

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**ANWENDUNG VON ANTIKÖRPERDOMÄNEN ZUR
KONSTRUKTION VON *IN VITRO* UND *IN VIVO*
SCHALTbaren ELEMENTEN**

VON JAN BARNIKOW
AUS BERLIN-KÖPENICK

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dieter Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

Lausanne, am 5.März 2003

(Jan Barnikow)

Dissertation eingereicht am 16. Dezember 2002

Mündliche Prüfung am 17. Februar 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Boris Steipe
2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1999 bis Dezember 2002 unter der Anleitung von Herrn Dr. Boris Steipe am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Teile dieser Arbeit fließen in Veröffentlichungen ein (Barnikow *et al.*, 2003; Wirtz *et al.*, 2003).

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. Boris Steipe für die herausfordernde Themenstellung, rege Diskussionen und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Prof. Dr. Dieter Oesterhelt für die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen.

Dr. Raymond Behrend für die Einführung zur Photochemie von Azobenzol und die Synthese von Liganden.

Dr. Eva-Kathrin Sinner für die spontane und freundliche Unterstützung der SPR-Untersuchungen.

Dr. Ingo Korndörfer und Dr. Yali Chen für die Kooperation beim Herstellen der NBAs, sowie Dr. Pamela Kolb für die Untersuchungen und Ausdauer beim Auswerten derselben.

Stefan Eimer für die Anregung und Vorbereitung der Y2H-Experimente.

Klaus Richter für die Hilfe bei ITC-Messungen.

den Studenten Gunther Heymann, Christian Schmolke, Oswald Krotz und Julia Spatz für Synthesen im Rahmen ihrer Lit-Praktika.

den ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe für die freundliche Laboratmosphäre, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen alltäglichen Kleinigkeiten; aber auch den anderen Mitarbeitern der 4. Etage für fachliche und insbesondere Claudia Buchen, Sigi Kastemüller und Marija Reggiani für seelische Unterstützung.

Peter Wirtz und Dr. Hartmut Volker Rohde für die abschließende Durchsicht der Arbeit.

Leslie Hötzer, deren Liebe mir die Kraft gab, hierher zu gelangen, und die Zuversicht weiterzukommen.

Für den Menschen ist nur die Wahrheit von Bedeutung, zu der er selbst gelangt ist.

Rabindranath Tagore, "Gora" (1910)

Für Jonas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Licht und Transkription	1
1.1.1	Natürliche Lichtrezeptoren	1
1.1.2	Lichtabhängige Transkriptionskontrolle	2
1.2	Transkriptionsregulation durch modulare Mechanismen	3
1.2.1	Künstliche Beeinflussung der Transkription	4
1.2.2	Artifizielle Transkriptionsfaktoren	5
1.2.3	Artifizielle Lichtrezeptoren	6
1.2.4	Azobenzol-Derivate	6
1.3	Antikörperfragmente zur molekularen Erkennung	7
1.3.1	Fv-Fragmente als Dimerisierungsmodule	10
1.3.2	<i>in vivo</i> -Proteininteraktions-Assays	11
1.4	Biologische Nanoassemblies	12
1.4.1	Nanotechnologie	12
1.4.2	Biologische Makromoleküle in der Nanotechnologie	13
1.5	Aufgabenstellung	14
2	Ergebnisse	17
2.1	Entwicklung eines lichtschtbaren Antikörper-Fragmentes	17
2.1.1	Konzept	17
2.1.2	Selektion von Azobenzol-bindenden Antikörperfragmenten	19
2.1.2.1	Übersicht zu den durchgeführten Selektionen	21
2.1.2.2	Spezielle Charakterisierungsverfahren	24
2.1.2.2.1	Klassischer ELISA	24
2.1.2.2.2	Vereinfachter ELISA	24
2.1.2.2.3	Direkter ELISA	24
2.1.2.3	Charakterisierung von selektierten Klonen	25
2.1.2.4	Diskussion zur Selektion eines Azobenzol-bindenden scFv	28
2.1.3	Rationales Design eines Phenyl-azobenzol-bindenden Fv-Fragments	30
2.1.3.1	Nutzung eines stabilisierten Fv-Fragmentes für <i>CDR-loopgrafting</i>	31
2.1.3.2	Strukturdesign und Herstellung	32
2.1.3.3	Überprüfung der Spezifitäten von aSt-Fv	35
2.1.3.3.1	Fluoreszenztitration der Affinität zu ASGA	35
2.1.3.3.2	Fluoreszenztitration der Affinität zu PZGA	38
2.1.3.3.3	Mathematisches Modell für die Fluoreszenztitrationen	41
2.1.3.3.4	<i>trans-/cis</i> -Spezifität	44
2.1.3.3.5	Thermische Konversion von PZGA	46
2.1.3.4	Ligandenabhängigkeit der Fv-Dimerisierung	47
2.1.3.5	Dissoziation infolge Antigen-Isomerisierung	50
2.1.4	<i>in vivo</i> -Anwendung des aSt-Fv als lichtschtbarer Transkriptionsfaktor	52
2.1.4.1	Zelluläre Lokalisation von Azobenzol-Derivaten	53

2.1.4.2	Untersuchungen mit dem <i>yeast2hybrid</i> -System	56
2.1.4.2.1	Konstrukte für das Y2H	57
2.1.4.2.2	Interaktion der Fusionsproteine im Y2H	58
2.1.4.2.3	<i>in vivo</i> -Effekte in Gegenwart des Liganden	59
2.1.4.2.4	Diskussion zum Y2H	59
2.1.4.3	Untersuchungen mit dem bakteriellen <i>2hybrid</i> -System	60
2.1.4.3.1	Konstrukte für das bakterielle <i>2hybrid</i>	61
2.1.4.3.2	Anwendung der Fusionsproteine im bakteriellen <i>2hybrid</i>	62
2.1.4.3.3	Diskussion zum bakteriellen <i>2hybrid</i>	63
2.2	Fluoreszein-bindendes Fv-Fragment	64
2.2.1	Design	64
2.2.2	Charakterisierung	66
2.3	Konstruktion nanoskopischer biomolekularer Assemblies / ein <i>in vitro</i>-Interaktionsassay für Fv-Fragmente	69
2.3.1	Konzept	69
2.3.2	Design und Konstruktion	71
2.3.2.1	Design der DNA-Scharniere	71
2.3.2.2	Design der DNA-bindenden Fusionsproteine	72
2.3.2.3	Konstruktion eines stabilisierten Digoxin-bindenden Fv-Fragments	75
2.3.2.4	Herstellung der Fusionsproteine	78
2.3.2.5	Konstitution der Nanoassemblies	79
2.3.2.5.1	DNA-Hybridisierung	79
2.3.2.5.2	Komplexierung der Proteine an der DNA	80
2.3.2.5.3	Antigenbindung	81
2.3.2.6	Diskussion zur Konstruktion der NBAs	81
2.3.3	Charakterisierung durch Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie	82
2.3.3.1	Komplexe mit Wildtyp -Domänen (1C10-Fv)	84
2.3.3.2	Komplexe mit stabilisierten Domänen (aDX-Fv)	86
2.3.3.3	Immobilisierte Komplexe (Y3i)	90
2.3.3.4	Diskussion zu spFRET-Untersuchungen der NBAs	90
3	Diskussion	95
3.1	Ist das Design neuartiger Proteinfunktionen möglich?	95
3.2	Intrazelluläre Anwendung von Antikörperfragmenten	96
3.3	Dimerisierung von Fv-Fragmenten	97
3.4	Voraussetzungen zur Anwendung des ast-Fv	98
3.5	Anwendung von Fv-Fragmenten als Transkriptionsfaktoren	98
3.6	Azobenzol als Lichtsensor	100
3.7	Nanoskopische biomolekulare Assemblies	101
4	Zusammenfassung	103
5	Ausblick	105

6	Material	107
6.1	Bakterien und Phagen	107
6.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	107
6.1.2	Bakteriophage	108
6.1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
6.2	DNA	109
6.2.1	Vektoren	109
6.2.2	Oligodesoxynukleotide	109
6.2.2.1	Sequenzier-Oligonukleotide	109
6.2.2.2	PCR- <i>primer</i>	110
6.2.2.3	Oligonukleotide zur <i>restriction selection</i>	112
6.2.2.4	Mutagenese-Oligonukleotide	113
6.2.2.5	Oligonukleotide zur Konstruktion der NBAs	113
6.3	Enzyme und andere Proteine	114
6.4	Standards und Kits	114
6.5	Chemikalien	115
6.6	nicht kommerziell erhältliche Chemikalien	116
6.7	Geräte	117
6.8	Andere Materialien	118
7	Methoden	119
7.1	Kultivierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	119
7.2	Transformation von <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983)	120
7.2.1	Herstellung kompetenter Zellen (Tang <i>et al.</i> , 1994)	120
7.2.2	Schnelltransformation mit Plasmid-DNA (Pope & Kent, 1996)	121
7.2.3	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	121
7.3	Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA	121
7.4	Molekularbiologische Methoden	123
7.4.1	Plasmid-DNA-Präparation	123
7.4.1.1	Alkalische Lyse (Birnboim, 1979)	123
7.4.1.2	Qiagen-Plasmid-DNA-Präparation	124
7.4.2	Präparation von Einzelstrang-DNA (nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	124
7.4.3	Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	125
7.4.4	<i>Restriction Selection</i> (nach Wirtz <i>et al.</i> , 2003)	126
7.4.5	DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	127
7.4.6	Zweistufige PCR	128
7.4.7	Restriktionsendonukleaseverdau von Plasmid-DNA	129
7.4.8	Agarose-Gelelektrophorese	129
7.4.9	Ligation von DNA-Fragmenten	130
7.4.10	DNA-Sequenzierung	130
7.5	Das <i>phage-display</i>-Verfahren	131
7.5.1	Infektion von <i>E. coli</i> mit Phagen	131

7.5.2	Herstellung und Reinigung von Bakteriophagen	132
7.5.3	Bestimmung des Phagentiters einer Lösung	132
7.5.4	Immobilisierung von Zielsubstanzen	133
7.5.5	<i>Panning</i> von Phagen-Bibliotheken	134
7.5.6	ELISA zur Bestimmung der Spezifität selektierter Klone	135
7.6	in vivo-Interaktionstests	136
7.6.1	<i>Yeast2Hybrid</i> (Y2H)-Interaktionstest	136
7.6.2	Bacteriomatch [®] -Interaktionstest	138
7.7	Expression rekombinanter Ig-Domänen und deren Fusionen	139
7.7.1	Periplasmatische Expression von Immunglobulin-Domänen	139
7.7.2	Expression in <i>inclusion bodies</i>	140
7.7.3	Cytoplasmatische Expression löslicher Immunglobulin-Domänen	141
7.7.4	Expression eines anti-His- <i>tag</i> -scFv-Fragments	142
7.8	Proteinchemische Methoden	142
7.8.1	Reinigung von Ig-Domänen aus dem Periplasma-Extrakt	142
7.8.2	Reinigung cytoplasmatisch exprimierter löslicher Proteine	143
7.8.3	Reinigung und Faltung von Proteinen aus <i>inclusion bodies</i>	143
7.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	145
7.8.4.1	Herstellen der Gele	145
7.8.4.2	Elektrophorese	146
7.8.4.3	Coomassie-Färbung	146
7.8.5	Western-Blots	146
7.8.6	Dialyse und Konzentrierung von Proteinen	147
7.8.7	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)	148
7.9	Analyse und Präparation von Protein-DNA-Komplexen	148
7.9.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden	148
7.9.2	Präparation von Protein-DNA-Komplexen	149
7.9.3	Native Gelelektrophorese	149
7.10	Spektroskopische Methoden	150
7.10.1	Absorptionsspektroskopie	150
7.10.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	150
7.10.1.2	Aufnahme von Absorptionsspektren	150
7.10.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen, intrinsische Absorption	150
7.10.2	Fluoreszenzspektroskopie	151
7.10.2.1	Aufnahme von Fluoreszenzspektren	151
7.10.2.2	Fluoreszenztitration der Affinität von Ig-Fragmenten	152
7.10.3	Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie	152
7.10.4	<i>Surface plasmon resonance</i> -Spektroskopie	153
7.10.5	Photo-Isomerisierung von Azobenzol-Derivaten	154
7.11	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	154
7.12	Computer-Analysen	155
8	Literaturverzeichnis	157

9	Anhang	167
9.1	Klonierungsschemata	167
9.1.1	Konstruktion von scFv-Fragmenten durch restriction-selection	167
9.1.2	pT-ph-AP	169
9.1.3	Bacteriomatch-Konstrukte	170
9.1.4	Y2H-Konstrukte	171
9.1.5	Konstrukte für die NBAs	173
9.2	Plasmidkarten	174
9.3	Abkürzungsverzeichnis	177
9.4	Lebenslauf	179

1 Einleitung

Der Zusammenhang von Licht und Leben wird von Wissenschaftlern ebenso oft zitiert wie die Aussage "Wasser ist Leben". Unter sonst vergleichbaren Umständen hätte sich ohne Sonnenstrahlung auf der Erde kein Leben der heutigen Komplexität entwickelt. Nach Verbrauch verfügbarer chemischer Energiequellen wurde die Photosynthese zur Voraussetzung für das weitere Leben auf unserem Planeten. Die Biochemie des irdischen Lebens hängt zur Energiegewinnung von Oxidationsprozessen ab; damit ist das Endprodukt des Kohlenstoffmetabolismus in die Atmosphäre abgegebenes CO₂. Zur Schließung des Kreislaufs ist es notwendig, dieses wieder in die Nahrungskette einzuschleusen. Die zu dieser Assimilation nötige Energie gewinnen photosynthetisch aktive Organismen durch Absorption von Sonnenlicht und bilden so die Grundlage aller anderen Lebensformen.

1.1 Licht und Transkription

1.1.1 Natürliche Lichtrezeptoren

Neben der Nutzung von Lichtenergie existieren in den meisten höheren Organismen (Metazoa) auch Mechanismen zur Wahrnehmung und Reaktion auf Licht spezifischer Wellenlängen. In Organismen, deren Metabolismus zur Energiegewinnung direkt von Licht abhängt, müssen lichtgesteuerte Schaltvorgänge existieren, welche die Expression der Maschinerie zur Lichtenergiegewinnung regulieren. Auch Bewegungen zur Optimierung der Belichtung werden lichtabhängig gesteuert. In einer frühen Beschreibung einer biologischen Antwort auf Lichteinstrahlung erwähnte Charles Darwin, daß die heliotrope Bewegung von Pflanzen bei Filterung des Lichts durch eine Lösung von Kaliumdichromat verhindert wird (Darwin, 1881). Da diese speziell den Blaulichtanteil reduziert, zeigte das Experiment die Sensibilität der Pflanzen für diesen Bereich des Spektrums. Heutzutage ist bekannt, daß die Fähigkeit zur Blaulichtrezeption (400 bis 500 nm) in allen biologischen Reichen weit verbreitet ist. Lange Zeit blieb die Natur der entsprechenden Photorezeptoren unklar, was ihnen den Namen Cryptochrome einbrachte (Gressel, 1979). Die Absorption von Licht durch diese Flavoproteine verursacht neben der beschriebenen Phototropie auch

die Synthese von Anthocyaninen und Carotinoiden in Pflanzen und Pilzen. Ähnlichkeiten in den Sequenzen dieser Rezeptoren in entfernt verwandten Organismen lassen vermuten, daß die Fähigkeit der Blaulichtrezeption ausgehend von einer Photolyase als gemeinsamem Vorfahr mehrfach und analog entwickelt wurde (Van Gelder, 2002). In Insekten sorgt sie für die Anpassung des Tagesrhythmus', in Säugern stellt sie eine zentrale Komponente der circadianen Uhr dar (ebenda).

Diese Cryptochrome sind hier nur stellvertretend für die Vielzahl natürlicher Photorezeptoren genannt. Bei ihnen, wie den anderen Vertretern dieser Funktionsklasse, ist zur Übertragung der Information einer Lichtrezeption eine Signalwandlung notwendig. In der Funktionsweise aller Lichtrezeptoren wird die Anregungsinformation nach Lichtabsorption transient intramolekular gespeichert (*intramolecular signalling*). Für die Flavine der Cryptochrome vermutet man eine Veränderung des Redoxpotentials (Cashmore *et al.*, 1999); Phytochrome vollziehen eine strukturelle Isomerisierung des Chromophors (Furuya & Song, 1994). Letzere findet sich auch nach Anregung bei den Lichtrezeptoren der Rhodopsin-Familie (Wald, 1968).

1.1.2 Lichtabhängige Transkriptionskontrolle

In phototropen Organismen erfolgt auch die Regulation der Transkription (Kap. 1.2) in Abhängigkeit von der Lichtrezeption. Pflanzen nehmen Lichtsignale mit mindestens drei verschiedenen Photorezeptorfamilien wahr, mit den Phototropinen, den Cryptochromen und den Phytochromen. Die einzelnen Vertreter dieser Gruppen erfüllen unterschiedliche Funktionen in der Ontogenese. Ihre zellulären Wirkungen sind jedoch über ein komplexes Netzwerk verflochten. Phytochrome vermitteln Lichtsignale auf *photoresponse*-Promotoren durch die Bindung von Transkriptions-Regulatoren, wie neuere Befunde vermuten lassen (Quail, 2002). Cryptochrome scheinen dagegen eher posttranskriptional zu wirken, indem sie durch direkte Bindung einer putativen Ubiquitin-Ligase die Proteasom-vermittelte Degradation eines Transkriptionsaktivators verhindern (ebenda). Weiterhin wurde aus halophilen Bakterien ein transkriptionsaktives Protein mit einer dem *photoactive yellow protein* verwandten Domäne beschrieben, dessen Sequenzähnlichkeit in den übrigen Berei-

chen zu Phytochromen auf einen gemeinsamen Vorläufer schließen läßt (Jiang *et al.*, 1999).

1.2 Transkriptionsregulation durch modulare Mechanismen

Proteine können prinzipiell auf drei Wegen reguliert werden: durch Beeinflussung ihrer Produktion, ihres Abbaus oder ihrer Aktivität. Die Proteinsynthese wird durch Regulation der Transkription genetischer Information, durch alternatives Spleißen, durch mRNA-Degradation und bei der Translation an Ribosomen kontrolliert. Den größten Anpassungsspielraum erlaubt dabei die Regulation der Transkription. In Abhängigkeit von externen oder zellulären Signalen wird dieser Schritt durch eine Vielzahl von Aktivatoren und Repressoren reguliert. Den modularen Charakter ihrer Funktionsweise findet man sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten. Die RNA-Polymerase letzterer kann jedoch die Transkription nicht selbst initiieren, daher vervielfältigen sich die Einflußmöglichkeiten hier durch Interaktionen mit essentiellen Transkriptionsfaktoren (TFs). Weiterhin können über tausend Basenpaare entfernt liegende *enhancer*- oder *repressor*-Sequenzen eine Rolle spielen. Oft assemblieren daran bindende regulatorische Proteine zu Komplexen, deren Funktion von jedem einzelnen Element gesteuert wird. Schließlich wird die Freilegung transkriptionsaktiver Sequenzen aus eng gepackten Nukleosomkomplexen durch Histon-Acetyltransferasen, -Methylasen und ihre Gegenspieler aktiv reguliert. Durch Kombination positiver und negativer Stimuli werden die vielfältigen Einflüsse auf einen Promotor integriert. Die Aktivität regulatorischer Proteine selbst kann durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung reguliert werden. Letztendlich sind die Mechanismen, welche zur Initiation der RNA-Synthese in Eukaryonten führen, um ein Vielfaches komplexer als in Prokaryonten.

Die einzelnen Effektoren der beteiligten Signalübertragungskaskaden wirken jedoch in den meisten Fällen modular, die Erkennung des gleichen Signals durch verschiedene Proteine kann unterschiedliche Reaktionen zur Folge haben. Ein deutliches Beispiel ist die Wirkung der Gravitation auf die Wuchsrichtung von Sproß und Wurzel eines Pflanzenkeimlings. Andererseits können verschiedene Signale über entsprechende Rezeptoren eine gleiche Wirkung erzielen. Diese Modularität der Faktoren, welche an der Transkriptions-

aktivierung beteiligt sind, und die Integration ihrer Wirkungen sollte eine künstliche Beeinflussung durch gezielte Veränderung von einzelnen Effektoren ermöglichen. Damit wird die technische Funktionalisierung einzelner Komponenten besonders interessant (Kap. 1.2.2). Eine Änderung der Transkriptionsfrequenz von Genen sollte daher von einer indirekten Einflußnahme auf die Initiationsaktivität in Abhängigkeit von molekularen Signalen ausgehen. Diese Regulation kann prinzipiell über Promotor-bindende Proteinen erfolgen, welche mit organismusspezifischen Faktoren der RNA-Polymerase interagieren.

1.2.1 Künstliche Beeinflussung der Transkription

Seit der Kenntnis der in Kap. 1.2 nur skizzierten, grundlegenden Transkriptionsmechanismen wird an Möglichkeiten geforscht, diese Vorgänge in Zellen, Geweben oder Organismen gezielt zu beeinflussen. Prinzipiell sind Eingriffe auf jeder Ebene der Transkriptionsregulation möglich. Die Inhibition der RNA-Polymerase selbst ist für Therapeutika in der Krebstherapie interessant; sie hat zumeist eine letale Wirkung auf die Zelle. Hier liegt das Problem in der Selektivität, nur das Krebsgewebe zu treffen. Das andere Extrem wäre die Modulation des externen Signals, wie in dem eingangs erwähnten Experiment der Lichtfilterung von Darwin (Kap. 1.1.1). Dazwischen liegen Möglichkeiten, die Transkription durch sogenannte *transcription modifier* zu regulieren. Grundlegend lassen sich dazu zwei Ansätze unterscheiden.

I) Eine Einflußnahme auf die Transkription in natürlichen Zellen oder Gewebe ist durch Zugabe von isolierten oder modifizierten Naturstoffen, aber auch vollständig synthetischen Verbindungen möglich. Diese wirken zumeist als Analoga organismuseigener Faktoren, wie orale Kontrazeptiva, oder die Zufuhr von Insulin bei Diabetes. In der Molekularbiologie erfolgt z.B. die Induktion von Genen, die unter Kontrolle des *lac*-Repressors stehen, durch das synthetische Lactose-Analogon β -D-Isopropyl-thiogalactosid.

II) Die andere Strategie nutzt eine genetische Veränderung der Zielzellen. Verständlicherweise ist dies im intakten Organismus ungleich schwieriger, als in Zellkultur. Durch Deletion, Überexpression oder Modifizierung (Mutation) von TFs, Repressoren oder Promotorsequenzen, also von einzelnen an der Transkriptionsinitiation beteiligten Modulen, läßt sich Einfluß auf zelluläre Expressionsmuster nehmen. Hierzu gehören jene Derivate

des tetracyclinkontrollierten Transaktivators, welche durch Analoga des Tetracyclins (Doxycyclin) aktiviert werden (Baron *et al.*, 1999).

1.2.2 Artificielle Transkriptionsfaktoren

Zur Funktionsanalyse eines Proteins oder einer Regulationssequenz bzw. zur Aufklärung zellulärer und ontogenetischer Zusammenhänge ist es oft vorteilhaft, ein System zu verwenden, welches die externe Kontrolle durch den Experimentator ermöglicht. Beispielsweise schließt embryonale Lethalität bei *knockout* eines Gens die Analyse weiterer phänotypischer Effekte des Proteins aus; eine Aktivierung kompensatorischer Mechanismen kann diese behindern. Die Nutzung eines gezielt induzierbaren Expressionssystems ist hier vorteilhaft. Eine reversible Kontrolle der Genexpression würde die adressierbaren Fragestellungen noch erweitern. In einem idealen System sollte sich das Zielgen an- und abschalten lassen, ohne daß die Expression anderer Gene beeinflußt wird. Verständlicherweise läßt sich ein solches nicht mit endogenen Faktoren realisieren, wenn diese jeweils auch andere Promotoren regulieren. Durch Verwendung von Faktoren aus genetisch entfernten Organismen kann dieses Problem umgangen werden. Die Übertragung der Tetracyclin-*response*-Elemente in eucaryontische Zellen war einer der bedeutendsten Fortschritte auf diesem Gebiet (Gossen & Bujard, 1992). Ein anderes vollständig transgenes Verfahren wurde für induzierbare Genexpression in Mäusen unter der Kontrolle des lac-Repressors aus *E. coli* beschrieben (Cronin *et al.*, 2001). Die Vorteile liegen hier in der Reversibilität (bei Entzug des Induktors IPTG) und der Selektivität, da ausschließlich Gene unter der Kontrolle des künstlichen Promotors beeinflußt werden. Bemerkenswert ist die Funktionstüchtigkeit des Systems nicht nur in Zellkultur, sondern auch im intakten Organismus der Maus. Für die Anwendung in anderen Organismen müßte jedoch der verwendete Promotor jeweils neu konzipiert werden. Die Konstruktion eines generellen, unabhängigen Systems zur Transkriptionsregulation, welches auch in Prokaryonten selektiv arbeitet, umgeht dieses Problem. Durch Adaption von Elementen, die in keinem bekannten Organismus bedeutsam für die Regulation der Genexpression sind, ließe sich ein solches unabhängiges System schaffen (Kap. 1.3.1).

1.2.3 Artificielle Lichtrezeptoren

Die Komplexierung einer photoschaltbaren Verbindung durch einen artifiziellen TF (Kap. 1.2.2) könnte eine künstliche Lichtregulation der Genexpression ermöglichen (Kap. 1.5). Um das Konzept zu verwirklichen, bedarf es einer lichtschtbaren Komponente, die weder von speziellen Stoffwechselmechanismen im jeweiligen Organismus abhängt, noch mit zellulären Prozessen interferiert. In modernen Technologien wird eine Reihe von synthetischen lichtsensiblen Substanzen genutzt. Einfache Beispiele sind die photolabilen Komponenten von Fotolacken. Eine breite Anwendung finden auch Materialien, die ihre Leitfähigkeit infolge Lichteinwirkung verändern. Die technische Nutzung von reversibel optisch schaltbaren organischen Verbindungen, deren molekulare Veränderung sich auslesen läßt, steckt jedoch noch in den Kinderschuhen.

Die Anwendung von photoaktiven Verbindungen in der Biochemie bzw. Molekularbiologie konzentriert sich bislang auf sogenannte *caged compounds*. Hier wird die Photosensibilität einer Abgangsgruppe genutzt; durch Belichtung wird in einer irreversiblen Reaktion die aktive Verbindung freigesetzt. Damit sind solche Substanzen als künstliche Lichtsensoren geeignet. So konnte eine zeitlich und räumlich kontrollierte Genexpression durch Anwendung von Derivaten natürlicher Signalmoleküle erzielt werden. Unter Bestrahlung mit Licht lassen sich mit z.B. Dimethoxy-nitrobenzyl-Gruppen blockierte Substanzen intrazellulär freisetzen, um dann ihre natürliche Funktion auszuüben. So ließen sich durch Verwendung eines Östradiol-Derivates Gene unter der Kontrolle des Östrogen-Rezeptors gezielt exprimieren (Cruz *et al.*, 2000). Mit einem analogen Verfahren konnten Li *et al.* (1998) zeigen, daß durch wiederholte kurzzeitige (gepulste) Freisetzung von Inositolphosphaten die Ca^{2+} -induzierte Transkription stärker stimuliert wird. Allerdings sind die Photoreaktionen solcher Verbindungen nicht reversibel.

1.2.4 Azobenzol-Derivate

Für die intrazelluläre Detektion von Licht sollte die sensorische Komponente niedermolekular und reversibel schaltbar sein (Kap. 1.2.2), um das Signal auch effizient zurücksetzen zu können. Weiterhin sollte es biologische Membranen passieren können und eine molekulare Unterscheidung seiner Zustände z.B. durch Proteinbindung möglich sein. Ein

solches reversibel lichtschtbares Molekül ist Azobenzol. Seine beiden Isomere (*cis/trans*) sind bei Zimmertemperatur photostabil und lassen sich durch gezielte Belichtung reversibel und mit hoher Quantenausbeute ineinander überführen. Sie unterscheiden sich erheblich in Konfiguration, Polarität und spektralen Eigenschaften (Abb. 1.1, Abb. 2.18).

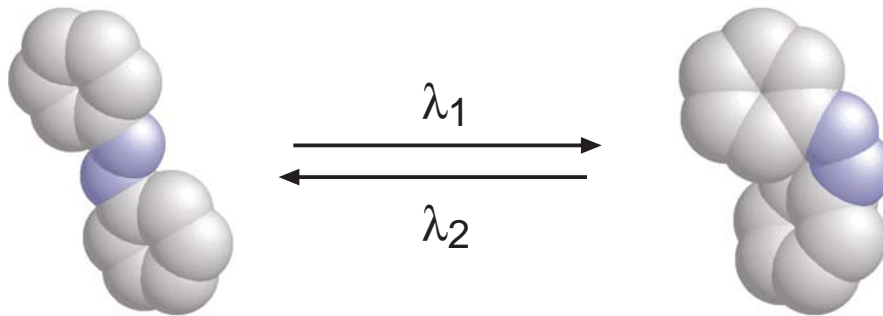


Abb. 1.1 Azobenzol, links *trans*-, rechts *cis*-Isomer, $\lambda_1 = 340$ nm, $\lambda_2 = 450$ nm.

Die spezifische Komplexierung eines der Azobenzol-Isomere würde die Verwirklichung eines neuartigen Prinzips artifizieller Transkriptionskontrolle ermöglichen. Die synthetische Verbindung wird jedoch von bekannten natürlichen Proteinen nicht spezifisch gebunden. Die intrazelluläre Erkennung von Azobenzolderivaten durch zellulär codierte Proteine bleibt damit der entscheidende Schritt zur Entwicklung eines *in vivo* funktionalen, lichtschtbaren TFs (Kap. 2.1.1). Durch Kombination von lichtregulierbarer Genexpression mit einem solchen artifiziellen, transgenen TF sollte sich die räumliche und zeitliche Adressierbarkeit eines Promotors verwirklichen lassen. Die Beeinflussung ließe sich "minimalinvasiv" gestalten; Gewebe bzw. Zellen können selektiv belichtet werden. Das artifizielle Rezeptorsystem sollte mit natürlichen zellulären Komponenten nicht interferieren und wäre in verschiedenen Organismen anwendbar. Ein solcher TF ließe sich möglicherweise mit Azobenzol-bindenden Antikörperfragmenten (Kap. 1.3) realisieren.

1.3 Antikörperfragmente zur molekularen Erkennung

In der Literatur wurde bislang die Konstruktion künstlicher TFs ausschließlich mit Proteinen beschrieben, welche auch die Natur dafür verwendet (Kap. 1.2.2). Ein generelles Konzept zur Erkennung neuartiger exogener Stimuli läßt sich jedoch am sinnvollsten mit

Proteinmodulen verwirklichen, die natürlicherweise die Bindung von Fremdstoffen übernehmen.

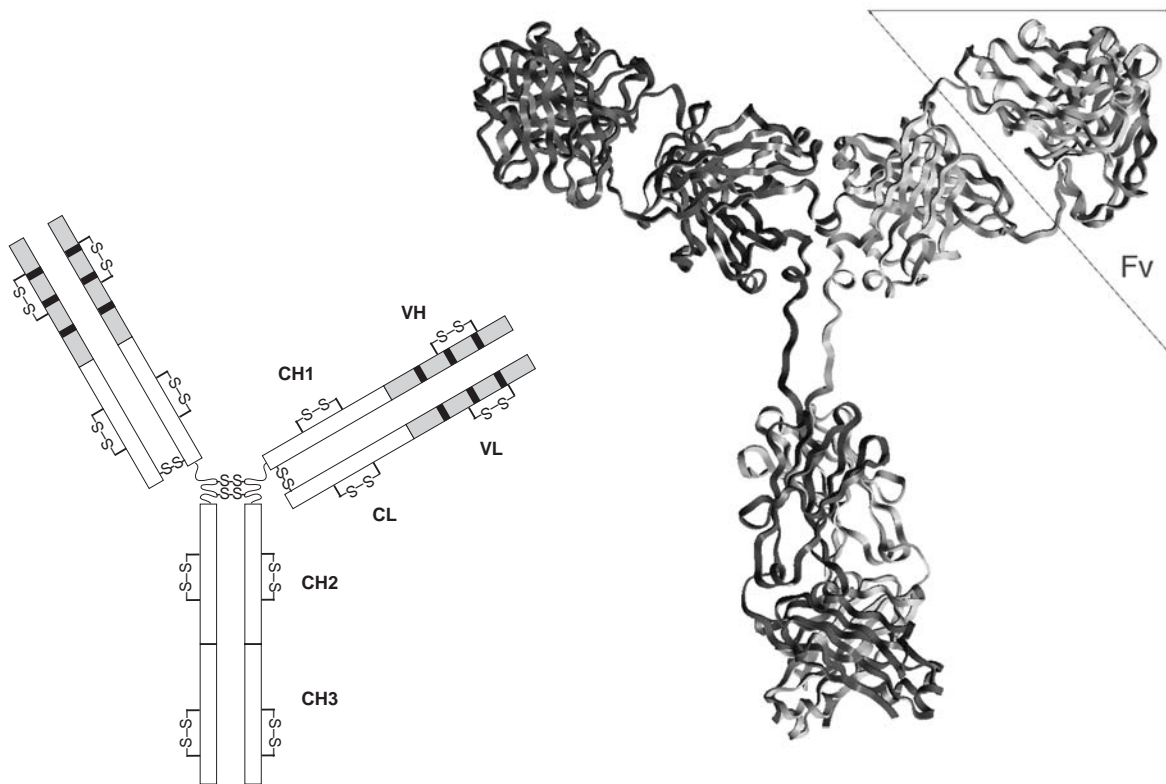


Abb. 1.2 Links: Schema der Domänenanordnung eines Antikörpers (IgG) mit Darstellung der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken (-S-S-). Die variablen Domänen der schweren (VH) und leichten Kette (VL) sowie die konstanten Domänen (CH1-3, CL) sind bezeichnet. Das Fv-Fragment (grau) mit seinen CDRs (schwarz) ist nur über CH1 und CL kovalent verknüpft. **Rechts:** Tertiärstrukturmodell eines IgG. Ein Fv-Fragment, hier als Dimer der N-terminalen, variablen Domänen zu erkennen, ist umrahmt.

Antikörper sind für die spezifische Erkennung und Markierung von organismusfremden Substanzen verantwortlich. Sie sind Bestandteile des adaptierenden Immunsystems der Säuger, welches für die Vernichtung von Endoparasiten, Pathogenen und krankhaft veränderten Zellen sorgt. Für die jeweils spezifische Bindung besitzt diese Proteinklasse eine enorme Diversität innerhalb eines Individuums ($\sim 10^{15}$ Klone), welche durch besondere genetische Mechanismen der Rekombination gewährleistet wird (Tonegawa, 1983). Die Antigen-bindenden Bereiche beschränken sich auf das sogenannte Fv-Fragment, das Dimer der variablen Domänen von leichter und schwerer Kette eines Antikör-

pers (Abb. 1.2). Beide Teile enthalten jeweils drei hypervariable Peptidregionen, in welchen die antigenkontaktierenden Aminosäuren konzentriert sind (Kabat, 1978). Diese sogenannten CDRs verleihen einem Antikörper die Spezifität gegenüber seinem Antigen.

Mit der Hybridomatechnik lassen sich monoklonale Antikörper (mAB) herstellen (Köhler & Milstein, 1975); im Gegensatz zum natürlichen, polyklonalen Immunsereum besitzen sie eine einzige Spezifität. Dies ermöglicht es, die Wechselwirkung mit ihrem jeweiligen Antigen detailliert zu charakterisieren; durch Röntgenkristallanalyse oder mit NMR-Techniken läßt sich die molekulare Struktur solcher Proteinpräparationen bestimmen.

Die Produktion von spezifischen Antikörpern gegen Fremdstoffe durch das Immunsystem läßt sich auch künstlich induzieren. Sie wurde zur Erzeugung von Proteinen gegen eine Vielzahl von Zielverbindungen eingesetzt (Nicklas, 1993). Molekularbiologische Verfahren wie das *phage display* (Winter *et al.*, 1994) erlauben die *in vitro*-Selektion von Antikörperfragmenten aus künstlich randomisierten oder natürlichen Bibliotheken. Beide Methoden verhalfen der Antikörpertechnologie zu einer Schlüsselfunktion in der Entwicklung von Diagnostika und Therapeutika der modernen Medizin. Aber auch als molekulare Werkzeuge der biotechnologischen Forschung lassen sie sich heutzutage kaum ersetzen.

Bislang ist die Anwendung von Antikörpern im Cytoplasma lebender Zellen jedoch ein nur in Einzelfällen gelöstes Problem (Cattaneo & Biocca, 1997; Wörn *et al.*, 2000). Das reduzierende Milieu dieses Kompartiments verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken (Gilbert, 1990), welche ein zentrales Struktur- und Stabilitätsmerkmal von Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) sind. Die thermodynamische Stabilität als Grundvoraussetzung der Funktion solcher Proteine konnte jedoch sowohl mit evolutiven als auch rationalen Verfahren erfolgreich erhöht werden, um den Schwellenwert für cytoplasmatische Exprimierbarkeit zu überschreiten (Übersichtsartikel, Steipe, 1998; Steipe, 1999; Wörn & Plückthun, 2001). Damit bieten Antikörper bzw. deren antigenbindende Fragmente das Potential, auch intrazellulär molekulare Oberflächen zu erkennen.

1.3.1 Fv-Fragmente als Dimerisierungsmodule

Die Rezeption eines Signals ist nur der erste Schritt einer Signalkaskade zur transkriptionellen Reaktion. Um eine zelluläre Reaktion zu ermöglichen, muß das Signal entsprechend verarbeitet, gewandelt werden (z.B. durch Transkriptionsregulatoren, Kap. 1.2). Wie bereits für Lichtrezeptoren erwähnt (Kap. 1.1.2), kann eine Signalwandlung durch Konformationsänderung erfolgen.

Antikörper besitzen keine derartigen Möglichkeiten zur intrinsischen Signalwandlung. Natürlicherweise wird das Signal ihrer Bindung aufgrund hoher lokaler Konzentration an der Oberfläche eines Fremdkörpers erkannt (IgG). Die Quervernetzung der Rezeptoren über den Fremdkörper ermöglicht eine Rezeptordimerisierung an der Zelloberfläche, welche zur Aktivierung von Kinasen und intrazellulärer Signaltransduktion führt. Bei Erkennung von MHC-präsentierten Peptiden auf Antigen-präsentierenden Zellen wird dieses Signal durch Aktivierung der Corezeptoren auf entsprechendem Wege weitergeleitet. Hierbei wird der modulare Aufbau dieser Signalübertragung deutlich (Antigenerkennung durch Antikörper, Antikörperbindung durch Fc-Rezeptoren, Rezeptordimerisierung, Kinase-Aktivierung).

Jedoch bieten Antikörperfragmente das Potential einer intrinsischen Signalwandlung. Den kleinsten Antigen-erkennenden Bestandteil stellt das Dimer der variablen Domänen dar (Abb. 1.2). Im Antikörper sind diese Fv-Fragmente über konstante Domänen kovalent verknüpft. Auf effiziente Dimerisierung wird daher in der Natur nicht selektiert. Im Komplex mit dem Antigen kann die apparente Dissoziationskonstante eines Fv-Dimers deutlich gesenkt sein. Unter der Voraussetzung, daß beide Domänen an der Bindung des Antigens beteiligt sind, läßt sich dieser Zusammenhang aus folgender thermodynamischen Betrachtung herleiten.



$$\text{Gl. 1.2} \quad K_{D1} = \frac{[\text{VL}] \cdot [\text{VH}]}{[\text{Fv}]} \quad K_{D2} = \frac{[\text{Fv}] \cdot [\text{Ligand}]}{[\text{Fv-Ligand}]}$$

Bei genügend hoher Affinität zum Antigen ($K_{D1} \gg K_{D2}$) hängt die apparente Dimerisierungskonstante der Domänen direkt von der Antigenkonzentration ab. Damit läßt sich die Bindung eines Antigens zum Dimerisierungssignal wandeln!

Mit diesem Prinzip wurde von Suzuki *et al.* (2000) ein *open sandwich*-ELISA mit Fv-Fragmenten zum Nachweis von Haptenen entwickelt. Die eine, Enzym-gekoppelte Domäne zeigte hier eine antigenabhängige Affinität zur immobilisierten anderen. Das Prinzip ließ sich auch für homogene Immunoassays verwenden, unter Verwendung von Chromophor-markierten Domänen kann mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET, Kap. 2.3.3) die Assoziation bestimmt werden (Arai *et al.*, 2000). Ein ähnlicher Ansatz unter Komplementation von Fusionen an β -($\Delta\alpha$)-Galactosidase mit einer α -Peptidfusion erlaubt die einfachere Bestimmung eines lumineszenten Substrates (Yokozeki *et al.*, 2002).

Auch als Dimerisierungsmodule von künstlichen TFs wurden Immunglobulin-Fragmente bereits verwendet. Fusionen von variablen Domänen an ToxR aus *Vibrio cholerae* induzieren so *in vivo* den *ctx*-Promotor abhängig von ihrer Dimerisierungsneigung (Kolmar *et al.*, 1994). Diese bakterielle Signaltransduktion basiert auf der Homodimerisierung der cytoplasmatischen DNA-Bindeproteine.

