weist Ac1 dennoch insgesamt eine lipocalinähnliche Struktur mit einer  $\beta$ -Barrel-artigen Faltung und einem hydrophoben Kern auf. In diesem wird eine schlauchartige Kavität durch eine Fettsäure besetzt, bei der es sich wahrscheinlich um Lactobacillsäure aus dem Expressionsorganismus *E. coli* handelt.

Ein zweites Anticalin, das auf der Lcn1-Gerüststruktur beruht, Ac2, bindet die extrazelluläre Domäne des IL4-Receptors, das sogenannte IL4-Bindeprotein (IL4-BP). Das antagonistisch wirkende Anticalin besitzt Anwendungspotential zur Therapie von Asthma. In dieser Arbeit wurde die Grundlage für die strukturelle Untersuchung des Komplexes aus Ac2 und IL4-BP geschaffen, indem eine Rückfaltungsprozedur für das hinsichtlich Faltungseffizienz sowie Löslichkeit anspruchsvolle IL4-BP erarbeitet wurde, die das Protein im Komplex mit dem Anticalin in für Kristallisationsexperimente ausreichenden Mengen liefert.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström ( $1 \times 10^{-10}$ m)
Amp	Ampicillin
aTc	Anhydro-Tetracyclin
bp	Basenpaar
Cam	Chloramphenicol
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated Antigen-4</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HABA	<i>Hydroxyl-Azophenyl-Benzoic Acid</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
(k)Da	(kilo-)Dalton
$K_D$	Dissoziationskonstante
Lcn	Lipocalin
MAD	<i>Multiple Wavelength Anomalous Dispersion</i>
MRSAD	<i>Molecular Replacement mit Single Wavelength Anomalous Dispersion</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
OD <sub>550</sub>	optische Dichte bei 550 nm
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
RBP	<i>Retinol-Binding Protein</i>
Rmsd	<i>Root Mean Square Deviation</i>
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SAD	<i>Single Wavelength Anomalous Dispersion</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tlc	<i>Tear Lipocalin</i>
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivitätseinheit)
UV-RIP	<i>UV-Radiation Induced Phasing</i>
v/v	<i>Volume per Volume</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>

## 7. Literatur

- Abergel, C.** (2004) Spectacular improvement of X-ray diffraction through fast desiccation of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1413-1416.
- Hoffmann-La Roche AG** (2011) Business Report.
- Aman, M.J., Tayebi, N., Obiri, N.I., Puri, R.K., Modi, W.S. & Leonard, W.J.** (1996) cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem* **271**, 29265-29270.
- Andrews, N.C.** (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* **341**, 1986-1995.
- Arakawa, T. & Timasheff, S.N.** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J* **47**, 411-414.
- Bachert, C. & Zhang, N.** (2012) Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE 'above atopy'. *J Intern Med* **272**, 133-143.
- Backmark, A., Nyblom, M., Tornroth-Horsefield, S., Kosinska-Eriksson, U., Norden, K., Fellert, M., Kjellbom, P., Johanson, U., Hedfalk, K., Lindkvist-Petersson, K., Neutze, R. & Horsefield, R.** (2008) Affinity tags can reduce merohedral twinning of membrane protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 1183-1186.
- Bailey, S.** (1994) The Ccp4 Suite - Programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **50**, 760-763.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. & McCammon, J.A.** (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-10041.
- Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F. & Kopf, M.** (1998) Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol* **8**, 669-672.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russelljones, G.J. & Gotschlich, E.C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline-phosphatase conjugated anti-antibody on western blots. *Analytical Biochemistry* **136**, 175-179.
- Bolen, D.W. & Baskakov, I.V.** (2001) The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**, 955-963.
- Bond, C.S.** (2003) TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics* **19**, 311-312.
- Bork, P., Holm, L. & Sander, C.** (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* **242**, 309-320.