1.3.2 *in vivo*-Proteininteraktions-Assays

Zur *in vivo*-Untersuchung der Assoziation bzw. Dimerisierung zweier verschiedener Proteine ist ein polares System mit unterschiedlichen DNA-Bindungs- und Aktivierungsmodulen sinnvoll. Diese Möglichkeit bieten sogenannte *2hybrid*-Systeme, die sowohl in Pro- als auch Eukaryonten etabliert sind. Sie werden intensiv zur Erforschung der Wechselwirkungen von Proteinen genutzt. Um mit solchen Methoden die Assoziation von Proteinen nachzuweisen, werden diese an Faktoren der Transkriptionsaktivierung fusioniert (Kap. 2.1.4.2, 2.1.4.3; Auerbach *et al.*, 2002).

Im *yeast2hybrid* (Y2H) wird ein "Köder"-Gen als Fusion mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 (DNA-BD) exprimiert, während ein anderes Genprodukt als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) vorliegt (Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Wenn die beiden interagieren, bringen sie DNA-BD und AD in räumliche Nähe, wodurch

die Expression von Reportergenen aktiviert wird. Die Technologie kann zur Identifikation unbekannter, zur Bestätigung vermuteter Interaktionen und zur Eingrenzung von Interaktionsdomänen genutzt werden. Die Sensitivität der Y2H-Systeme liegt vor allem an der Vervielfachung der Signale über Transkription, Translation und Enzymaktivität. Da der Assay *in vivo* durchgeführt wird, liegen die Proteine mit größerer Wahrscheinlichkeit in ihrer nativen Konformation vor als bei *in vitro*-Studien. Jedoch kann die Fusionierung der Proteine ihre Struktur oder Funktion negativ beeinflussen. Die Methode erlaubt auch eine Bestimmung relativer Interaktionsunterschiede verschiedener Proteinvarianten (Yang *et al.*, 1995). scFv-Fragmente wurden bereits in solchen Systemen zur Selektion gegen bestimmte Antigene verwendet (Cattaneo & Biocca, 1999).

1.4 Biologische Nanoassemblies

1.4.1 Nanotechnologie

Die Beobachtung und Beeinflussung zellulärer Vorgänge unter Nutzung modifizierter natürlicher oder völlig artifizieller Komponenten ist ein Weg, molekulare Prozesse der Natur verstehen zu lernen. Ein anderer, im Grunde jedoch ähnlicher Ansatz wendet natürliche Prinzipien für den Bau artifizieller Strukturen *in vitro* an. Damit wird eine andere Ebene der Organisation beeinflusst. Erkenntnisse zu molekularen Prozessen lassen sich aus beidem ableiten, sowohl aus dem Verständnis des Zusammenspiels von Bestandteilen in einer lebenden Zelle, als auch aus der Erforschung grundlegender Prozesse bei der Selbstorganisation biologischer Makromoleküle. Ein relativ junges Gebiet, in welchem zunehmend solche natürlichen Prinzipien Anwendung zur Herstellung neuartiger Materialien finden, ist die Nanotechnologie (Andreas *et al.*, 1998). Mit diesem Begriff lassen sich jene Technologien zusammenfassen, welche die Erforschung, gezielte Strukturierung und Anwendung von Molekülen und Prozessen auf der submikroskopischen, makromolekularen Größenordnung verfolgen.

1.4.2 Biologische Makromoleküle in der Nanotechnologie

Biologische Makromoleküle sind aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften für diese Forschungsrichtung außerordentlich interessant. Die Vielfalt in der Natur verwirklichter Funktionen läßt sich zum Teil in künstliche Systeme übertragen. Die Kenntnis ihrer genetischen Information vorausgesetzt, lassen sich beispielsweise Proteine oder RNA-Moleküle einfach produzieren und modifizieren. Sie besitzen die Fähigkeiten sowohl zur Selbstorganisation, sich also schnell und effizient in einfache oder komplexe Strukturen zu ordnen, als auch diese umgebungsabhängig zu ändern. Gegenüber nicht biologischen Materialien besitzen diese Moleküle einen entscheidenden Vorteil. Für die künstliche Entwicklung und Optimierung ihrer Eigenschaften können evolutive Prozesse genutzt werden. Dazu lassen sich ihre Gene variieren, die entstehenden Bibliotheken können nach relevanten Kriterien selektiert werden. Erzielte Veränderungen sind mit der genetischen Information verknüpft.

Dem Erfolg dieser funktionellen Selektionen biologischer Moleküle steht ein entscheidender Nachteil gegenüber: das fehlende Verständnis von Prinzipien zur rationalen Konstruktion von Biomolekülen mit neuen Eigenschaften. Die Schwierigkeiten eines Biomolekül-Designs liegen unter anderem in dem komplexen, kontextabhängigen Verhalten der Verbindungen begründet. Selbst geringfügige, lokale Veränderungen (z.B. Punktmutationen) können zum Teil globale, scheinbar unvorhersehbare Effekte wie den Verlust der Strukturbildung nach sich ziehen. Die erfolgreiche systematische Anwendung von Wissen über Zusammenhänge von Proteinstruktur und -sequenz blieb daher bislang auf wenige Beispiele gezielter Veränderung bestehender Strukturen beschränkt (Steipe *et al.*, 1994; Kraemer-Pecore *et al.*, 2001). Inzwischen werden dennoch beachtliche Erfolge auf dem Weg zu einem Verständnis von Proteinfaltung und -funktion erzielt (Berezovsky & Trifonov, 2001; Trifonov & Berezovsky, 2002).

Die Reißbrett-Konstruktion biologischer makromolekularer Strukturen gelang allerdings mit künstlichen DNA-Assemblies (Seeman, 1998; Bashir, 2001). Diese aus synthetischen Oligonukleotiden bestehenden Komplexe ließen sich zu vielfältigen, räumlich geordneten Gerüststrukturen assemblieren. Die spezifische Proteinbindung an solche Gerüste wurde bislang noch nicht beschrieben. Die Erkennung der Doppelhelixstrukturen innerhalb

des Gerüsts gelang jedoch durch Enzyme, wodurch die korrekte Ausbildung und Zugänglichkeit der Strukturen belegt werden konnte.

Die gentechnisch erzeugte, kovalente Verknüpfung von unabhängigen Proteindomänen zu sogenannten "Fusionsproteinen" ist heutzutage eine Standardtechnik. Bei Zugänglichkeit der N- bzw. C-Termini sowie guter Expressierbarkeit der einzelnen Domänen stellt die Herstellung von Fusionsproteinen zumeist kein Problem dar.

Zur Verknüpfung funktionaler Einheiten verschiedener Makromoleküle kommt dem in der Natur verwirklichten Prinzip des *self assembly* eine grundlegende Rolle zu. *in vitro* ist die gegenseitige Erkennung und Bindung von Partnermolekülen zur funktionellen Einheit jedoch nur begrenzt anwendbar, da natürliche Kontroll- und Korrekturfunktionen fehlen. Daher ist die sequentielle Kombination von Konzepten der molekularen Erkennung mit gezielter Assemblierung ein naheliegender Weg zur Herstellung nanoskopischer Assemblies aus biologischen Molekülen (nanoskopische biomolekulare Assemblies, NBAs). Die Konstruktion solcher NBAs sollte sich unter Nutzung natürlicher Prinzipien der Selbstorganisation vereinfachen lassen.

1.5 Aufgabenstellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich die Eigenschaften der variablen Domänen von Antikörper-Fv-Fragmenten zur Konstruktion artifizieller schaltbarer Elemente nutzen lassen, die antigenabhängig dimerisieren. Unter Verwendung einer photoisomerisierbaren Verbindung als Antigen sollte die Möglichkeit der Lichtschaltbarkeit dieser Dimerisierung untersucht werden.

Als Ausgangspunkt diente das *framework* eines rational stabilisierten Fv-Fragments, welches sich intrazellulär in *E.coli* exprimieren läßt (Wirtz *et al.*, 2003). Auf diese Plattform ließen sich andere Spezifitäten effizient übertragen. Um damit die Schaltbarkeit zu realisieren, sollten Antikörper-Fragmente isoliert werden, deren Eigenschaften dem stabilisierten Fv-Fragment die Erkennung niedermolekularer Antigene (Haptene) ermöglicht. Sowohl evolutive Methoden wie *phage display*, als auch rationale Ansätze wie die Anwendung von Strukturdatenbanken sollten als Zugang zu Proteinen genutzt werden, welche

spezifisch derartige Liganden binden. Die Anwendungsmöglichkeiten eines solchen schaltbaren Elements sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht werden.

Im einzelnen sollte durch genetische Fusion der Domänen eines anti-Digoxin-Fv mit DNA-bindenden Zinkfingern deren Anknüpfung an DNA-Stränge ermöglicht werden. Auf diesem Weg sollten biomolekulare Assemblies mit den funktionstragenden Eigenschaften der Antikörperdomänen sowie den strukturierenden Eigenschaften von doppelsträngiger DNA konstruiert werden. Dimerisierung und Antigenbindung des Fv-Fragments sollten in diesem Kontext über FRET als Distanzmaß DNA-gebundener Fluoreszenzchromophore untersucht werden.

Die genetische Fusionierung von Fv-Domänen an transkriptionsaktive zelluläre Komponenten sollte einen Zugang für die Untersuchung dieser Eigenschaften in lebenden Zellen schaffen. Die Reportergenaktivität in verschiedenen *2hybrid*-Systemen bietet ein sensitives Maß für Proteininteraktionen. Dazu sollte ein Fv-Fragment gegen die photoisomerisierbare Verbindung Azobenzol entwickelt werden. Die selektive Erkennung eines der Isomere sollte verbunden mit den Dimerisierungseigenschaften des Fv zur Entwicklung eines lichtschtbaren Transkriptionsfaktors führen.

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Christoph Bräuchle (Institut für Physikalische Chemie, Department Chemie, LMU München) wurde dazu Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Eva-Kathrin Sinner (Abteilung Membranbiochemie, MPI für Biochemie, Martinsried) wurden plasmonenspektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Messungen zur Isothermalen Titrationskalorimetrie wurden mit Unterstützung der AG Buchner (Institut für Chemie, TU München, Garching) durchgeführt.

2 Ergebnisse

2.1 Entwicklung eines lichtschtbaren Antikörper-Fragmentes

2.1.1 Konzept

Die Grundvoraussetzung zur Konstruktion eines lichtschtbaren genetischen Elements ist eine Licht absorbierende Komponente als Signal-Eingang. Die Absorption sollte eine Veränderung des Moleküls hervorrufen (z.B. Konformationswechsel). Die Veränderung muß wiederum von einem biologischen Makromolekül erkannt werden, welches infolgedessen intrazellulär die Genexpression beeinflusst (z.B. durch Transkriptionsaktivierung oder -repression, siehe auch Abb. 2.1).

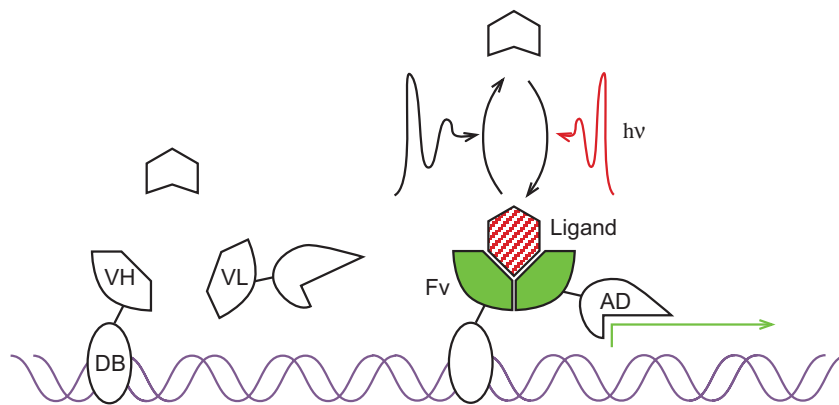


Abb. 2.1 Schema eines genetischen Lichtschalters. Eine DNA-bindende Domäne (DB) lokalisiert das Liganden-abhängig dimerisierende Fv-Fragment in Promotornähe. Bei Photoisomerisierung des Liganden wird die Transkription eines Reportergens, welche von der Aktivierungsdomäne (AD) abhängt, induziert bzw. reprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Azobenzol-Derivate als photoisomerisierbare synthetische Liganden genutzt (Abb. 2.2, Abb. 2.21). Um ein Lichtsignal auf die Genexpression zu übertragen, muß es entweder direkt intrazellulär rezeptiert (absorbiert) werden oder eine Verknüpfung zur extrazellulären Erkennung hergestellt werden. Die cytosolische Lokalisation sollte durch chemische Modifizierung der funktionellen Gruppen des artifiziell-

len Lichtrezeptors zur Permeation der Zellmembran möglich sein (Kap. 2.1.4.1; Tsien, 1981; Li *et al.*, 1998).

Die Konformer-selektive Erkennung von Azobenzol durch ein Protein ist Voraussetzung für eine weitere Übertragung der Information. Die synthetische Verbindung Azobenzol wird von bekannten natürlichen Proteinen nicht selektiv gebunden. Das Immunsystem von Säugern ist jedoch in der Lage, Antikörper zu erzeugen, welche spezifisch organismusfremde Substanzen binden (Kap. 1.3). Damit stellt es eine hervorragende Möglichkeit dar, bindende Proteine gegen artifizielle Liganden zu selektieren (Nicklas, 1993). Alternativ können Binder auch über *in vitro*-Selektionsverfahren von randomisierten Proteinen gewonnen werden (Hoess, 1993). Das *phage display* mit scFv-Fragmenten ist eine dieser erfolgreichen Methoden, bei denen sich die Bedingungen genauer einstellen lassen, als *in vivo* bei der Nutzung eines Immunsystems (Gavilondo & Larrick, 2000; Schmitz *et al.*, 2000).

Zur cytosolischen Bindung von Azobenzol-Derivaten sind dort exprimierbare bzw. funktionsfähige Antikörperfragmente notwendig. Natürliche Ig-Domänen lassen sich cytoplasmatisch dann erfolgreich exprimieren, wenn sie sich trotz fehlender intramolekularer Disulfidbrücke effizient falten können. Dies ist nur bei ausreichend hoher thermodynamischer Stabilität der Domänen möglich. Durch rationales *engineering*, sogenannte Konsensus-Sequenz-Approximation (Steipe,) wurden Antikörper-Fragmente mit dieser Eigenschaft entwickelt (Ohage, 1999). Durch *loopgrafting* konnten Spezifitäten anderer Antikörper auf das so stabilisierte *framework* scFvAR übertragen werden (Wirtz *et al.*, 2003). Ein derartiges Experiment sollte auch mit selektierten Azobenzol-Bindern möglich sein.

Azobenzol sollte nicht nur gebunden werden, das Signal der Isomerisierung muß von Proteinen übertragen werden können. Natürliche Licht-Rezeptoren erfahren z.B. eine Liganden-induzierte intrinsische Strukturänderung des Proteins. In einem künstlichen System kann die Signalvermittlung vom Liganden auch über die induzierte Assoziation bzw. Dissoziation eines Antikörperfragmentes erfolgen. Eine solche Liganden-abhängige Dimerisierung wurde für Fv-Fragmente *in vitro* beschrieben (Suzuki *et al.*, 2000). Bei konforma-

tionsselektiver Bindung von Azobenzol wäre ein entsprechendes Fv-Dimer sensitiv für die Photoisomerisierung.

Die Signalvermittlung auf die Transkription erfordert die Beeinflussung zellulärer Komponenten. Ein genereller Zugang zur Transkriptionsaktivierung bzw. -repression infolge von Dimerisierung bzw. Dissoziation von Proteinen besteht mit sogenannten *yeast2hybrid*-Experimenten (Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Dazu wird einer der Interaktoren an eine DNA-bindende Domäne und der andere an eine die RNA-Polymerase aktivierende Domäne fusioniert. Die Transkriptionsaktivierung eines Reportergens ist damit abhängig von der Affinität der beiden Proteine zueinander. Der Effekt lässt sich anhand eines Wachstumsvorteils von Zellen mit Reporter-Aktivität makroskopisch sichtbar machen. Das System sollte sich auch zur Untersuchung der Affinität von Fv-Domänen zueinander, in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration, nutzen lassen.

2.1.2 Selektion von Azobenzol-bindenden Antikörperfragmenten

Unter Ausnutzung der Lichtschaltbarkeit von Azobenzolderivaten sollte eine gezielte Selektion von scFvs im *phage display* möglich sein, die nur ein Isomer binden und die möglicherweise sogar infolge seiner Isomerisierung von diesem Antigen dissoziieren.

Im Rahmen der Arbeit wurde die "ETH-2"-Phagenbibliothek verwendet (Kap. 7.5; Pini *et al.*, 1998). Sie besteht aus filamentösen Phagen, welche auf ihrer Oberfläche randomisierte scFv-Fragmente präsentieren. Durch Mutagenese der kurzen CDR3-Regionen in Fv-Genen humaner Keimzellen tragen diese Proteine an Positionen Vh 95-98 und Vl 91, 93, 94 und 96 zufällige Aminosäuren (Abb. 2.3; Numerierung nach Tomlinson *et al.*, 1995).

In den drei im Verlaufe dieser Arbeit durchgeführten Selektionen kamen die unter Kap. 2.1.2.1 aufgeführten Strategien zur Anwendung. Generell wurde das Antigen über kovalent gebundenes Biotin an eine mit Streptavidin beschichtete Oberfläche gekoppelt. Als besonderer Ansatz zur Elution *trans*-Azobenzol-spezifischer Proteine wurde kein denaturierendes Agens verwendet, wie es gewöhnlich im *phage display* eingesetzt wird. Anstelle dessen wurde durch UV-Belichtung bei 356 nm die *trans*→*cis*-Isomerisierung angeregt. Diese Wellenlänge trifft nicht das Absorptionsmaximum des *trans*-Isomers, aber die

Absorption des *cis*-Isomers ist hier deutlich geringer, so daß sein Anteil bei photostationären Experimenten maximiert wird (Rudolph-Böhner *et al.*, 1997). Durch die Belichtung sollten sich speziell die bei diesem Konformationswechsel dissoziierenden Antikörperfragmente gewinnen lassen.

Durch Photoisomerisierung der verwendeten Azobenzol-Derivate (Abb. 2.2) wird ein maximaler *cis*-Anteil von etwa 80 % erreicht (Kap. 2.1.3.3.4; Harada *et al.*, 1991; Rudolph-Böhner *et al.*, 1997). Es verbleibt also nach optischer Isomerisierung ein Fünftel des immobilisierten Azobenzols an der Festphasengrenze im *trans*-Zustand. Deshalb wurde in den Selektionen B und C bei der Elution zusätzlich mit löslichem Antigen kompetiert, um die Rückbindung zum *target* an der Oberfläche zu verhindern.

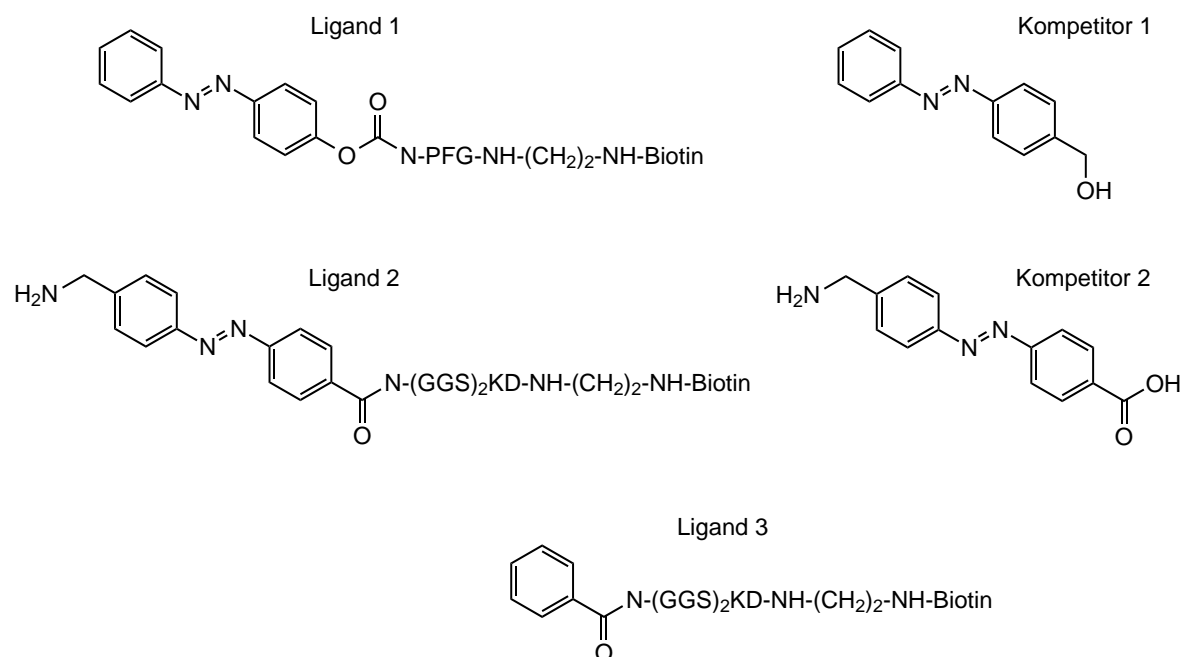


Abb. 2.2 Im *phage display* verwendete Liganden: 4-(Phenylazo)-phenol-O-carbamoyl-N-Pro-Phe-Gly-1,2-diaminoethyl-biotin (Ligand 1, oben-links), 4-(Phenylazo)-benzylalkohol (Kompetitor 1, oben-rechts) 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoyl-N-(Gly₂-Ser)₂-Lys-Asp-1,2-diaminoethyl-biotin (Ligand 2, mitte-links), 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoesäure (Kompetitor 2, mitte-rechts), Benzoyl-N-(Gly₂-Ser)₂-Lys-Asp-1,2-diaminoethyl-biotin (Ligand 3, unten).

Weiterhin kam in der Selektion C ein verändertes Antigen mit besserer Löslichkeit zum Einsatz. Seine geringere Immunogenität durch Vermeidung des Pro-Phe-Gly-Motivs

im verlängerten Linkerbereich ließen eher die Gewinnung eines Azobenzol-bindenden Antikörpers erwarten. Um die Spezifität der Bibliothek auf die Azo-Gruppe zu lenken, wurden in einem zusätzlichen Subtraktionsschritt mit dem Benzoyl-Analogen des Antigens Linker- bzw. Streptavidin-bindende scFvs entfernt.

2.1.2.1 Übersicht zu den durchgeführten Selektionen

In drei verschiedenen Selektionen wurde versucht, Klone mit Spezifität für Azobenzol anzureichern. Die Unterschiede der verwendeten Strategien sind im folgenden kurz zusammengefaßt. Willkürlich ausgewählte Klone nach 7-10 Selektionsrunden wurden mit den Primern fdseq1 und DP47CDR2back sequenziert. Die Sequenzunterschiede sind in Tabelle 2.1 zusammengefaßt. Die Untersuchung der Spezifitäten erfolgte mit ELISA (Kap. 2.1.2.2, 7.5.6).

Selektion A)

Immobilisiertes Antigen: Ligand 1 (Abb. 2.2)

Trägermaterial: Dyna-beads, Streptavidin-beschichtet

Durchführung:

Elution durch Belichtung mit UV-Licht, 356 nm

10 Zyklen

Probleme: lange Trennzeiten der Phasen (begünstigte Rückbindung),

Störung der magnetischen Partikel bei der Abtrennung der Flüssigphase

Ergebnis:

teilweise Konvergenz, 2 Sequenzen populiert (4 bzw. 3 von 11 zufällig gewählten Klonen)

Klone #1, 2, 3, 6 getestet mit ELISA (Abb. 2.4). Alle Klone lassen sich gut exprimieren.

Selektion B)

Immobilisiertes Antigen: Ligand 1

Trägermaterial: Nunc-Röhrchen, Streptavidin-beschichtet

Durchführung:

Elution durch Belichtung, $\lambda = 356$ nm, in Gegenwart von Kompetitor 1

9 Zyklen

Problem: keine signifikanten Unterschiede im Phagentiter zwischen Vorelution und verschieden langen Elutionsdauern bis zum 9. Zyklus

Ergebnis:

teilweise Konvergenz, 2 Sequenzen populiert (andere als in Selektion A), 2 Cluster à 4 bzw. 3 Klone (mit vereinzelt Punktmutationen).

Die Klone #4, 5 lassen sich schlecht exprimieren.

ELISA: Klone #1(=12), 7, 11 positiv (Abb. 2.5) binden jedoch an Oberfläche, lassen sich nicht mit Ligand 1 kompetieren (Abb. 2.6).

Selektion C)

Immobilisiertes Antigen: Ligand 2

Trägermaterial: Nunc-Röhrchen, Streptavidin-beschichtet

Durchführung:

Subtraktionsschritt mit Ligand 3 (Eliminierung von Linker- bzw. Streptavidinbindung)

Elution durch Belichtung, $\lambda = 356$ nm, in Gegenwart von Kompetitor 2

Erhöhung der Stringenz mit jeder Selektionsrunde durch Herabsetzen der Streptavidin-Konzentration bei der Immobilisierung, Erhöhung von Anzahl und Dauer der Waschschr

7 Zyklen

Problem: die präparierte DNA war Sequenzierung nicht zugänglich

Ergebnis: 20 Klone getestet, bei keinem war signifikante Affinität im ELISA nachweisbar.

```

1  EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSA
51 ISGSGGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKxx
101 xxxxFDYWGQ GTLVTVSRGG GSGGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
151 RITCQGDSLRL SYIASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN
201 TASLTITGAQ AEDEADYYCN SSxxxxxxxVV FGGGTKLTVL GAAADDDSD
251 DYKDDDDKHH HHHH*

```

Abb. 2.3 Sequenz der scFv-Fragmente der ETH-2-Bibliothek. x - randomisierte Positionen in CDRH3 (99-104) und CDRL3 (223-228), entspricht Vh95-98, V191-96 nach Tomlinson (1995), * - *amber*-Codon, welches die Fusion mit dem Capsidprotein G3 des Phagen ermöglicht (Kap. 7.5).

Tabelle 2.1 Sequenzen selektierter Klone an den randomisierten Positionen der ETH-2-Bibliothek (Numerierung nach Abb. 2.3).

Klon#	CDRH3 (99-104)	CDRL3 (223-228)	sekund. Mutationen
A1	VGWYTA	PSDNMN	
A2	VYHKKD	ENREPP	Q169R
A3	MNVNYT	DPLQRQ	
A4	VGWYTA	PSDNMN	
A5	MNVNYT	DPLHRQ	
A6	TMMDRG	YPLTES	
A8	VGWYTA	PSDNMN	
A9	MNVNYT	DPLQRQ	
A10	MNPQLT	IPMTRN	
A12	MNVNYT	DPLQRQ	
B1	NDHGDQ	SPARDG	Q82R, N220S
B2	.FRPHN	ENEERP	Q82R
B3	TTPPFG	NPLSET	V116A
B4	TNELY.	NPLRMA	
B5	.AGPYY	ISAESP	
B6	NDHGDQ	SPARDG	Q82R, N220S
B7	FAEA..	PDMGGR	V116A
B8	.LRPHN	VNEERP	
B9	.LRPHN	VNEERP	V116A
B10	NDHGDQ	SPARDG	Q82R, V116A, D246E, D247Y
B11	VGWYTA	PSDNMN	
B12	NDHGDQ	SPARDG	Q82R, V116A, N220S
B17	SIPTR.	NPLQQT	

2.1.2.2 Spezielle Charakterisierungsverfahren

2.1.2.2.1 Klassischer ELISA

Die Spezifitäten der selektierten Klone wurden im ELISA (Kap. 7.5.6) durch Vergleich mehrerer scFvs in einem Experiment charakterisiert. Das genetische Konzept der ETH-2-Phagemide (*pelB-leader*-Sequenz vor, *amber*-Stopcodon nach scFv-Gen) ermöglichte die periplasmatische Expression unfusionierter scFvs (Kap. 7.7.1). Die Assays wurden in ELISA-Platten durchgeführt, welche analog den Selektionsgefäßen modifiziert waren: mit biotinyliertem Antigen, welches über Streptavidin an die Gefäßwand gekoppelt wurde. Die Bindung der scFvs erfolgte an diesen Oberflächen und wurde über ihren C-terminalen FLAG-tag nachgewiesen. Eine Unterscheidung, ob die selektierten scFvs ausschließlich Azobenzol oder auch an Streptavidin binden, gelang jedoch nicht direkt. Um die Spezifität einzugrenzen, wurde daher die Bindung mit gelösten Azobenzolderivaten kompetiert.

Zur effizienteren Bestimmung der Spezifität selektierter Proteine sollte die Azobenzol-Komponente auf einem Trägermolekül präsentiert werden, das nicht bereits zur Selektion verwendet wurde. Dadurch würde die Bindung bei der Untersuchung auf das interessierende Epitop gelenkt.

2.1.2.2.2 Vereinfachter ELISA

Unter Verwendung eines Fusionsproteins aus einem anti-His₆-scFv und alkalischer Phosphatase (AP) sowie eines entsprechenden löslichen Substrats sollten die Schrittzahl und Dauer der Entwicklung der Immunoassays (Kap. 7.5.6) verringert werden (nach Lindner *et al.*, 1997), da diese limitierend für die Sensitivität des Tests war. Mit diesen Experimenten wurden keine auswertbaren Daten für die Spezifität der getesteten scFvs erzielt. Anscheinend ist die Affinität des Konstrukts für die hier beschriebene Anwendung nicht ausreichend.

2.1.2.2.3 Direkter ELISA

Eine Vereinfachung des ELISA war durch Umklonierung der nach Kap. 2.1.2.2.1 positiv getesteten Klone als genetische Fusionen an AP möglich. Hierzu wurde ein Derivat

von pAK100_15L (Lindner *et al.*, 1997) hergestellt (Kap. 9.1.2). Nach ortsspezifischer Mutagenese (verwendete Oligonukleotide in Klammern) zur Einführung der Klonierungsschnittstelle *NotI* (phoA_*NotI*.as) und eines His₆-tags am C-Terminus der AP (phoA_*His*.as) sowie Deletion einer intrinsischen *NcoI*-Sequenz des Vektors (phoA_*delNcoI*.as) ließen sich die selektierten scFv-Gene über *NcoI* und *NotI* direkt in diesen Vektor pscFv-AP klonieren.

Bei Expression selektierter Klone in diesem Format zeigte sich teilweise eine Angleichung der Expressionseffizienz. Bei den scFvs im ursprünglichen Format (im pHEN-Vektor der ETH2-Bibliothek) waren z.T. erhebliche Unterschiede in der Menge exprimierten Proteins zu beobachten. Daher können die Unterschiede nicht durch die selektierte scFv-Sequenz bedingt sein. Als Ursache liegen Mutationen an anderen Stellen im Phagemid nahe. Da diese für die Charakterisierung der scFvs nicht von Bedeutung waren, erfolgte keine nähere Untersuchung.

2.1.2.3 Charakterisierung von selektierten Klonen

Für einen von 10 getesteten Klonen aus Selektion A (Klon A1) konnte im ELISA eine deutliche Affinität zur Ligand 1-modifizierten Streptavidin-Oberfläche gezeigt werden (Abb. 2.4). Die Bindung ließ sich jedoch nicht mit dem löslichen linkerlosen Kompetitor 1 unterdrücken (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 2.6).

Für die Klone B1 (sequenzidentisch mit B12), B7 und B11 der angereicherten Population von Selektion B wurde ebenfalls eine deutliche Bindung beobachtet. Eine Affinität zu Streptavidin ohne Ligand war nicht festzustellen, dies bestätigt die Spezifität zu einer das Antigen enthaltenden Struktur (Abb. 2.5).

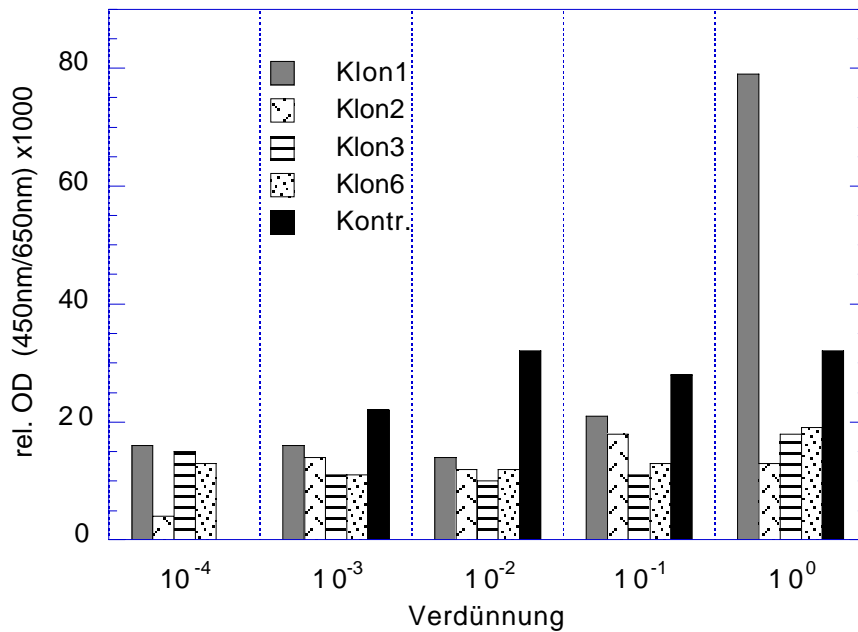


Abb. 2.4 ELISA-Signal verdünnter Expressions-Kulturüberstände, Klone A1, A2, A3, A6, Kontr. (Überstand ohne scFv), 1°AK: α -FLAG mAB-M2, 2°AK: α -mouse::HRP, Entwicklung mit TMB. Nur Klon 1, unverdünnt, zeigte signifikante Bindung.

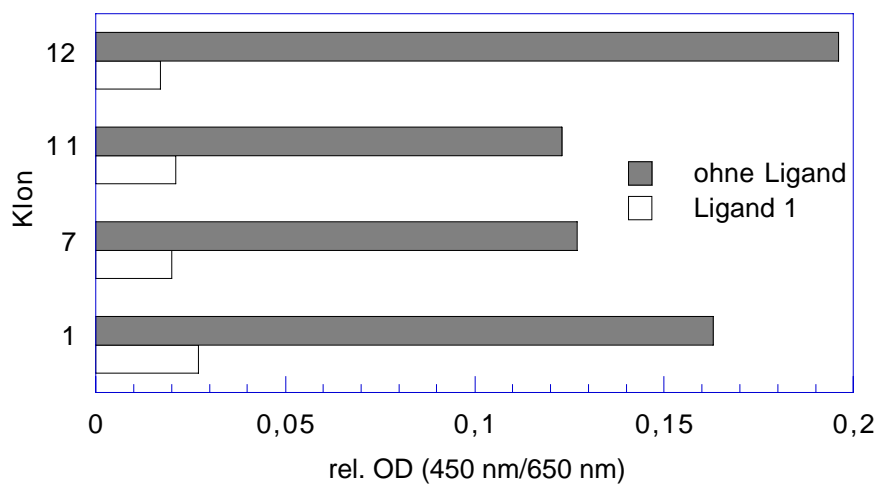


Abb. 2.5 ELISA-Signal unverdünnter Expressions-Kulturüberstände, Klone B1, B7, B11, B12, 1°AK: α -FLAG mAB-M2, 2°AK: α -mouse::HRP, Entwicklung mit TMB. Die Bindung erfolgte an eine Oberfläche mit bzw. ohne immobilisiertem Ligand 1. Die scFvs banden nur bei Präsentation des Liganden.

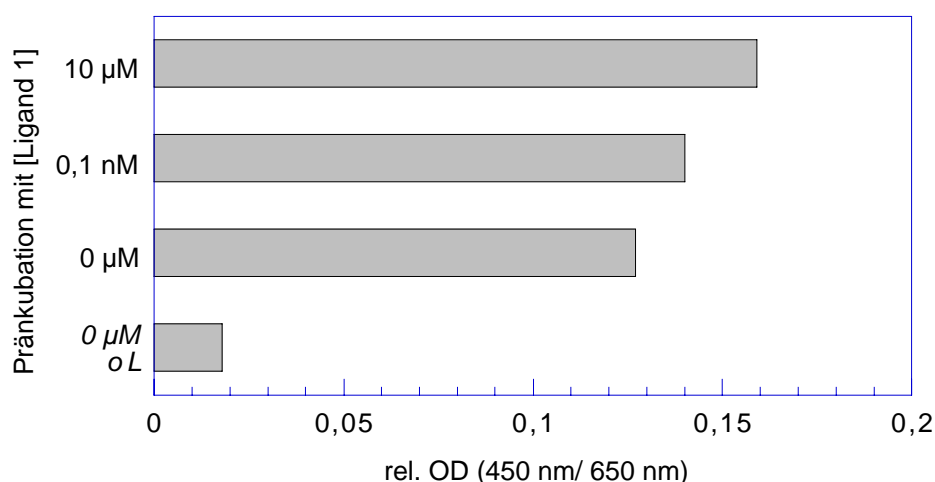


Abb. 2.6 ELISA-Signal unverdünnten Expressions-Kulturüberstands, Klon B12, 1°AK: α -FLAG mAB-M2, 2°AK: α -mouse::HRP, Entwicklung mit TMB. Die Bindung erfolgte nach Präinkubation des Überstands mit gelöstem Ligand 1, (oL) bezeichnet die Bindung an ligandenfreie Streptavidin-Oberfläche. Die Bindung des scFv ließ sich nicht durch Konkurrenz unterdrücken, war jedoch abhängig von der Präsentation des Liganden.

Eine beispielhafte nähere Charakterisierung von Klon B12 ergab folgendes Bild: Ein ELISA unter Konkurrenz mit dem kompletten Liganden 1 (inklusive Linkerpeptid) zeigte keine Verringerung der Bindung (Abb. 2.6). Eine Bindung an ligandenfreies Streptavidin konnte nicht beobachtet werden. Das erkannte Epitop ist demzufolge komplex; es umfaßt offenbar sowohl den immobilisierten Liganden, als auch einen Teil der Streptavidin-Oberfläche. Der Anteil der Bindungsoberfläche zum Liganden allein reicht jedoch nicht aus, um die Wechselwirkung im ELISA kompetieren.

Für Klon B6 wurde eine deutliche Verringerung des ELISA-Signals nach Isomerisierung zum *cis*-Azobenzol festgestellt (Abb. 2.7). Die Bindung dieses Antikörperfragments ist also von der Präsentation des *trans*-Isomers abhängig. Durch die Bedingungen in Selektion B (Elution durch Isomerisierung und Zugabe von Kompetitor 1) konnte somit ein Klon isoliert werden, welcher Isomer-abhängig an eine Azobenzol-präsentierende Streptavidin-Oberfläche bindet.

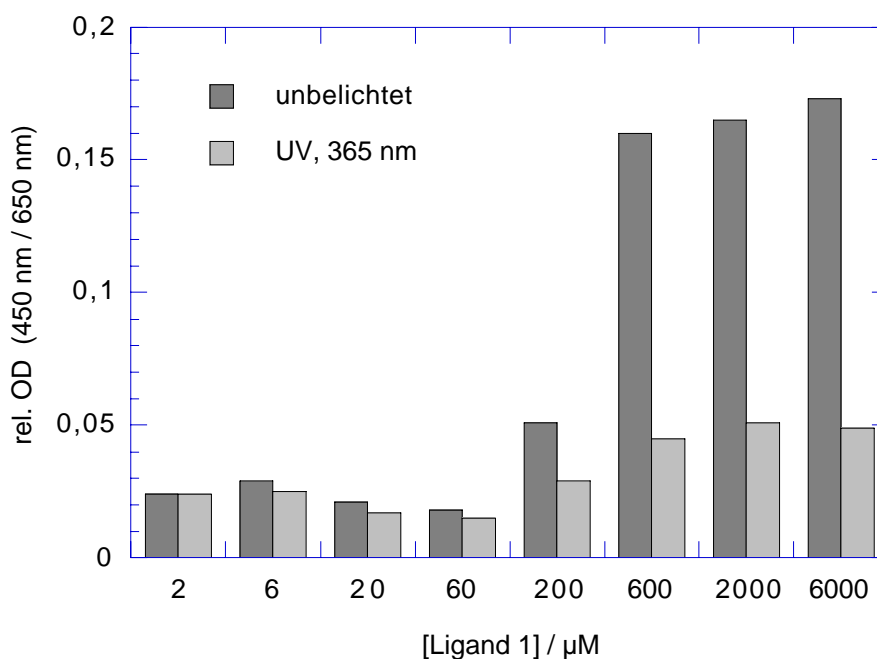


Abb. 2.7 ELISA von unverdünntem Expressions-Kulturüberstand, Klon B6, 1°AK: α -FLAG mAB-M2, 2°AK: α -mouse::HRP, Entwicklung mit TMB. Nach Immobilisierung verschiedener Konzentrationen an Ligand 1 erfolgte die Bindung ohne Belichtung oder unter UV-Belichtung (365 nm). Sie wurde durch UV-Belichtung deutlich vermindert.