- Bostrom, J., Yu, S.F., Kan, D., Appleton, B.A., Lee, C.V., Billeci, K., Man, W., Peale, F., Ross, S., Wiesmann, C. & Fuh, G.** (2009) Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* **323**, 1610-1614.
- Breustedt, D.A., Chatwell, L. & Skerra, A.** (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 1118-1125.
- Breustedt, D.A., Korndörfer, I.P., Redl, B. & Skerra, A.** (2005) The 1.8 Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *J Biol Chem* **280**, 484-493.
- Brozzo, M.S., Bjelic, S., Kisko, K., Schleier, T., Leppanen, V.M., Alitalo, K., Winkler, F.K. & Ballmer-Hofer, K.** (2011) Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood* **119**, 1781-1788.
- Brünger, A.T.** (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. & Warren, G.L.** (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 905-921.
- Bucher, M.H., Evdokimov, A.G. & Waugh, D.S.** (2002) Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 392-397.
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. & Huber, R.** (1995) High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **230**, 788-796.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M.** (1987) X11-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5**, 376-&.
- Burton, O.T. & Oettgen, H.C.** (2011) Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol Rev* **242**, 128-143.
- Carson, M., Johnson, D.H., McDonald, H., Brouillette, C. & Delucas, L.J.** (2007) His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 295-301.

- Castillo, R.M., Mizuguchi, K., Dhanaraj, V., Albert, A., Blundell, T.L. & Murzin, A.G.** (1999) A six-stranded double-psi beta barrel is shared by several protein superfamilies. *Structure* **7**, 227-236.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P.H.** (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Chen, V.B., Arendall, W.B., 3rd, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S. & Richardson, D.C.** (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12-21.
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H.W., McKay, P., de Vos, A.M. & Lowman, H.B.** (1999) Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J Mol Biol* **293**, 865-881.
- Chomarat, P. & Banchereau, J.** (1998) Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* **17**, 1-52.
- Christinger, H.W., Muller, Y.A., Berleau, L.T., Keyt, B.A., Cunningham, B.C., Ferrara, N. & de Vos, A.M.** (1996) Crystallization of the receptor binding domain of vascular endothelial growth factor. *Proteins* **26**, 353-357.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Cohn, L., Homer, R.J., MacLeod, H., Mohrs, M., Brombacher, F. & Bottomly, K.** (1999) Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4Ralpha, but not on eosinophils. *J Immunol* **162**, 6178-6183.
- Dartt, D.A.** (2011) Tear lipocalin: structure and function. *Ocul Surf* **9**, 126-138.
- de La Fortelle, E. & Bricogne, G.** (1997) SHARP: Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In Charles W. Carter, J. (Ed.) *Macromolecular Crystallography Part A*. Volume 276 ed. Academic Press.
- DeLano, W.L.** (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*.
- Diederichs, K. & Karplus, P.A.** (1997) Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* **4**, 269-275.
- Dimitrov, D.S. & Marks, J.D.** (2009) Therapeutic antibodies: current state and future trends - is a paradigm change coming soon? *Methods Mol Biol* **525**, 1-27, xiii.

- Dineen, S.P., Sullivan, L.A., Beck, A.W., Miller, A.F., Carbon, J.G., Mamluk, R., Wong, H. & Brekken, R.A.** (2008) The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* **8**, 352.
- Drakesmith, H. & Prentice, A.M.** (2012) Heparin and the iron-infection axis. *Science* **338**, 768-772.
- Ducancel, F. & Muller, B.H.** (2012) Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *MAbs* **4**, 445-457.
- Duschl, A. & Sebald, W.** (1996) Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw* **7**, 37-49.
- Emsley, P. & Cowtan, K.** (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.
- Fellouse, F.A., Esaki, K., Birtalan, S., Raptis, D., Cancasci, V.J., Koide, A., Jhurani, P., Vasser, M., Wiesmann, C., Kossiakoff, A.A., Koide, S. & Sidhu, S.S.** (2007) High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol* **373**, 924-940.
- Fellouse, F.A., Wiesmann, C. & Sidhu, S.S.** (2004) Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a dominant role for tyrosine in antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12467-12472.
- Ferrara, N., Hillan, K.J. & Novotny, W.** (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 328-335.
- Fleming, M.D.** (2008) The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 151-158.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Flower, D.R.** (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* **318**, 1-14.
- Frey, M.** (1994) Water structure associated with proteins and its role in crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 663-666.
- Fuh, G., Wu, P., Liang, W.C., Ultsch, M., Lee, C.V., Moffat, B. & Wiesmann, C.** (2006) Structure-function studies of two synthetic anti-vascular endothelial growth factor Fabs and comparison with the Avastin Fab. *J Biol Chem* **281**, 6625-6631.