Eine Lenkung der Spezifität durch Subtraktion der Phagenbibliothek an einem Träger ohne das Zielmolekül wurde in Selektion C versucht. Hierbei konnte für keinen Klon eine Affinität zu Ligand 2 (Abb. 2.2) im ELISA festgestellt werden. Möglicherweise wurden bereits im Subtraktionsschritt potentielle Azobenzolbinder eliminiert, wenn sie eine hinreichende Affinität zum Ligand 3 zeigten. Als Optimierung der Subtraktionsmethode könnte man nur das Linkerpeptid an der Oberfläche anbieten.

2.1.2.4 Diskussion zur Selektion eines Azobenzol-bindenden scFv

Die hier beschriebenen Versuche mit der Phagenbibliothek ETH-2 führten nicht zur Selektion eines scFv, das spezifisch die Azobenzolgruppe der eingesetzten Liganden bindet. Mögliche Gründe dafür können sowohl an der Art des *targets* liegen, als auch an der verwendeten Bibliothek bzw. Selektionsmethode.

Zur Erzeugung von Antikörpern gegen niedermolekulare Haptene wird zumeist die Kopplung an größere Trägermoleküle genutzt, da kleine Moleküle zumeist eine zu geringe Immunogenität besitzen. In der Folge ist jedoch vor allem eine Erkennung des Liganden am Träger zu erwarten, wie auch hier beobachtet wurde. Bei Elution durch Kompetition mit dem ungekoppelten Hapten wie in Selektion B und C sollte sich die Anreicherung solcher Phagen jedoch unterdrücken lassen (Moghaddam *et al.*, 2001). Offenbar war dies hier nicht erfolgreich. Möglicherweise wäre eine Selektion unter Kompetition jedoch ohne Isomerisierung des Liganden sinnvoller. Damit ließe sich die Elution auf Azobenzol-spezifische scFvs beschränken. Eine Dissoziation von Bindern an komplexe Epitope sollte so vermeidbar sein.

Die Selektion von Proteinen, welche das Trägermolekül erkennen, sollte auch durch Wechsel des Trägers zwischen den Selektionsrunden vermeidbar sein.

Vom Konzept her ist die Verwendung der ETH-2-Bibliothek wahrscheinlich nicht optimal für die experimentelle Fragestellung. Die scFv-Fragmente, welche von den Phagen präsentiert werden, besitzen eng begrenzte randomisierte Bereiche (siehe Kap. 2.1.2). Speziell für kleine Antigene findet man andere Bindungsoberflächentopologien als bei Antikörpern gegen größere Epitope (MacCallum *et al.*, 1996). Nach diesen Statistiken sind die randomisierten Bereiche der verwendeten Bibliothek nur teilweise an der Bindung von Haptenen beteiligt.

Prinzipiell kann die Selektion einer Spezifität im *phage display* nur dann erfolgreich sein, wenn eines der randomisierten Proteine *per se* in der Lage ist, das gewünschte Antigen wenn auch mit niedriger Affinität zu erkennen. Ob ein solches vorhanden ist, läßt sich nur nach erfolgreicher Selektion positiv feststellen, die Umkehrung gilt jedoch nicht. Daher bestehen bessere Chancen zur Selektion eines Azobenzol-bindenden Antikörperfragments mit einer Bibliothek, die speziell für die Bindung von kleinen Liganden konzipiert ist. Die Herstellung einer "präselektierten" (nicht naiven) *phage display*-Bibliothek ist z.B. mit der Klonierung von Antikörperfragmenten aus der Immunantwort (aus den B-Zellklonen) nach Immunisierung von Mäusen mit dem gewünschten Antigen möglich. Ein solches Konzept war ursprünglich im Rahmen dieser Arbeit geplant, wurde jedoch auf-

grund unzureichender zeitlicher Überschneidung nicht genutzt. Eine entsprechende Immunisierung von Mäusen erfolgte inzwischen mit dem Azopeptid Ligand 1 (siehe Abb. 2.2 oben).

Eine weitere Alternative besteht in der gezielten Randomisierung eines Hapten-Binders mit bekannter Struktur, wie des mAB 19G2 aus der Immunantwort auf das Stilben-derivat ASGA (Simeonov *et al.*, 2000). Dabei sollten die randomisierten Positionen auf jene Bereiche fokussiert sein, die statistisch gesehen häufig an der Bindung kleiner (und hydrophober) Antigene beteiligt sind (MacCallum *et al.*, 1996).

Immerhin konnte ein Klon (B6) selektiert werden, dessen Bindung von der Präsentation des *trans*-Isomers abhängt. Somit war die photoselektive Elution im Prinzip erfolgreich. Eine Strategie zur schrittweisen Verbesserung eines Antikörpers durch Mutagenese ist generell denkbar. Da jedoch bei Untersuchung der Spezifität unter Konkurrenz mit Azobenzol kein spezifischer Klon identifiziert werden konnte, bietet sich dies hier nicht an. Insofern stellt auch B6 keine "Leitstruktur" zur Darstellung eines Azobenzolbinders dar. Näheren Aufschluß würde hier eine experimentell bestimmte Kristallstruktur des Antigen-Antikörper-Komplexes geben.

Als Alternative zum *phage display* könnte die Adaption eines bekannten Antikörpers zum rationalen Design einer Leitstruktur für einen Azobenzolbinder möglich sein. Durch einen glücklichen Zufall wurde vor Abschluß der vorliegenden Arbeit ein anti-Stilben-Antikörper von Simeonov *et al.* (2000) publiziert, dessen Struktur die Bindung von Azobenzol-Derivaten denkbar erscheinen ließ. In Anlehnung an diese Arbeiten wurde ein Antikörper gegen Azobenzol rational designed (Kap. 2.1.3).

2.1.3 Rationales Design eines Phenyl-azobenzol-bindenden Fv-Fragments

Die photoisomerisierbare Verbindung Azobenzol ist isoelektronisch zu Stilben. Im *trans*-Zustand sind ihre molekularen Oberflächen nahezu identisch (Abb. 2.8). Die tiefere Kerbe zwischen den aromatischen Ringen des Azobenzols ist aufgrund der freien Elektronenpaare durch eine erhöhte Elektronegativität gekennzeichnet.

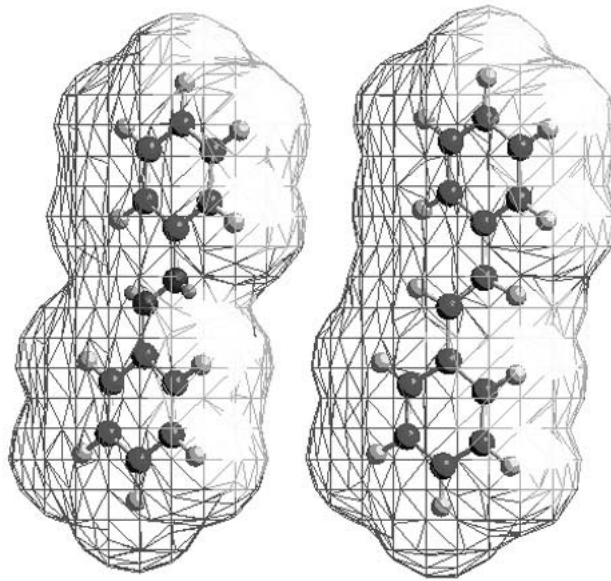


Abb. 2.8 Strukturmodelle mit van-der-Waals-Oberflächen von Azobenzol (links) und Stilben (rechts).

Aufbauend auf dieser Ähnlichkeit wurde der Antikörper 19G2, welcher ein Stilben-derivat bindet (Abb. 2.9; Simeonov *et al.*, 2000), als Vorlage zur Konstruktion eines Azobenzol bindenden scFv-Fragmentes genutzt. Um dieses für *in vivo*-Anwendungen (Kap. 2.1.4) intrazellulär exprimieren zu können, wurden seine CDRs auf ein stabilisiertes Antikörper-Fv-Fragment übertragen.

2.1.3.1 Nutzung eines stabilisierten Fv-Fragmentes für CDR-loopgrafting

Das verwendete Fv-*framework* besteht aus einer V_L-Domäne, welche von MCPc603 (Glockshuber, 1989) durch die Kombination Punktmutationen gezielt stabilisiert wurde (Steinbacher, 1993; Ohage & Steipe, 1999), und der ebenso stabilisierten V_H-Domäne von B1-8 (Wirtz & Steipe, 1999). Die CDRs beider Domänen wurden an den esterolytischen Antikörper 17E8 adaptiert (Ohage *et al.*, 1999). In ihre Gene wurden im Bereich der CDRs Restriktionsschnittstellen zur effizienten Übertragung neuer Spezifitäten eingefügt (Kap. 7.4.4; Wirtz *et al.*, 2003). Dieses rational stabilisierte Fv-Fragment "scFvAR" läßt sich hervorragend löslich im Cytoplasma von *E. coli* exprimieren (12 mg pro Kulturliter). Seine Aggregationstemperatur als Maß für die Stabilität liegt bei 48 °C (ebenda).

Sogenanntes *grafting* von Proteinstrukturen unter Funktionserhalt ist prinzipiell möglich; für Antikörper ließ sich die Übertragbarkeit der Spezifität zeigen (Jones *et al.*, 1986), welche von den CDR-Sequenzen abhängt. Selbst für katalytisch aktive Antikörperfragmente ist ein solches *loopgrafting* möglich (Ohage *et al.*, 1999).

Das Konzept der Bindung eines fremden anstelle des natürlichen Liganden an ein Protein ist eine der Grundvoraussetzungen für die Entwicklung pharmazeutischer Produkte. Anhand von Strukturmodellen der Proteine können künstliche Liganden vor ihrer Synthese entworfen werden (Moon & Howe, 1991). Vor diesem Hintergrund ist die Annahme der Affinität eines Stilben bindenden Antikörpers zu Azobenzol als isoelektronischer Verbindung mit ähnlicher Van-der-Waals-Oberfläche (Abb. 2.8) durchaus gerechtfertigt.

2.1.3.2 Strukturdesign und Herstellung

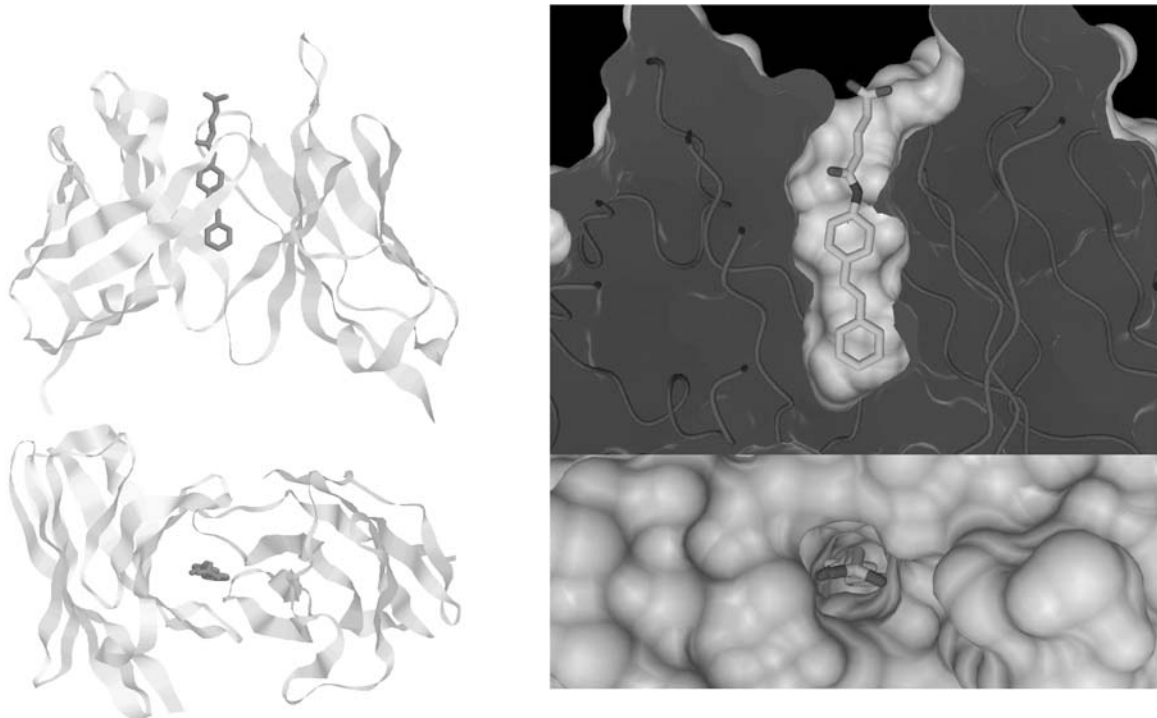


Abb. 2.9 Strukturmodell des Antikörpers 19G2 (1FL3.pdb, Simeonov *et al.*, 2000), Ausschnitte. **Oben links:** Fv-Fragment des Antikörpers (vgl. Abb. 1.2), **oben rechts:** Schnittdarstellung der Antigenbindungstasche (mit freundlicherweise von Dr. K. Zeth zur Verfügung gestellt), **unten:** Sicht jeweils aus der Richtung des Antigens ASGA, Modell um 90° gedreht.

Zur Übertragung der Spezifität von 19G2 auf das stabilisierte Fv-Fragment scFvAR (Kap. 2.1.3) wurden anhand von Strukturmodellen zunächst die antigenbindenden Bereiche von 19G2 ermittelt. Zur Visualisierung der stabilisierten Antikörperdomänen wurden die Raumkoordinaten der pdb-Einträge von 17E8 (1EAP.pdb), von MCPc601 (2IMM.pdb) und ein unveröffentlichter Datensatz des Antikörpers B1-8 (persönliche Mitteilung von T. Simon) als Strukturmodelle genutzt. Eine Überlagerung der Vl- bzw. Vh-Domänen aus diesen mit dem Strukturmodell von 19G2 (1FL3.pdb) erlaubte die Bestimmung antigenkontaktierender AS im Stilben-bindenden Fv (siehe auch Abb. 2.9). Von diesen Positionen sowie benachbarten Resten wurde eine ausschlaggebende Rolle für die Stilbenbindung erwartet, wenn sich ihre Konformation deutlich von jener in den Modellen für Fv-AR unterscheidet. Diese Bereiche wurden für eine Mutagenese zum CDR-*loopgrafting* in Betracht gezogen.

In den Sequenz-*alignments* der Abb. 2.10 sind die auf das stabilisierte *framework* zu übertragenden Bereiche durch ”+” markiert. Anhand dieser Festlegungen wurde die Mutagenese mit einer effizienten Methode zur Änderung der CDR-Sequenzen durchgeführt. Der namensgebende Verdau parentaler DNA erlaubt bei dieser *restriction selection* (Kap. 7.4.4; Wirtz *et al.*, 2003) eine Sechsfach-Mutagenese des Vektors pTscFv-AR in einem Schritt. Zur Durchführung der Mutagenese wurden die Oligonukleotide Asth1-3 und Astl1-3 verwendet.

Das so hergestellte Antikörper-Fragment (aSt-scFv) mit den an 19G2 adaptierten CDRs ließ sich im Cytoplasma von *E.coli* sehr gut löslich exprimieren (Ausbeute 8 mg/l Kultur) und durch IMAC (Kap. 7.8.2) reinigen. Damit war das *loopgrafting* unter Beibehalt der cytoplasmatischen Exprimierbarkeit erfolgreich. Die Aggregationstemperatur des synthetischen Antikörperfragments aSt-scFv liegt bei 41 °C (Wirtz *et al.*, 2003), es besitzt demzufolge eine deutlich erhöhte thermodynamische Stabilität gegenüber typischen natürlichen variablen Domänen. Die übertragenen Sequenzen interferieren offenbar nicht mit der Faltung bzw. Expression.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Spezifität von 19G2 erhalten werden konnte und ob sich eine Affinität zu Azobenzol feststellen läßt.

VH										
		01								_50
VH-AR	M	AEVKLQQSGAE	LVKPGGSVKL	SCKASGYTFT	DHVIHWVKQR	PGQGLEWIGY				
19G2H		AALLESGGG	LVKPGGSLKL	SCTASGITFS	RYIMSWVRQI	PEKRLEWVAS				
aStH	M	AEVKLQQSGAE	LVKPGGSVKL	SCKASGYTFT	RYIMSWVKQR	PGQRLEWIGS				
mut.		-- -- --	-	- - -	+++++	- -	---+	---+		
cons.		EVQLQeSGgE	LVKPGaSVKL	SCKASGYTFT	SYYMnWVKQR	PGkGLEWIGY				
		51								_100
VH-AR		ISPGNGHVKY	NEKFKSKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCKRSY				
19G2H		IS.SGGITYY	PDSVAGRFTI	SRDNVRNILY	LQMSSLRSED	TALYYCARG.				
aStH		INPGNGSTYY	NEKFKSKATL	TVDKSSSTAY	MQLSSLTSED	SAVYYCARG.				
mut.		+--- +++	-----	- - - - -	- - -	- -	---	----		
cons.		INPGNGStNy	NEKFKGKATL	TrDKSSSTAY	lQLSSLTSED	SAVYYCARDy				
		101		120						
VH-AR		YGSSHVDYWG	QGTTLTVSSH	HHHHH						
19G2H		QGR...PYWG	QGTSVTVSAA							
aStH		QGR...PYWG	QGTTLTVSSH	HHHHH						
mut.		+-----	-- --							
cons.		YySGYFDYWG	QGTTVTVSS							
VL										
		01								_50
VL-AR	M	AIVMTQ.PSS	LSVSLGERVT	ISCRASTSVS	NH....LAWYQQKP	GQPPKLLIYE				
19G2L		AALTQSPVS	NPVTLGTSAS	ISCRSTKSL	HSNGITYLYWYLQKP	GQSPQLLIYQ				
aStL	M	AIVMTQ.PSS	LSVSLGERVT	ISCRASKSLS	SY....LYWYQQKP	GQPPKLLIYK				
Mut.		--- - -	-- - ----	---+ +-	+++++++ +	- -	- -	+		
cons.		DIVMTQSPSS	LSVSLGERVT	ISCRASQSVS	sY....LAWYQQKP	GQSPKLLIYk				
		51								100
VL-AR		ASTREPGVPD	RFSGSGSGTD	FTLTISSVQA	EDLAVYYCQQ	DHSYPLTFGA				
19G2L		MSNLASGVPN	RFSSSGSGTD	FTLRINTVEA	EDVGVYYCAQ	NLELPPTFGA				
aStL		ASNLAGVPD	RFSGSGSGTD	FTLTISSVQA	EDLAVYYCAQ	NLELPPTFGA				
Mut.		- ++++ -	-	- - - -	-- +	++++ +				
cons.		ASNLAGVPD	RFSGSGSGTD	FTLTISSVEA	EDLAtYYCQQ	DSSYPLTFGG				
		101								
VL-AR		GTKLELKH	HHH	HH						
19G2L		GTKLELKRA								
aStL		GTKLELKH	HHH	HH						
Mut.			--							
cons.		GTKLEIKRA								

Abb. 2.10 Sequenzalignment zur Übertragung der Spezifität von 19G2 auf Fv-AR durch CDR-loopgrafting. Sequenzen des stabilisierten *framework* "Fv-AR", des anti-Stilben-mAB 19G2, des resultierenden, chimären anti-Stilben-Fv "aSt-Fv" und der Konsensus-Sequenzen Vh bzw. Vκ-kombiniert (cons, Steipe, a). Mutationen, welche zur Herstellung von aSt in FvAR eingeführt wurden, sind mit (+), verbliebene Sequenzunterschiede zu 19G2 mit (-) gekennzeichnet, CDRs überstrichen. Das N-terminale Met wurde prozessiert (vgl. Ohage & Steipe, 1999).

2.1.3.3 Überprüfung der Spezifitäten von aSt-Fv

2.1.3.3.1 Fluoreszenztitration der Affinität zu ASGA

Für die Experimente zur Bestimmung der Spezifität von des synthetischen aSt-Fv-Fragmentes wurden die Verbindungen 4-Aminostilben-N-glutaramid (ASGA) und 4-Amino-phenylazobenzol-N-glutaramid (PZGA) genutzt (Abb. 2.11).

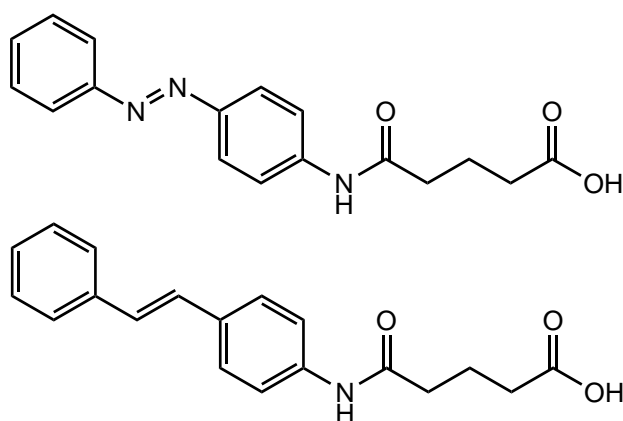


Abb. 2.11 Liganden von aSt-Fv: 4-Amino-phenylazobenzol-N-glutaramid (PZGA, oben) und 4-Aminostilben-N-glutaramid (ASGA, unten).

Infolge der Bindung des Stilbenderivats ASGA durch den mAB 19G2 wurde eine dramatische Zunahme der Stilben-Fluoreszenz beschrieben (Simeonov *et al.*, 2000). Einen solchen Effekt zeigte das stabilisierte, intrazellulär exprimierbare aSt-scFv ebenfalls. In Gegenwart dieses Proteins findet also ebenfalls eine sterische Hinderung der Relaxation optisch angeregter Stilbene statt, wie sie für 19G2 beschrieben wurde; diese Eigenschaft konnte also übertragen werden.

Diese Fluoreszenzzunahme erfolgte nur in Gegenwart des Fv-Fragments wie ein Vergleich mit den Spektren in Gegenwart der isolierten aSt-Domänen Vh und Vl zeigte, bei denen keine Fluoreszenzsteigerung des Stilbens beobachtet wurde (Abb. 2.12). Da die Anwesenheit beider Domänen Voraussetzung für die sterische Einschränkung des angeregten Chromophors ist, welche zur Fluoreszenz führt, läßt sich dies als spezifische Bindung durch das Fv-Fragment interpretieren.

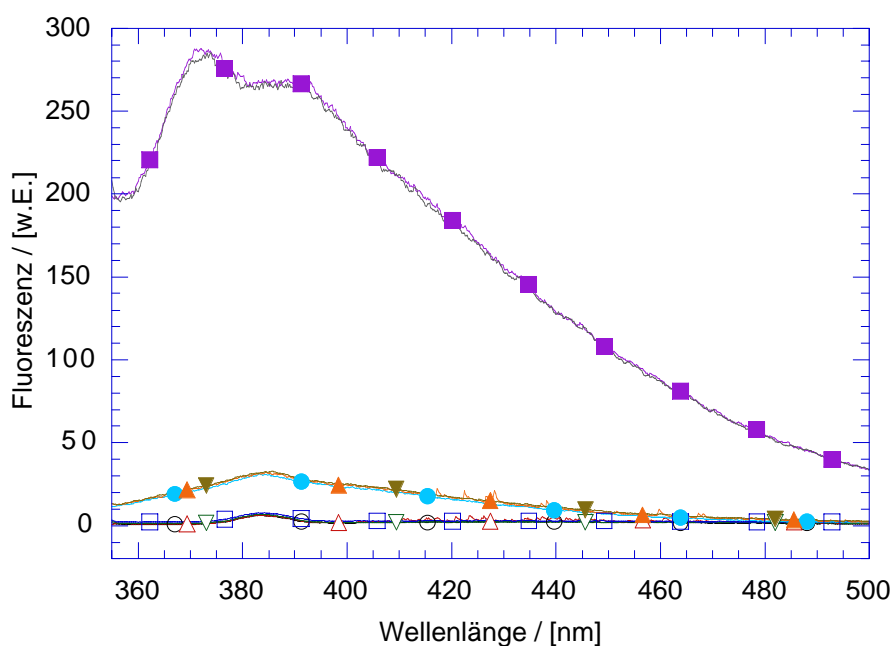


Abb. 2.12 Fluoreszenzspektren von ASGA und aSt, $\lambda_{\text{EX}} = (340 \pm 2.5) \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} \pm 10 \text{ nm}$, PBS, 1 % DMSO, ohne Protein (O, ●), 1 μM aSt: VI (Δ , \blacktriangle), Vh (∇ , \blacktriangledown), Fv (\square , \blacksquare), ohne Ligand (offene Symbole), 1 μM ASGA (gefüllte Symbole), Fv mit ASGA zwei aufeinanderfolgende Messungen. Das Stilbenderivat zeigte deutliche Fluoreszenz in Gegenwart von aSt-Fv.

Die spektroskopische Änderung bei Bindung des Aromaten an das Fv wurde zur Bestimmung der Affinität des stabilisierten aSt-scFv zu ASGA genutzt. Zum Vergleich mit dem mAB 19G2 wurde das periplasmatisch exprimierte, also oxidierte scFv für eine Fluoreszenztitration unter Variation der Ligandenkonzentration eingesetzt. Die Dissoziationskonstante $K_D = (390 \pm 40) \text{ nM}$ konnte durch Anpassung einer Funktion für bimolekulare Reaktion (Kap. 2.1.3.3.3, Gl. 2.9) an die gemessenen Daten ermittelt werden (Abb. 2.13). Dieser Wert ist dem durch Gleichgewichtsdialyse von Simeonov *et al.* (2000) für 19G2 bestimmten $K_D = 160 \text{ nM}$ für trans-Stilben erstaunlich nahe. Abweichungen von dem Reaktionsmodell, welches aus theoretischen Überlegungen zur Auswertung in Betracht kam (Gl. 2.1), wurden aufgrund der guten Korrelation der Funktion mit den Meßdaten nicht deutlich. Die Spezifität des Originalantikörpers wurde demzufolge ohne deutliche Veränderung der Affinität auf das stabilisierte Fv-Fragment übertragen.

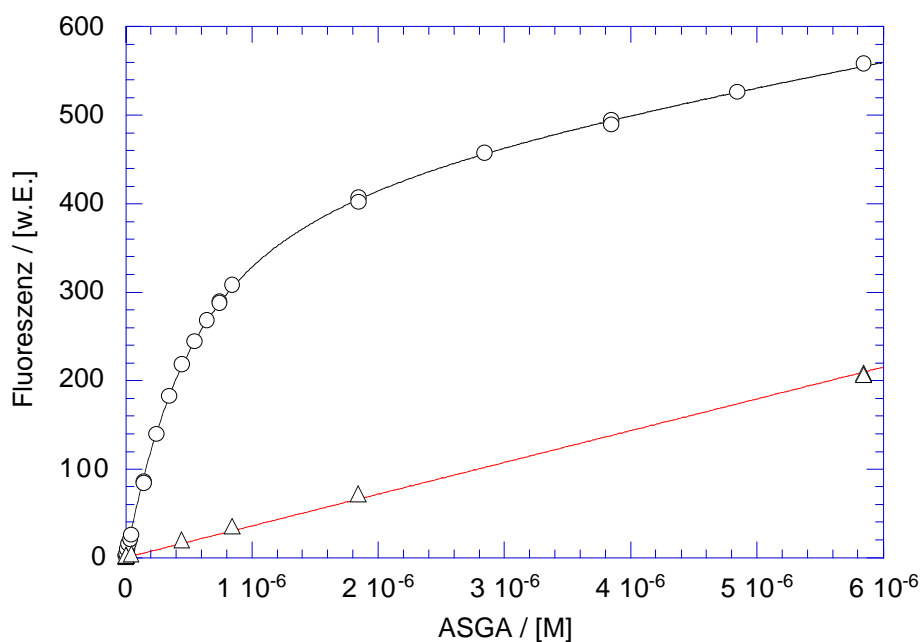


Abb. 2.13 Fluoreszenztitration der Affinität von aSt-scFv (oxidiert) zu ASGA. 250 nM Protein (O), ohne Protein (Δ), PBS, 1 % DMSO, $\lambda_{\text{EX}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{EM}} = 410$ nm, Fit für bimolekulare Reaktion, $K_D = (386 \pm 42)$ nM.

In einem weiteren Experiment wurde die Signalzunahme infolge zunehmender Proteinmenge bei konstanter Konzentration des fluoreszenten Liganden verfolgt. Bei der hier dargestellten Messung wurde das cytoplasmatisch exprimierte Fv-Heterodimer eingesetzt, um festzustellen, inwiefern die Affinität durch die kovalente Domänenverknüpfung beeinflusst wird (Abb. 2.14). Das halbmaximale Fluoreszenzsignal lag bei 0.4 μM aSt-Fv. Durch Anpassung einer Gleichung für bimolekulare Reaktion (Gl. 2.9) wurde ein K_D von (360 ± 60) nM ermittelt; das Fehlerintervall lag im Bereich der zuvor beschriebenen Messung. Die Daten ließen sich jedoch nicht sinnvoll mit dem Modell (Gl. 2.1) beschreiben. Hier hing die Affinität des Fv zu seinem Liganden offenbar aufgrund eines vorgelagerten Gleichgewichts von der Fv-Dimerisierung ab (Gl. 1.1, siehe auch Abb. 3.1). Ein solch komplexer Zusammenhang war hier zu erwarten. Sein Einfluß auf die tatsächlich beobachtbare Reaktion hängt von den einzelnen Gleichgewichtskonstanten ab. Für die geplanten Anwendungen des Antikörperfragmentes (Kap. 2.1.1, 2.1.4) ist die ligandenabhängige

Assoziation eine Voraussetzung. Eine kubische Gleichung, welche diesen Zusammenhang beschreibt, ist unter Kap. 2.1.3.3.3 zu finden (Gl. 2.15). Sie ließ sich unter den gegebenen Voraussetzungen nicht explizit herleiten, eine nähere Untersuchung wurde mit dieser Methode nicht verfolgt, da eine signifikante Affinität von aSt zu ASGA durch die vorliegenden Experimente bestätigt werden konnte (siehe auch Kap. 2.1.3.3.3 Abschnitt nach Gl. 2.15).

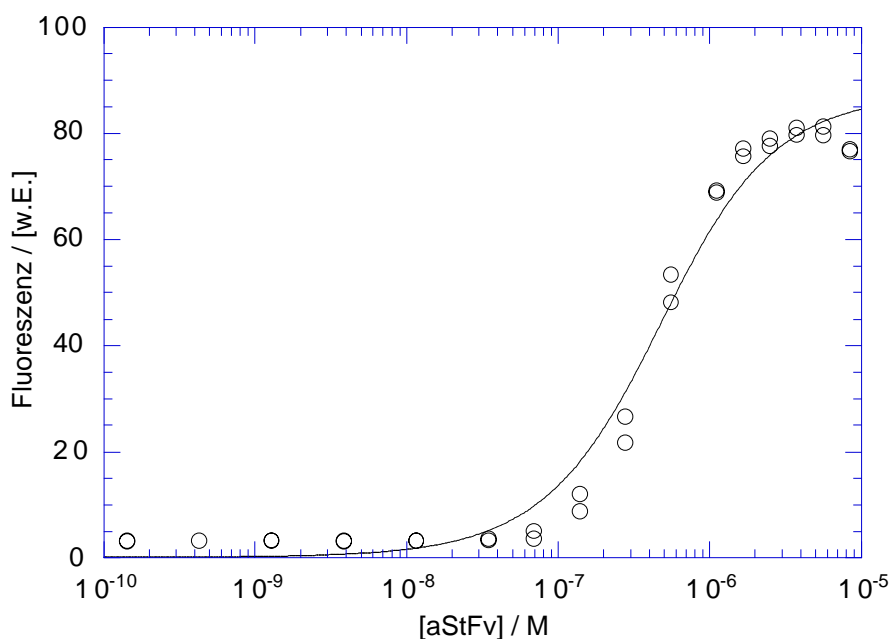


Abb. 2.14 Fluoreszenztitration der Affinität von aSt-Fv (Dimer, reduziert), 225 nM ASGA, sonst wie in Abb. 2.13, Anpassung einer Gleichung für bimolekulare Reaktion mit $K_D = (358 \pm 55)$ nM.

2.1.3.3.2 Fluoreszenztitration der Affinität zu PZGA

Eine Abschätzung der Affinität des Proteins zum Azobenzolderivat PZGA (Abb. 2.11) gelang ebenfalls durch Fluoreszenztitration. Die Bindung des nichtfluoreszenten Liganden führte zu einem deutlichen *quenching* der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz. Die beiden Tryptophane Wh49 und Wh106 liegen in direkter Nachbarschaft der Antigenbindungstasche, die konservierten (Wh38, W140) befinden sich neben den ebenfalls als Fluoreszenz-*quencher* wirksamen Disulfidbrücken, wie aus dem Strukturmodell von 19G2 ersichtlich ist. Daher war im oxidierten scFv mit gebundenem PZGA eine nahezu vollstän-

dige Fluoreszenz-Löschung zu erwarten. Die Messung wurde analog zu Abb. 2.13 durchgeführt. Das halbmaximale Fluoreszenzsignal lag bei 1 μM PZGA. Durch Anpassung der entsprechenden Funktion (Gl. 2.7) wurde die Dissoziationskonstante für das oxidierte scFv mit $K_D = (980 \pm 40)$ nM bestimmt (Abb. 2.15). Damit schien die Affinität von aSt zu PZGA gegenüber ASGA nur geringfügig schwächer.

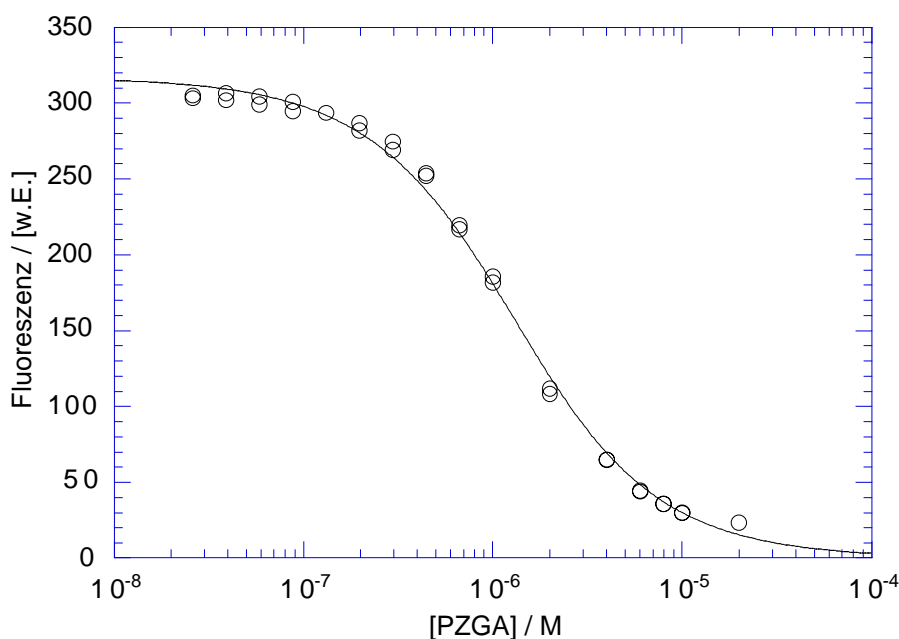


Abb. 2.15 Fluoreszenztitration der Affinität von aSt-scFv (oxidiert) zu PZGA, 0.6 μM Protein, PBS, 1 % DMSO, $\lambda_{\text{EX}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{EM}} = 335$ nm, Fit für bimolekulare Reaktion mit $K_D = (984 \pm 41)$ nM.

Eine bimolekulare Reaktion beschrieb den Titrationsverlauf auch hier nicht exakt, wenngleich die Abweichung weniger deutlich wurde als in Abb. 2.14. Allerdings blieb die Proteinkonzentration hier wie auch bei der in Abb. 2.13 dargestellten Titration konstant. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß mit der Sonde Trp-Fluoreszenz ein molekularer Vorgang beobachtet wurde, welcher bei Messung der Stilbenfluoreszenz nicht detektiert wurde. Aufgrund des anderen Liganden PZGA war keine Veränderung des Reaktionsmechanismus zu erwarten (siehe Abb. 3.1). Daher weisen die Abweichungen in Abb. 2.15 auf eine vorgelagerte Reaktion hin, welche die Umgebung der Tryptophane beeinflusst. Diese

Reaktion findet offenbar auch im scFv statt! Aufgrund der hohen lokalen Konzentration der Dimerisierungspartner ist die eigentliche Dimerisierung hier unwahrscheinlich. Möglicherweise findet im scFv aber eine Antigen-induzierte Umorientierung der Domänen in Bezug auf ihre Assoziationsoberfläche statt. In der Kristallstruktur des Komplexes von 19G2 mit dem zwischen den Domänen gebundenen Antigen (1FL3.pdb) ist eine leicht verdrehte VI-Vh-Orientierung gegenüber Fv-Fragmenten mit "normaler" Quartärstruktur zu erkennen. Eine Umorientierung kann über die Änderung der Trp-Umgebung zur Beeinflussung des Fluoreszenzsignals führen.

Die Ergebnisse lassen sich nicht genauer quantifizieren, geben jedoch einen guten Hinweis auf vorhandene Affinität und vorgelagerte Dimerisierung. Mit der unabhängigen Methode ITC wurde eine analoge Titration durchgeführt, deren Ergebnisse in dieselbe Richtung weisen (Kap. 2.1.3.3.4); deshalb wurde im folgenden von einer ausreichenden Affinität des Proteins zu dem verwendeten Azobenzol-Derivat ausgegangen.

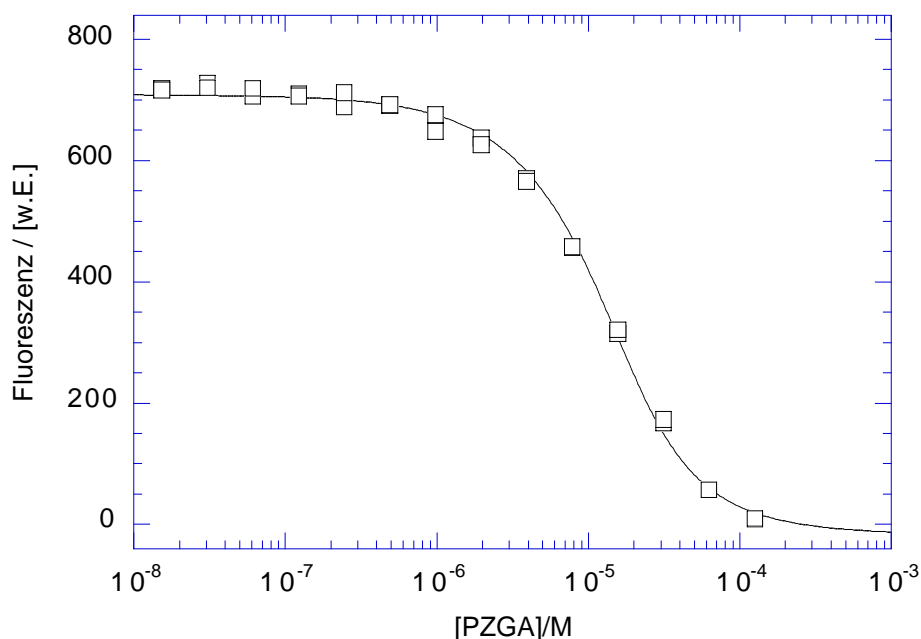


Abb. 2.16 Fluoreszenztitration zur Konkurrenz der Bindung von ASGA an aSt-scFv (red.) durch PZGA. 1 μ M Protein, 2 μ M ASGA, PBS, 1 % DMSO, $\lambda_{\text{EX}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{EM}} = 410$ nm.

Um das Verhältnis der Bindungskonstanten zu den beiden Liganden in einem Experiment zu untersuchen, wurde eine Fluoreszenztitration von scFv-gebundenem ASGA mit PZGA als Kompetitor unternommen (Abb. 2.16). Auch hier zeigte sich eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz, infolge der Verdrängung des fluoreszenten Liganden mit steigender PZGA-Konzentration. Die halbmaximale Fluoreszenzsignal lag im Bereich von 10 μM PZGA, dies korreliert mit einer höheren Affinität zu ASGA. Die Anpassung einer Funktion, welche eine einfache Competition beschreibt, war hier nicht sinnvoll möglich. Die dargestellte Kurve enthält einen negativen Wert für den Fluoreszenzkoeffizienten des freien Liganden. Dieser Befund ließ sich durch Fluoreszenz-*shielding* erklären; PZGA absorbiert deutlich bei Konzentrationen über 10^{-5} M im Bereich der Anregungswellenlänge ($\lambda = 340$ nm, $\epsilon_{\text{trans}} \approx 25\,000$ l/(mol*cm)). Eine komplexere Funktion zur Auswertung der Daten wurde nicht explizit hergeleitet.

2.1.3.3.3 Mathematisches Modell für die Fluoreszenztitrationen

Für das Gleichgewicht



gilt die Gleichgewichtskonstante K_D mit den Gleichgewichtskonzentrationen $[X]_G$ und

$$\text{Gl. 2.2} \quad K_D = \frac{[P]_G [L]_G}{[PL]_G}.$$

Weiterhin ergeben sich mit den initialen Konzentrationen $[X]_0$ nach dem Massenwirkungsgesetz die Zusammenhänge

$$\text{Gl. 2.3} \quad [P]_G = [P]_0 - [PL]_G; \quad [L]_G = [L]_0 - [PL]_G.$$

Durch Einsetzen erhält man die quadratische Gleichung

$$\text{Gl. 2.4} \quad [PL]_G^2 - ([P]_0 + [L]_0 + K_D)[PL]_G + [P]_0[L]_0 = 0.$$

Wenn $[L]_0 = 0$, gilt auch $[PL]_G = 0$, daher ist die positive Halblösung der Gleichung physikalisch nicht sinnvoll. Es ergibt sich die explizite Form der Gleichung für die Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht mit

$$\text{Gl. 2.5} \quad [PL]_G = \frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2} - \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [P]_0[L]_0}.$$

A) Für das Fluoreszenzsignal Fl gilt unter Annahme zweier fluoreszenter Proteinspezies mit verschiedenen Fluoreszenzkoeffizienten fl_P, fl_{PL}

$$\text{Gl. 2.6} \quad Fl = fl_P [P]_G + fl_{PL} [PL]_G.$$

Nach Einsetzen erhält man

$$\text{Gl. 2.7} \quad Fl = fl_P \frac{[P]_0 - [L]_0 - K_D}{2} + fl_{PL} \frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2} + (fl_P - fl_{PL}) \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [P]_0[L]_0}.$$

B) Unter Annahme zweier fluoreszenter Ligandenspezies mit verschiedenen Fluoreszenzkoeffizienten fl_L, fl_{PL}

$$\text{Gl. 2.8} \quad Fl = fl_L [L]_G + fl_{PL} [PL]_G$$

ergibt sich das Fluoreszenzsignal Fl entsprechend zu

$$\text{Gl. 2.9} \quad Fl = fl_L \frac{[L]_0 - [P]_0 - K_D}{2} + fl_{PL} \frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2} + (fl_L - fl_{PL}) \sqrt{\left(\frac{[P]_0 + [L]_0 + K_D}{2}\right)^2 - [P]_0[L]_0}.$$

Gl. 2.7 und Gl. 2.9 wurden zur Anpassung von Funktionen an die Daten der Fluoreszenztitrationen (Kap. 2.1.3.3 und 2.3.2.3 genutzt, um rechnerisch die jeweiligen Dissoziationskonstanten zu bestimmen.

Fluoreszenztitrationen unter Variation der Proteinkonzentration ließen sich durch diese Funktionen nicht genau beschreiben. Eine Gleichung für einen komplexeren Mechanismus unter Annahme eines vorgelagerten Dimerisierungsgleichgewichts wurde wie folgt abgeleitet:

Für das zusammengesetzte Gleichgewicht



gelten unter der Voraussetzung $[A]_0 = [B]_0$ die Gleichgewichtskonstanten

$$\text{Gl. 2.11} \quad K_p = \frac{[A]_G \cdot [B]_G}{[P]_G} \quad \text{und} \quad K_D = \frac{[P]_G \cdot [L]_G}{[C]_G}.$$

Weiterhin nach dem Massenwirkungsgesetz

$$\text{Gl. 2.12} \quad [P]_0 = [A]_G + [P]_G + [C]_G; \quad [L]_0 = [L]_G + [C]_G.$$

Durch Einsetzen erhält man die quadratische Gleichung

$$\text{Gl. 2.13} \quad [C]_G^2 - 2 \frac{K_C}{[L]_G} [P]_0 - [L]_0 + [L]_G + \frac{K_P}{2} [C]_G + \frac{[L]_G^2}{K_C^2} (2[P]_0[L]_G - 2[L]_0[L]_G - 2[P]_0[L]_0 + [P]_0^2 + [L]_0^2 + [L]_G^2) = 0.$$

Wenn $[P]_0 = 0$, gilt auch $[C]_G = 0$, daher ist die positive Halblösung der Gleichung nicht sinnvoll. Es ergibt sich für die Konzentration des Komplexes im Gleichgewicht die nicht explizite Gleichung

$$\text{Gl. 2.14} \quad [C]_{G,2} = \frac{[L]_G}{[K]_C} [P]_0 - [L]_0 + \frac{K_P}{2} + [L]_G - \sqrt{\frac{K_P^2}{2} + K_P[P]_0 - K_P[L]_0 + K_P[L]_G}.$$

Nach Einsetzen in die Gleichung für die Fluoreszenzintensität erhält man

$$\text{Gl. 2.15} \quad Fl = f_{PL}[L]_0 + (f_{PL} - f_P) \frac{[L]_G}{[K]_C} [P]_0 - [L]_0 + \frac{K_P}{2} + [L]_G - \sqrt{\frac{K_P^2}{2} + K_P[P]_0 - K_P[L]_0 + K_P[L]_G}.$$

Diese Gleichung wird nur unter bestimmten Voraussetzungen explizit darstellbar. So läßt sie sich bei großem Überschuß an Ligand gegenüber Protein (Sättigung) unter der Annahme $[L]_0 \cup [L]_G$ näherungsweise vereinfachen.

Mit den verwendeten Verbindungen und Fluoreszenzspektroskopie als Meßmethode ließen sich Versuche jedoch nicht unter derartigen Bedingungen durchführen. Sowohl die Hydrophobizität als auch die Absorbtionseigenschaften der Liganden ASGA und PZGA schlossen einen Einsatz in dafür ausreichend hohen Konzentrationen bei den Fluoreszenztitrationen aus. Eine untere Konzentrationsgrenze an Reaktanden war durch die Empfind-

lichkeit des Fluoreszenz-Spektrometers gesetzt. Die Ergebnisse lassen sich zwar nicht genauer quantifizieren, geben jedoch einen guten Hinweis auf vorhandene Affinität und vorgelagerte Dimerisierung. Mit der unabhängigen Methode ITC wurde eine analoge Titration durchgeführt, deren Ergebnisse in dieselbe Richtung weisen; deshalb wurde im folgenden von einer ausreichenden Affinität des Proteins zu dem verwendeten Azobenzol-Derivat ausgegangen.

2.1.3.3.4 *trans*-/*cis*-Spezifität

In der Röntgen-Kristallstruktur von 19G2 (1FL3.pdb) wird nur die Bindung des *trans*-Stilbens dargestellt (Abb. 2.9). Simeonov *et al.* (2000) konnten durch Kompetitions-experimente auch eine zehnfach schwächere Bindung des *cis*-Isomers beobachten. Für die Nutzung von aSt-Fv als *cis/trans* abhängiger Schalter (2.1.4) wäre eine deutliche Diskriminierung der Azobenzolisomere Voraussetzung.

Zur Untersuchung der differentiellen Affinitäten zu den Isomeren war Fluoreszenztitration als Methode ungeeignet. Wenn die PZGA-aSt-Komplexe der beiden Isomere unterschiedliche Fluoreszenz-Intensitäten zeigen, ließe sich daraus nicht folgerichtig auf einen Affinitätsunterschied schließen. Unterschiedlich effizientes *quenching* der Tryptophanfluoreszenz bei vergleichbarer Bindung könnte ebenfalls diesen Effekt nach sich ziehen.

Eine selektive Methode, die Bindung verschiedener Isomere zu charakterisieren, ist die direkte Messung der freiwerdenden Reaktionswärme. Die isothermale Titrations-Kalorimetrie (ITC, Kap. 7.11) erlaubt bei etwa zehnfach höheren Konzentrationen (Protein aStscFv 20 μ M, PZGA 320 μ M) deren Bestimmung und theoretisch auch eine Berechnung der Gleichgewichtskonstanten.

Experimente mit zuvor auf all-*trans* oder 80 % *cis* geschaltetem PZGA (Kap. 7.10.5) zeigten deutliche Unterschiede für den Verlauf dieser Titrations (Abb. 2.17). Im Fall des all-*trans*-Liganden wurde die Sättigung bereits nach Zugabe wesentlich kleinerer Volumina erreicht. Im "80 %-*cis*"-Experiment war für die Sättigung eine größere Menge an Ligandenlösung nötig. Weiterhin fiel die zunächst deutlich kleinere und bis zur Sättigung leicht zunehmende Amplitude der Reaktionswärme auf. Dieser Kurvenverlauf

korrelierte gut mit dem initialen Anteil von 20 % *trans*-Azobenzol und der fortschreitenden *cis*→*trans*-Konversion; eine deutliche Reaktion mit dem *cis*-Isomer konnte daraus nicht abgeleitet werden. Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von *cis*-PZGA (Abb. 2.18) ließ sich anhand der durchgeführten Titrations zumindst die qualitative Aussage treffen, daß für *cis*-Azobenzolderivate eine deutlich geringere Affinität vorliegt. Eine Abschätzung war nur schwer möglich, sie sollte sich zumindest um mehr als eine Größenordnung von derjenigen zu *trans* unterscheiden. Ein solches Verhältnis der Affinitäten zu Stilbenisomeren wurde für 19G2 ebenfalls bestimmt (Simeonov *et al.*, 2000). Eine genauere Bestimmung der Bindungskonstanten für beide PZGA-Isomere auf diesem Weg ließ die thermisch aktivierte Konversion von *cis*-PZGA nicht zu.

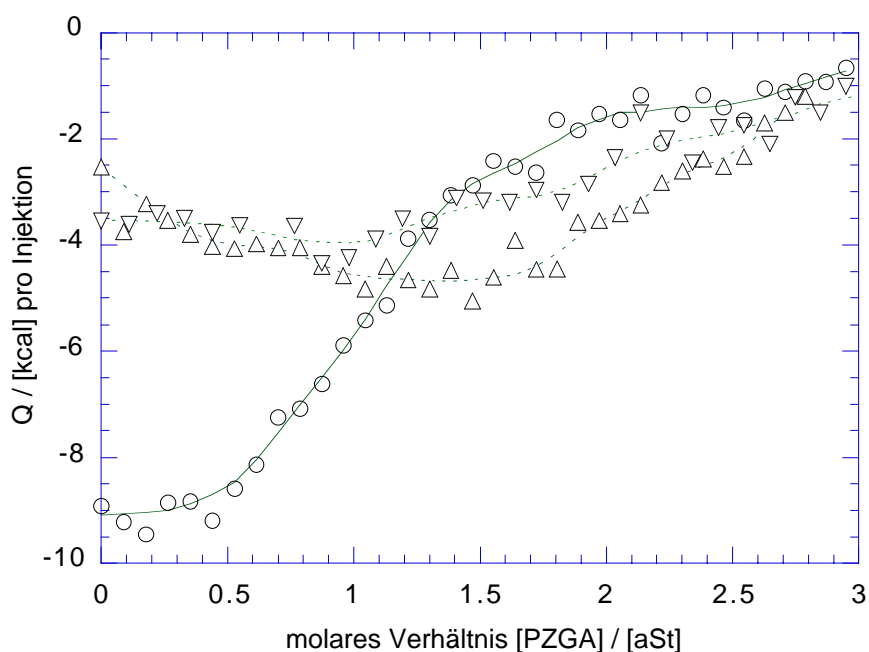


Abb. 2.17 Diskriminierung von *cis*- und *trans*-PZGA durch aSt-scFv. Isothermale Titrationskalorimetrie, PBS, 1 % DMSO, 20 μ M aSt-scFv vorgelegt, 320 μ M PZGA injiziert, all-*trans* (O) bzw. vor Beginn der Messung durch UV-Belichtung ($\lambda = 356$ nm, siehe Kap. 7.10.5) zu 80 % *cis* isomerisiert (Δ und ∇ , zwei Experimente). An die Daten wurden zu 20 % gewichtete Graphen angepaßt. Bei der Titration mit all-*trans*-PZGA wurde pro Injektion mehr Wärme frei, und die Stöchiometrie wurde eher erreicht.

2.1.3.3.5 Thermische Konversion von PZGA

Zur Ermittlung der Halbwertszeit einer thermisch aktivierten Umwandlung von *cis*- zu *trans*-Azobenzol wurden zeitabhängig Spektren von PZGA aufgenommenen (Abb. 2.18), welches zuvor durch UV-Belichtung zu 80 % *cis* isomerisiert wurde (Kap. 7.10.5). Um einen möglichen Effekt der Proteinbindung auf die Konversion festzustellen, erfolgten die Experimente sowohl mit "freiem" PZGA als auch in Gegenwart von aStscFv in stöchiometrischen Konzentrationen. Die mit dem Fv-Fragment aufgenommenen Spektren zeigten eine deutliche Schulter der Proteinabsorption.

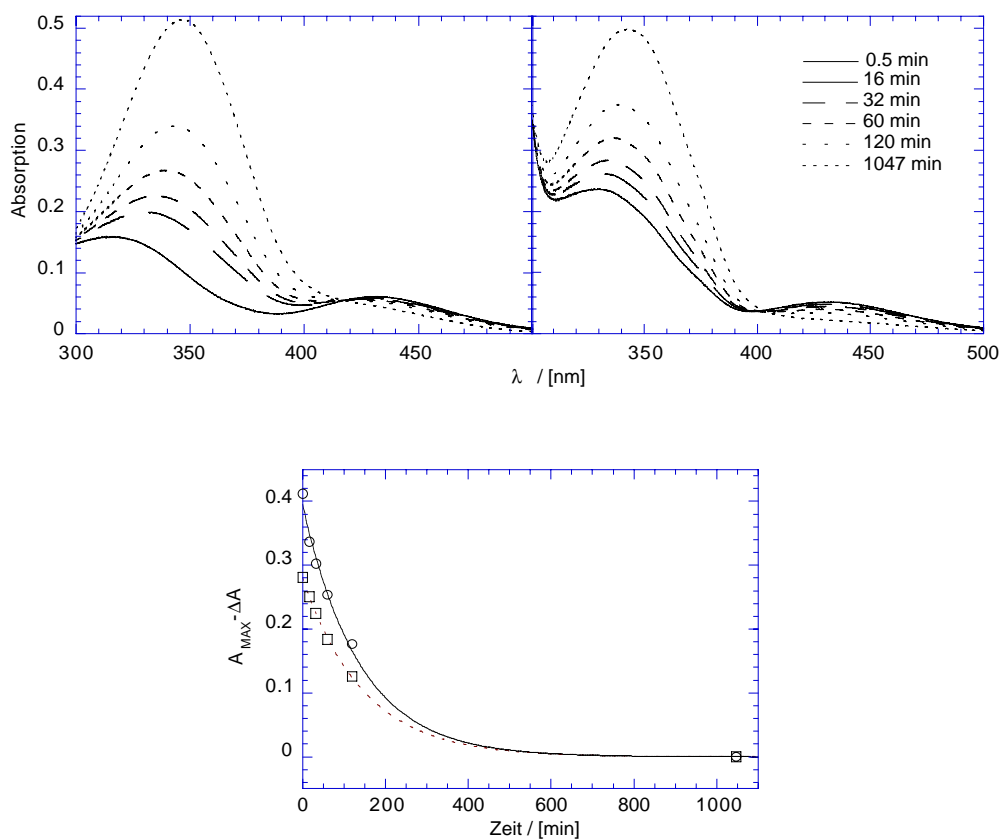


Abb. 2.18 Thermisch aktivierte Konversion von PZGA. Zeitabhängig aufgenommene UV/vis-Spektren von PZGA nach Belichtung ($\lambda = 356$ nm, siehe Kap. 7.10.5), PBS, 2 % DMSO, 20°C. **links:** PZGA 20 μ M, **rechts:** aStscFv 20 μ M, PZGA 20 μ M. Deutlich ist der Anteil der Proteinabsorption zu erkennen. **unten:** Sekundärauftragung, $\lambda = 347$ nm, Anpassung der Exponentialfunktion $A_{\text{MAX}} - \Delta A = e^{-(a-kt)}$, PZGA (O), $k = (7.24 \pm 0.68) \text{ min}^{-1}$, PZGA/aStscFv (\square), $k = (6.80 \pm 0.12) \text{ min}^{-1}$. Die Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten waren nicht signifikant.

Durch Sekundärauftragung der Absorptionsdifferenzen für das Maximum bei 347 nm konnten die Geschwindigkeitskonstanten der Konversion von *cis*-PZGA mit bzw. ohne aStscFv ermittelt werden: $k_{\text{PZGA}} = (7.2 \pm 0.7) \text{ min}^{-1}$, $k_{[\text{aSt-PZGA}]} = (6.8 \pm 0.2) \text{ min}^{-1}$. Aufgrund der überlappenden Fehlerintervalle konnte nicht auf einen signifikanten Unterschied der Konversionsraten in Abhängigkeit von der Gegenwart des Antikörperfragments geschlossen werden. Es ließ sich jedoch die Halbwertszeit mit $\tau = (97 \pm 10) \text{ min}$ abschätzen. Sie lag damit deutlich innerhalb des experimentellen Zeitraums der Isothermalen Titrations (Kap. 2.1.3.3.4).

Tabelle 2.2 Aus den Experimenten zur thermischen Konversion von *cis*-PZGA (Abb. 2.18) durch Sekundärauftragungen ermittelte Konstanten.

$A_{\text{MAX}} - \Delta A = e^{-(a-kt)}$	PZGA	PZGA-aStscFv
a	-0.921 ± 0.027	-1.272 ± 0.005
$k [1/\text{min}] \times 10^{-3}$	7.24 ± 0.68	6.80 ± 0.12
$\tau [\text{min}]$	97 ± 10	102 ± 2

2.1.3.4 Ligandenabhängigkeit der Fv-Dimerisierung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Anwendung von Fv-Fragmenten als ligandenabhängige genetische Schalter analog zum *yeast2hybrid*-System. Eine Voraussetzung dafür war die Beeinflussung des Assoziationsgleichgewichts der variablen Domänen durch die Ligandenkonzentration (siehe dazu auch Abb. 3.1). Auch für das *in-vitro*-System der nanoskopischen biomolekularen Assemblies (Kap. 2.2) war eine solche Eigenschaft von zentraler Bedeutung.

Um ihre Assoziation zu untersuchen, wurden die getrennt exprimierten Domänen des aSt-Fv in einem ITC-Experiment (Kap. 7.11) zueinander titriert. Unter Vorlage der V1-Domäne (20 μM) wurden kleine Aliquots (jeweils wenige tausendstel Volumina) von Vh (200 μM) stufenweise über den Stöchiometrie-Bereich hinaus zugegeben. Ein sigmoider Verlauf der Titration, welcher die Sättigung einer Bindung charakterisiert, konnte durch

Auftragung der freigewordenen Wärme in diesem Fall nicht beobachtet werden. Wurde das gleiche Experiment bei fünffachem Liganden-Überschuß (100 μM) durchgeführt, ließ der sigmoide Verlauf der Kurve auf die Sättigung einer Reaktion im Stöchiometrie-Bereich schließen (Abb. 2.19).

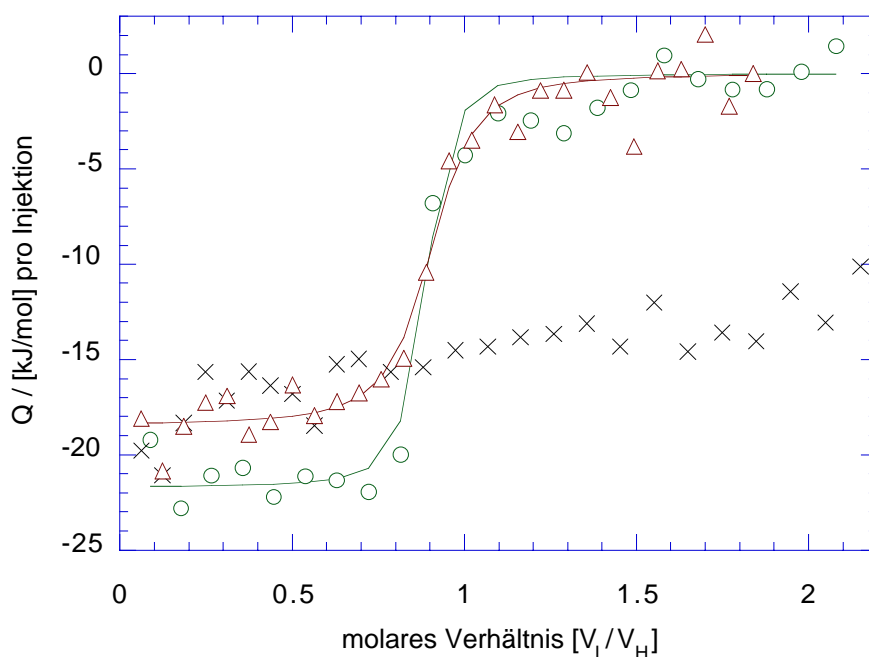


Abb. 2.19 Ligandenabhängigkeit der Dimerisierung von aSt-Fv. Isothermale Titrationskalorimetrie, 20 μM V_L vorgelegt, 200 μM V_H injiziert, PBS, 1 % DMSO, ohne Ligand (x), mit 100 μM ASGA (O), mit 100 μM *trans*-PZGA (Δ). In Gegenwart der Liganden wurde der sigmoide Titrationsverlauf der deutlich.

Dies war sowohl für den beschriebenen Bindungspartner Stilben, als auch für *trans*-Azobenzol zu beobachten. Die beobachtete Reaktion setzt sich hierbei aus der Assoziation der Domänen und der Bindung des Liganden zusammen. Da im Experiment ohne Ligand keine Reaktion beobachtet wurde und die einzelnen Domänen den Liganden nicht binden (vgl. Abb. 2.12), muß ein gekoppeltes Gleichgewicht von Ligandenbindung und induzierter Dimerisierung vorliegen (siehe auch Abb. 3.1). Anhand der freigewordenen Wärme ließ sich nur die Summe der beiden Reaktionen beobachten. Dies sollte sich mit gleich-

artigen Titrations unter Austausch der beiden Domänen bestätigen lassen (Titration von VI zu vorgelegter Vh-Domäne). Ein solches Experiment wurde nicht durchgeführt, da die VI-Domäne nicht in ausreichenden Konzentrationen gewonnen werden konnte. Die aus dem Kurvenverlauf berechneten apparenten Affinitäten der variablen Domänen zueinander in Gegenwart von Liganden sind in Tabelle 2.3 zusammengefaßt. Ihr Verhältnis ($Q = 3.2$) liegt jenem der Bindungskonstanten zu den Antigenen (Kap. 2.1.3.3.1, $Q = 2.5$) nahe. Da jeweils identische Proteine vermessen wurden, ließen sich Unterschiede in der Domänenassoziation auf die Affinitäten von aSt zu den beiden Liganden zurückführen. Somit ließ sich feststellen, daß die Domänenassoziation des aSt-Fv-Dimers im vermessenen Konzentrationsbereich deutlich von der Antigenkonzentration abhängig ist. Sie läßt sich sowohl mit Stilben- als auch Azobenzol-Derivaten induzieren. Prinzipiell wäre eine Bestimmung der einzelnen Gleichgewichtskonstanten für das zusammengesetzte Gleichgewicht im vorliegenden Fall mit einer Reihe von ITC-Messungen über einen breiten Konzentrationsbereich des Liganden möglich. Da eine Ligandenabhängigkeit der Fv-Dimerisierung bereits bestätigt werden konnte, wurde auf diese Experimente verzichtet.

Tabelle 2.3 Aus der ITC (Abb. 2.19) berechnete Konstanten für die Dimerisierung von aSt-Vh und -VI. Stöchiometrie (N), Assoziationskonstante ($K_A = 1/K_D$), freie Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS). Die Domänen zeigten in Gegenwart jedes der beiden Liganden eine deutliche Affinität zueinander.

Ligand	ASGA	PZGA
N	0.845 ± 0.013	0.877 ± 0.014
K_A [1/M]	$(3.41 \pm 2.38) E7$	$(1.06 \pm 0.41) E7$
ΔH [kJ/mol]	-5186 ± 144.6	-4409 ± 110.8
ΔS [kJ/mol/K]	17.07	17.34

Ein Experiment mit *cis*-Azobenzol zur Überprüfung einer möglichen Verhinderung der Domänenassoziation wurde nicht durchgeführt (siehe Kap. 2.1.3.3.5). Die Messung der Dimerisierung in Gegenwart von 80 % *cis*-PZGA entspräche aufgrund der thermischen Konversion einem Experiment mit langsam steigender *trans*-Konzentration. Bei Messung mit vergleichbarem (fünffachem) Ligandenüberschuß würde der Anteil an *trans*-PZGA bereits zur Sättigung der Proteine ausreichen. Hierbei würden sich Signale für die Asso-

ziation der Domänen, die Bindung verbleibenden *trans*- mit möglicher schwacher Bindung von *cis*-Azobenzol überlagern. Daher wurde auf diese Messung ebenfalls verzichtet.

2.1.3.5 Dissoziation infolge Antigen-Isomerisierung

Mit der *surface plasmon resonance*-Spektroskopie (SPR) läßt über die Verschiebung des Brechungsindex' an einer (modifizierten) Goldoberfläche sowohl Bindung als auch Dissoziation von Proteinen und Nukleinsäuren direkt verfolgen (Kap. 7.10.4). Auf diesem Weg wurde versucht, die molekularen Vorgänge infolge Isomerisierung des Liganden im Azobenzol/aSt-scFv-Komplex zu charakterisieren.

An die Au-Oberfläche wurde ein Derivat von PZGA gekoppelt, welches einen Abstand von etwa 6 Peptidbindungen zur Oberfläche gewährleistet: PZGA-N-Gly-Ahx₂-Cys-OH (PZGA-SH, mit Ahx = Aminohexansäure). 1/10 mit einem entsprechenden Peptid ohne die PZGA-Kopfgruppe (HN-Gly-Ahx₂-Cys-OH) verdünnt, wurde der Ligand aus der Flüssigphase durch Chemisorption des Thiols auf Gold bis nahe der Sättigungsgrenze aufgebracht (Beobachtung der Bindungskinetik anhand des Reflektivitätssignals).

Bei Inkubation von aSt-scFv mit der Ligand-modifizierten Oberfläche zeigte der Reflektivitätsverlauf eine deutliche Bindungskurve (Abb. 2.20, oben). In einem weiteren Experiment (neu präparierte Oberfläche) wurde zuerst das Azobenzol isomerisiert. Nach UV-Belichtung zeigte die entsprechende Bindungskurve des scFvs eine deutlich kleinere Amplitude (Abb. 2.20, unten). Offenbar fand die Bindung an das *trans*-Isomer in größerem Ausmaß statt. Eine detaillierte Auswertung zur Bestimmung von Affinitätsunterschieden erfolgte hier nicht. Im übrigen ist die in Kap. 2.1.3.3.5 beschriebene, thermisch aktivierte Konversion des *cis*-Azobenzols hier ebenfalls zu berücksichtigen.

Im Experiment, Abb. 2.20 oben, war die Amplitude der Dissoziation nach UV-Belichtung größer als im unten dargestellten Experiment. Dies ist ein Hinweis auf eine Desorption infolge UV-Belichtung. Da die Dissoziation nach Pufferwechsel hier noch nicht abgeschlossen war, ist fraglich, inwiefern dies ein spezifisches Signal für die Dissoziation des aStscFv/Azobenzol-Komplexes darstellt. Der Waschschrift sollte im betrachteten Zeitrahmen zur Entfernung unspezifisch gebundenen Proteins dienen. Ob eine vergleichbare Amplitude der Dissoziation auch ohne UV-Belichtung erreichbar wäre, konnte

nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Vorgänge, welche die Isomerisierung des protein-komplexierten Azobenzol-Derivates an der Oberfläche auslösen, ließen sich mit der Methode bislang nicht verständlich analysieren.

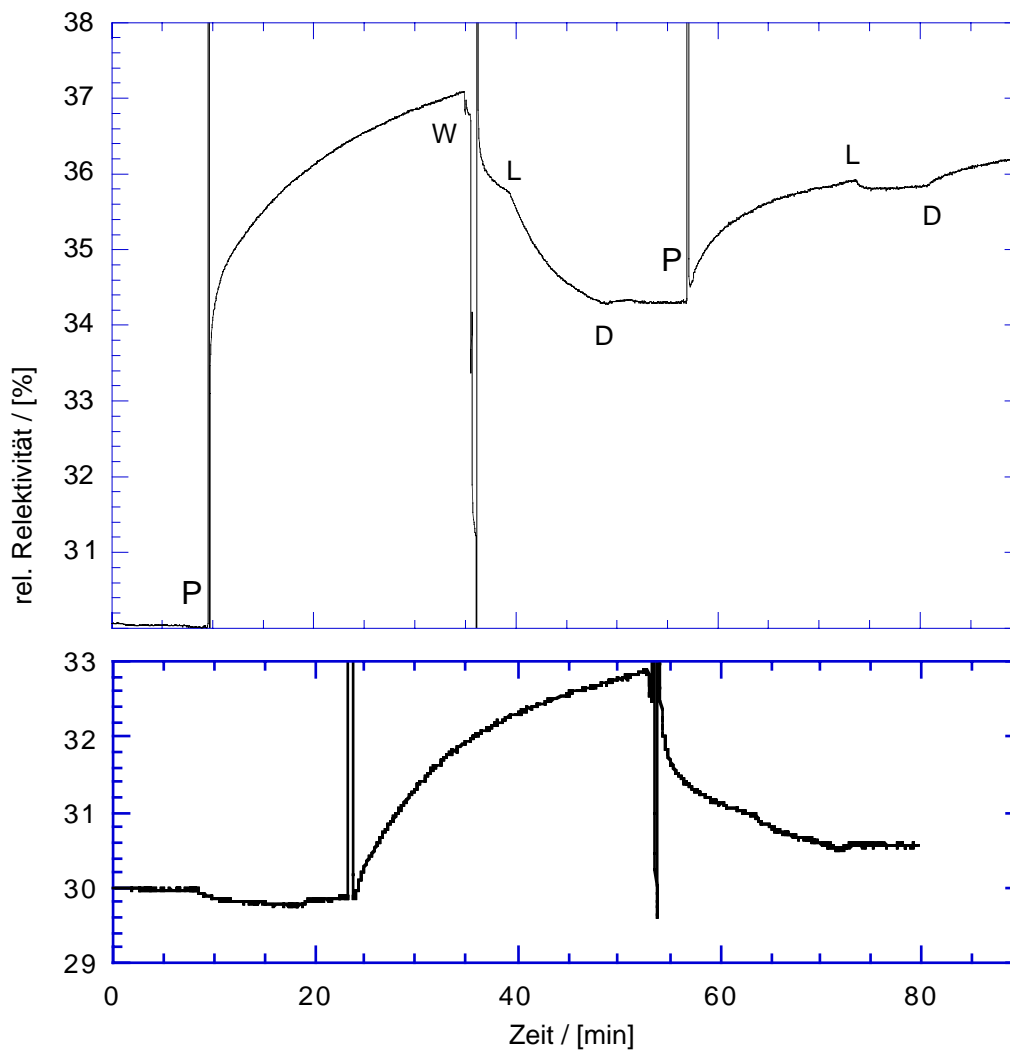


Abb. 2.20 Bindung von aSt-scFv an PZGA-SH. Reflektivitätsverlauf in *surface plasmon resonance*-Experimenten. PBS, PZGA-SH gekoppelt an Au-Oberfläche, Isomerisierung durch UV-Belichtung (356 nm), 2 getrennte Experimente. **Oben:** Bindung vor UV-Belichtung, **unten:** Bindung nach UV-Belichtung. P) Zugabe von 10 μM aSt-scFv in PBS; W) Waschen mit PBS, 3x ; L) UV-Bestrahlung; D) Dunkel-Inkubation. Nach UV-Belichtung war die Bindung von aSt-scFv deutlich schwächer. Die Amplituden an Unstetigkeiten (infolge Pufferwechsel, deutliche *peaks*) sind nicht vergleichbar, da zur Darstellung der Kurven die Absolutwerte angeglichen wurden.

Für gewöhnlich werden Experimente zur spezifischen Proteinbindung an Oberflächen in Gegenwart milder Detergenzien durchgeführt, z.B. 0.01 % Triton X-100. Dadurch wird eine dauerhafte Benetzung der Oberfläche auch bei Pufferwechsel bewirkt. Infolgedessen werden Sprünge im Refraktivitätsverlauf (wie in Abb. 2.20) vermindert. Beim Vergleich von Experimenten mit bzw. ohne Detergenz im Meßpuffer konnte sein Einfluß auf den Refraktivitätsverlauf festgestellt werden. Die Beschichtung von Au-Oberflächen mit PZGA-SH war in Gegenwart von Triton biphasisch (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigte sich mit Detergenz eine deutliche Refraktivitätsminderung bei UV-Belichtung zur Isomerisierung, unabhängig von der Anwesenheit von Protein. Eine solche Minderung wurde in Abwesenheit von Detergenz und Protein nicht beobachtet (Abb. 2.20, unten). Offenbar erfolgt eine konformationsabhängige Wechselwirkung des Detergenz mit dem hydrophoben Azobenzol-Derivat. Bei weiteren Experimenten zur Wechselwirkung von Proteinen mit diesen Aromaten sollten solche Einflüsse Berücksichtigung finden.

2.1.4 *in vivo*-Anwendung des aSt-Fv als lichtschtbarer Transkriptionsfaktor

Die Dimerisierung des cytoplasmatisch exprimierbaren aSt-Fv-Fragments war von der Anwesenheit eines *trans*-Azobenzol- oder -Stilben-Derivates abhängig, wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt werden konnte.

Um die zellulär vorliegenden Konzentrationen der Proteine abzuschätzen, kann man bei cytoplasmatischer Expression auch unter einem schwachen konstitutiven Promotor von 10 Kopien pro *E. coli*-Zelle ausgehen. Das entspräche bei einem Zellvolumen von 2 pl einer intrazellulären Konzentration von 10 μM . In diesem Bereich konnte für das Azobenzol bindende Fv-Fragment die Antigenabhängigkeit der Dimerisierung bestätigt werden. Bei fünffachem Überschuß der Liganden ASGA bzw. PZGA zeigte sich ein deutliches Signal für Domänenassoziation (Kap. 2.1.3.4). Bei gleicher Proteinkonzentration wurde mit ITC die Antigenbindung nachgewiesen (Kap. 2.1.3.3.4), durch Fluoreszenztitration gelang dies bei mikromolaren Konzentrationen des Fv-Fragmentes (Kap. 2.1.3.3.1). Insofern liegen die Bindungskonstanten in einem Bereich, welcher die intrazelluläre Nutzung der Ligand-abhängigen Dimerisierung von aSt-Fv ermöglichen sollte.

Mit den in Kap. 2.1.4.2 und 2.1.4.3 dargestellten Experimenten wurde das Fv-Fragment in *2hybrid*-Systemen auf seine Eignung als dimerisierender Transkriptionsfaktor hin untersucht. Dazu wurden die Fv-Domänen an Proteine fusioniert, die in dem jeweiligen Organismus eine Transkriptionsaktivierung auslösen können. Mit diesen Konstrukten sollte sich Promotor-bindendes Element hergestellt werden, welches in lebenden Zellen die belichtungsabhängige Steuerung der Genexpression ermöglicht (siehe Kap. 2.1.1).

Als Voraussetzung dafür wurde zunächst untersucht, ob der lichtschtbare Ligand des Fv-Fragments intrazellulär verfügbar vorliegen kann.

2.1.4.1 Zelluläre Lokalisation von Azobenzol-Derivaten

Nach dem in Kap. 2.1.1 beschriebenen Konzept muß der Ligand membrangängig sein. Für *in vivo*-Experimente wurden daher chemisch modifizierte Derivate des N-Glutaryl-4-aminoazobenzols und -4-aminostilbens sowie das N-Acetyl-4-aminoazobenzol verwendet (Abb. 2.21). Die Maskierung der negativ geladenen Glutarsäurefunktion mit einer O-Acetoxymethylgruppe sollte eine effiziente Permeation der zellulären Membranen als Diffusionsbarriere gewährleisten (Tsien, 1981; Li *et al.*, 1998). Die Schutzgruppe kann von zellulären Esterasen abgespalten werden. Das entstehende Halbacetal hydrolysiert unter Freisetzung der Säurefunktion, die Ladung bedingt eine Retention der Verbindung im Zellinneren.

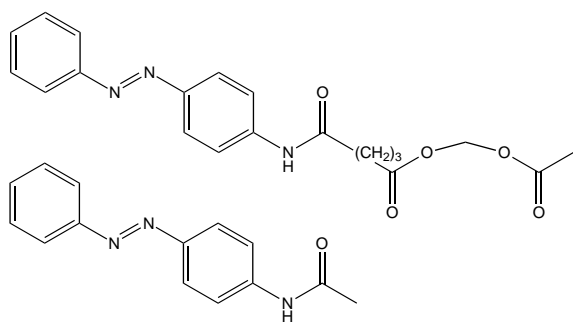


Abb. 2.21 Im *yeast2hybrid* und Bakteriomatch[®] genutzte Liganden. O-Acetoxymethyl-N-glutaryl-4-amino-phenylazobenzol (PZGA-Ac, oben) und N-Acetyl-4-amino-phenylazobenzol (unten).

Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften der aromatischen Azobenzol-Derivate war der Nachweis ihrer zellulären Lokalisation nicht mit einfachen Methoden möglich. Von den hydrophoben Verbindungen würde man eine Konzentrierung in Lipidmembranen erwarten. Eine detaillierte Analyse setzt die Trennung von Membran- und Cytoplasma-Fraktion voraus; normalerweise werden die Nicht-Membranbestandteile beim Zellaufschluß durch Zugabe eines Puffers verdünnt. Dieses Vorgehen kommt bei dem Konzentrationsgefälle einer hydrophoben Substanz zwischen den Fraktionen einer Flüssig-Flüssig-Extraktion gleich. Daher lassen sich nach Aufschluß nicht mehr die ursprünglichen Konzentrationsverhältnisse beobachten.

Ein recht spezifischer Nachweis war jedoch für die analogen Stilbenderivate durch ihre Bindung an aSt-scFv zugänglich; die Bindung von ASGA an das Antikörperfragment wird von der beschriebenen Fluoreszenzzunahme begleitet (Kap. 2.1.3.3.1). Unter der Annahme ähnlicher Membrangängigkeit beider Aromaten sollten sich die Ergebnisse auf die nichtfluoreszierenden Azobenzol-Derivate übertragen lassen. Zur Feststellung intrazellulärer Lokalisation bietet sich daher ein Vergleich der Stilbenfluoreszenz in Zellen, die aSt exprimieren, mit aSt-freien an. Unter Vermeidung des Zellaufschlusses sollte somit eine spezifische Detektion der intrazellulären Verfügbarkeit in Gegenwart des cytoplasmatischen Bindeproteins möglich sein. Die Fluoreszenz von membranlokalisierten Stilbenen ist dabei zu berücksichtigen; aufgrund der erhöhten Viskosität kommt es in Lipidschichten ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensdauer der fluoreszenten Spezies (Likhtenshtein *et al.*, 1996).

Zur Analyse der Aufnahme wurde O-Acetoxyethyl-N-glutaroyl-4-aminostilben (ASGA-Ac, analog zu PZGA-Ac, Abb. 2.21) genutzt. Die zelluläre Lokalisation des Stilbenderivats wurde in exponentiell wachsenden *E. coli* BL21-Stämmen untersucht. Die Zellen wurden in Gegenwart von 20 μM ASGA-Ac für 4 h bei 20°C wachsen gelassen, weitere 24 h bei 4°C h inkubiert, danach abzentrifugiert, das Zellpellet in PBS gewaschen und die Zellen zu OD₆₀₀ 0.1 verdünnt. Von dieser Suspension wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb. 2.22).

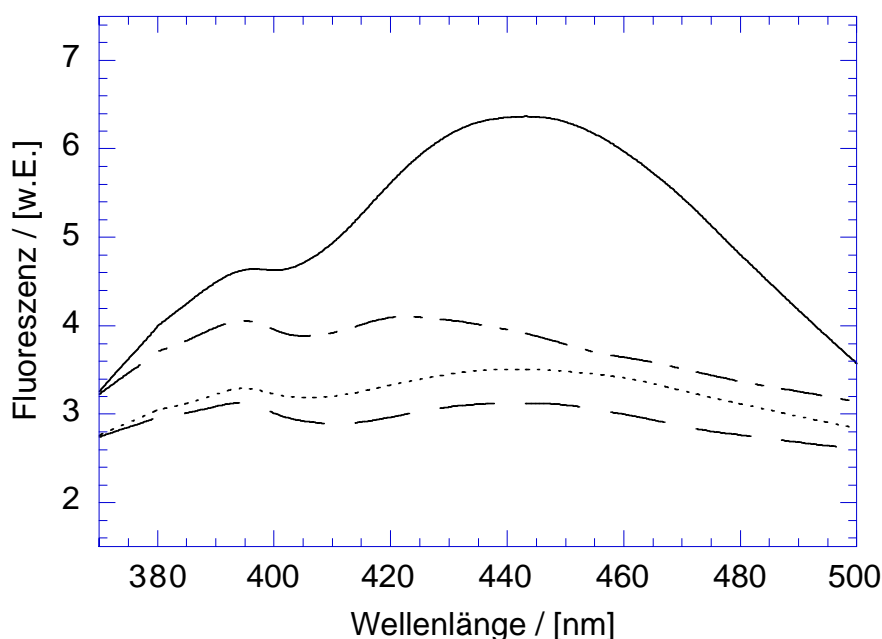


Abb. 2.22 Aufnahme des Stilbenderivats ASGA-Ac durch BL21-Zellen. Die Fluoreszenzspektren von Zellsuspensionen in PBS (OD_{600} 0.1) nach Wachstum in 20 μ M ASGA-Ac. λ_{EX} = 340 nm waren sehr stark verrauht. Dargestellt sind zu 35 % gewichtete, geglättete Graphen, welche an die Spektren angepaßt wurden. Zellsuspension, aSt-scFv-exprimierend mit ASGA-Ac (—), aStscFv-exprimierend ohne ASGA-Ac (- - -), ohne Fv-Expression mit ASGA-Ac (-----), FlaK-scFv-exprimierend mit ASGA-Ac (- · -). Nur Zellen, welche das Stilben-bindende Fv-Fragment exprimierten, zeigten die erhöhte Stilbenfluoreszenz.