- Ganz, T.** (2003) Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* **102**, 783-788.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A.** (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788.
- Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G. & Skerra, A.** (2013) Combinatorial design of an anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol.*
- Gilbreth, R.N., Truong, K., Madu, I., Koide, A., Wojcik, J.B., Li, N.S., Piccirilli, J.A., Chen, Y. & Koide, S.** (2011) Isoform-specific monobody inhibitors of small ubiquitin-related modifiers engineered using structure-guided library design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7751-7756.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319-326.
- Glasgow, B.J., Abduragimov, A.R., Gasymov, O.K. & Yusifov, T.N.** (2002) Tear lipocalin: structure, function and molecular mechanisms of action. *Adv Exp Med Biol* **506**, 555-565.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K.** (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-1043.
- Götz, M., Hess, S., Beste, G., Skerra, A. & Michel-Beyerle, M.E.** (2002) Ultrafast electron transfer in the complex between fluorescein and a cognate engineered lipocalin protein, a so-called anticalin. *Biochemistry* **41**, 4156-4164.
- Grunewald, S.M., Werthmann, A., Schnarr, B., Klein, C.E., Brocker, E.B., Mohrs, M., Brombacher, F., Sebald, W. & Duschl, A.** (1998) An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. *J Immunol* **160**, 4004-4009.
- Grünig, G., Warnock, M., Wakil, A.E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D.M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D.D., Locksley, R.M. & Corry, D.B.** (1998) Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* **282**, 2261-2263.
- Grzyb, J., Latowski, D. & Strzalka, K.** (2006) Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol* **163**, 895-915.

- Hage, T., Sebald, W. & Reinemer, P.** (1999) Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface. *Cell* **97**, 271-281.
- Harp, J.M., Timm, D.E. & Bunick, G.J.** (1998) Macromolecular crystal annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 622-628.
- Hay, R.T.** (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12.
- Hendrickson, W.A., Horton, J.R. & LeMaster, D.M.** (1990) Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J* **9**, 1665-1672.
- Henningfeld, K.A., Rastegar, S., Adler, G. & Knochel, W.** (2000) Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter. *J Biol Chem* **275**, 21827-21835.
- Heras, B., Edeling, M.A., Byriel, K.A., Jones, A., Raina, S. & Martin, J.L.** (2003) Dehydration converts DsbG crystal diffraction from low to high resolution. *Structure* **11**, 139-145.
- Heras, B. & Martin, J.L.** (2005) Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1173-1180.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. & Fiedler, M.** (2005) Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol* **23**, 514-522.
- Hilton, D.J., Zhang, J.G., Metcalf, D., Alexander, W.S., Nicola, N.A. & Willson, T.A.** (1996) Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 497-501.
- Hochuli, E.** (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**, 293-302.
- Holm, L. & Rosenström, P.** (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545-549.
- Hoyer, W., Grönwall, C., Jonsson, A., Ståhl, S. & Härd, T.** (2008) Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5099-5104.
- Hunter, H.N., Fulton, D.B., Ganz, T. & Vogel, H.J.** (2002) The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis. *J Biol Chem* **277**, 37597-37603.

- Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M.** (1996) PROMOTIF--a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Protein Sci* **5**, 212-220.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jain, N.K. & Roy, I.** (2010) Trehalose and protein stability. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 4**, Unit 4 9.
- Jancarik, J., Scott, W.G., Milligan, D.L., Koshland, D.E., Jr. & Kim, S.H.** (1991) Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **221**, 31-34.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R.K. & Alitalo, K.** (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276**, 1423-1425.
- Jordan, J.B., Poppe, L., Haniu, M., Arvedson, T., Syed, R., Li, V., Kohno, H., Kim, H., Schnier, P.D., Harvey, T.S., Miranda, L.P., Cheetham, J. & Sasu, B.J.** (2009) Heparin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure. *J Biol Chem* **284**, 24155-24167.
- Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U. & Alitalo, K.** (1997) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* **173**, 211-215.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. & Alitalo, K.** (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **15**, 1751.
- Juurs, D.H. & Matthews, B.W.** (2001) Reversible lattice repacking illustrates the temperature dependence of macromolecular interactions. *J Mol Biol* **311**, 851-862.
- Kabsch, W.** (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* **26**, 795-800.
- Kabsch, W. & Sander, C.** (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.
- Keyt, B.A., Berleau, L.T., Nguyen, H.V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R. & Ferrara, N.** (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* **271**, 7788-7795.

- Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A.** (2009) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc* **131**, 3565-3576.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S. & Ferrara, N.** (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844.
- Knapp, S., Ladenstein, R. & Galinski, E.A.** (1999) Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* **3**, 191-198.
- Kondo, M., Takeshita, T., Ishii, N., Nakamura, M., Watanabe, S., Arai, K. & Sugamura, K.** (1993) Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* **262**, 1874-1877.
- Kriminski, S., Caylor, C.L., Nonato, M.C., Finkelstein, K.D. & Thorne, R.E.** (2002) Flash-cooling and annealing of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 459-471.
- Krissinel, E. & Henrick, K.** (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-797.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskowski, R.A., Chistyakov, V.V. & Thornton, J.M.** (2005) PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **33**, D266-268.
- Laskowski, R.A., Macarthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M.** (1993) Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 283-291.
- Lauth, X., Babon, J.J., Stannard, J.A., Singh, S., Nizet, V., Carlberg, J.M., Ostland, V.E., Pennington, M.W., Norton, R.S. & Westerman, M.E.** (2005) Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and in vivo hepatic response to bacterial infections. *J Biol Chem* **280**, 9272-9282.
- Leahy, D.J., Hendrickson, W.A., Aukhil, I. & Erickson, H.P.** (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**, 987-991.
- Lee, P.L. & Beutler, E.** (2009) Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol* **4**, 489-515.

- Leslie, A.G.W.** (1992) *Joint CCP4/ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* **26**, 27-33.
- Lonberg, N.** (2008) Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol* **20**, 450-459.
- Macdougall, I.C. & Cooper, A.** (2002) The inflammatory response and epoetin sensitivity. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 1**, 48-52.
- Macdougall, I.C. & Cooper, A.C.** (2002) Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 11**, 39-43.
- MacKenzie, E.L., Iwasaki, K. & Tsuji, Y.** (2008) Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* **10**, 997-1030.
- Mandal, K., Uppalapati, M., Ault-Riche, D., Kenney, J., Lowitz, J., Sidhu, S.S. & Kent, S.B.** (2012) Chemical synthesis and X-ray structure of a heterochiral {D-protein antagonist plus vascular endothelial growth factor} protein complex by racemic crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 14779-14784.
- Marblestone, J.G., Edavettal, S.C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. & Butt, T.R.** (2006) Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. *Protein Sci* **15**, 182-189.
- Marr, A.G. & Ingraham, J.L.** (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **84**, 1260-1267.
- Matthews, B.W.** (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-497.
- McCoy, A.** (2007) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallographica Section D* **63**, 32-41.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C. & Read, R.J.** (2005) Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 458-464.
- Milovnik, P., Ferrari, D., Sarkar, C.A. & Plückthun, A.** (2009) Selection and characterization of DARPins specific for the neurotensin receptor 1. *Protein Eng Des Sel* **22**, 357-366.
- Mohammadian-Mosaabadi, J., Naderi-Manesh, H., Maghsoudi, N., Nassiri-Khalili, M.A., Masoumian, M.R. & Malek-Sabet, N.** (2007) Improving purification of recombinant human interferon gamma expressed in *Escherichia coli*; effect of removal of impurity on the process yield. *Protein Expr Purif* **51**, 147-156.
- Moos, T. & Morgan, E.H.** (2004) The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann N Y Acad Sci* **1012**, 14-26.