Trotz des ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnisses wird anhand der Spektren eine Korrelation der Stilbenfluoreszenz in der Zellfraktion mit der Expression des Stilben-bindenden aStscFv-Fragmentes deutlich. Nur in Gegenwart dieses Proteins zeigte sich die deutlich erhöhte zellgebundene Fluoreszenz gegenüber den Kontrollzellen. Dieser Unterschied läßt sich als intrazelluläre Bindung an das Protein interpretieren, was eine Zugänglichkeit des Cytosols durch das Antigen voraussetzt. Die Anwesenheit des aStscFv-Fragmentes war offenbar Voraussetzung für eine intrazelluläre Retention des Chromophors, da zwischen Zellen mit und ohne diesem Protein kein Unterschied in der Aufnahme zu erwarten war.

Bei analoger Aufnahme des Azobenzol-Derivats O-Acetoxymethyl-N-glutaryl-4-amino-phenylazobenzol (PZGA-Ac, Abb. 2.21) sollte eine intrazelluläre Verfügbarkeit dieses Lichtrezeptors sichergestellt sein.

Im Weiteren wurde davon ausgegangen, daß die Hefe-Zellwand keine zusätzliche Diffusionsbarriere für Verbindungen niedrigen Molekulargewichts darstellt. Eine nähere Charakterisierung ihrer zellulären Konzentration erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, da der Nachweis über den funktionalen Transkriptionsfaktor eine sensitive Methode darstellen sollte. Die Verbindungen reichern sich aufgrund ihres hydrophoben Charakters in Membranen an, eine effektive Permeation der Zellmembran und intrazelluläre Verfügbarkeit konnten bislang nicht zufriedenstellend quantifiziert werden. Als entsprechend komplizierter gestaltet sich der Nachweis intrazellulärer Lokalisation in den Kompartimenten eukaryontischer Zellen. Für eine Anwendung im Y2H sollte jedoch die Diffusion von kleinen Molekülen zwischen Cytoplasma und Nukleus durch Kernporen ausreichend sein.

Ob die Verbindung im zellulären Kontext gleichfalls photoisomerisierbar bleibt, wurde ebenfalls zunächst nicht näher untersucht. Vor allem aufgrund der möglichen Wirkung von Zellbestandteilen als optische Filter besteht hier Klärungsbedarf, ob das Molekül unter zellulären Bedingungen effizient durch Belichtung isomerisiert werden kann.

Für die *in vivo*-Interaktionstests wurde neben PZGA-Ac auch das Acetamid des Aminoazobenzols genutzt (Abb. 2.21).

2.1.4.2 Untersuchungen mit dem *yeast2hybrid*-System

Die Assoziation der Domänen des aSt-Fv-Fragmentes *in vivo* wurde mit einem *yeast2hybrid*-System (Y2H) charakterisiert. Das verwendete System Proquest[®] wurde ursprünglich für die Untersuchung der Interaktion von Fusionsproteinen im großen Maßstab, sogenannten Y2H-*screenings*, entwickelt. Die Fusionen erfolgten an die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors Gal4. In Hefe rekrutiert dieser durch seine Bindung an die entsprechende *upstream activating sequence* die RNA-Polymerase an den gal-Promotor. Eine Trennung der beiden Gal4-Domänen verhindert die Transkription der von diesem Promotor kontrollierten Gene. Die Fusion von miteinander interagierenden Proteinen an die beiden Gal4-Domänen schließt die Brücke zwischen DNA-Bindung und RNA-Polymerase-

Rekrutierung und führt wieder zur Genexpression (siehe auch Abb. 2.23). Die Fülle an Varianten der kommerziell erhältlichen Interaktions-*screening*-Systeme zeigt den Erfolg dieser Methode zur Untersuchung von Proteininteraktionen *in vivo*.

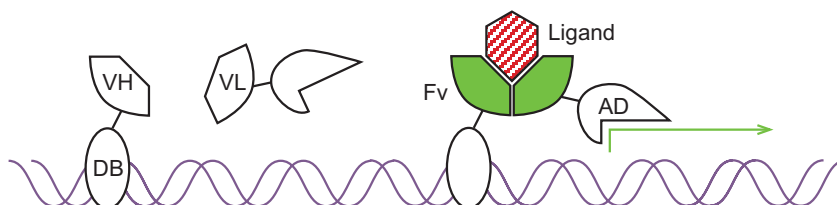


Abb. 2.23 Schema der Konstrukte in den *2hybrid*-Systemen. Eine DNA-bindende Domäne lokalisiert den einen Interaktor in Promotornähe (im Y2H Gal4-DB, im B2H λ cI). Der andere ist an eine transkriptionsaktivierende Domäne fusioniert (im Y2H Gal4-AD, im B2H RpoA). Ligandenabhängige Assoziation zum Komplex induziert die Transkription vom jeweiligen Promotor. Die Fusionierung der variablen Domänen erfolgte sowohl in der dargestellten Richtung, als auch umgekehrt (Vh, Vl vertauscht).

2.1.4.2.1 Konstrukte für das Y2H

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Affinität der Domänen des aSt-Fv-Fragmentes zueinander zur Transkriptionsaktivierung im Y2H zu nutzen. Die *in vitro* deutlich verstärkte Assoziation in Gegenwart des Liganden sollte entsprechend in der Zelle zu einer Verstärkung der Transkription führen. Für diese Experimente wurden die variablen Domänen an die Gal4-DNA-bindende (DB) bzw. Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) in Vektoren des Y2H-Systems Proquest[®] fusioniert (siehe Abb. 9.7). Die verwendeten Vektoren waren von Stefan Eimer (AG Baumeister, Genzentrum der LMU München, persönliche Mitteilung) dahingehend modifiziert worden, daß die Interaktoren an den N-Termini der Fusionsproteine vorlagen. Die entsprechenden Gene wurden mit den Oligonukleotiden IcaF.for, SE_Vl-rev bzw. SE_tivh-for und SE_Vh-rev amplifiziert und über *Nco*I- und *Eco*RI-sites in die Vektoren pPC86VH-AD und pVL-DBleu ligiert (Kap. 9.1.4). Auf diese Weise wurden Fusionen an die AD und die DB sowohl mit Vh- als auch Vl-Domänen kloniert. Die AS-Sequenzen der erhaltenen Konstrukte sind in Abb. 2.24 dargestellt. Eine Prozessierung des N-terminalen Methionins der cytoplasmatisch

exprimierten Polypeptide wird in Hefe durch die Methionin-Aminopeptidasen I und II sichergestellt (Bradshaw *et al.*, 1998).

VL-

M AIVMT//KLELK -

VH-

M AEVKL//LTVSS -

-Gal4DB (1-147)

NSGAYPYDVP DYATSSGMKL LSSIEQACDI CRLKKLKCSK EKPCKAKCLK
 NNWECRYSPK TKRSPLTRAH LTEVESRLER LEQLFLLIFP REDLDMILKM
 DSLQDIKALL TGLFVQDNVN KDAVTDRLAS VETDMPLTLR QHRISATSSS
 EESSNKGQRQ LTVSSRSTSL RPHSSK

-Gal4AD (767-818)

ANSGAYPYDV PDYATSSVDK LMPKKKRVKVS SGANFNQSGN IADSSLSFTF
 TNSSNGPNLI TTQTNSQALS QPIASSNVHD NFMNNEITAS KIDDGNNSKP
 LSPGWTQTA YNAFGITTGM FNTTMDVVY NYLFDDEDTP PNPKKEGGST
 PGIQIY

Abb. 2.24 Sequenzen der im Y2H verwendeten Fusionsproteine. Sie bestanden aus einer N-terminalen Fv-Domäne (unterstrichen, durch ihre jeweils ersten und letzten 5 AS dargestellt, vollständige Fv-Sequenzen siehe Abb. 2.10), und einer C-terminalen Gal4-Domäne (bei der Klonierung eingeführte AS kursiv). Die 4 Kombinationen waren VL-Gal4DB, VL-GalAD, VH-Gal4DB, VH-Gal4AD.

2.1.4.2.2 Interaktion der Fusionsproteine im Y2H

Bei Wachstum von Stämmen mit beiden Fusionsproteinen auf Selektivagar (mit 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazol), der eine Minimalaktivität des Reportergens *his3* unterdrückt, konnte kein Wachstumsunterschiedes gegenüber Stämmen mit nur einem Fusionsprotein (AD unfusioniert) festgestellt werden. Die Stämme wuchsen unter gleichen Bedingungen ebenso schwach bzw. langsam. Eine spezifische Interaktion der Fusionsproteine sollte sich hier anhand eines Wachstumsvorteils zeigen (Größe der Kolonien auf Festmedium nach gleicher Zeit). Es konnte somit keine Assoziation der aSt-Domänen anhand einer Transkriptionsaktivierung des Reportergens vor Hintergrund beobachtet werden. Im Vergleich mit anderen stabilisierten, nicht "zusammengehörigen" Antikörperdomänen (VI703, Ohage & Steipe, 1999; VI401, Wirtz & Steipe, 1999; kloniert von Stefan Eimer, persönliche Mitteilung) zeigte sich jedoch eine leichte Aktivierung, die Zellen wuchsen

etwas schneller bzw. Kolonien wurden etwas früher sichtbar und größer. Demzufolge liegt das Assoziationsgleichgewicht bei der intranukleären Konzentration der Proteine weitgehend auf der Seite der Monomere, es zeigt sich keine feste Assoziation. Dies wäre ideal, um eine Liganden-induzierte Assoziierung beobachten zu können. Verglichen mit der Interaktion der Domänen des anti-Fluoreszein-Fv (FlaK, Kap. 2.2) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Allerdings ließ sich anhand der schwachen Interaktion keine sichere Aussage über die Funktionalität der Domänen in den Konstrukten treffen. Bei einer spezifischen, starken Interaktion (Wachstum bei höheren 3-Amino-1,2,4-triazol-Konzentrationen) könnte man von funktionalen Proteinen ausgehen. Ein Nachweis der Exprimierbarkeit dieser Fusionsproteine gelang zumindest im Western blot (Kap. 7.8.5).

2.1.4.2.3 *in vivo*-Effekte in Gegenwart des Liganden

Weiterhin wurde untersucht, ob die Gegenwart des Antigens (wie *in vitro*, Kap. 2.1.3.4) eine Assoziation der aSt-Fv-Domänen induziert. Mit keinem der getesteten Derivate (Abb. 2.21) konnte eine Verstärkung der Reportergenaktivität bei Wachstum des Fv-Dimer-exprimierender Linien auf Liganden-haltigem Medium festgestellt werden. Auch für die Interaktion der Domänen des FlaK-scFv konnte auf Fluoreszeindiacetat-haltigem Medium kein Signal beobachtet werden.

Bei hohen Konzentrationen der Stilbenderivate (100 μM) kam es unabhängig von den exprimierten Fusionen zu einer Inhibition des Wachstums. Offensichtlich wirkten die Azobenzolderivate ab bestimmten Konzentrationen zytotoxisch. Dieser Effekt war bei zehnfach höheren Konzentrationen des Acetoxymethyl-glutaroyl-Derivats etwa vergleichbar dem von Acetyl-Aminoazobenzol. Dieser Effekt wurde auch für andere aromatische Amine beschrieben und ist auf Nitreniumionen als Stoffwechselzwischenprodukte zurückzuführen (Ford & Herman, 1992). Offenbar wird das verwendete Acetamid effizienter hydrolysiert. Diese Toxizität sollte durch Wahl geeigneter Substituenten vermeidbar sein, welche zellulär nicht zum freien Amin hydrolysiert werden.

2.1.4.2.4 Diskussion zum Y2H

Abgesehen von der Inhibition bei höheren Antigenkonzentrationen ließ sich insgesamt also weder eine signifikante Interaktion der Domänen der Fv-Dimere über dem Hin-

tergrund nachweisen, noch eine Verstärkung der Transkription in Gegenwart der Antigene feststellen. Die möglichen Ursachen konnten zum Teil überprüft werden. Ein Nachweis der Expression gelang im Western blot. Die Konzentration der Fusionsproteine am Funktionsort im Kern und die Antigenbindung durch die Proteine konnten jedoch im vorliegenden Format nicht überprüft werden. Aufgrund der hohen Aggregationstemperatur und guten cytoplasmatischen Exprimierbarkeit war von einer ausreichenden Stabilität auszugehen.

Eine Beeinträchtigung der Funktion durch die Fusionierung war ebenfalls nicht zu erwarten. Die Assoziationsfähigkeit von Proteinen kann beeinträchtigt sein, wenn DB- oder AD-Fusionen die natürliche Interaktionsseite eines Proteins ausschließen oder seine richtige Faltung behindern (van Aelst *et al.*, 1993). Für die verwendeten variablen Antikörperdomänen war dies unwahrscheinlich, da sie natürlicherweise C-terminale Fusionen tragen (die konstanten Domänen) und ihre Fusionen mit anderen Proteinen für gewöhnlich funktionsfähig sind. Speziell im Y2H wurden randomisierte scFv-Fragmente erfolgreich eingesetzt (Visintin *et al.*, 2002). Insofern ist auch bei den hier verwendeten Konstrukten eine Kernlokalisierung zu erwarten.

Durch Verwendung des ADHlong-Promotors war eine niedrige intrazelluläre Konzentration der Fusionsproteine beabsichtigt, um größtmögliche Sensitivität zu gewährleisten. Da *in vitro* im mikromolaren Konzentrationsbereich eine signifikante Reaktion auf das Antigen beobachtet wurde, sollte eine stärkere Expression ohne eine Assoziation der Domänen in Abwesenheit des Liganden möglich sein. Möglicherweise wäre die nicht induzierte Dimerisierung dann auch vom Hindergrundsignal (Kontrolle mit freier DB) unterscheidbar. Bei genügend hohen zellulären Konzentrationen des Rezeptors läßt sich möglicherweise eine Abschwächung des zytotoxischen Effekts durch das Antigen erwarten. Insofern wäre zur Überprüfung bzw. Realisierung der Ligandenabhängigkeit einer Fv-Dimerisierung *in vivo* die Expression ähnlicher Konstrukte unter einem etwas stärkeren Promotor (z.B. ADH anstelle ADHlong) sinnvoll.

2.1.4.3 Untersuchungen mit dem bakteriellen *2hybrid*-System

Das bakterielle *2hybrid*-System (Bacteriomatch[®]) erlaubt die Untersuchung der Interaktion von Proteinen in *E.coli* (Dove *et al.*, 1997); als alternatives *screening*-System

umgeht es eine Reihe von Nachteilen des *yeast2hybrid* (Joung, 2001). Es wurde für die Untersuchung der Fv-Dimerisierung im vorliegenden Fall verwendet, da in der *E.coli*-Zelle als einfacherem Organismus einige Unwägbarkeiten vermieden werden können:

- Es ist kein Transport der Fusionsproteine in den Zellkern nötig.
- Die zellulären Mechanismen, auf Chemikalien im Medium zu reagieren, sind in Bakterien weniger komplex.
- Die Kulturen sind in der Laborhandhabung wesentlich einfacher, etc.

2.1.4.3.1 Konstrukte für das bakterielle *2hybrid*

RpoA-

```

1 mqqsvteflk prlvdieqvs sthaktlep lergfghtlg nalrrillss
51 mpgcavteve idgvlheyst kegvqedile illnlkglav rvqgkdevil
101 tlnksgigpv taadithdgd veivkpqhvi chltidenasi smrikvqgrg
151 gyvpastrih seederpigr llvdacyspv eriaynveaa rveqrtdldk
201 lviemetngt idpeeairra atilaeqlea fvdldrdrqp evkeekpe
  AAGSAAAs/          /NSV

```

-VL DIVMT//KLELK

-VH EVKLO//LTVSS

λcI-

```

1 mstkkkpltq eqledarrlk aiyekkknel glsqesvadk mgmgqsgvga
51 lfnginalna ynaallakil kvsveefsp iareiyemye avsmqpslrs
101 eyeypvfshv qagmfspelr tftkgdaerw vsttkkasds afwlevegns
151 mtaptgskps fpdgmlilvd pegavepgdf ciarlggdef tfkklirdsg
201 qvflqplnpq ypmipcnesc svvgkviasq wpeetfg
  AAAs/          /NSRGS SS

```

-VL DIVMT//KLELK

-VH EVKLO//LTVSS

Abb. 2.25 Sequenzen der für den Bacteriomatch-Interaktionsassay verwendeten Fusionsproteine. Sie bestanden aus RpoA (oben, gegenüber natürlichem Protein C-terminal um 81 AS trunziert) bzw. λcI und einer C-terminalen Fv-Domäne (unterstrichen, durch ihre ersten und letzten 5 AS dargestellt, vollständige Fv-Sequenzen siehe Abb. 2.10). Bei der Klonierung eingeführte AS kursiv. Die 4 Kombinationen waren RpoA-VL, RpoA-VH, λcI-VL, λcI-VH.

Das Prinzip der Interaktionsanalyse ist vergleichbar dem *yeast2hybrid*. In diesem Fall liegen auf dem F'-Episom des Reporterstammes proximal der Erkennungssequenz (λ-Operator) die Reportergene *amp^R* und *lac^Z*. Eines der zu untersuchenden Proteine wird C-terminal an das DNA-bindende Bakteriophagenprotein λcI fusioniert (siehe auch Abb.

2.23). Das andere wird an die N-terminale Domäne der bakteriellen RNA-Polymerase α -Untereinheit (RpoA) fusioniert und konkurriert daher mit der endogenen RpoA im *core*-Enzym. Bei Affinität der beiden Interaktoren zueinander erhält die Zelle mit diesen Konstrukten einen Wachstumsvorteil auf Selektivmedium mit Carbenicillin.

Um die aSt-Fv-Domänen in dieses Systems einzubringen, wurden ihre Gene mit den Oligonukleotiden Noti_Vh2.For, Vh_Ecori.rev bzw. Noti_Vl.For und Vl_Ecori.rev amplifiziert und über *NotI* und *EcoRI* *in frame* zu den jeweiligen Fusionspartnern in je beide Vektoren, pBT und pTRG, kloniert (siehe Kap. 9.1.3, Abb. 9.6). Die Sequenzen der Fusionen von RpoA und λ cI mit den C-terminalen Vl- bzw. Vh-Domänen sind in Abb. 2.25 dargestellt.

2.1.4.3.2 Anwendung der Fusionsproteine im bakteriellen *2hybrid*

Die Expression beider aSt-Fusionsproteine im Reporterstamm ergab keinen Wachstumsvorteil gegenüber Kontrolllinien, in welchen nur der DNA-bindende λ cI eine Fusionsdomäne trug (RpoA unfusioniert). Es konnte also *in vivo* keine Interaktion der Fusionsproteine vor dem entsprechenden Hintergrund festgestellt werden. Bei Wachstum auf einem den Liganden PZGA-Ac enthaltenden Medium wurde keine über diesen Hintergrund hinaus verstärkte Interaktion der beiden Proteine beobachtet. Das gleiche Bild zeichnete sich mit den Domänen des Fluoreszein-bindenden Fv-Fragmentes ab (Kap. 2.2). Eine Überexpression der Fusionen durch Induktion mit IPTG, was dieses System ermöglicht, führte zu deutlich schwächerem Wachstum der Zelllinien mit Fusionsproteinen, unabhängig von der Anwesenheit des Liganden.

Mögliche Ursachen, warum keine Antigen-induzierte Assoziation der Fusionsproteine beobachtet werden konnte, wurden mit weiteren Experimenten eingegrenzt.

Um ihre zelluläre Verfügbarkeit festzustellen, wurden die Konstrukte zunächst getrennt überexprimiert und die Fusionsproteine durch Zellfraktionierung und gelelektrophoretische Auftrennung charakterisiert. Die λ cI-Konstrukte lagen demnach sowohl in der unlöslichen als auch in der löslichen Zellfraktion vor. Das unfusionierte N-terminale Fragment der RNA-Pol α war überexprimiert gut löslich. Die Fusionen mit diesem konn-

ten jedoch weder in der löslichen noch unlöslichen Zellfraktion in mit Coomassie nachweisbaren Mengen gefunden werden (Abb. 2.26). Da die Übereinstimmung mit der erwarteten Gensequenz für alle Konstrukte bestätigt wurde, scheint das Problem eher in der effizienten Faltung der Fusionsproteine zu liegen, möglicherweise aufgrund der ungünstigen Fusionsrichtung.

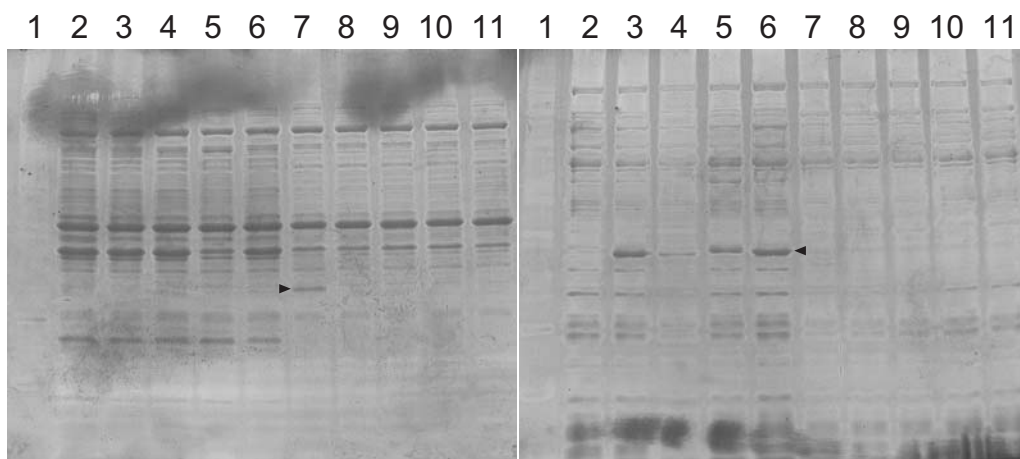


Abb. 2.26 Expression der im Bacteriomatch verwendeten Fusionsproteine (Abb. 2.25) in BL21-Zellen. SDS-PAGE, Coomassie-gefärbt, links lösliche, rechts unlösliche Fraktionen nach Zellaufschluß: Spur 1: Marker, Spuren 2-6: λ cI-0, -aStH, -aStL, -FlaKH, -FlaKL, Spuren 7-11: RpoA-0, -aStH, -aStL, -FlaKH, -FlaKL. Die Banden von löslichem RpoA-0 und der unlöslichen λ cI-Fusionen sind gekennzeichnet (➤).

2.1.4.3.3 Diskussion zum bakteriellen *2hybrid*

Das Bacteriomatch[®]-System erlaubt in der verwendeten Version lediglich Fusionen an die C-Termini von λ cI und RpoA. Natürlicherweise liegen die variablen Domänen im Antikörper N-terminal vor. Wahrscheinlich beeinträchtigt die ungünstige Domänenabfolge Faltung und Löslichkeit der Konstrukte. Dafür spricht auch die Wachstumsinhibition bei Überexpression, die zum Teil zu unlöslichem Protein führt. Eine Klonierung in umgekehrter Orientierung, wie sie im *yeast2hybrid* genutzt wurde, war hier neben der recht aufwendigen Durchführung auch aus anderen Gründen nicht sinnvoll. Die N-terminale Domäne von RpoA interagiert direkt mit der katalytischen UE der Polymerase. Bei Konkurrenz mit endogener RpoA wäre ein in diesem Bereich verändertes Protein eher benachteiligt, da der N-Terminus an der Dimerisierung der Domänen direkt beteiligt ist (zur Struktur des

Dimers siehe auch 1HQM.pdb). Ebenso würde eine N-terminale Fusion an den λ -Repressor wahrscheinlich dessen Funktion beeinträchtigen, da dieser Bereich unmittelbar an der DNA-Bindungsstelle lokalisiert ist (Strukturmodell 1LMB.pdb). Nichtsdestotrotz sollte ein Interaktionsassay mit N-terminal fusioniertem λ cI möglich sein, da dieser nicht mit endogenem Protein um die Operator-Bindung kompetieren muß.

Prinzipiell ließen sich auch Fusionen mit anderen Proteinen vorstellen, um einen ähnlichen Interaktionsassay in *E. coli* zu konstruieren. Für eine sequenzspezifische DNA-Lokalisation in größeren Genomen sind multiple Zinkfingerdomänen geeignet (Beerli & Barbas, 2002), welche sowohl N- als auch C-terminal fusioniert werden können. Ein Fusionsprotein zur Rekrutierung der RNA-Polymerase ließe sich auch mit der ω -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase herstellen. Sie wurde bereits erfolgreich für ähnliche Zwecke verwendet. Da ihr *knockout* in Laborstämmen keinen nachteiligen Phänotyp zu verursachen scheint, läßt sich eine Konkurrenz mit endogenem Protein umgehen. Nach der Kristallstruktur (1HQM.pdb) würde allerdings eine N-terminale Fusion auch hier die Funktion bzw. Bindungsstelle zum *core*-Enzym deutlich beeinträchtigen, die entsprechenden AS sind in der Interaktionsfläche verborgen.

2.2 Fluoreszein-bindendes Fv-Fragment

2.2.1 Design

Als Referenz für die *in vivo*-Untersuchungen mit dem stilbenbindenden stabilisierten Fv-Fragment aSt wurde ein weiteres cytoplasmatisch exprimierbares funktionales Fv-Fragment konstruiert. Dazu wurde die Spezifität des Fluoreszein bindenden mAB 4-4-20 durch *CDR-loopgrafting* auf scFv-AR übertragen. Die Methodik hinsichtlich Feststellung der antigenkontaktierenden Bereiche und Festlegung der auf das stabilisierte *framework* zu übertragenden AS war analog zu Kap. 2.1.3.2. Der Datensatz 1FL3.pdb (Gibson *et al.*, 1988) wurde als Strukturmodell des Antikörpers 4-4-20 (Bedzyk *et al.*, 1989) verwendet. Die Sequenzalignments mit dem resultierenden Fv-Fragment FlaK sind in Abb. 2.27 dargestellt. Die Mutagenese zur Änderung der CDR-Sequenzen erfolgte mit *restriction selec-*

2.2.2 Charakterisierung

Das so hergestellte Antikörper-Fragment (FlaK-scFv) mit den an 4-4-20 adaptierten CDRs ließ sich im Cytoplasma von *E.coli* gut löslich exprimieren (Ausbeute 2 mg/l Kultur) und durch IMAC (Kap. 7.8.2) reinigen. Damit war auch hier das *loopgrafting* unter Beibehalt der cytoplasmatischen Expressierbarkeit erfolgreich. Die Aggregationstemperatur dieses Antikörperfragments liegt bei 40 °C (Wirtz *et al.*, 2003), es besitzt demzufolge ebenfalls eine erhöhte thermodynamische Stabilität gegenüber natürlichen variablen Domänen.

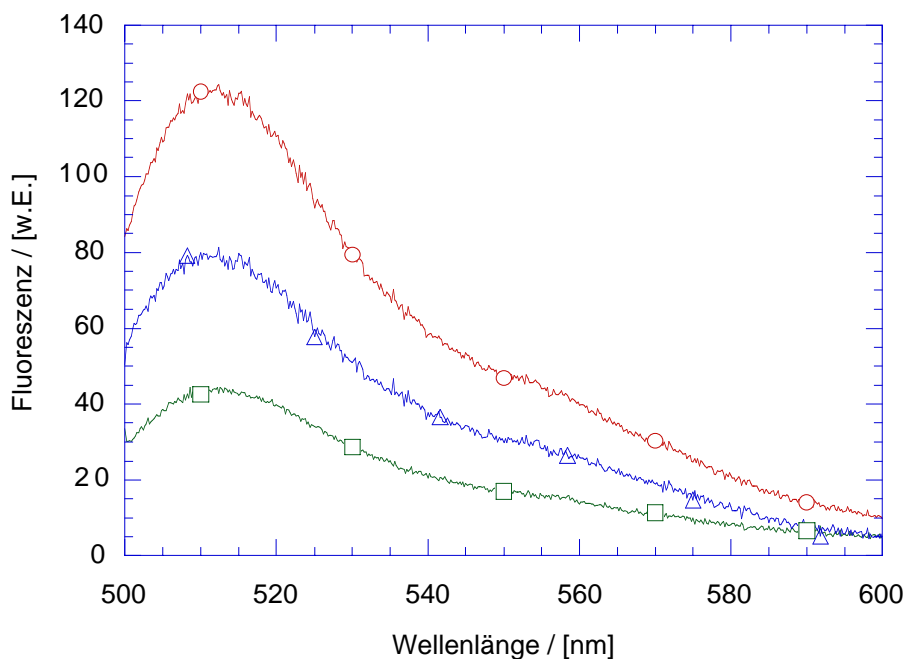


Abb. 2.28 Fluoreszenzspektren von Fluoreszein (1 nM), $\lambda_{\text{EX}} = 480$ nm, PBS, ohne Protein (○), 4 μM FlaK-scFv (oxidiert, □), Differenzspektrum (Δ). Fluoreszein zeigte deutliche abgeschwächte Fluoreszenz in Gegenwart von FlaK-scFv.

Zur Untersuchung der Spezifität wurde in diesem Fall die Fluoreszenz des Antigens Fluoreszein für eine Fluoreszenztitration genutzt. Für ein Fluoreszein bindendes Protein der Lipocalin-Familie wurde ein deutliches Fluoreszenz-*quenching* infolge Bindung an das Protein beschrieben (Beste *et al.*, 1999). Bei FlaK-scFv konnte ebenfalls eine solche Ab-

schwächung der Liganden-Fluoreszenz festgestellt werden (Abb. 2.28), sie wurde zur Bestimmung der Affinität zu Fluoreszein genutzt (Abb. 2.29). Der K_D -Wert konnte mit $K_D = (932 \pm 151)$ nM bestimmt werden. Hier zeigte sich eine deutliche Verringerung der Affinität gegenüber 4-4-20 ($K_A = 1.7E10 \text{ M}^{-1}$, entspricht $K_d = 5.9 \text{ pM}$). Die Affinität von 4-4-20 ließ sich also partiell auf das stabilisierte Fv-*framework* übertragen.

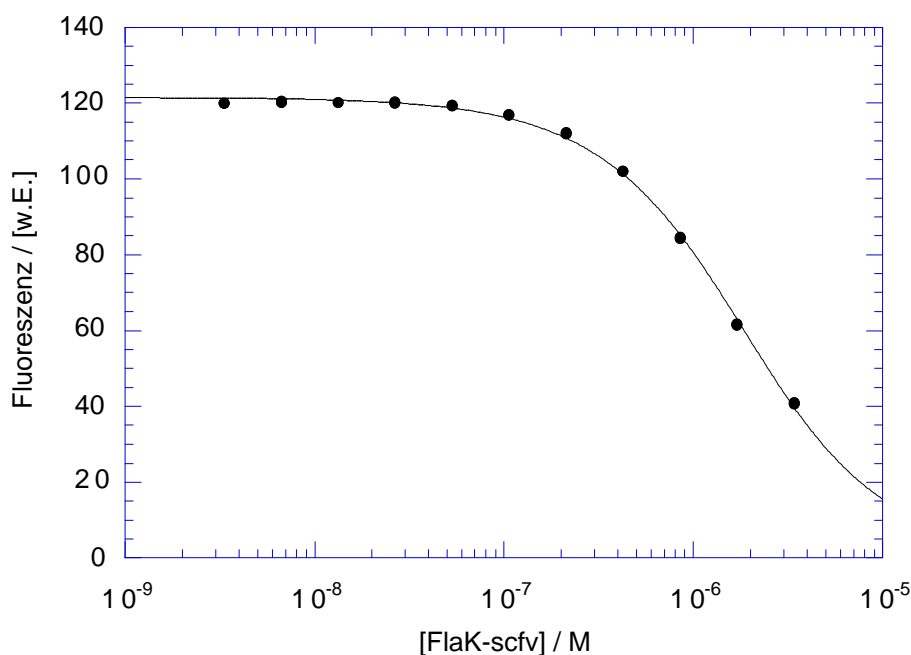


Abb. 2.29 Fluoreszenztitration der Affinität von FlaK-scfv (oxidiert) zu Fluoreszein. 1.3 nM Fluoreszein, PBS, $\lambda_{\text{EX}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 512 \text{ nm}$, Fit für bimolekulare Reaktion, $K_D = (932 \pm 151)$ nM.

Die Aufnahme des zellmembranpermeablen ungeladenen Derivates Fluoreszeindiacetat (FDA) in Bakterienzellen wurde analog zu Kap. 2.1.4.1 untersucht. Hier zeigte sich die deutlich erhöhte intrazelluläre Fluoreszenz des hydrolysierten Derivates nur in Gegenwart des Fluoreszein bindenden Fv-Fragmentes (Abb. 2.30). Ohne dieses spezifische Protein lag die Fluoreszenz der Zellen nur geringfügig erhöht gegenüber dem Nullwert ohne Fluorophor.

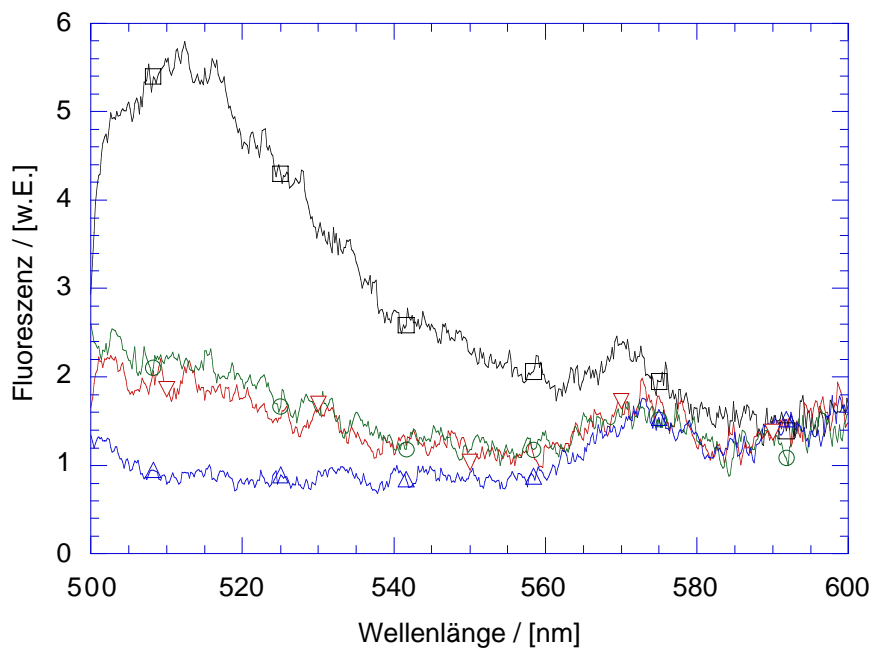


Abb. 2.30 Aufnahme des Fluoreszeinderivats FDA durch BL21-Zellen. Fluoreszenzspektrien von Zellsuspensionen in PBS (OD_{600} 0.1) nach Wachstum in 20 μ M FDA, $\lambda_{EX} = 480$ nm. Zellsuspension, FlaK-scFv-exprimierend mit FDA (\square), FlaK-scFv-exprimierend ohne FDA (Δ), ohne Fv-Expression mit FDA (\circ), aSt-scFv-exprimierend mit FDA (∇). Nur Zellen, welche das Fluoreszein-bindende Fv-Fragment exprimierten, zeigten erhöhte Fluoreszenz.

Die Anwesenheit des FlaK-Fv-Fragmentes war offenbar Voraussetzung für eine intrazelluläre Retention des Chromophors, da zwischen Zellen mit und ohne diesem Protein kein Unterschied in der Aufnahme bestehen sollte. Offenbar wurden genügend hohe zelluläre Konzentrationen erreicht, so daß eine signifikante Fluoreszenz detektierbar war, obwohl die Fluoreszeinbindung an FlaK-Fv zu Fluoreszenz-*quenching* führt.

Die Domänen dieses Antikörperfragments wurden als Referenzproteine in den *in vivo*-Untersuchungen zur ligandenabhängigen Domänenassoziation genutzt (Kap. 2.1.4.2, 2.1.4.3). Dazu wurden sie analog in die Vektoren pPC86VH-AD und pVL-DBleu (Abb. 2.24) bzw. pBT und pTRG kloniert (Abb. 2.25).

2.3 Konstruktion nanoskopischer biomolekularer Assemblies / ein *in vitro*-Interaktionsassay für Fv-Fragmente¹

In einem weiteren Projekt wurde die Dimerisierung von Fv-Fragmenten *in vitro* in einem nanomechanischen Sensor angewandt. Dieser sollte vergleichbar mit den *in vivo*-Untersuchungen ebenfalls das Konzept der Modularität eines schaltbaren Elements verkörpern. Dazu wurden einzelne Module *in vitro* zu artifiziellen Komplexen (nanoskopischen biomolekularen Assemblies, NBAs) verknüpft. Aufgrund ihres kontextabhängigen Verhaltens gestaltet sich die rationale Konstruktion von biologischen Makromolekülen mit neuartigen Eigenschaften problematisch (siehe Kap. 1.4.2). Die Konstruktion eines funktionalen NBA sollte jedoch ermöglicht werden, indem durch Verknüpfung verschiedenartiger Biomoleküle die beiden Aspekte der Funktionalisierung und der Strukturierung getrennten Verbindungsklassen zugeordnet werden. Hier wurden die strukturgebenden Eigenschaften von Nukleinsäuren mit den Funktionen von Proteindomänen kombiniert. Diese Proteine sollten mit DNA-Gerüststrukturen zur räumlichen Selbstorganisation in einem artifiziellen biomolekularen Assembly (NBA) gebracht werden.

2.3.1 Konzept

Das Prinzip der Strukturierung und Selbstorganisation eines NBA wurde zunächst als Modellsystem anhand eines Nanosensors verwirklicht. In dem konzipierten Komplex sollte durch reversible Bindung eines Liganden ein Konformationswechsel induziert werden, der optisch nachgewiesen werden kann (Abb. 2.31). Der modulare Komplex wurde mit einem Gerüst aus jeweils zwei DNA-Strängen geplant, an welches Antikörperfragmente gebunden werden sollten. Dimerisieren die Proteindomänen, so sollte dies durch ein FRET-Signal von FRET-Donor- bzw. -Akzeptormolekülen an den Enden der DNA-Stränge angezeigt werden. Da das FRET-Signal von einzelnen Chromophor-Paaren nachgewiesen werden kann, lassen sich die funktionstragenden Komplexe einzeln betrachten. Durch Immo-

¹ Die Y-Scharniere und die Fusionsproteine SH, SL betreffende Arbeiten wurden von Dr. Ingo Korndörfer und Dr. Yali Chen in der AG von Dr. Steipe am Genzentrum der LMU München durchgeführt.

bilisierung der Assemblies sollte sich das "On-Off"-FRET-Signal über die Zeit für ein einzelnes molekulares Reaktionspaar verfolgen lassen.

Dem Konzept liegt die Verallgemeinerung eines Prozessors zugrunde, eine Vorrichtung, welche eine Eingabe in eine Ausgabe umwandelt. Dieser Informationsprozessor ist hier gleichzeitig ein Sensor, das Eingangssignal wird an einem Detektor empfangen, über einen Modulator transformiert und ein Signal von einem Effektor ausgegeben.

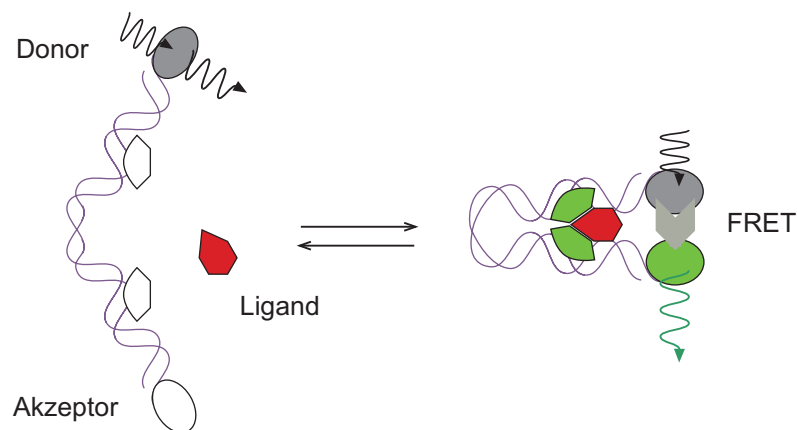


Abb. 2.31 Schema eines Biosensors, der auf Ligandenbindung mit erhöhter FRET-Effizienz reagiert. An strukturgebende, scharnierartige DNA-Stränge sind terminale Fluoreszenzchromophore (Donor bzw. Akzeptor) geknüpft, an die DNA gebundene, dimerisierende Proteine versehen das Konstrukt mit einer Ligandenerkennungs-Funktion (nach B. Steipe).

Der vorgeschlagene Aufbau sollte sich aufgrund seiner Modularität für eine Vielzahl von Anwendungen anpassen lassen. Ein Konformationswechsel des Konstrukts sollte durch reversible Bindung eines Liganden stabilisiert und mittels optischer Spektroskopie detektiert werden. Der spezielle Aufbau nutzt die Assoziation der Fv-Domänen von Antikörpern als Dimer mit einem Liganden. Diese Bindung des Liganden ist ebenso wie die Dimerisierung ein reversibler Vorgang. Als Detektorelement wird ein Fv-Dimer verwendet (Kap. 2.3.2.3); seine Dimerisierungseigenschaften dienen gleichzeitig als Modulator. Dessen beide Domänen werden genetisch an je eine Zinkfinger-Domäne fusioniert (Kap. 2.3.2.2). Dies ermöglicht ihre sequenzspezifische Bindung an ein DNA-Gerüst (Kap. 2.3.2.5.2), in welches entsprechende Zinkfinger-Erkennungssequenzen inkorporiert werden. Das Signal sollte durch die DNA-Stränge (Transducer) auf das Donor-Akzeptor-

FRET-Paar als Effektor übertragen werden. Bei der Synthese der Oligonukleotide für dieses DNA-Scharnier werden an den gegenüberliegenden Enden geeignete Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt (Kap. 2.3.2.1). Nach Assemblierung des gesamten Komplexes sollte durch Antigenbindung am Fv-Fragment eine Konformation stabilisiert werden, welche die Chromophore in räumliche Nähe bringt. Die Bestimmung der Effizienz des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET, Kap. 2.3.3), die ein Maß für den Abstand der Chromophore darstellt, würde dementsprechend einen Rückschluß auf den Assoziationszustand der Fv-Domänen ermöglichen. Durch die Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften einzelner Komplexe sollte Einblick in die Populationsverteilung des Chromophorabstandes gewonnen werden (Kap. 2.3.3). Die Häufigkeit einer geringen Distanz sollte sich über eine Erhöhung der Antigenkonzentration steigern lassen.

2.3.2 Design und Konstruktion

2.3.2.1 Design der DNA-Scharniere

Die Oligonukleotide für DNA-Stränge wurden gezielt nach der konzipierten Struktur entworfen. Je nach Konstrukt sollten diese zu zwei oder drei Doppelsträngen (ds) hybridisieren, die durch flexible Einzelstrangbereiche (ss) verbunden sind (Abb. 2.32). Für die DNA-Scharniere "U", "V", "Y3" und "Y10" (Nomenklatur nach Kolb, 2002) wurden synthetische Oligonukleotide entworfen: TMR-P53-8T-ZIF268, CY5-ZIF268-8T-P53 für "V", zusätzlich TMR-P53, Zif268-OL für "U", sowie Yt, Yb, Yc, Y0 für "Y3" und zusätzlich B-7T, Cy5-7T für "Y10" (Kap. 6.2.2.5). An zwei Enden pro Scharnier wurden die FRET-Donor- bzw. -Akzeptor-Fluorophore Tetramethylrhodamin (TMR) und Cyanin5 (Cy5) chemisch gebunden (zu physikochemischen Daten der Chromophore siehe auch Tabelle 7.1). Die Auswahl speziell dieser Chromophore erfolgte im Hinblick auf die Anforderungen durch die Untersuchungsmethode *single pair*-FRET-Spektroskopie (spFRET, siehe Kap. 2.3.3 bzw. 7.10.3). Diese 5'-Fluorophorverknüpfungen erfolgten für TMR mit einem C₃-linker, für Cy5 mit einem C₆-Linker. Die FRET-Effizienz gewährte so eindimensionale Einsicht in die molekulare Anordnung der Scharniere. Am dritten Arm des Y3-Konstrukt gekoppeltes Biotin ermöglichte seine Immobilisierung an Streptavidin. Zum

Verständnis der unterschiedlichen Hybridisierungsstrukturen findet sich in Abb. 2.32 eine schematische Darstellung.

Zur Anknüpfung von Proteinen an die DNA-Scharniere wurden zwei Erkennungssequenzen von Zinkfinger-Domänen in die doppelsträngigen Bereiche inkorporiert. In räumlich gerichteter Weise konnten so eine Zif268-Domäne und eine Mutante mit veränderter Spezifität, welche die p53-Sequenz erkennt, die DNA komplexieren (siehe dazu auch Abb. 2.33; Wolfe *et al.*, 1999).

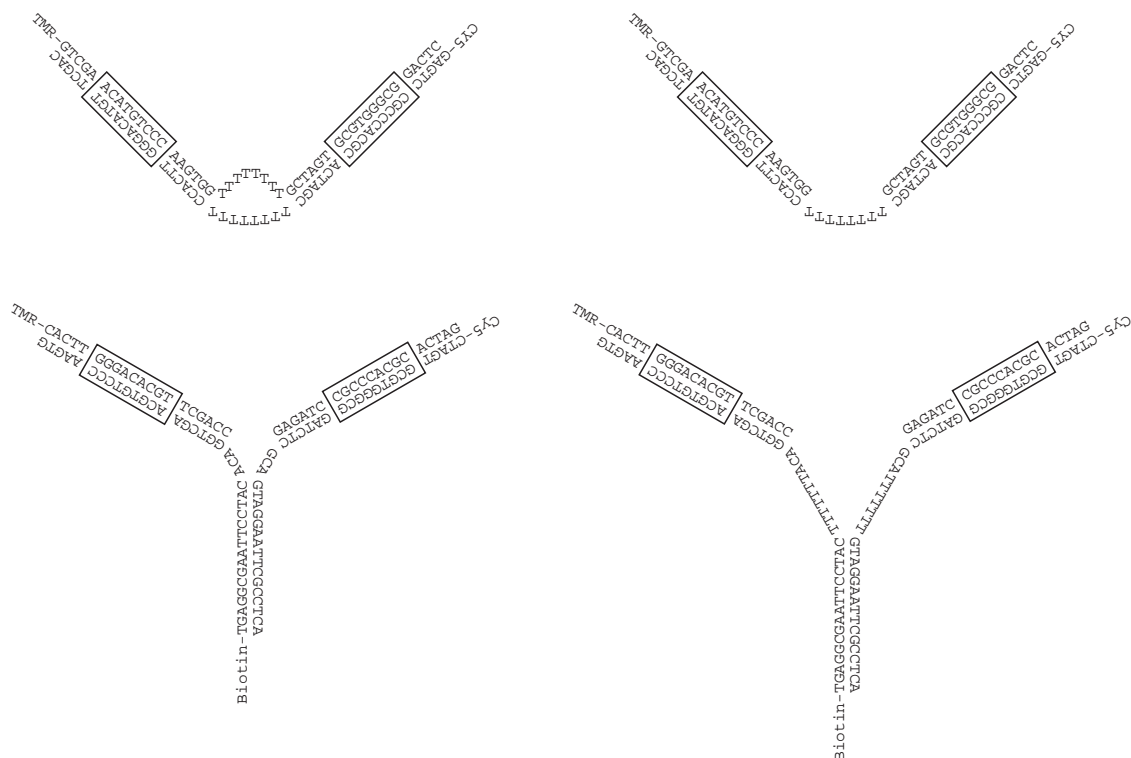


Abb. 2.32 Hybridisierungs-Schemata der DNA-Scharniere: V (oben links), U (oben rechts), Y3 (unten links), Y10 (unten rechts). Die Erkennungssequenzen der Zinkfinger in den schräg dargestellten Bereichen sind schwarz umrahmt (Kolb, 2002).

2.3.2.2 Design der DNA-bindenden Fusionsproteine

Die funktionstragenden Proteine wurden als Fusionen eines Zinkfingers mit einer variablen Antikörperdomäne konzipiert. Zur Verwendung mit den zweiarmigen DNA-Kom-

plexen U und V wurden die variablen Domänen des mAB 1C10 (Wahyono *et al.*, 1990) an einen C-terminalen Zinkfinger wie folgt fusioniert: 1C10Vl-P53zf (WL) resp. 1C10Vh-Zif268 (WH, Abb. 2.35). Das Fv-Fragment dieses mAB bindet Digitalis-Glycoside (Lemeulle *et al.*, 1998). Es besitzt eine fünffach höhere Affinität zu Lanatosid C (LC) als zu Digoxin (Dig, Abb. 2.34). Beide Dissoziationskonstanten liegen im nanomolaren Bereich. Das strukturell ähnliche Ouabain wird jedoch nicht gebunden. Mit den DNA-Scharnieren Y3 und Y10 wurden Fusionsproteine kombiniert, welche die stabilisierten Domänen des anti-Digoxin-Fv-Fragmentes aDX enthielten (siehe hierzu Kap. 2.3.2.3). Das Fusionsprotein SH (aDXh-Zif268) war analog zu WH, im dazugehörenden SL (P53zf-aDXVI) lag die VI-Domäne jedoch C-terminal (Abb. 2.35).

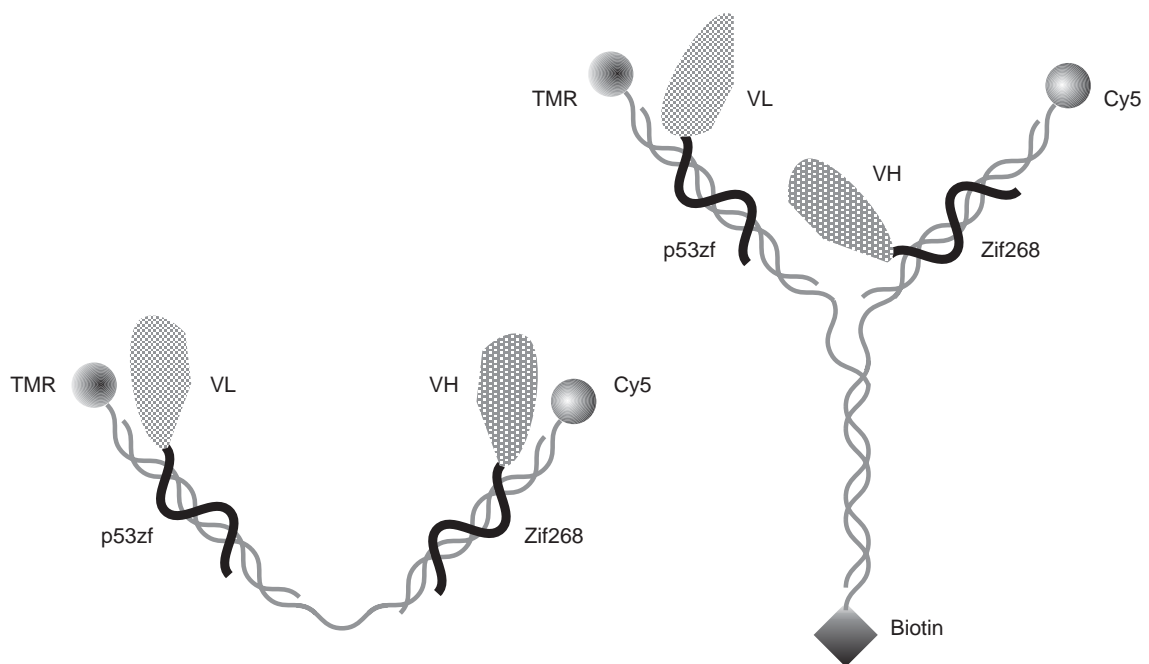


Abb. 2.33 Schematische Darstellung der NBAs. Links U-Scharnier mit den Fusionsproteinen WL (Vl-P53zf) und WH (Vh-Zif268); (V-Scharnier analog mit Doppelstrang-*linker*, siehe Abb. 2.32), rechts Y3-Scharnier mit den Fusionsproteinen SL (P53zf-Vl) und SH (Vh-Zif268); (Y10-Scharnier analog mit längeren *linker*-Regionen). Die Scharniere unterscheiden sich in den Orientierungen der Fusionsproteine.

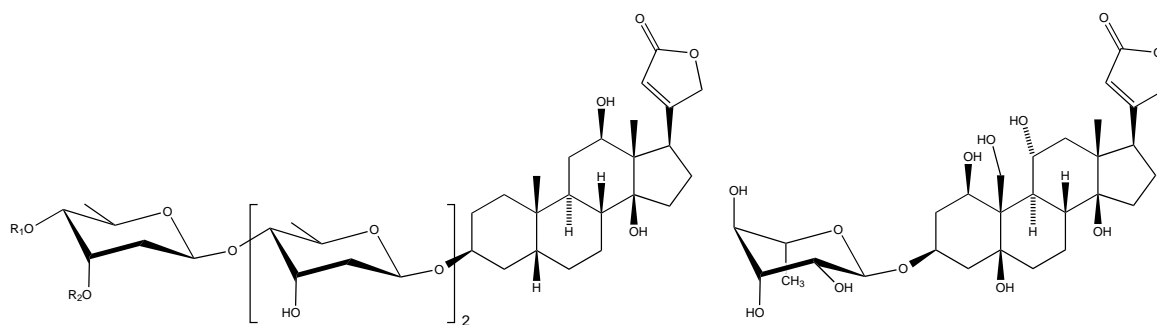


Abb. 2.34 Links: Die Digitalis-Cardenolide Digoxin ($R_1 = R_2 = H$) und Lanatosid C ($R_1 = O1$ -glucosyl, $R_2 = acetyl$). Die Unterschiede beschränken sich auf den Kohlenhydrat-Teil. **Rechts:** Das von 1C10 nicht gebundene Strophantus-Cardenolid Ouabain.

Somit wiesen in den Komplexen U und V die Antikörperdomänen der gebundenen Proteine in Richtung der Chromophore. Dagegen war in den Y-Komplexen die Vh-Domäne zur Scharniermitte gerichtet, die VI-Domäne zum TMR-Chromophor (Abb. 2.33).

WL (1C101-P53zf, 200 AS)

```

1 ADIQMTQTPS SLSASLGERV SLTCRASQDI GSSLNWLQQE PDGTIKRLIY
51 ATSSLDSGVP KRFSGSRSGS DYSLTISSLE SEDFGDYCYL QYASSPWTFG
101 GGTKLELKGK GERPYACPVE SCDRRFSMSH HLKEHIRIHT GOKPFOCRIC
151 MRNFSORGLT TRHIRHTTGE KPFACDICGR KFARLHHRLL HTKIHLROKD

```

WH (1C10h-Zif268, 212 AS)

```

1 AQVQAAESGA ELVRPGTSVK ISCKASAYSL TNYWLGWYKQ RPGQGLEWIG
51 DIYSGGGYTN HNEKFKGKAS LTADTSSSTA YMQLSSLTPE DSAVYFCVRS
101 GPYDYDEVYV GQGTLLTVSS GGERPYACP VESCDRRFSR SDELTRHIRI
151 HTGOKPFOCR ICMRNFSRSD HLTTHIRHTT GEKPFACDIC GRKFARSDER
201 KRHTKIHLRO KD

```

SL (P53zf-aDXL, 201 AS)

```

1 MERPYACPVE SCDRRFSMSH HLKEHIRIHT GOKPFOCRIC MRNFSORGLT
51 TRHIRHTTGE KPFACDICGR KFARLHHRLL HTKIHLROKD GGGDIVMTQP
101 SLSVSLGER VTISCRASQD IGSYLNWLQK KPGQPPKRLI YATSSLDSGV
151 PDRFSGSGSG TDFTLTISSV QAEDLAVYYC LQYASSSWTF GAGTKLELK

```

SH (aDXH-Zif268, 214 AS)

```

1 MEVKLQQSGA ELVKPGGSVK LSCKASGYTF TNYWLGWVKQ RPGQGLEWIG
51 DIYSGGGYTN HNEKFKSKAT LTVDKSSSTA YMQLSSLTSE DSAVYYCKRS
101 GPYDYDEVYV GQGTLLTVSS GGERPYACP VESCDRRFSR SDELTRHIRI
151 HTGOKPFOCR ICMRNFSRSD HLTTHIRHTT GEKPFACDIC GRKFARSDER
201 KRHTKIHLRO KD

```

Abb. 2.35 Sequenzen der aDX-Zinkfinger-Fusionsproteine. Zinkfingersequenzen unterstrichen.

2.3.2.3 Konstruktion eines stabilisierten Digoxin-bindenden Fv-Fragments

Um stabilisierte, im reduzierten Zustand effizient faltende Antikörperdomänen mit natürlichen auf ihre Funktion in den NBAs hin vergleichen zu können, wurden stabilisierte Varianten von 1C10 hergestellt. Die Spezifität wurde durch *CDR-loopgrafting* auf das rational stabilisierte Fv-Fragment Fv-AR analog zu Kap. 2.1.3.2 übertragen. Zum Zeitpunkt dieser Experimente gab es kein experimentell bestimmtes Strukturmodell des mAB 1C10. Deshalb wurden zur Festlegung der zu übertragenden AS-Positionen Strukturmodelle von variablen Domänen höchster Sequenzidentität verwendet; 1KNOa.pdb (Vl-Domäne), 1A3Lh.pdb (Vh-Domäne). Durch Vergleich von 1C10 mit Fv-AR und den Modellproteinen wurden die Sequenzunterschiede analysiert. Anhand der Strukturmodelle wurde die anzunehmende Position der jeweiligen Aminosäure in 1C10 ermittelt. Bei Kontakt zur Antigenbindungstasche oder Relevanz für eine alternative Peptidstruktur wurde diese Position zur Mutagenese in Betracht gezogen (Abb. 2.36). Zur *restriction selection*-Mutagenese des Vektors pTscFv-AR wurden die Oligonukleotide DigcdrH1.rev -H3.rev und DigcdrL1.rev -L3.rev verwendet. Das durch *loopgrafting* hergestellte chimäre Fv-Fragment ließ sich mit einer Ausbeute von 0.7 mg/l Kultur cytoplasmatisch exprimieren und durch IMAC (Kap. 7.8.2) reinigen. Die Aggregationstemperatur des reduzierten scFv-Fragments lag bei 39.6 °C, das Protein besitzt also eine erhöhte thermodynamische Stabilität, diese ist jedoch gegenüber der des *framework* scFv-AR (48°C) deutlich reduziert (Kap. 2.1.3; Wirtz *et al.*, 2003).

Die Bindung des Antigens (LC oder Dig) an das synthetische aDX-Fv führte zu deutlicher Abschwächung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz. Ein solcher Effekt wurde auch bei Proteinen anderer Strukturklassen mit Affinität zu derartigen Steroiden festgestellt (Schlehuber *et al.*, 2000). Dies wurde zur Messung der Affinität des Proteins zu LC durch Fluoreszenztitration genutzt (Abb. 2.37, Kap. 7.10.2.2).

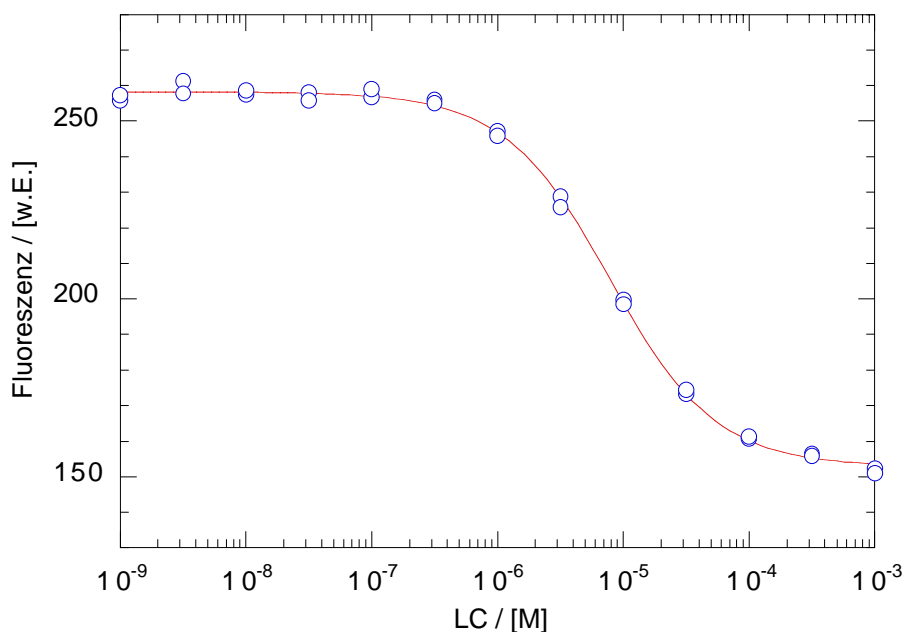


Abb. 2.37 Fluoreszenztitration zur Bestimmung der Affinität des oxidierten anti-Digoxin-scFv aDX zu Lanatosid C (LC). 1 μ M Protein, 1 % DMF, $\lambda_{\text{EX}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{EM}} = 350$ nm, $K_D = (7.3 \pm 0.3)$ μ M.

Im Vergleich zu 1C10 war die ermittelte Dissoziationskonstante mit $K_D = (7.3 \pm 0.3)$ μ M um drei Größenordnungen erhöht. Lemeulle *et al.* (1998) bestimmten die Affinität des scFv von 1C10 durch Kompetitions-ELISA mit $K_D = (2.5 \pm 0.5)$ nM. Die Spezifität des Antikörpers 1C10 zu LC konnte also mit verminderter Affinität auf das cytoplasmatisch exprimierbare aDX-Fv-Fragment übertragen werden.

Da zum Design der Mutationen für das *loopgrafting* die Nutzung eines experimentellen Strukturmodells nicht möglich war, wurden hier möglicherweise nicht alle für eine effiziente Antigenbindung notwendigen Positionen einbezogen. Die Feststellung von Positionen, welche an der Antigenbindung beteiligt und daher zu übertragen sind, ist anhand eines solchen Modells recht einfach. Gerade Haptene wie das Digoxin werden von Antikörpern oft in tiefen Kavitäten gebunden, an deren Kontaktfläche auch Nicht-CDR-Seitenketten beteiligt sind (MacCallum *et al.*, 1996). Eine Modellierung anhand der Struktur homologer Proteine (Schwede *et al.*,) war zur Bestimmung antigenkontaktierender AS nicht

verwertbar. Die putativen Kontaktregionen wurden nur anhand der Sequenz- und Strukturalignments von Proteinen mit hoher Sequenzidentität ermittelt (Abb. 2.36). Diese Vorgehensweise ist offenbar weniger effizient für den Erhalt der Affinität als die Verwendung eines experimentellen Strukturmodells wie im Fall des Stilben-bindenden mAB 19G2 (Kap. 2.1.3.2). Andererseits ist das Erreichen der nanomolaren Dissoziationskonstante von 1C10 bei tiefgreifenden *framework*-Veränderungen ohnehin weniger wahrscheinlich, als die Konservierung einer schwächeren Affinität. Möglicherweise spielen für die Affinität von 1C10 auch AS-Kontakte zur Domänenadjustierung eine Rolle, die im Templat scFv-AR nicht nachvollzogen werden.

Daß die Spezifität auf das stabilisierte Fv auch ohne Kenntnis einer Kristallstruktur des Antigen-Antikörper-Komplexes von 1C10 übertragen wurde, bestätigt die Robustheit der *loopgrafting*-Methode. Ein Großteil der entscheidenden AS-Positionen wurde also mit den Alignments identifiziert und übertragen.

2.3.2.4 Herstellung der Fusionsproteine

Das Gen von Zif268 wurde mit den Oligonukleotiden 5P-zif.for und 3P-zif.rev aus einer Maus-cDNA-Bank (zur Verfügung gestellt von Dr. Adelheit Dinkel, AG Grosschedl, Genzentrum der LMU, München) amplifiziert. Die Gene der stabilisierten aDX-Domänen wurden mit den Oligonukleotiden 5pvhzif, vh3pzif bzw. zif5pvl, zifvl3p amplifiziert, das Zinkfinger-Gen entsprechend mit vh5pzif, vhzif3p bzw. 5pzifvl und zif3pvl. Diese primären Produkte wurden durch zweistufige PCR fusioniert und über *NcoI* / *BamHI* in den Vektor pET15b kloniert. Der Zinkfinger mit zur p53-Sequenz veränderter Spezifität wurde durch drei aufeinanderfolgende zweistufige PCR-Schritte hergestellt und in die jeweiligen Vektoren im Austausch gegen Zif268 kloniert. Die Gene der variablen Domänen von 1C10 wurden aus dem Vektor BM28 mit den Oligonukleotiden 1c10h.For, 1C10H_Bpu10I.rev, 1c10l.For, 1C10L_SacI.rev amplifiziert und über *NcoI* und *Bpu10I* bzw. *SacI* als Fusionen an die Zinkfinger im Austausch gegen die stabilisierten Domänen in den pET15b-Derivaten kloniert (Klonierungsschemata siehe Kap. 9.1.5, Abb. 9.8).

Die Reinigung der Fusionsproteine gelang über in *E.coli* exprimierte *inclusion bodies* (Kap. 7.7.2). Die im denaturierenden Puffer solubilisierten Polypeptide konnten *in vitro* rückgefaltet werden (Kap. 7.8.3). Der dazu verwendete Puffer ROAMG (Kap. 7.8.3) wurde durch Vergleich von verschiedenen Rückfaltungsbedingungen optimiert (nach Armstrong *et al.*, 1999). Nach dem Waschen der *inclusion bodies* verbliebene Verunreinigungen an zellulären Proteinen präzipitierten zum größten Teil im Faltungsschritt sowie der anschließenden Dialyse. Die Fusionsproteine konnten so, je nach Konstrukt, zu 90 bis 95 % Reinheit erhalten werden. Den grundsätzlich verschiedenen Redoxbedingungen, welche Ig-Domänen und Zinkfinger zur Funktion benötigen, wurde hierbei keine Rechnung getragen. Die Experimente fanden in reduzierendem Milieu statt, um eine Quervernetzung über Cystine zu vermeiden. Zinkfinger-Domänen benötigen reduzierte Cysteine zur Zn^{2+} -Komplexierung als Voraussetzung ihrer DNA-Bindung. Ihre Strukturbildung und Funktionalität konnte anhand ihrer Bindung an die DNA-Strukturen überprüft werden (Kap. 2.3.2.5.2). Eine effiziente Faltung natürlicher Fv-Domänen unter Ausbildung der intrachainaren Disulfid-Brücke erfordert für gewöhnlich oxidierende Bedingungen. Daher war nach dem Rückfaltungsschritt nicht von korrekter Strukturbildung der 1C10-Domänen auszugehen. Für die stabilisierten aDX-Domänen, welche sich unter den reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma von *E. coli* löslich und funktional exprimieren lassen, konnte dagegen das Vorliegen einer korrekt gefalteten Struktur angenommen werden. Die Funktion der Ig-Domänen in den Fusionsproteinen als Antigen bindende Module sollte durch Untersuchung im Kontext der NBAs erfolgen (Kap. 2.3.3.1, 2.3.3.2).

2.3.2.5 Konstitution der Nanoassemblies

Die NBAs wurden jeweils schrittweise aufgebaut. Nach DNA-Hybridisierung (Kap. 7.9.1) erfolgte die Bindung der Zinkfinger-Fusionsproteine (Kap. 7.9.2). Danach wurden die Komplexe mit nativer Gelelektrophorese analysiert (Kap. 7.9.3) bzw. durch Extraktion relevanter Banden gereinigt. Die Antigenreaktion erfolgte jeweils direkt vor der spFRET-Messung (Kap. 2.3.2.5.3).

2.3.2.5.1 DNA-Hybridisierung

Das *annealing* der DNA-Stränge (Kap. 7.9.1) führte zu gegenüber dem Einzelstrang verringerter elektrophoretischer Mobilität des resultierenden partiellen Doppelstranges für alle beschriebenen Konstrukte. Der Doppelstrangcharakter wurde weiterhin anhand der erhöhten Ethidiumbromid-Bindekapazität verglichen mit den einzelsträngigen Oligonukleotiden deutlich.

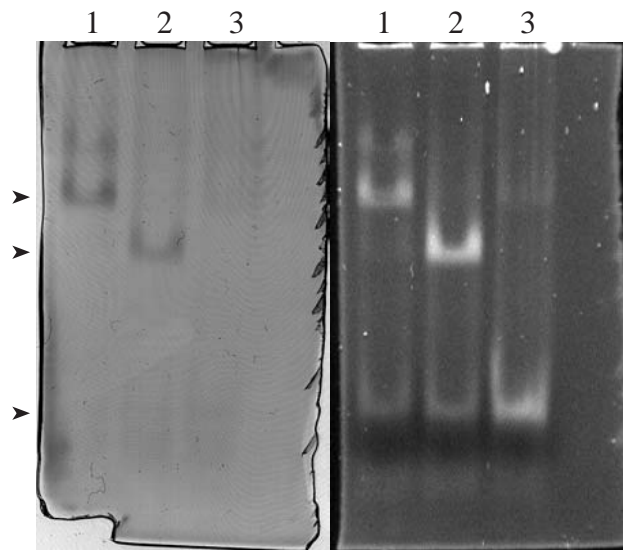


Abb. 2.38 Gel-Retardationsassay der NBAs (V-DNA) mit bzw. ohne komplexierendes Protein. 8 % Polyacrylamid; Laufrichtung nach unten; **links**: Coomassie-Färbung; **rechts**: EtBr-Färbung; Spur 1: DNA V (siehe Abb. 2.32) mit den Proteinen WH und WL (siehe Abb. 2.35); Spur 2: DNA V mit WH; Spur 3: DNA V. Die unterschiedliche Laufweite der Komplexe mit zwei Proteinen, der mit einem und der freien DNA-Scharniere ist gekennzeichnet (►).

2.3.2.5.2 Komplexierung der Proteine an der DNA

Die Inkubation der gefalteten Fusionsproteine mit den DNA-Scharnieren (Kap. 7.9.2) führte zur Bildung eines Komplexes mit weiter verringerter Mobilität im nativen Gelshift-Assay (Kap. 7.9.3). Diese Komplexe konnten durch Anfärbung sowohl mit Coomassie Blue R-250 als auch Ethidiumbromid nachgewiesen werden (Abb. 2.38). Die Komplexbildung mit nur je einem der beiden Proteine führte zu einem intermediären Laufverhalten im Gel. Daraus ließ sich auf unabhängige und spezifische Bindung beider Zinkfingerdomänen an ihre jeweiligen Erkennungssequenzen schließen. Die Komplexie-

rung mit Fv-Zinkfinger-Fusionen verlieh dem System den Charakter eines Biosensors, der auf Antigenbindung mit erhöhter FRET-Effizienz reagieren sollte (Kap. 2.3.3).

2.3.2.5.3 Antigenbindung

Die Bindung des Antigens durch die DNA-gekoppelten Fv-Fragmente erfolgte nach einfachem Mischen der Antigen-haltigen DMF-Lösung zu den gereinigten Komplexen. Für U- und V-Scharniere wurde LC als Ligand verwendet. Seine Endkonzentration lag bei 2 mM im jeweiligen Puffer mit 2 % DMSO. Y3-Komplexe wurden mit 2 mM Dig oder Ouabain, 2 % DMF, Y10 in Gegenwart von 5 mM Ligand, 5 % DMF vermessen. Um effiziente Bindung zu ermöglichen, wurde die Inkubationszeit zwischen 5 min im Fall der aDX-Domänen (Y3 und Y10-Scharniere) und 24 h für die 1C10-Domänen (U- und V-Komplexe) variiert. Nach diesen Zeiten ergaben sich in den jeweiligen Experimenten keine weiteren Verschiebungen der Populationsstatistiken (Kap. 2.3.3).

2.3.2.6 Diskussion zur Konstruktion der NBAs

Die von der Natur vor allem als Informationsspeicher genutzte DNA wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Organisation der Assemblies verwendet. DNA-Oligonukleotide als Gerüststruktur boten eine Reihe von Vorteilen. Ihre Synthese und die spezifische Chromophoranbindung sind mit den Methoden der heutigen Chemie sehr einfach und gezielt durchführbar. Die Doppelstrang-Hybridisierung als spontaner, strukturbildender Prozeß, aber auch weitere Schritte wie Proteinbindung waren unter milden physiologischen Bedingungen möglich. Die sequenzabhängige Hybridisierung komplementärer Stränge ermöglichte im Design eine Unterteilung in rigide doppelsträngige Bereiche und flexible nicht komplementäre Scharnierregionen. Auf vergleichbare Art wurden bereits eine Reihe von Strukturen entwickelt, welche DNA zur Verknüpfung und Anordnung anderer Komponenten nutzen (siehe Zitationen in Seeman, 1998). Die Sequenzinformation der doppelsträngigen Teile diente weiterhin der spezifischen Lokalisation von Proteinen an dem Nukleinsäuregerüst.

Zur Verknüpfung von Proteinfunktion und DNA boten sich Zinkfingerdomänen an. Da sie auch in der Natur als kovalent-repetitive Einheiten auftreten, was die Erkennung asymmetrischer Sequenzen ermöglicht, sind sie zur Konstruktion DNA-bindender Fakto-

ren besonders geeignet. Ihre Modularität in Funktion und Struktur ist der entscheidende Vorteil bei der Verwendung in artifiziellen Systemen gegenüber anderen Proteinen, welche DNA mit nichtmodularen Domänen zumeist als Dimer binden (Beerli & Barbas, 2002). Natürlicherweise sind diese Domänen in einer Vielzahl verschiedener Multidomänenproteine zu finden. Die gezielte künstliche Bindung von anderen Proteinen über Zinkfinger an DNA wurde sehr erfolgreich zur Konstruktion verschiedenartiger intrazellulärer Transkriptionseffektoren verwendet (ebenda).

Auch *in vitro*-Anwendungen von Zinkfingern zur Selektion veränderter Spezifitäten sind bekannt (Rebar & Pabo, 1994). Ihre Verwendung zur Lokalisation in artifiziellen Komplexen wie NBAs wurde jedoch bislang nicht beschrieben.

Durch genetische Fusion dieser Proteine mit Antikörperdomänen gelang es, den DNA-Scharnieren eine antigenbindende Funktion zu geben. Die Separation der DNA-Bindungsstellen verknüpfte die Fv-Domänenassoziation mit einer räumlichen Annäherung der DNA-Arme des Gerüsts. Somit konnte dem Komplex eine antigenabhängige Reaktion verliehen werden, welche sich über DNA-gekoppelte Chromophore spektroskopisch analysieren ließ. Damit wurde eine neue Methode der Verknüpfung von molekularer Erkennung mit makroskopischer Detektion realisiert.

2.3.3 Charakterisierung durch Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der NBAs sollte die Detektion von Konformationsänderungen innerhalb eines Makromoleküls mit hoher Sensitivität möglich sein. Für die Messung von Abständen im Bereich von 10-100 Å unter diesen Anforderungen hat sich die Nutzung des Energietransfers nach Förster (FRET) bewährt (Förster, 1946; Selvin, 1995). Da seine Messung unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann, hat sich die Technik auch in der Biologie und Biochemie durchgesetzt. Bei dem strahlungslosen Energietransfer wird über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen Energie von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen. Die Effizienz des Transfers Φ_{FRET} ist sensibel (mit der sechsten Potenz) für die Distanz R (Gl. 2.16).

$$\text{Gl. 2.16} \quad \Phi_{\text{FRET}} = 1 / \left(1 + (R / R_0)^6 \right)$$

R_0 als Abstand, bei welchem die Effizienz 50 % beträgt, stellt eine Funktion der Donor- und Akzeptoreigenschaften und der Orientierung ihrer Übergangsdipolmomente dar (Gl. 2.17; Yang & Millar, 1997).

$$\text{Gl. 2.17} \quad R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{-5} \cdot \Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot \eta^{-4} \cdot J(\lambda) \quad [\text{\AA}^6]$$

In die Berechnung dieses Abstandes gehen die spektrale Überlappung $J(\lambda)$ der Donoremission mit der Akzeptorabsorption, die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors (Φ_D), der Refraktionsindex η des Mediums und ein geometrischer Faktor κ^2 ein, der die Orientierung der Übergangsdipolmomente beschreibt. In Lösung liegen die Moleküle in einer Vielzahl von Orientierungen vor. Durch Mittelung über diese ergibt sich $\kappa = 2/3$, κ kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Typische Werte für R_0 liegen zwischen 30 und 70 Å, für das verwendete Chromophorpaar TMR und Cy5 beträgt $R_0 = 53 \text{ \AA}$.

Mit der Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie ist auch der Nachweis des Energietransfers zwischen einzelnen Molekülen möglich (Ha *et al.*, 1996; Schlichting *et al.*, 1999). Sie erlaubt, im Gegensatz zur konventionellen Ensemble-Spektroskopie, die Verteilung von Moleküleigenschaften inhomogener Systeme zu messen. Dabei kann die Verteilung entweder statisch (Craig *et al.*, 1996) oder dynamisch sein (Geva & Skinner, 1998). Die Aufnahme stochastischer Trajektorien von Einzelmoleküleigenschaften in Echtzeit erlaubt eine statistische Analyse (Lu *et al.*, 1998). Dadurch werden detaillierte Aussagen über unterschiedlich reagierende Moleküle aufgrund ihrer unterscheidbaren spektralen Eigenschaften möglich. Durch die Mittelung eines Meßwertes aufgrund der Detektionsmethode könnte eine vollständige Umsetzung mit einer kleinen Signaländerung zu einem ähnlichen Resultat führen, wie eine partielle Umsetzung mit verhältnismäßig stärkerem Signal. Anhand von Populationsstatistiken lassen sich diese Fälle unterscheiden.

Die *single pair*-FRET (spFRET)-Spektroskopie wurde an den hier beschriebenen Nanoassemblies von Frau Pamela Kolb in der Arbeitsgruppe von Prof. Christoph Bräuchle, Institut für Physikalische Chemie, Department Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchgeführt (siehe auch Kap. 7.10.3; Kolb, 2002).

Die konstruierten DNA-Scharniere wurden auf Veränderungen ihrer FRET-Effizienzen in Abhängigkeit von gebundenen Proteinen und deren jeweiliger Reaktion mit Liganden untersucht (Kap. 2.3.3.1, 2.3.3.2). Zum Vergleich wurden die ermittelten FRET-Effizienzen gegen ihre Häufigkeit aufgetragen (Abb. 2.39, Abb. 2.40). An die Daten wurden Gauß-Verteilungen angepaßt, um die verschiedenen Populationen mathematisch zu analysieren. Die ermittelten Daten sind in Tabelle 2.4 zusammengefaßt.

2.3.3.1 Komplexe mit Wildtyp -Domänen (1C10-Fv)

Die Untersuchungen ergaben für die freie U-DNA eine breite Verteilung des FRET-Signals mit einer Halbwertsbreite von 45 % (Abb. 2.39, Tabelle 2.4), die auf hohe Flexibilität des 8 Nukleotid (nt)-Einzelstranglinkers schließen ließ. Die Bindung der Proteine WL und WH führte zu deutlicher Einschränkung dieser Flexibilität, wie die schmalere Verteilung (Halbwertsbreite 20 %) mit einem Maximum (Max.) bei 0 % und das Fehlen von Molekülen mit FRET-Effizienzen über 60 % anzeigten. Weniger ausgeprägt war dieser Effekt, wenn nur ein Protein gebunden wurde (Max. 7-10 %, Halbwertsbreite 31-35 %).

Für den Komplex V konnte die Bindung der Proteine nicht deutlich beobachtet werden, da bereits das FRET-Max. der unkomplexierten DNA bei 10 % lag. Offenbar erzeugten die beiden gleich langen ungepaarten Stränge eine Rigidität bzw. konformationelle Beschränkung, die keine breite Konformationsverteilung erlaubte.