- Mross, K., Richly, H., Fischer, R., Scharr, D., Buchert, M., Stern, A., Gille, H., Audoly, L.P. & Scheulen, M.E.** (2013) First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors. *PLoS One* **8**, e83232.
- Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B. & de Vos, A.M.** (1998) VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* **6**, 1153-1167.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J.** (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255.
- Mustonen, T. & Alitalo, K.** (1995) Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* **129**, 895-898.
- Nakanishi, K.** (2010) Basophils are potent antigen-presenting cells that selectively induce Th2 cells. *Eur J Immunol* **40**, 1836-1842.
- Nanao, M.H. & Ravelli, R.B.** (2006) Phasing macromolecular structures with UV-induced structural changes. *Structure* **14**, 791-800.
- Nobbmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Shen, F., Yi, J. & Harding, S.E.** (2007) Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* **24**, 117-128.
- Noben-Trauth, N., Shultz, L.D., Brombacher, F., Urban, J.F., Jr., Gu, H. & Paul, W.E.** (1997) An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4<sup>+</sup> T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10838-10843.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A.** (1997) Binding proteins selected from combinatorial libraries of an alpha-helical bacterial receptor domain. *Nat Biotechnol* **15**, 772-777.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhlen, M. & Nygren, P.A.** (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol* **80**, 45-54.
- Oettgen, H.C. & Geha, R.S.** (1999) IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest* **104**, 829-835.
- Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y. & Shibuya, M.** (1998) A

- novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* **273**, 31273-31282.
- O'Leary W.M.** (1962) The fatty acids of bacteria. *Bacteriol Rev.* **26** (4), 421-447.
- O'Neil, J. & Powell, L.** (2005) Clinical aspects of hemochromatosis. *Semin Liver Dis* **25**, 381-391.
- Orlova, A., Magnusson, M., Eriksson, T.L., Nilsson, M., Larsson, B., Hoiden-Guthenberg, I., Widstrom, C., Carlsson, J., Tolmachev, V., Stahl, S. & Nilsson, F.Y.** (2006) Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule. *Cancer Res* **66**, 4339-4348.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A.L.** (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V.S., Weiss, M.S. & Tucker, P.A.** (2005) Auto-Rickshaw: an automated crystal structure determination platform as an efficient tool for the validation of an X-ray diffraction experiment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 449-457.
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V.S., Weiss, M.S. & Tucker, P.A.** (2009) On the combination of molecular replacement and single-wavelength anomalous diffraction phasing for automated structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 1089-1097.
- Peat, T.S., Christopher, J.A. & Newman, J.** (2005) Tapping the Protein Data Bank for crystallization information. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 1662-1669.
- Perrakis, A., Morris, R. & Lamzin, V.S.** (1999) Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* **6**, 458-463.
- Pieris, A.** (2007) Pieris demonstrates potent anti-tumor activity of a VEGF-Specific Anticalin® in preclinical studies. [www.pieris-ag.com](http://www.pieris-ag.com).
- Pieris, A.** (2011) EUROCALIN Consortium initiates EU grant funded collaboration to develop novel anticalin therapeutic to treat anemia. [www.pieris-ag.com](http://www.pieris-ag.com).
- Pieris, A.** (2011) Pieris announces results and successful completion of its PRS-050 anticalin phase I Trial at AACR-EORTC-NCI molecular targets and cancer therapeutics conference. [www.pieris-ag.com](http://www.pieris-ag.com).
- Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M. & Ferrara, N.** (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders.