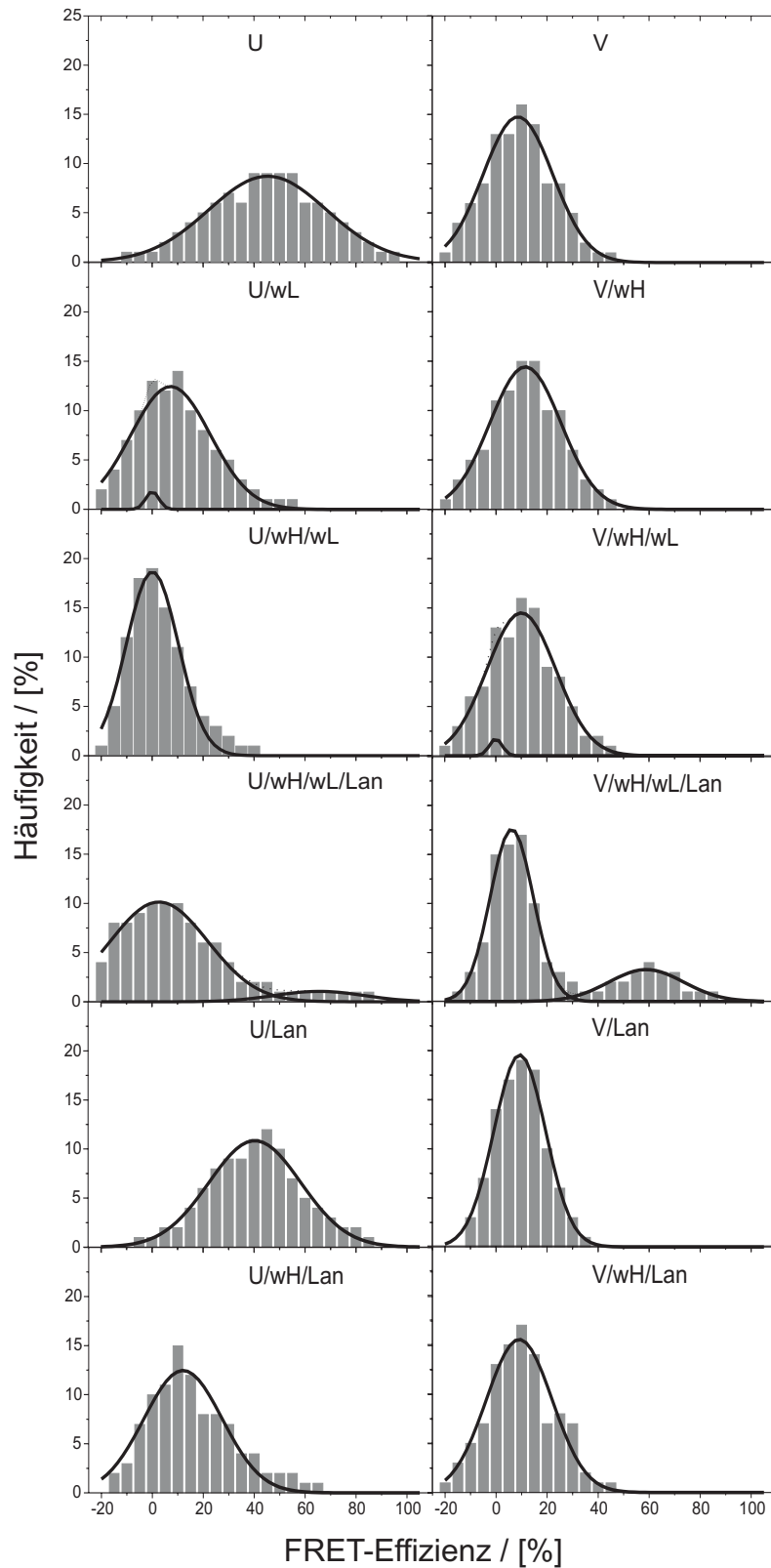


Abb. 2.39 Häufigkeitsverteilungen der FRET-Effizienzen (Kap. 2.3.3) für U- und V-Scharniere. Nähere Erläuterungen im Text.

Die Bindung von LC an V-DNA-gekoppelte Fv-Fragmente wurde von einer Verschiebung einer Subpopulation um 50 % zu höheren FRET-Effizienzen (Max. 59 %) begleitet. Diese Reaktion konnte erst nach sehr langen Inkubationszeiten (24 h) festgestellt werden. Sie erfolgte trotz sättigender Ligand-Konzentration (10^{-3} M) nur bei 24 % der Komplexe. Zur Kontrolle ebensolang inkubierte Proben ohne LC zeigten nach dieser Zeit keine meßbare Veränderung ihrer FRET-Verteilungen. Die Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen während der langen Inkubation wurde allerdings nicht kontrolliert. Daher könnte die partielle Reaktion auf Fv-Fragmente zurückzuführen sein, welche durch falsche Verknüpfung ihrer Cysteine ihre Funktionalität verloren haben. Ein Funktionsverlust mit Dissoziation der Zinkfinger-Domänen konnte im Vergleich mit U-DNA ausgeschlossen werden, da hier die proteinkomplexierten DNA-Scharniere deutlich andere FRET-Verteilungen als die freie DNA zeigten.

Bei Komplexen, die nur eines der Fusionsproteine enthielten, war keine Konformationsänderung nach Antigenzugabe zu beobachten, wie an den unveränderten FRET-Werten (Max. 10 %) deutlich wurde. Daher ließ sich die Reaktion der Scharniere mit dem vollständigen Fv-Fragment als spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion interpretieren. Durch die Bindung von Antigen an transient dimerisierende Domänen wurde das Dimer fixiert. Diese Reaktion ließ sich anhand der erhöhten FRET-Effizienzen in der geschlossenen Konformation des Scharniers für einen Teil der Population beobachten.

2.3.3.2 Komplexe mit stabilisierten Domänen (aDX-Fv)

Proteinfreie Y3-DNA zeigte eine FRET-Verteilung (Max. 11 %, Halbwertsbreite 23 %, Tabelle 2.4) ähnlich zu V, trotz ihrer zwei "aufeinanderfolgenden" einzelsträngigen 3 nt-Scharnierbereiche (Abb. 2.32). Die Flexibilität war also ebenfalls deutlich geringer als im Komplex U mit dem 8 nt-Scharnier. Andererseits war hier eher eine Abnahme des Anteils an offener Konformation aufgrund der Raumeinnahme durch den dritten Arm bei den Y-Scharnieren zu erwarten. Dies wurde jedoch anhand der gemessenen FRET-Werte allein nicht deutlich, die Fluorophore sind offenbar ausreichend voneinander entfernt. Eine Verlängerung des Linkers um 14 nt bei Y10 (Abb. 2.32), die eine höhere Flexibilität erwarten ließ, drückte sich nicht in einer verbreiterten FRET-Verteilung aus (Halbwertsbreite 23 %).

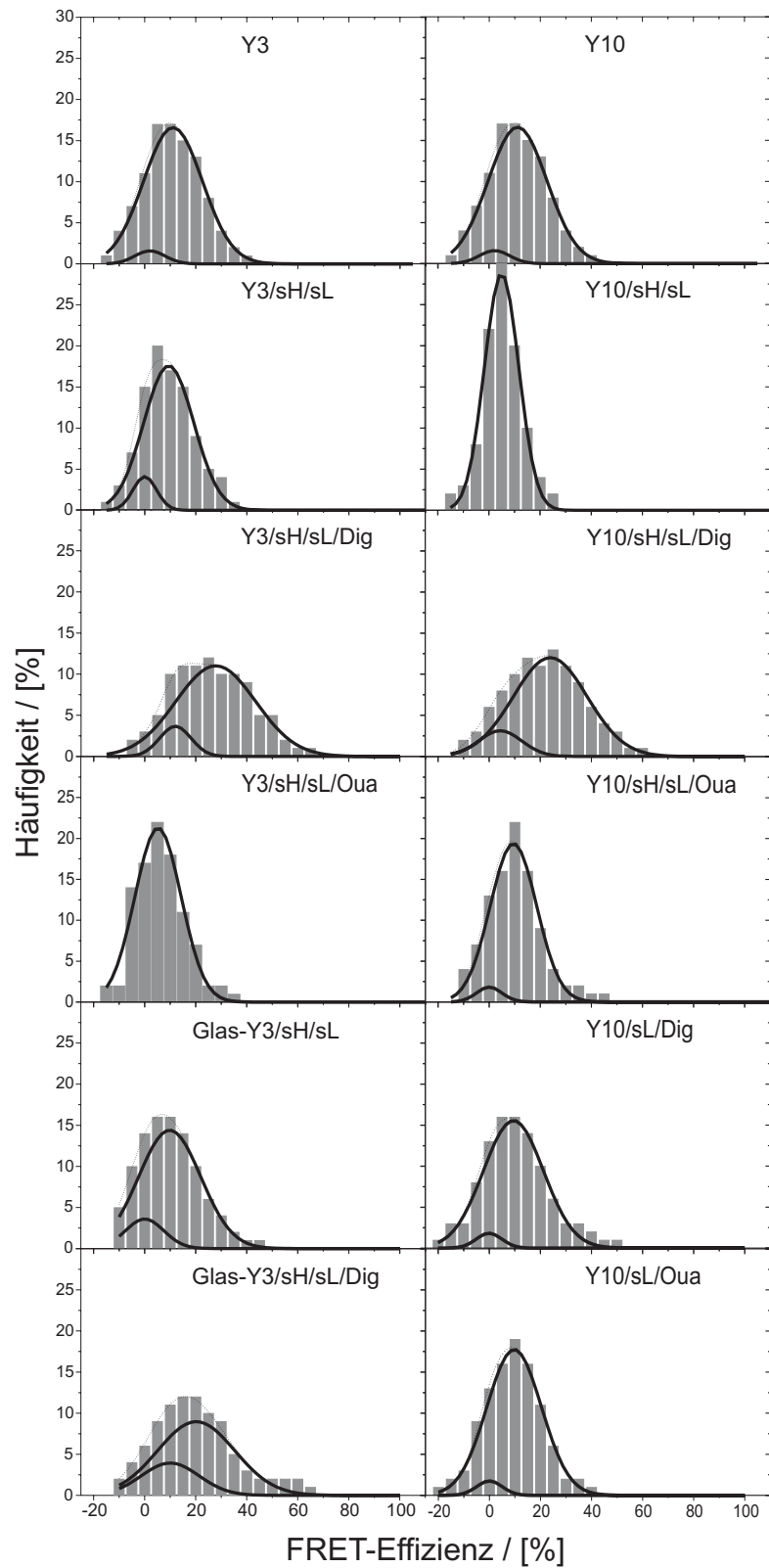


Abb. 2.40 Häufigkeitsverteilungen der FRET-Effizienzen (Kap. 2.3.3) für Y3- und Y10-Scharniere. Nähere Erläuterungen im Text.

Demnach war die Flexibilität in proteinfreien Y-Komplexen nicht durch die Linkerlänge beschränkt.

Die Bindung der Proteine SL und SH an Y3 bzw. Y10 führte zu einer leichten Verschiebung der FRET-Maxima um 2 bzw. 4 % zu niedrigeren Effizienzen. Bei Y10 wurde auch eine deutlicher Verringerung der Halbwertsbreite des Peaks um 10 auf 13 % beobachtet (siehe auch Abb. 2.40); bei Komplexierung mit nur einem Protein war dieser Effekt weniger ausgeprägt (Verringerung um 4 %). Die Proteinbindung konnte also wie auch im Fall des U-Scharniers anhand der FRET-Verteilung bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den 1C10-gekoppelten U- und V-Scharnieren zeigte die Mehrheit (fast 90 %) der aDX-Y-Komplexe infolge Dig-Bindung eine Konformationsänderung, die zu höheren FRET-Effizienzen führte. Das Maximum lag mit 28 % (Y3) bzw. 24 % (Y10) deutlich niedriger als für den 1C10-V-LC-Komplex. Die Max.-Verschiebung betrug für beide Y-Scharniere 19 % gegenüber 50 % bei V-DNA. Andererseits konnte die Reaktion bereits 5 min nach Ligandenzugabe beobachtet werden. Die Halbwertsbreiten wurden durch Antigenbindung ebenfalls erhöht, auf 31 % (Y3) bzw. 28 % (Y10).

Die Zugabe von Ouabain führte zu keiner signifikanten Verschiebung der FRET-Werte, es wurde nicht als Ligand gebunden. Die leichte Verschiebung des FRET-Max. von Y10 auf 11 % wurde auch bei Zugabe von Digoxin zum Scharnier mit nur einem Protein (Tabelle 2.4) oder nach Zugabe von 5 % reinem DMF (Daten nicht gezeigt) festgestellt.

Aus den Maxima ließen sich theoretische Abstände von $R = 62 \text{ \AA}$ für den Komplex aDX-Y3-Dig, $R = 64 \text{ \AA}$ für aDX-Y10-Dig und $R = 50 \text{ \AA}$ für 1C10-V-LC berechnen. Diese Distanzen korrelieren mit einer geknickten Konformation der flexiblen DNA-Struktur, da sie unterhalb des Erwartungswertes für ein gestrecktes 48 bp DNA-Molekül in der B-Konformation liegen, der bei Vernachlässigung der Chromophoranknüpfung 163 \AA beträgt ($3,4 \text{ \AA/bp}$). Ausgehend von dieser Länge entsprechen die berechneten Abstände bei idealisierter Konformation (keine Torsion, ein Knickpunkt im Linkerbereich) theoretischen Winkeln zwischen 43° (aDX-Y3-Dig) und 34° (1C10-V-LC).

Auch bei diesen Komplexen wurde also eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion beobachtet werden. Die erhöhten FRET-Effizienzen, welche mit der Antigenbindung korrelieren wurde für einen Großteil der Population beobachtet. Die stabilisierten Fv-Do-

mänen reagieren offenbar wesentlich effizienter, bzw. sind sie unter den Versuchsbedingungen deutlich robuster in Bezug auf ihre Funktionsfähigkeit.

Tabelle 2.4 Numerische Auswertung der FRET-Statistiken (Abb. 2.39 und Abb. 2.40). Maximum (Max.), Halbwertsbreite (HB), Populationsanteil (F) des relevanten Gaußplots, durchschnittliche "bulk"-Effizienz (BE) der jeweiligen Probe. {Daten eines dritten Gaußplots für Y3i/SH/ SL/Dig in geschweiften Klammern.} *) Maximum für U/WH/WL/LC bei 66 % nicht signifikant.

DNA	Proteine	Ligand	Max. [%]	HB [%]	F [%]	BE [%]
U	-	-	46	45	.	45
		LC	46	.	.	41
	WH	-	10	35	.	13
		LC	10	.	.	15
	WL	-	7	31	.	9
	WH, WL	-	0	20	.	3
LC		66*	35	9	11	
V	-	-	9	27	.	9
		LC	10	.	10	
	WH	-	9	26	.	11
		LC	10	.	10	
	WH, WL	-	9	21	.	10
		LC	59	29	24	19
Y3	-	-	11	23	.	11
		-	9	19	.	9
	SH, SL	Dig	28	31	89	25
		Ouabain	5	13	.	6
Y3i	-	-	10	21	.	12
		-	10	24	.	10
	SH, SL	Dig	26 {56}	20 {14}	38 {6}	18
Y10	-	-	9	23	.	11
		-	6	19	.	7
	SL	Dig	11	.	.	9
		-	5	13	.	5
	SH, SL	Dig	24	28	87	22
		Ouabain	11	.	.	10

2.3.3.3 Immobilisierte Komplexe (Y3i)

Durch Immobilisierung der Y3-Komplexe über kovalent gekoppeltes Biotin, Streptavidin und biotinyliertes BSA an einer Glasoberfläche (Y3i) konnte der zeitliche Verlauf der spektroskopischen Eigenschaften einzelner Komplexe aufgenommen werden. Ihre FRET-Effizienzen als Maß der Chromophor-Abstände beschrieben damit die Molekulardynamik solcher einzelnen Partikel im Meßzeitraum. Experimente mit oder ohne gebundene Proteine ergaben ein gleichartiges Verhalten der Molekülkomplexe. Der FRET-Wert jedes einzelnen schwankte um einen zeitlich konstanten Mittelwert, die Verteilung der Mittelwerte entsprach den in Abb. 2.40 für Y3i dargestellten. Dieser begrenzte Bereich der Signalfuktuation einzelner Komplexe in antigenfreien Proben war mit 30 % deutlich breiter als für Digoxin komplexierende (10 %). Für die einzelnen vermessenen Komplexe konnte jedoch keine zeitliche Änderung ihrer Konformationen unter den gewählten Bedingungen festgestellt werden.

Die immobilisierten Scharniere verhielten sich in Bezug auf ihre Populations-Verteilungen analog den frei im Puffer diffundierenden. Allerdings zeigte sich in Anwesenheit von Ligand eine Subpopulation mit höheren FRET-Werten {in Tabelle 2.4 in geschweiften Klammern dargestellt}. Besonders deutlich wurde eine geringere Effizienz der Antigenbindung durch immobilisierte Komplexe. Offenbar wurde der Anteil antigenerkennender Komplexe durch die Bedingungen der Immobilisierung an der Oberfläche verringert.

2.3.3.4 Diskussion zu spFRET-Untersuchungen der NBAs

Für die hier verwendeten Komplexe gelang die Analyse ihrer Funktion auf der Einzelmolekül-Ebene. Damit war die Unterscheidung von in Antigengegenwart "geschlossenen" und offenbar nicht reagierenden Populationen möglich. Anhand der unterschiedlichen Konstrukte konnte eine Zuordnung von Faktoren erfolgen, welche das detektierbare Signal beeinflussen. Eine unzureichende Komplexbildung der DNA mit daran bindenden Domänen wurde zunächst durch den Gelretardations-Assay ausgeschlossen (Kap. 2.3.2.5.2). Die Funktion der antigenbindenden Proteine dagegen zeigte sich anhand der spektroskopischen Messung (Kap. 2.3.3.1, 2.3.3.2). Bei niedriger Stabilität dieser Domänen verringerte anscheinend die Größe der an einer Antigen-Reaktion teilnehmenden

Population. Auch nahm ihre Reaktion deutlich mehr Zeit in Anspruch, was jedoch nicht näher untersucht wurde. Als Ursache für die nur partielle Reaktion kamen sowohl die geringe Stabilität der Domänen als auch mögliche Oxidationseffekte während der langen Inkubationszeit in Frage. Einerseits wurde die Funktionalität der reduzierten Fv-Domänen vor Kopplung an die DNA-Scharniere nicht eingehend analysiert. Möglicherweise war nach der Rückfaltung nur eben jener Teil in der Lage, Antigen zu binden. Für wenig effiziente bzw. erst durch das Antigen induzierte Faltung der Antikörperdomänen spricht auch die notwendige Inkubationsdauer bis zur Beobachtung der Reaktion. Andererseits konnte in dieser Zeit eine Oxidation von Cysteinen nicht ausgeschlossen werden. Reduzierte SH-Gruppen sind für die Bindung des strukturellen Metallions der Zinkfinger notwendig. Der resultierende Verlust der DNA-Bindungsfunktion könnte den FRET von der Antigenbindung entkoppelt haben. Ein Vergleich mit den breiten Effizienz-Verteilungen des Zinkfinger-freien U-Scharniers schloß jedoch eine Dissoziation der Proteine von der DNA als Grund für fehlende Reaktion aus. Daher war eher von Fehlfaltung bzw. fehlerhafter Oxidation der Antikörperdomänen auszugehen.

Bei Verwendung von stabilisierten Domänen reagierte die Mehrheit der Population bereits nach einer kurzen Inkubation mit dem Antigen. Die Funktionsfähigkeit dieser Proteine wurde unter den Versuchsbedingungen also nicht durch die Faktoren wie Fehlfaltung oder Oxidation der Cysteine eingeschränkt. Allerdings lag kein Vergleich mit 24 h inkubierten aDX-Komplexen vor. Aufgrund der erhöhten Faltungsstabilität wäre hier jedoch eher mit korrekter Oxidation der Cysteine zu rechnen.

Die verzerrte Anordnung der aDX-Domänen bedingte einen größeren verbleibenden Abstand zwischen den Chromophoren, was mit einer Erhöhung der FRET-Effizienzen um einen geringeren Betrag korreliert, verglichen mit optimaler Ausrichtung am Scharnier wie bei den 1C10-Domänen.

Durch Immobilisierung von Y3-Scharnieren wurde das FRET-Signal bezüglich der Schließ- und Öffnungsbewegung einzelner Scharniere in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Allerdings konnte keine Veränderung des Mittelwertes des FRET-Signals festge-

stellt werden. Offenbar fand unter den Versuchsbedingungen keine zeitlich auflösbare Konformationsänderung der Scharniere statt. Die Schwankungen der FRET-Daten um einen jeweils charakteristischen Mittelwert lassen auf Fluktuation im Mikrosekunden-Bereich schließen. Anhand der Messungen konnte jedoch keine Dissoziation des Liganden von den Scharnieren beobachtet werden, welche mit einer dauerhaften Änderung des Chromophorabstandes verbunden war. Entweder erfolgte trotz Dissoziation keine Öffnung des Scharniers, oder die Antigen-Konzentration unterband aus thermodynamischer Sicht die Dissoziation. Eine Unterscheidung der Fälle sollte bei Variation der Antigenkonzentration möglich sein.

Aus der statistischen Analyse reversibler Einzelmolekülreaktionen als stochastische Ereignisse ließen sich die Ratenkonstanten der Hin- und Rückreaktion ermitteln. Durch Messung vieler einzelner Nanoassemblies würde eine Verteilung der Raten die statische Inhomogenität des Reaktionssystems aufzeigen (Craig *et al.*, 1996). Bei zeitlicher Fluktuation der Raten einzelner Komplexe ließe sich die dynamische Inhomogenität feststellen (Lu *et al.*, 1998). Diese Parameter ließen sich in dem beschriebenen System jedoch nicht näher charakterisieren.

Die optimale Anordnung der natürlichen Antikörperdomänen führte zu einer deutlichen Verschiebung des FRET-Maximums bei einem Teil der Scharniere um 50 % oder mehr. Dies belegt die prinzipielle Eignung auch nicht stabilisierter Fv-Fragmente. Eine sterisch optimale Anordnung mit stabilisierten antigenbindenden Domänen ist demnach die sinnvollste Kombination. Ein solches Konstrukt wäre zur deutlichsten Reaktion (Antigen-induzierte Dimerisierung des Fv) in Bezug auf teilnehmende Population und Erhöhung der FRET-Effizienz befähigt. Sowohl die Faltungstabilität der verwendeten Proteine als auch ihre Orientierung im Komplex mit der DNA spielen also eine bedeutende Rolle bei der Konstruktion von derartigen biomolekularen Nanoassemblies.

Einen genaueren Vergleich der molekular-mechanischen Zustände und Vorgänge sollte mit Methoden des *molecular modelling* zugänglich sein.

Zusammenfassend ließ sich mit den spektroskopischen Untersuchungen die Verwirklichung des eingangs beschriebenen Konzeptes der NBAs bestätigen. Die Strukturierung unter Hybridisierung zu DNA-Doppelsträngen mit einzelsträngigen Scharnierbereichen konnte im Gelshift nachgewiesen werden. Ebenso führte die Bindung der verschiedenen Proteine zu veränderter elektrophoretischer Mobilität. In den spektroskopischen Untersuchungen führte die Bindung der Zinkfinger-Proteine z.T. zu einer deutlichen Einschränkung der DNA-Scharniere bezüglich ihrer konformationellen Freiräume. An diesen Komplexen konnten Antigen-induzierte Populationsverschiebungen der FRET-Effizienzen beobachtet werden, welche sich mit einer Dimerisierung der Fv-Domänen erklären ließ. Das ließ auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der Konstrukte mit den Fv-Fragmenten schließen. Zur Konstruktion eines nanomechanischen Sensors ließen sich also sowohl die Antigenbindungs- als auch die Dimerisierungseigenschaften der 1C10- und aDX-Fv-Fragmente nutzen.

3 Diskussion²

3.1 Ist das Design neuartiger Proteinfunktionen möglich?

Die Anwendung in der Natur verwirklichter Prinzipien hat die Geschichte von Wissenschaft und Technik begründet und begleitet. In der modernen Forschung gewinnt sie weiter an Bedeutung aufgrund der Zunahme an Einsicht in natürliche Prozesse.

Eine Schlüsselstellung in sämtlichen zellulären Prozessen kommt der molekularen Erkennung zu. In dieser Arbeit wurde im Rahmen der Entwicklung eines künstlichen, lichtschtbaren Transkriptionsfaktors eine artifizielle Ligand-Protein-Wechselwirkung (Kap. 2.1.1) konzipiert und genutzt. Eine weitere Anwendung fand dieses Prinzip bei der Konstruktion von artifiziellen biologischen Assemblies (NBAs, Kap. 2.3.2).

Dabei stellte sich die Frage, ob die Implementation neuartiger Funktionalitäten in natürliche Systeme überhaupt möglich ist. Offenbar arbeitet die Natur in dieser Hinsicht konservativ; wenn eine ähnliche Funktion bereits vorhanden ist, wird sie eher adaptiert als "neu erfunden". Auch die vom Menschen betriebene technische Entwicklung folgt diesem Prinzip, insbesondere in der naturwissenschaftlichen Forschung:

So wurden in Proteine neu implementierte Funktionalitäten bereits existierenden abgeschaut. Durch Mutationen wurden beispielsweise Metall-Bindungsstellen erzeugt, welche bekannten Metallo-Proteinstrukturen nachempfundenen sind (Hellings, 1996). Die Anforderungen der Koordinationsgeometrie solcher Chelatliganden ließen sich z.T. bereits durch Punkt-Mutationen auf der Oberfläche natürlicher Proteine erfüllen (Higaki *et al.*, 1990). Im diesem Fall konnte die Aktivität einer Trypsin-Mutante über die Konzentration divalenter Kationen gesteuert werden. Das Enzym wurde auf diesem Weg mit einer neuen Steuerungsfunktion seiner Aktivität versehen; umgekehrt betrachtet stellt es somit einen Metallsensor dar.

² Eine Diskussion und Interpretation der einzelnen Experimente erfolgte jeweils im Zusammenhang des betreffenden Ergebnis-Kapitels.

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden existierende Funktionen zum Design neuartiger adaptiert, so ist das Azobenzol bindende Fv-Fragment aSt einem ähnlichen, Stilben bindenden nachgebaut.

Prinzipiell scheint die Anwendung von Biomolekülen mit neuartigen Funktionen in lebenden Zellen ein seltener begangener Weg zu sein. Die gezielte genetische Veränderung zellulärer Elemente sollte es ermöglichen, die Zellen nicht-natürlichen Stimuli zugänglich zu machen. So führen in die Interaktionsoberfläche des humanen Wachstumsfaktors (hGH) und seines extrazellulären Rezeptors (hGHR) an entscheidenden Positionen eingeführte Mutationen zur Inhibition ihrer Interaktion. Die Assoziation der veränderten Proteine und die davon abhängige Transkriptionsaktivität der entsprechenden Zellen konnte mit einem synthetischen Benzimidazolderivat wiederhergestellt werden, das die Kavität in der zerstörten Interaktionsoberfläche komplementiert (Guo *et al.*, 2000). In diesem Fall ließ sich die hGH-regulierte Genexpression nun gezielt stimulieren. Eine breite Anwendung des vielversprechenden Prinzips auf andere Proteininteraktionen steht bislang noch aus.

3.2 Intrazelluläre Anwendung von Antikörperfragmenten

Zur Konstruktion eines artifiziellen, lichtschtbaren Transkriptionsfaktors wurden im Rahmen dieser Arbeit Antikörperfragmente hergestellt, die intrazellulär angewandt sein sollten. Damit war ihre Funktion unter den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas notwendig. Dies wurde durch Nutzung eines rational stabilisierten *frameworks* ermöglicht, welches sich auch ohne seine Disulfid-Brücke stabil faltet (Kap. 2.1.3.1; Wirtz *et al.*, 2003).

Die systematische Anwendung intrazellulärer Antikörpertechnologie ist ein recht junges Gebiet, auch wenn cytoplasmatische Exprimierbarkeit funktionalen Proteins bereits in einer Reihe von Fällen erreicht worden ist (Cattaneo & Biocca, 1997; Cochet *et al.*, 1999). Die ersten Berichte von Antikörpern, welche Enzyme intrazellulär inaktivieren oder ersetzen können, liegen bereits länger zurück (Carlson, 1988; Tang *et al.*, 1991). Eine detaillierte Analyse wurde für die *in vivo*-Funktion eines anti-Tau-scFv beschrieben (Visintin *et al.*, 2002).

3.3 Dimerisierung von Fv-Fragmenten

Für bestimmte Fv-Fragmente konnte bereits gezeigt werden, daß ihre Dimerisierung sensitiv gegenüber Konzentrationsänderungen des Antigens ist bzw. durch das Antigen induziert wird (Suzuki *et al.*, 2000). Voraussetzung dafür ist die Dissoziation der variablen Domänen im entsprechenden Konzentrationsbereich, der für natürliche Fv-Fragmente sehr variabel ist. Entscheidend ist das Verhältnis der beiden Dissoziationskonstanten für Dimerisierung und Antigenbindung sowie die intrazellulären Konzentrationen. Aus theoretischen Überlegungen sollte das System dann sensitiv gegenüber der Antigenkonzentration sein, wenn $K_{D1} \gg K_{D2}$ gilt (Abb. 3.1).

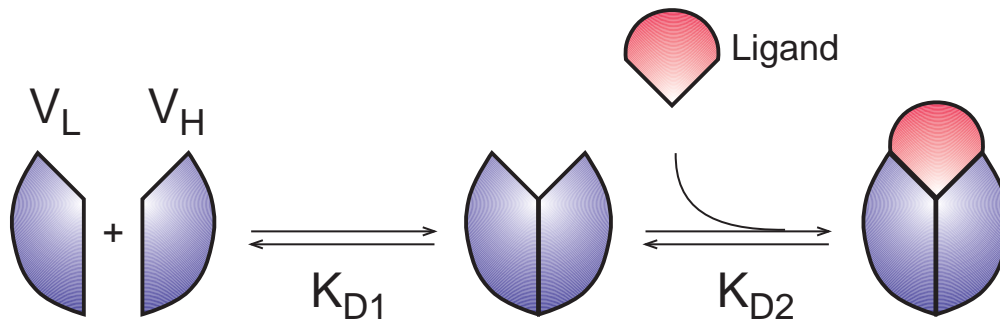


Abb. 3.1 Schema der Gleichgewichtsreaktion eines Fv-Dimers mit seinem Antigen (Ligand).

Bei niedriger Proteinkonzentration kann Fv-Dissoziation in Abwesenheit des Antigens sogar zur Entfaltung der Domänen führen (Jäger & Plückthun, 1999). Hier kommt die thermodynamische (Faltungs-)Stabilität der einzelnen Domänen zum Tragen. Die Korrelation von guter Exprimierbarkeit mit Stabilität (Ohage & Steipe, 1999) läßt einen solchen Fall für die aSt-Domänen nicht erwarten. Für dieses Fv-Fragment konnte eine Antigen-abhängige Dimerisierung nach obigem Schema mit ITC-Untersuchungen bestätigt werden (Kap. 2.1.3.4). Damit war eine wichtige Voraussetzung zur Nutzung des Fv als Transkriptionsfaktor erfüllt.

3.4 Voraussetzungen zur Anwendung des ast-Fv

Nach dem in Kap. 2.1.1 vorgestellten Konzept eines Transkriptionsfaktors mußten weitere Bedingungen erfüllt sein. Dazu gehören seine intrazelluläre Exprimierbarkeit, die Funktionalität in diesem Kompartiment auch als Fusionsprotein und die Lichtschaltbarkeit der Dimerisierung.

Die intrazelluläre Expression des Fv wurde durch *loopgrafting* der CDRs auf ein stabilisiertes *framework* erreicht, welches sich in sehr guten Ausbeuten cytoplasmatisch exprimieren läßt (Wirtz *et al.*, 2003). Auch das synthetische aSt-scFv ließ sich unter diesen reduzierenden Bedingungen herstellen (Kap. 2.1.3.2).

Die Spezifität des Proteins konnte durch Fluoreszenztitration bestätigt werden (Kap. 2.1.3.3.1). Der Nachweis der *in vivo*-Funktion, also Bindung des Antigens in der lebenden Zelle, sollte mit der Anwendung des Transkriptionsfaktors selbst erfolgen. Ein positives Indiz für diese Bindung war die verstärkte Stilbenfluoreszenz in aSt-scFv exprimierenden Zellen (Kap. 2.1.4.1).

Die Funktionalität eines ähnlichen Dimerisierungsmoduls aus den aDX-Fv-Domänen (fusioniert mit Zinkfingern) konnte unter reduzierenden Bedingungen *in vitro* nachgewiesen werden. Die Konstruktion der NBAs läßt sich gewissenmaßen als Modellsystem zur Untersuchung der Dimerisierungseigenschaften eines Fv-Fragmentes verstehen.

Fusionsproteine mit Fv-Fragmenten bzw. Antikörperdomänen wurden in einer Reihe von Anwendungen genutzt (Gavilondo & Larrick, 2000). Eine Funktionalität der Fusionen kann jedoch nicht generell vorausgesagt werden. In den meisten Fällen beeinträchtigt die Verknüpfung der Domänen über das "sc"-Linkerpeptid die Funktion nicht. Auch bei Vereinzelung der Domänen erfolgt die Antigenbindung für gewöhnlich durch das Dimer. Aufgrund des großen Anteils der Antigenbindungstasche am Domänen-*interface* war dies auch im Fall des Azobenzol-bindenden Fv zu erwarten.

3.5 Anwendung von Fv-Fragmenten als Transkriptionsfaktoren

Eine interessante Theorie zur Funktion künstlicher Transkriptionsfaktoren (SIBRAs, *synthetic inducible biological response amplifiers*) wurde von Radulescu (1995) vorgestellt. Die wichtigsten Eckpunkte des Konzeptes sind Ligandenbindung, DNA-Lokalisation

und eine Transaktivierungsdomäne. Im beschriebenen Fall sollte der Faktor auch seine eigene Expression kontrollieren können.

Das Konzept der Anwendung des aSt-Fv-Fragmentes schien im Prinzip ein gangbarer Weg zur Entwicklung eines künstlichen Transkriptionsfaktors zu sein. Die DNA-Lokalisation wird durch das *2hybrid*-System gegeben, die Ligandenbindung konnte *in vitro* nachgewiesen werden, Indizien für die Funktion *in vivo* wurden ebenfalls gefunden (Kap. 2.1.4.1). Sowohl die Abhängigkeit der Azobenzolbindung von seiner Konformation (Kap. 2.1.3.3.4; siehe auch Harada *et al.*, 1994), als auch die Antigen-induzierte Dimerisierung von Antikörperfragmenten (Kap. 2.1.3.4; siehe auch Suzuki *et al.*, 2000) sind verstandene Prinzipien und konnten für das verwendete Fv ebenfalls gezeigt werden.

Beispiele für Antikörperfragmente als Interaktoren in *2hybrid*-Systemen sind bereits bekannt (Cattaneo & Biocca, 1999; Visintin *et al.*, 2002). Allerdings ist die Antigen-induzierte Dimerisierung in die Anwendung von Antikörperdomänen als Transkriptionsfaktoren bislang nicht einbezogen worden. Bezogen auf die Theorie der SIBRAs (s.o., Radulescu, 1995) entspricht dies der Verknüpfung von Ligandenbindung mit der Transaktivierungsdomäne. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebene Anwendung eines Fv-Fragmentes implementiert damit einen neuartigen, artifiziellen Mechanismus. Im Gegensatz zu natürlichen photosensitiven Transkriptionsfaktoren reagiert es auf Lichtstimuli nicht durch Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden weiterer Faktoren. Hier sollte die Photoisomerisierung eines artifiziellen Lichtsensors direkt die Dissoziation der transkriptionsaktivierenden Domäne von der Initiationssite an der DNA auslösen.

Die Anwendung des Fv-Fragmentes in den *2hybrid*-Systemen führte jedoch bislang nicht zum erwarteten Erfolg. Wahrscheinlich waren die Konzentrationen der Proteine zur Komplexbildung im Sinne des thermodynamischen Gleichgewichts aufgrund des verwendeten Y2H-Systems nicht ausreichend (Kap. 2.1.4.2.4). Eine höhere Konzentration der Azobenzolderivate war aufgrund ihrer Toxizität nicht sinnvoll einsetzbar. Im bakteriellen *2hybrid* verhinderte wahrscheinlich die Fusionsrichtung eine effiziente Strukturbildung der Fv-Domänen (Kap. 2.1.4.3.3).

3.6 Azobenzol als Lichtsensor

Bislang beschriebene, *in vivo* anwendbare photosensitive Elemente umfassen vor allem *caged compounds*, welche bei Belichtung eine photolabile Komponente abspalten und ein natürliches Effektormolekül freisetzen (caged Östradiol, Cruz *et al.*, 2000).

Die Verwendung von Azobenzol-Derivaten in den Materialwissenschaften umfaßt z.B. Flüssigkristalle mit modulierbarer Refraktivität oder optische Speicher (Ikeda *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2002). Aber auch aus der Biochemie und Molekularbiologie sind erfolgreiche *in vitro*-Anwendungen des photoisomerisierbaren Azobenzol bereits bekannt. So wurde sie zur lichtabhängigen Regulation von Enzymaktivitäten genutzt (Willner *et al.*, 1991a; Willner *et al.*, 1991b). Eine neuere Entwicklung ermöglicht gezieltes *labeling* von Proteinen durch Einsatz Azobenzol-modifizierter Aminoacyl-tRNAs, welche spezielle Quadruplett-Codons erkennen (Muranaka *et al.*, 2002). In einem anderen Fall konnte nach künstlichem Einbau von Azobenzol-markierten Basen in Promotorregionen eine lichtabhängige direkte Transkriptionsmodulation bewirkt werden (Asanuma *et al.*, 2002). Die erzielte spezifische Interkalation des Aromaten in transkriptionell aktive DNA-Bereiche eröffnet völlig neuartige Möglichkeiten der Einflußnahme auf die Aktivität von RNA-Polymerasen. Bislang blieben solche Anwendungen unter Einsatz künstlich modifizierter Komponenten der Genexpression jedoch auf *in vitro*-Systeme beschränkt.

Bei Verwendung eines Azobenzol-Derivats als Antigen zur Immunisierung ließ sich ein lichtsensitiv bindender Antikörper gewinnen. So wurde von dem murinen Antikörper 1ZHO1, der das *trans*-Isomer eines Azobenzol-alanin-haltigen Peptids bindet, eine photo-reversible Antigen-Antikörper-Reaktion beschrieben (Harada *et al.*, 1991). Weiterhin konnte unter Bestrahlung mit gepulstem Laserlicht festgestellt werden, daß eine Photoisomerisation des Antigens im gebundenen Zustand möglich ist und erst infolgedessen der sterisch ungünstige *cis*-Ligand von diesem Antikörper dissoziiert (Harada *et al.*, 1994). Eine *in vivo*-Anwendung, welche auf der spezifischen Bindung des Antigens beruht, ist bislang nicht beschrieben.

Vor diesem Hintergrund stellt eine *in vivo*-Anwendung von Azobenzol nach dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Prinzip einen neuen Weg zu einem künstlichen

transkriptionsaktiven Lichtsensor dar (Abb. 2.1). Allerdings sind für eine erfolgreiche Etablierung noch einige Fragen offen. Die Reaktionen auf eine Photoisomerisation des Azobenzols ließen sich in allen oben genannten Fällen makroskopisch nachweisen, sind jedoch im molekularen Detail bislang nicht verstanden.

3.7 Nanoskopische biomolekulare Assemblies

Die Konstruktion der NBAs erfolgte als Modellsystem zur Untersuchung der ligand-induzierten Dimerisierungseigenschaften von Fv-Fragmenten. Mit diesem System konnten zugleich Konzepte der Konstruktion eines modularen Biosensors verwirklicht werden. Die Aspekte "Funktion" und "Organisation" wurden dazu auf verschiedene Klassen von Biomolekülen aufgeteilt. Auch in natürlichen Systemen findet man eine "Aufgabenteilung" zwischen Molekülen verschiedener Klassen, wenn auch weniger strikt (z.B. dient DNA als Speicher genetischer Information, Lipide begrenzen als Membranen zelluläre Reaktionsräume, Proteine übernehmen Funktionen katalytischer Art im Metabolismus, der Signalrezeption bzw. -übertragung, aber auch der Strukturgebung).

In artifiziellen Systemen wurde das Konzept einer solchen Aufgabenteilung zur Präsentation von Oligonukleotiden auf Membranen angewandt, welche sich durch Hybridisierung modifizieren lassen. Boireau *et al.* (2001) verknüpften Oligonukleotide zur Verankerung chemisch mit Cytochrom B5. Die ssDNA diente der Funktionalisierung, das Protein lokalisierte die Komplexe in Lipidmembranen. Miyake *et al.* (1997) konnten Cytochrom C-modifizierte, photosynthetische Reaktionszentren an Lipidschichten assemblieren. Mit diesen konstruierten sie künstliche *light harvesting*-Komplexe in Chlorophyll-haltigen Liposomen. Niemeyer *et al.* (2001) verwendeten dsDNA als *spacer* und Proteine als Knotenpunkte zur Strukturierung artifizieller Nanoassemblies. Eine Funktionalisierung erfolgte auch hier über Hybridisierung der chemisch an Streptavidin gekoppelten ssDNA mit komplementären Oligonukleotiden. Diese können beispielsweise mit Enzymen oder Antikörpern modifiziert werden. Der Artikel von Niemeyer (2002) bietet eine Übersicht über semisynthetische DNA-Protein-Komplexe.

Ein prinzipiell ähnlicher FRET-Sensor zur Antigendetektion, der jedoch nicht durch DNA-Strukturen präformiert ist, wurde von Arai *et al.* (2000) als *open sandwich*-ELISA

entwickelt. Die Autoren konnten mit Fusionsproteinen von GFP-Derivaten und Antikörperdomänen in *bulk*-Messungen eine gute Korrelation von FRET-Effizienz und Antigenkonzentration feststellen. Die Untersuchung einer derartigen Reaktion durch Einzelmolekülspektroskopie wurde jedoch noch nicht beschrieben.

Die Konstruktion von nanoskopischen biomolekularen Assemblies konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit realisiert werden. Das hier verwendete Konzept der nicht-kovalenten Verknüpfung läßt den einfachen Austausch sowohl der struktur- als auch funktionsgebenden Module zu. Damit ist ein Umbau oder eine Erweiterung derartiger Assemblies aufgrund von Reißbrettskizzen prinzipiell möglich. Veränderte Module zur Verankerung, Quervernetzung oder Detektion lassen sich mit einfachen chemischen oder molekularbiologischen Methoden effizient und preiswert herstellen.