*Cancer Res* **57**, 4593-4599.

- Ramagopal, U.A., Dauter, M. & Dauter, Z.** (2003) Phasing on anomalous signal of sulfurs: what is the limit? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1020-1027.
- Rauth, S., Hinz, D. & Skerra, A.** in Vorbereitung.
- Reichert, J.M.** (2012) Which are the antibodies to watch in 2013? *MAbs* **5**.
- Reichert, J.M. & Valge-Archer, V.E.** (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 349-356.
- Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A.** (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **16**, 276-277.
- Richardson, J.S.** (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv Protein Chem* **34**, 167-339.
- Rodgers, D.W.** (1994) Cryocrystallography. *Structure* **2**, 1135-1140.
- Romagnani, S.** (1990) Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* **11**, 316-321.
- Rosenblum, N.D. & Yager, T.D.** (1997) Changing patterns of gene expression in developing mouse kidney, as probed by differential mRNA display combined with cDNA library screening. *Kidney Int* **51**, 920-925.
- Russell, S.M., Keegan, A.D., Harada, N., Nakamura, Y., Noguchi, M., Leland, P., Friedmann, M.C., Miyajima, A., Puri, R.K., Paul, W.E. & Eckerskorn, C.** (1993) Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* **262**, 1880-1883.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Salunke, D.M., Swamy, M.J., Khan, M.I., Mande, S.C., Surolia, A. & Vijayan, M.** (1985) Arrangement of subunits in peanut lectin. Rotation function and chemical cross-linking studies. *J Biol Chem* **260**, 13576-13579.
- Sambrook, J.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sasu, B.J., Cooke, K.S., Arvedson, T.L., Plewa, C., Ellison, A.R., Sheng, J., Winters, A., Juan, T., Li, H., Begley, C.G. & Molineux, G.** (2010) Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* **115**, 3616-3624.

- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D. & Skerra, A.** (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* **26**, 489-501.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A.** (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* **19**, 385-390.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A.** (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J Mol Biol* **297**, 1105-1120.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A.** (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528-1535.
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A.** (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8198-8203.
- Schönfeld, D.L., Ravelli, R.B., Müller, U. & Skerra, A.** (2008) The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J Mol Biol* **384**, 393-405.
- Schweizer, A., Rusert, P., Berlinger, L., Ruprecht, C.R., Mann, A., Corthesy, S., Turville, S.G., Aravantinou, M., Fischer, M., Robbiani, M., Amstutz, P. & Trkola, A.** (2008) CD4-specific designed ankyrin repeat proteins are novel potent HIV entry inhibitors with unique characteristics. *PLoS Pathog* **4**, e1000109.
- Scolnik, P.A.** (2009) mAbs: a business perspective. *MAbs* **1**, 179-184.
- Sheldrick, G.M., Dauter, Z., Wilson, K.S., Hope, H. & Sieker, L.C.** (1993) The application of direct methods and Patterson interpretation to high-resolution native protein data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**, 18-23.
- Shen, B.J., Hage, T. & Sebald, W.** (1996) Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein. *Eur J Biochem* **240**, 252-261.
- Shi, H.Z., Deng, J.M., Xu, H., Nong, Z.X., Xiao, C.Q., Liu, Z.M., Qin, S.M., Jiang, H.X., Liu, G.N. & Chen, Y.Q.** (1998) Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1818-1821.
- Shibuya, M.** (1995) Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis.

*Adv Cancer Res* **67**, 281-316.

- Shibuya, M.** (2001) Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* **26**, 25-35.
- Shibuya, M., Luo, J.C., Toyoda, M. & Yamaguchi, S.** (1999) Involvement of VEGF and its receptors in ascites tumor formation. *Cancer Chemother Pharmacol* **43 Suppl**, S72-77.
- Skerra, A.** (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr Opin Immunol* **5**, 256-262.
- Skerra, A.** (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A.** (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Stevenson, W., Cheng, S.F., Dastjerdi, M.H., Ferrari, G. & Dana, R.** (2012) Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: ranibizumab (Lucentis) vs bevacizumab (Avastin). *Ocul Surf* **10**, 67-83.
- Strupat, K.** (2005) Molecular weight determination of peptides and proteins by ESI and MALDI. *Methods Enzymol* **405**, 1-36.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Subramanian, E., Swan, I.D., Liu, M., Davies, D.R., Jenkins, J.A., Tickle, I.J. & Blundell, T.L.** (1977) Homology among acid proteases: comparison of crystal structures at 3 Å resolution of acid proteases from *Rhizopus chinensis* and *Endothia parasitica*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 556-559.
- Subramanian, M.L., Abedi, G., Ness, S., Ahmed, E., Fenberg, M., Daly, M.K., Houranieh, A. & Feinberg, E.B.** (2010) Bevacizumab vs ranibizumab for age-related macular degeneration: 1-year outcomes of a prospective, double-masked randomised clinical trial. *Eye (Lond)* **24**, 1708-1715.
- Suguna, K., Bott, R.R., Padlan, E.A., Subramanian, E., Sheriff, S., Cohen, G.H. & Davies, D.R.** (1987) Structure and refinement at 1.8 Å resolution of the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*. *J Mol Biol* **196**, 877-900.
- Takahashi, T. & Shibuya, M.** (1997) The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF

- receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* **14**, 2079-2089.
- Takahashi, T., Ueno, H. & Shibuya, M.** (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18**, 2221-2230.
- Tanaka, K., Yamaguchi, S., Sawano, A. & Shibuya, M.** (1997) Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Jpn J Cancer Res* **88**, 867-876.
- Tang, J., James, M.N., Hsu, I.N., Jenkins, J.A. & Blundell, T.L.** (1978) Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature* **271**, 618-621.
- Terwilliger, T.C.** (2000) Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 965-972.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J.S. & Arakawa, T.** (2004) Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog* **20**, 1301-1308.
- Vagin, A. & Teplyakov, A.** (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J Appl Crystallogr* **30**, 1022-1025.
- van der Veen, A.G. & Ploegh, H.L.** (2012) Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* **81**, 323-357.
- Voss, S. & Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10**, 975-982.
- Weigel, U., Meyer, M. & Sebald, W.** (1989) Mutant proteins of human interleukin 2. Renaturation yield, proliferative activity and receptor binding. *Eur J Biochem* **180**, 295-300.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A. & de Vos, A.M.** (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* **91**, 695-704.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L. & Donaldson, D.D.** (1998) Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* **282**, 2258-2261.
- Winkler, J., Martin-Killias, P., Plückthun, A. & Zangemeister-Wittke, U.** (2009) EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed

ankyrin repeat proteins. *Mol Cancer Ther* **8**, 2674-2683.

- Winzor, C.L., Winzor, D.J., Paleg, L.G., Jones, G.P. & Naidu, B.P.** (1992) Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality. *Arch Biochem Biophys* **296**, 102-107.
- Wojcik, J., Hantschel, O., Grebien, F., Kaupe, I., Bennett, K.L., Barkinge, J., Jones, R.B., Koide, A., Superti-Furga, G. & Koide, S.** (2010) A potent and highly specific FN3 monobody inhibitor of the Abl SH2 domain. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 519-527.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yeh, J.I. & Hol, W.G.** (1998) A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**, 479-480.
- Yuan, X.M. & Li, W.** (2003) The iron hypothesis of atherosclerosis and its clinical impact. *Ann Med* **35**, 578-591.
- Zhu, Z., Homer, R.J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G.P., Wang, J., Zhang, Y. & Elias, J.A.** (1999) Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* **103**, 779-788.

**Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Arne Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Sarstedt, den 22.12.2015

Till Giese