4 Zusammenfassung

Die Nutzung von Antikörpern als Werkzeuge der molekularen Erkennung findet zunehmendes Interesse in nicht medizinischen Gebieten wie der molekularbiologischen Forschung und der Nanotechnologie. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Anwendungsmöglichkeiten der Dimerisierung von Antikörper-Fv-Domänen als modulare Einheiten untersucht. Zur intrazellulären Expression dieser Proteine wurden die Spezifitäten bekannter Antikörper auf rational stabilisierte Fv-Fragmente übertragen. Darauf aufbauend wurden zwei grundlegend verschiedene Einsatzmöglichkeiten der Proteine entworfen und entwickelt. Die intrinsische Fähigkeit unverbrückter Antikörper-Fv-Fragmente zur Domänen-Dissoziation war Voraussetzung für beide Anwendungen. Daher konnte die Verschiebung des Dimerisierungsgleichgewichts der variablen Domänen in Abhängigkeit von der Konzentration des Fv-spezifischen Antigens (Ligand) für molekulare Schaltvorgänge genutzt werden.

in vitro wurde diese Ligand-induzierbare Assoziation zur Funktionalisierung von modular aufgebauten, artifiziellen nanoskopischen Assemblies genutzt. Hierzu wurden anti-Digoxin-Fv-Domänen mit DNA-bindenden Zinkfingerproteinen fusioniert. Diese wurden sequenzspezifisch an flexiblen synthetischen DNA-Scharnieren mit terminalen FRET-Fluorophoren verankert. Der Chromophorabstand in den Komplexen war damit ein Maß für die Dimerisierung und Ligandenbindung der Fv-Fragmente. Der Zusammenhang von FRET-Effizienz mit der ligandeninduzierten Dimerisierung konnte bestätigt werden.

Struktur und Wirkung dieser Komplexe ließen sich offenbar aufgrund einfacher natürlicher Prinzipien entwerfen und verstehen. Damit bietet das Konzept der verwendeten Module (synthetische DNA-Stränge, Zinkfinger, Antikörperdomänen als dimerisierender Schalter) interessante Möglichkeiten zur Funktionalisierung von makromolekularen nanoskopischen Strukturen.

Aufbauend auf den Erkenntnissen zur Konstruktion dieses modularen Schalters wurde in einem weiteren Projekt die Dimerisierung von Antikörperdomänen für einen molekularen Lichtschalter genutzt. Zur Konstruktion eines Fv-Fragmentes, welches iso-

merselektiv ein Azobenzol-Derivat bindet, wurde die Antigenbindungstasche eines Stilben-bindenden Antikörpers adaptiert. Auch für diese Fv-Domänen konnte eine Abhängigkeit der Dimerisierung von der Gegenwart des Liganden *trans*-Azobenzol festgestellt werden. Unter Nutzung der Photoisomerisierbarkeit der Azobenzols konnte ein System konzipiert werden, dessen Dimerisierungszustand sich in Abhängigkeit von der eingestrahlten Wellenlänge ändern läßt.

Erste Experimente zur *in vivo*-Anwendung dieses molekularen Lichtschalters zeigten bislang keine Beeinflussung durch Zugabe eines membranpermeablen Azobenzolderivats unter zellulären Bedingungen, weder im bakteriellen noch im *yeast-2hybrid*. Dies unterstreicht die größere Komplexität der zu berücksichtigenden Faktoren bei der Etablierung künstlicher funktionaler Systeme in lebenden Organismen verglichen mit *in vitro*-Anwendungen.

5 Ausblick

Die natürlichen Mechanismen, welche zur Funktion biomolekularer Strukturen beitragen, sind durchaus komplex. Artifizielle Assemblies biologischer Makromoleküle lassen sich jedoch auch in einer "naiven" Art funktional herstellen. Voraussetzung für eine gezielte Strukturierung ist das Verständnis einfacher Prinzipien der molekularen Erkennung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es bei der Komplexierung von Proteinen an DNA-Molekülen und anschließender Ligandenbindung angewandt. Für die Konstruktion höhergeordneter künstlicher Strukturen werden diese Prinzipien ebenfalls hilfreich sein. Insofern ist das Verständnis des Konzeptes und die hier gewonnenen Erkenntnisse von Interesse bei der künstlichen Herstellung und Funktionalisierung biomolekularer Komplexe.

Stabilisierte Antikörperdomänen können im Kontext artifizierender Systeme sowohl die Rolle einer Ligandenbindung übernehmen, als auch ein induzierbares Dimerisierungsmodul darstellen. Diese Kombination eröffnet Anwendungen, welche nur mit wenigen natürlichen Bindeproteinen denkbar wären. In diesem Zusammenhang liegt der Vorteil von Antikörperfragmenten in der Möglichkeit, sie gezielt gegen bestimmte Antigene herstellen zu können.

Antikörper erkennen ein "chemisches Signal", Anwesenheit ihres Liganden. Mit dem Design des *trans*-Azobenzol-bindenden Fv-Fragmentes wurde dies um den Aspekt der Erkennung eines physikalischen Signals, der Lichtabsorption erweitert. Seine Anwendung *in vitro* oder *in vivo* sollte die Herstellung eines künstlichen "molekularen Lichtschalters" erlauben. Versuche zur intrazellulären Expression von Fusionen mit diesen Fv-Domänen und zur Zellokalisierung von membranpermeablen Azobenzol-Derivaten lassen letzteres vielversprechend erscheinen.

6 Material

6.1 Bakterien und Phagen

6.1.1 *Escherichia coli* Stämme

BL21 (DE3), *hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*

Der Stamm wird zur Überexpression plasmidkodierter Gene unter dem starken Promoter des T7-Bakteriophagen verwendet. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase ist in das Genom des Stamms integriert und befindet sich dort hinter dem *lac*-Promotor/Operator. Durch Zugabe von IPTG wird die Expression der T7-RNA-Polymerase induziert, die das gewünschte Gen unter dem T7-Promotor transkribiert (Studier & Moffatt, 1986). Alle BL21-Stämme sind bezüglich der Proteasen *OmpT* und *Lon* defizient und lassen sich auch für Genexpressionen einsetzen, die nicht unter dem T7-Promotor stattfinden.

CJ 236, *F' cat [pCJ 105 (M13^SCm^r)]/dut1 ungl thi-1 relA1 spoT1 mcrA*

Der Stamm wird zur Gewinnung von Uracil-haltiger Einzelstrang-DNA (ssDNA) verwendet. Um das zur Phagen-Transfektion essentielle F'-Plasmid zu erhalten, müssen Bakterien dieses Stammes unter Selektionsdruck mit Chloramphenicol gehalten werden (Geisselsoder *et al.*, 1987).

JM 83, *F⁻ ara Δ(lac-proAB) rpsL (Str^r) [Φ80 dlacΔ(lacZ)M15] thi*

E. coli JM83 wird zur Expression und Sekretion von Proteinen ins Periplasma verwendet. Bakterien dieses Stammes sind in der Lage, Resistenzgene eines Plasmids in das Genom zu rekombinieren. Sie sind deshalb nicht längerfristig mit Plasmid in Kultur haltbar und müssen regelmäßig aus Glycerinkulturen angezogen werden (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

JM 109, *F' traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/e14-(McrA-)Δ(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁻) relA1 supE44 recA1*

Der Stamm dient zu Klonierungsexperimenten. Zur Selektion auf plasmidtragende Klone wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

TG 1, *supE thi-1 D(lac⁻proAB) D(mcrB-hsdSM)5 (rK⁻ mK⁻) [F' traD36 proAB lacIqZDM15]*

Aus diesem Stamm lassen sich elektrokompetente Zellen mit besonders hoher Transformationskompetenz herstellen. Er eignet sich deshalb hervorragend zur Herstellung von plasmidkodierten Bibliotheken (z. B. für *phage-display* Bibliotheken).

XL 1-blue, *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tetr)]*

Dieser Stamm kann DNA nicht rekombinieren (*recA*) und ist DNase defizient (*endA1*). Er eignet sich somit besonders zum Präparieren von DNA und für Klonierungsexperimente.

Bacteriomatch™ Reporter-Stamm, *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' laqI^q bla lacZ Kan^r]*

Der Stamm wird zur *in vivo*-Untersuchung von Protein-Interaktionen mit dem Bacteriomatch™ Two-Hybrid System genutzt. (Stratagene, Heidelberg). Um das als Reporter-konstrukt dienende F'-Plasmid zu erhalten, müssen Bakterien dieses Stammes unter Selektionsdruck mit Kanamycin gehalten werden.

TG 1-Zellen und Bacteriomatch™ Reporter-Zellen wurden von Stratagene® GmbH (Heidelberg) bezogen. Alle anderen Stämme wurden aus der Sammlung der Arbeitsgruppe bezogen.

6.1.2 Bakteriophage

M13K07, *II' (M13mp1), ori p15A, kan⁺ (Tn903)*

(Vieira & Messing, 1987), von Bio-Rad Laboratories GmbH, München.

6.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

MaV203, MAT α ; *leu2-3,112*; *trp1-901*; *his3 Δ 200*; *ade2-101*; *cyh2R*; *can1R*; *gal4 Δ* ; *gal80 Δ* ; Gal1::lacZ; His3(UASGal1)::His3@Lys2; Spal10::Ura3

Stefan Eimer, AG Baumeister, Genzentrum der LMU München, persönliche Mitteilung.

6.2 DNA

6.2.1 Vektoren

ETH-2 Phagenbibliothek	Dr. Dario Neri, Inst. für Biotechnologie, ETH Zürich, Schweiz
Diese Bibliothek basiert auf dem Phagemid-Vektor pHEN1 (Hoogenboom <i>et al.</i> , 1998) und liegt in TG1 Zellen vor (Pini <i>et al.</i> , 1998).	
BM28 (Lemeulle <i>et al.</i> , 1998)	Thierry Chardès, Inst. de Biotechnol. et Pharmacologie, UMR CNRS 5094, Montpellier, Frankreich,
pET15b	von Dr. Ingo Korndörfer, LMU München / Novagen
pTscFv-AR	von Peter Wirtz, LMU München, (Wirtz, 2002)
pRSET5d, ptetGFP01	von Dr. H. Bruhn, LMU München
pAK100_15L	von Dr. P. Lindner (Lindner <i>et al.</i> , 1997)
Bacteriomatch™ Vector Kit (pBT, pTRG)	Stratagene GmbH, Heidelberg
Y2H Proquest (pDBleu, pPC86-AD)	Stefan Eimer, AG Baumeister, Genzentrum
pPC86VH-AD	Stefan Eimer, AG Baumeister, Genzentrum
pVL-DBleu	Stefan Eimer, AG Baumeister, Genzentrum

6.2.2 Oligodesoxynukleotide

Sämtliche Oligonukleotide sind in 5'→3'-Richtung dargestellt. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Oligodesoxynukleotide verwendet. Außer jener zur Konstruktion der nanoskopischen biomolekularen Assemblies wurden sie von der Firma Interactiva, Ulm, nach dem Phosphoramiditverfahren (Sinha *et al.*, 1984; Kaplan, 1985) hergestellt. Sie wurden entschützt und entsalzt geliefert.

6.2.2.1 Sequenzier-Oligonukleotide

hind-rev (antisense)

TTCACCTCAC AGGTCAAGC

IcaF.for

GAAAAGTGAA ATGAATAGTT CG

ompA.for (sense)

GCTATCGCGA TTGCAGTG

T7 (sense)

TAATACGACT CACTATAGGG

Y2H, pPC4200.for

CTGCACAATA TTTCAAGC

ETH-2

DP47CDR2back (sense)

TACTACGCAG ACTCCGTCAA C

fdseq1 (antisense)

GAATTTTCTG TATGAGG

Bacteriomatch

pBT.for (sense)

TCCGTTGTGG GGAAAAGTTAT C

pTRG.for (sense)

CAGCCTGAAG TGAAAGAA

6.2.2.2 PCR-primer

Y2H

SE_tiVh-for

ACTTAACCAT GGCCGAAGTT AAACTGCAG

SE_Vh-rev

GTGGGAGCTC GCGGTACCAG AATTCGCTGA GGAGACGGTG AGCGTGGTC

SE_Vl-rev

CGTGAATTCT TCAGTTCCAG TTTGGTGCC

1c10h.For

CAGGTCCAAG CCGCAGAGTC C

1c10h.Rev

AGCCGGATCC CTATTATGCA GAGACAGTGA CCAGAGTCC

1c10l.For

ATCCAGATGA CCCAGACTCC ATCC

1c10l.Rev

AGCCGGATCC CTATTACGCC CGTTTGATTT CCAGC

1C10L_SacI_rev

GAATTCTTGAGCTCCAGCTTGGTGC

1C10H_Bpu10I_rev

GAATTCGCTGAGGAGACAGTGACCAGAGTCC

Bacteriomatch

Noti_Vh2.For

ATGATGATGG CGGCCGCATCT GAAGTTAAAC TGCAGCAGAG

Noti_VI.For

ATGATGATGG CGGCCGCATC TGATATCGTT ATGACCCAGC CGAG

Vh_Ecori.rev

CATCATCATG AATTCGAGGA GACGGTGAGC GTGG

VI_Ecori.rev

CATCATCATG AATTCTTGAG CTCCAGTTTG GTGCC

Isolierung des Zif268-Gens

5P-zif.for

CCATGGAACG CCCATATGCT TGCTTG

3P-zif.rev

GGATCCCTAT TAGTCCTTCT GTCTTAAATG GATTTTGG

PCR-Mutagenese des Zinkfingers

Zif268_2_P53_Finger1.for

CCTGCGATCG CCGCTTTTCT ATGAGCCACC ATCTTAAAGA ACATATCCGA ATTCACACAG

Zif268_2_P53_Finger1.rev

CTGTGTGAAT TCGGATATGT TCTTTAAGAT GGTGGCTCAT AGAAAAGCGG CGATCGCAGG

Zif268_2_P53_Finger2.for

CGAATCTGCA TGCGAAATTT CAGTCAGCGC GGCACCCTTA CGCGCCACAT CCGCACCCAC ACAG

Zif268_2_P53_Finger2.rev

CTGTGTGGGT GCGGATGTGG CGCGTAAGGG TGCCGCGCTG ACTGAAATTT CGCATGCAGA TTCC

Zif268_2_P53_Finger5.for

CATTTGTGGG AGGAAATTTG CCAGGCTTCA CCATAGGCTT CTTCATACCA AAATCCATTT
AAGACAGAAG

Zif268_2_P53_Finger3.rev

CTTCTGTCTT AAATGGATTT TGGTATGAAG AAGCCTATGG TGAAGCCTGG CAAATTTCTT
CCCACAAATG

Zinkfinger-Fusionen

5pvhzif

GCGCCATGGA AGTTAAACTG CAGCAGAGC

vh3pzif

ATATGGGCGT TCTCCACCTC CTGAGGAGAC GGTGAGCGTG

vh5pzif

ACGCTCACCG TCTCCTCAGG AGGTGGAGAA CGCCCATATG CTTGCCC

vhzif3p

GGATCCCTAT TAGTCCTTCT GTCTTAAATG GATTTTGG

5pzifvl

CCATGGAACG CCCATATGCT TGCTTG

zif3pvl

AACGATAGCC ATTCCACCTC CGTCCTTCTG TCTTAAATGG

zif5pvl

GACAGAAGGA CGGAGGTGGA ATGGCTATCG TTATGACCCA GC

zifvl3p

GGATCCCTAT TACTTGAGCT CCAGTTTGGT GC

6.2.2.3 Oligonukleotide zur *restriction selection*

alle antisense

Asth1.rev

CCTCTGCTTC ACCCAGCTCA TGATGTAACG GGTGAAGGTG TAGCCAGAAG CCTTGC

Asth2.rev

CCTTGCTCTT GAACTTCTCA TTGTAATAAG TGCTACCGTT ACCAGGGTTA ATGGATCCAA
TCCACTCGAG ACGTTGTCCA GG

Asth3.rev

GGTCCCTTGG CCCCAGTACG GACGACCCTG ACCACGCGCA CAATAATAGA CCGCAGAGTC CTC

Astl1.rev

CCAGGCTTTT GCTGATACCA GTACAGGTAG CTGGAGAGCG ACTTCGACGC GCGGCAGCTG

Astl2.rev

CGGTCCGGAA CACCCGATGC AAGGTTGGAC GCCTTGTAGA TCAGCAGTTT CGGC

Astl3.rev

GGTGCCAGCG CCAAAGGTCG GCGGCAGTTC GAGGTTCTGT GCACAGTAGT AACAGCCAG
ATCTTCAGC

Flah1.rev

TCCAGGCCTC TGCTTCACCC AGTTCATCCA GTAGTCGGTG AAGGTGTAGC CAGAAG

Flah2k.rev

CCTTGCTCTT GAACTTCTCA TTGTAGTACG TGTCGTAGTT GTAAGGTTTG TTGCGAATCT
GTCCAATCCA CTCGAGACCT TG

Flah3.rev

GGTCCCTTGG CCCCAGTAGT CCATACCGTA GTAAGAACCG GTACAATAAT AGACCGCAGA
GTCCCTC

Flal1.rev

CCAGGCTTTT GCTGATACCA ACGCAGGTAG GTGTTGCCAT TGGAGTGGAC GAGCGACTGC
GACGCGCGGC AGC

Flal2.rev

GAGAAACGGT CCGGAACACC AGAGAAACGG TTCGACACCT TGTAGATCAG CAGTTTCGGC G

Flal3.rev

GGTGCCAGCG CCAAAGGTCC ACGGAACGTG GGTGGACTGG CTACAGTAGT AAACAGCCAG
ATCTTCAGC

DigcdrH1.rev

CTCTGCTTCA CCCAGCCGAG CCAGTAGTTG GTGAAGGTGT AGCC

DigcdrH2.rev

CTTGAACTTC TCATTGTGGT TGGTGTAAACC GCCACCAGAG TAAATGTCTC CAATCCACTC GAG

DigcdrH3.rev

CCTTGGCCCC AGTAGACCTC GTCGTAATCA TAAGGGCCAG AACGTTTACA ATAATAG

DigcdrL1.rev

CCAGGCTTTT GCTGAAGCCA GTTCAGGTAG CTGCCGATGT CCTGCGACGC GCGGCAGCTG

DigcdrL2.rev

GGTCCGGAAC ACCCGAGTCA AGGGACGAGG TCGCGTAGAT CAGACGTTTC GGCGGTTGG

DigcdrL3.rev

CCAGCGCCAA AGGTCCAAGA GGAAGAGGCG TACTGGAGAC AGTAGTAAAC AGC.

6.2.2.4 Mutagenese-Oligonukleotide

AP-Mutagenese für Fusionen mit scFv aus ETH-2, antisense

phoA_NotI.as

GCCTTCGGCC CCCGCGGCCG CAGAGACAG

phoA_delNcoI.as

GCTTATCGAT ATTGCCGTGG TACGTTGC

phoA_His.as

CACTTCACAG GTCAAGCTTA ATGGTGATGG TGATGGTGCT TAAGCCCCAG AGCGGC

6.2.2.5 Oligonukleotide zur Konstruktion der NBAs

Diese Oligodesoxynukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, hergestellt. Die Fluorophorverknüpfungen erfolgten für TMR mit einem C₃-linker, für Cy5 mit einem C₆-linker.

TMR-P53-8T-ZIF268

TMR- GTCGAACATG TCCCAAGTGG TTTTTTTTGC TAGTGCGTGG GCGGACTC

CY5-ZIF268-8T-P53

CY5- GAGTCCGCCC ACGCACTAGC TTTTTTTTTCC ACTTGGGACA TGTTTCGAC

TMR-P53

TMR- GTCGAACATG TCCCAAGTGG

Zif268-OL

GCTAGTGCGT GGGCGGACTC

Yt

TMR- CACTTGGGAC ACGTTCGACC

Yb

BIOTIN- TGAGGCGAAT TCCTACACAG GTCGAACGTG TCCCAAGTG

Yc

CY5- CTAGTGCGTG GCGGATCTC GCAGTAGGAA TTCGCCTCA

Y0

GAGATCCGCC CACGCACTAG

B-7T

TGAGGCGAAT TCCTACTTTT TTTACAGGTC GAACGTGTCC CAAGTG

Cy5-7T

CY5- CTAGTGCGTG GCGGATCTC GCATTTTTTT GTAGGAATTC GCCTCA

6.3 Enzyme und andere Proteine

Alkalische Phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Rinderserum-Albumin (BSA)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNase A	Roth GmbH, Karlsruhe
Streptavidin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Vent</i> -DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
α -FLAG mAB-M2	IBI/Kodak, Rochester, New York, USA
mAB α -mouse::HRP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

6.4 Standards und Kits

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DNA-Längenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinmarker	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein / Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Qiagen [®] Mini Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen [®] DNA-Purification Kit	Qiagen, Hilden

6.5 Chemikalien

Acetanhydrid	Merck AG, Darmstadt
Acrylamid (rotiphorese [®] -Gel30)	Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Agarose, <i>elektrophoresis grade</i>	Roth GmbH, Karlsruhe
4-Amino-azobenzol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-Amino-1,2,4-triazol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Ammoniumpersulfonsäure (APS)	Merck AG, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Roth GmbH, Karlsruhe
anhydro-Tetracyclin-hydrochlorid (a-Tet)	Acros Organics, Geel, Belgien
Bacto [®] -Trypton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bacto [®] -Yeast	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
BiTec TM -Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Borsäure	Roth GmbH, Karlsruhe
Bromomethylacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck AG, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Calciumcarbonat	Merck AG, Darmstadt
Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol, kristallin	Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie [®] Brilliant Blau G250	Roth, Karlsruhe
2'-Desoxynukleotid- 5'-triphosphate (dNTP's)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Digoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck AG, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, puriss. (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatrium-hydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck AG, Darmstadt
Essigsäure, p.a.	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Ethanol, p.a. (EtOH)	Merck AG, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck AG, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth GmbH, Karlsruhe
Fluoreszein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fluoreszeindiacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glutaranhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin (87 %)	Riedel de Haën, Seelze
Glycin, p.a.	Riedel de Haën, Seelze
Guanidiniumchlorid (GdmCl)	ICN-Biomedicals GmbH, Meckenheim
Harnstoff, p.a.	Roth GmbH, Karlsruhe
Heringsspermien-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Imidazol, > 99 %	Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Hoechst, Gersthofen, Industriespende
Kalium-dihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck AG, Darmstadt

Kaliumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Kanamycin-disulfat	Merck AG, Darmstadt
Lanatosid C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lithiumacetat	Merck AG, Darmstadt
Lithiumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid-2-hydrat	Merck AG, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck AG, Darmstadt
Natriumazid	Merck AG, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogensulfat	Merck AG, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck AG, Darmstadt
Nickelsulfat-hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ouabain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraffin, dünnflüssig	Merck AG, Darmstadt
Pivaloyloxymethylchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Polyethylenglykol 3550, 6000 (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Roti [®] -Block	Roth GmbH, Karlsruhe
Roti [®] -Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol, 99 % z. Synth.	Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure, 32 %	Riedel de Haën, Seelze
Tetracyclin Hydrochlorid (Tet)	Merck AG, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Roth GmbH, Karlsruhe
3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin (TMB)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Roth GmbH, Karlsruhe
Tween [®] 20	Roth GmbH, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Merck AG, Darmstadt
Zinkchlorid	Merck AG, Darmstadt

6.6 nicht kommerziell erhältliche Chemikalien

Neben den Substanznamen sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen und die jeweiligen Quellen angegeben.

Synthesen durchgeführt im "Lit-Praktikum", Institut für Organische Chemie, Department Chemie der LMU München:

- 4-Aminostilben-N-glutaramid (ASGA), Oswald Krotz
- ASGA-O-acetoxymethylester (ASGA-Ac), Julia Spatz
- 4-Aminoazobenzol-N-glutaramid (PZGA), Christian Schmolke

- PZGA-O-acetoxymethylester (PZGA-Ac), Gunter Heymann
- PZGA-O-pivaloyloxymethylester (PZGA-Piv), Gunter Heymann

Synthesen der in *phage display*- und *surface plasmon resonance*-Experimenten (SPR) verwendeten Azobenzol-Derivate, durchgeführt von Raymond Behrend, AG Moroder/ Peptidservice, MPI für Biochemie, Martinsried:

- 4-(Phenylazo)-phenol-O-carbamoyl-N-Pro-Phe-Gly-1,2-diaminoethyl-biotin (RB106)
- 4-(Phenylazo)-benzylalkohol (PZOH)
- 4-(4-Aminomethyl-phenylazo)-benzoyl-N-(Gly₂-Ser)₂-Lys-Asp-1,2-diaminoethyl-biotin (AMPB-Biotin)
- 4-(4-Amino-methyl-phenylazo)-benzoat (AMPB)
- Benzoyl-N-(Gly₂-Ser)₂-Lys-Asp-1,2-diaminoethyl-biotin
- PZGA-N-Gly-Ahx₂-Cys-OH (PZGA-Cys, Ahx: Aminohexansäure)
- HN-Gly-Ahx₂-Cys-OH

4-Aminostilben, auf Anfrage synthetisiert von Chemstar Ltd., Moskau, GUS

N-Acetyl-(N-4-Aminostilben) (AS-Ac), Synthese durchgeführt vom Autor mit freundlicher Unterstützung durch Raymond Behrend, AG Moroder/ Peptidservice, MPI für Biochemie, Martinsried

6.7 Geräte

Absorptionsspektrophotometer Uvikon 941	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Brutschrank für Agarplatten	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Brutschrank für Schüttelkulturen	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Chromatographiesäulen	Pharmacia GmbH, Freiburg
Eagle Eye TM II	Stratagene GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammern	Harnischmacher Labortechnik, München / Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA-Plattenreader SpectraMAX 250	Molecular Devices, CA, USA
Fluoreszenzspektrometer Hitachi F4500	Jouan Meßtechnik GmbH, München
<i>french press</i>	Gaulin, Hintertupfingen
Iasys Biosensor	Applied Biosystems,

ITC-Gerät MicroCal UK	Heath Scientific Co Ltd, Bletchley, England,
Kühlzentrifuge Universal 16R	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Z233MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
Kühlzentrifugen Sorvall RC-3B/-5B/-5C	Du Pont GmbH, Bad Homburg
Kugelmühle	Retsch, Oberammergau
Massenspektrometer TSQ 7000	Finnigan MAT GmbH, Bremen
Mikroprozessor pH-Meter, 471 Calamatic	Knick GmbH, Berlin
Niederdruck-Chromatographie-Anlage	Pharmacia GmbH, Freiburg
Pipetten Gilson Pipetman	Abimed, Langenfeld
Quecksilberdampfampe	Abt. Moroder, MPI für Biochemie, Martinsried
dazugehörige Filtersets UG 1, BG 12,	Itos, Mainz
ThermoBlock Typ 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler Varius V45	Landgraf, Langenhagen
Überkopffrotor	Werkstatt, Genzentrum, München
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
UV-Handlampe	Genzentrum (Erstausrüstung), LMU, München
Vortex Genie 2, G560 E	Scientific Industries Inc., NY, USA
Wasserbad DC1	Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe

6.8 Andere Materialien

Blot-Membran PVDF	Roth GmbH, Karlsruhe
centricon10 <i>centrifugal filter device</i>	
Chelating-sepharose [®] , <i>fast flow</i>	Pharmacia GmbH, Freiburg
Dialyse Membran Spectra Por 1 (MWCO: 6-8 kDa) 14,6 mm	Spectrum Medical Industries, Houston, Texas
Dyna-beads, Streptavidin-beschichtet	Dynal
ELISA-Platten, (unbeschichtet und Streptavidin-beschichtet, PrecInnova)	Peske GmbH, Ainding-Pichl
<i>Gel drying film</i>	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Glasperlen Ø 0.1-0.2 mm	Bernd Euler, Frankfurt
Magnetrührfische	Roth GmbH, Karlsruhe
membraspin-micro, 10 kDa	membraPure GmbH, Lörzweiler
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nunc-Röhrchen maxisorb	Nunc, Paris
Plastikverbrauchsmaterialien	Peske GmbH, Ainding-Pichl
Quarzglas-Küvetten	Hellma GmbH & Co., Müllheim/Baden
Sterilfilter 0.2µM, 0.4µM	Peske GmbH, Ainding-Pichl
Ultrafiltrationsmembran YM 10	Amicon GmbH, Witten
Zentrifugenbecher 11 / GS3 / GSA / SS34	Nalgene Company, Rochester, N.Y., USA

7 Methoden

Die Vorschriften orientieren sich überwiegend an den von (Sambrook *et al.*, 1989) publizierten Protokollen. Medien werden mit entionisiertem, Puffer mit zusätzlich ultrafiltriertem Wasser angesetzt. Mischungsverhältnisse sind für flüssige Substanzen als Volumen pro Volumen (v/v), für Lösungen fester Stoffe als Masse pro Volumen (w/v) angegeben. Molekularbiologische Arbeiten werden mit sterilen Medien und Gefäßen durchgeführt. Nach Benutzung werden alle mit Bakterien kontaminierten Geräte und Flüssigkeiten autoklaviert.

7.1 Kultivierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Einzelkolonien werden durch einen Verdünnungsausstrich auf Luria-Bertani-Kulturschalen (LB-Platten, je nach Stamm und Plasmid mit den entsprechenden Antibiotika versetzt), und Inkubation für 12-15 h bei 37 °C erhalten. Die Platten können, mit Parafilm verschlossen, etwa 1 Monat bei 4 °C gelagert werden. Kulturschalen werden generell auf dem Deckel liegend aufbewahrt. Für Flüssigkulturen von *E. coli* wird LB-Medium je nach Selektion (z.B. auf plasmidtragende Zellen) Lösung (Lsg.) des Antibiotikums zugesetzt. Nach Animpfen mit einer Einzelkolonie wird, soweit nicht anders angegeben, für ca. 12-15 h mit 200 Upm bei 37 °C geschüttelt. Die Zelldichte wird durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt.

LB-Medium:	10 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Yeast Extract
	5 g	NaCl
	1.3 ml	2 M NaOH
	ad 1L	H ₂ O
	autoklaviert und bei RT gelagert;	
	für Kulturschalen + 1.5 % Bacto Agar	

Antibiotika-Stammlösungen, 1/1000 verdünnt einzusetzen			
Amp	100 mg/ml	Ampicillin	in H ₂ O
Carb	10 mg/ml	Carbenicillin	in H ₂ O
Cam	30 mg/ml	Chloramphenicol	in Ethanol
Kan	70 mg/ml	Kanamycin	in H ₂ O
Tet	50 mg/ml	Tetracyclin	in Ethanol
sterilfiltriert, aliquotiert, bei -20 °C gelagert			

Zur längerfristigen Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen werden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu werden 700 µl einer Übernachtskultur mit 300 µl sterilem 87 % Glycerin in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und bei -80 °C gelagert. Glycerinkulturen können über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

7.2 Transformation von *E. coli* (Hanahan, 1983)

7.2.1 Herstellung kompetenter Zellen (Tang *et al.*, 1994)

200 ml LB-Medium werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 20 ml stationärer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Kultur wird bei 200 Upm und 37 °C bis zu einer OD_{600} von möglichst genau 0.94 geschüttelt, durch Schwenken in einem Eiswasserbad abgekühlt und in Zentrifugenbecher überführt. Alle weiteren Schritte erfolgen unter strikter Eiskühlung.

Die Bakteriensuspension wird 15 min bei 3 000 *rcf* und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 40 ml TfbI-Lösung resuspendiert und die Suspension in Falcongefäße überführt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 4 °C, 2 000 *rcf* wird das Pellet vorsichtig in 8 ml TfbII-Lösung aufgenommen, zu je 100-200 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bei -80 °C mehrere Monate gelagert werden. Die Transformationseffizienz sollte bei ca. 10^6 Kolonien pro µg DNA liegen.

Tfb I :	100 mM	KCl
	50 mM	MnCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl ₂
	15 %	Glycerin
	(sterilfiltriert)	
Tfb II:	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	KCl
	10 mM	NaMOPS, pH 7.0
	15 %	Glycerin
	(autoklaviert)	

7.2.2 Schnelltransformation mit Plasmid-DNA (Pope & Kent, 1996)

Diese besonders schnelle Transformationsmethode kann für Plasmide mit z.B. Ampicillinresistenz als Selektionsmarker verwendet werden. Für 10-100 *cfu* müssen 0.1 bis 1 ng Plasmid-DNA eingesetzt werden.

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Maximal 10 µl DNA-Lösung werden zugegeben und durch mehrmaliges Aufnehmen mit der Pipette gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wird der Ansatz auf eine bei 37 °C vorgewärmte LB-Kulturschale mit geeignetem Antibiotikum plattiert. Diese wird anschließend bei 37 °C für 12-15 h inkubiert. Kolonien werden nach ca. 8 h sichtbar.

7.2.3 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut. Für 10-100 *cfu* werden 0.1 bis 1 ng Plasmid-DNA in < 10 µl Lösung kalt zugegeben und durch kurzes Antippen gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis erhalten die Zellen für 45 s bei genau 42 °C einen Hitzeschock und werden danach für wenige min wiederum auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml vorgewärmten SOB-Mediums verdünnt und in ein Reagenzglas überführt. Nach 1-2 h schüttelnder Inkubation (37 °C, 200 Upm) wird 1/10 der Kultur auf antibiotikahaltige LB-Platten ausgestrichen und bei 37 °C bis zum Sichtbarwerden von Kolonien inkubiert.

SOC-Medium:	20 g	Bacto Trypton
	5 g	Bacto Yeast Extract
	7.8 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	pH 7.0 (NaOH)	
	ad 1 l H ₂ O, autoklaviert	

SOB-Medium:	SOC-Medium +	
	20 mM	Glukose, sterilfiltriert
	10 mM	MgCl ₂ , sterilfiltriert

7.3 Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA

Für diese vereinfachte Transformation werden 25 µl einer frisch gewachsenen Kolonie von *Saccharomyces cerevisiae* pro Ansatz mit steriler Impföse in 1 ml sterilem H₂O in

einem 1.5 ml Gefäß resuspendiert (für 4 Ansätze entsprechend 100 µl). Die Kolonie sollte nicht älter als eine Woche sein. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 14 000 *rcf* in 5 s pelletiert, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat (LiAc) resuspendiert und 5 min bei 30 °C inkubiert. Das einem Ansatz entsprechende Volumen (250 µl bei 4 Ansätzen) wird in ein neues Gefäß überführt, die Zellen pelletiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen. Auf das Pellet werden in angegebener Reihenfolge folgende Lösungen geschichtet (!) und dabei nicht gemischt:

240 µL	PEG, M _w 3350 (50 %), sterilisiert
36 µl	LiAc 1 M, sterilisiert
50 µl	ssDNA (Heringsspermien-DNA, 2.0 mg/ml in TE), vor Verwendung 5 min, 100 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt
ca. 5 µl	Plasmid-DNA (0.1-5 ng pro Plasmid)
20 µl	H ₂ O (Vol. Plasmid-DNA + H ₂ O = 25 µl)

Die Ansätze werden mindestens 1 min gevortext, um die Zellen im Transformationsmix zu resuspendieren und 20 min bei 42 °C inkubiert. Danach werden die Zellen erneut bei 14 000 *rcf* in 10 s pelletiert und der Überstand verworfen. Nach sanftem Resuspendieren in 200-400 µl sterilem H₂O werden die Zellen auf SCdropout-Medium zur Selektion auf das(die) Plasmid(e) plattiert. Kolonien sollten nach 2-4 d bei 30 °C sichtbar sein.

SCdropout-Mix:	2.0 g	Adeninhemisulfat *
	2.0 g	Arginin-HCl
	2.0 g	Histidin-HCl *
	2.0 g	Isoleucin
	4.0 g	Leucin *
	2.0 g	Lysin-HCl
	2.0 g	Methionin
	3.0 g	Phenylalanin
	2.0 g	Serin
	2.0 g	Threonin
	3.0 g	Tryptophan *
	2.0 g	Tyrosin
	1.2 g	Uracil *
	9.0 g	Valin

Die Festsubstanzen werden in eine Plastikflasche eingewogen und mit wenigen zugegebenen Glasperlen unter kräftigem Schütteln vermischt. Zur Selektion auf Plasmide werden die mit * markierten Komponenten weggelassen und bei Bedarf in entsprechenden Konzentrationen dem sterilisierten Medium zugefügt. (Alle Komponenten von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

SCdropout-Medium:	4.0 g	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
	12.0 g	Glucose
	0.5 g	SCdropout-Mix (s.u.)
	600 ml	H ₂ O
		pH 5.6 (NaOH)
		autoklavieren.

Für Platten nur mit 300 ml H₂O ansetzen und mit folgender getrennt zu autoklavierender Lösung mischen.

10.0 g	Bacto Agar (für festes Medium)
300 ml	H ₂ O

Dem Gemisch eventuell zusätzliche Komponenten zugeben (bei unvollständigem SCdropout-Mix) und in Petrischalen gießen.

7.4 Molekularbiologische Methoden

7.4.1 Plasmid-DNA-Präparation

7.4.1.1 Alkalische Lyse (Birnboim, 1979)

2 ml einer Übernacht-Flüssigkultur eines plasmidtragenden *E. coli*-Stammes werden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2 min mit 18 000 *rcf* zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 100 µl Lösung I resuspendiert, mit 200 µl Lösung II versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisiert.

Die wässrige (obere!) Phase enthält die Plasmid-DNA und wird möglichst ohne Verunreinigungen in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0.7 Vol. 2-Propanol und anschließendem Durchmischen wird die gefällte Plasmid-DNA durch Zentrifugation 4 °C, 18 000 *rcf* pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 0.5 ml 70 % Ethanol (RT) gewaschen, zentrifugiert und bei RT vollständig getrocknet. Zur Entfernung der RNA wird das Pellet in 20 µl TE/RNase A gelöst. Die DNA wird bei -20 °C gelagert.

Bei einem *high-copy-number*-Plasmid mit einem *ColE1* Replikationsursprung ist eine Ausbeute von ca. 3-5 µg Plasmid-DNA pro ml Bakterienkultur zu erwarten.

Das Überspringen der üblichen Proteinextraktion mit TE-gesättigter Phenol/ Chloroform-Lösung nach Zugabe von Lösung III bedingt eine stärkere Verunreinigung mit Proteinen. Bei Anwendungen wie analytischen Restriktionsdaus und sekundären Transformationen wird dies in Kauf genommen, wenn ihre Effizienz eine untergeordnete Rolle spielt.

Lösung I:	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA

Lösung II:	0.2 M 1 %	NaOH SDS
Lösung III:	60 ml 11.5 ml 28.5 ml	5 M Kaliumacetat Eisessig H ₂ O
	Endkonzentrationen: 3 M K ⁺ , 5 M Acetat	
TE:	10 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 8.0 EDTA
TE/RNase A:	10 mg/ml	DNase-freie RNase A
	20 min bei 95-100 °C in TE erhitzen, langsam abkühlen lassen, in einer Endkonzentration von 20 µg/ml einsetzen.	

7.4.1.2 Qiagen-Plasmid-DNA-Präparation

Hochreine Plasmid-DNA, welche mit Hilfe des Qiagen-Midi-Plasmid Kits nach Anleitung der Hersteller gewonnen wird, kann für Sequenzierreaktionen verwendet werden. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse und einer anschließenden Reinigung über einen Anionenaustauscher.

7.4.2 Präparation von Einzelstrang-DNA (nach Sambrook *et al.*, 1989)

1 ml 2xYT-Medium (incl. 30 µg/ml Chloramphenicol und Antibiotikum zur Selektion auf das Plasmid) wird mit einer Einzelkolonie von *E. coli* CJ236 angeimpft und bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. Sobald in der Kultur eine leichte Trübung erkennbar wird, wird sie zu 20 ml gleichen Mediums in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit dem Phagen M13K07 (Endkonzentration 2×10^7 pfu/ml) transfiziert. Nach zweistündigem Schütteln bei 37 °C und 250 Upm wird Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) zur Selektion auf Phageninfektion zugesetzt und weiter über Nacht inkubiert (37 °C, 250 Upm).

Die Übernachtskultur wird zweimal 5 min bei 4 °C und 12 000 *rcf* zentrifugiert, das Zellpellet jeweils verworfen. Die Phagenpartikel werden aus dem Überstand durch Zugabe von 135 µl 20 % PEG 6000 in 2.5 M NaCl-Lösung pro ml Überstand gefällt. Nach 15 min Inkubation bei RT und 5 min Zentrifugation bei 12 000 *rcf* und 4 °C wird das Pellet durch Vortexen in 500 µl TE aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Aufschluß der Phagenpartikel durch 1 Vol. TE-gesättigtem Phenol wird bei 4 °C, 18 000 *rcf* zentrifugiert. Der Überstandes wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die phenolische Phase erneut mit 200 µl TE extrahiert. Die Überstände werden in einem Corex-

Glas vereinigt und die Einzelstrang-DNA nach Zugabe von 0.1 Vol. 8 M Lithiumchlorid-Lösung mit 2.5 Vol. EtOH 1 h bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 4 °C, 12 000 *rcf*) wird das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 min) und bei RT getrocknet. Die DNA wird in 25-50 µl TE aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Durch Elektrophorese eines Aliquots im Agarose-Gel kann die Reinheit (Anteil an M13K07) und durch Extinktionsmessung bei 260 nm die Ausbeute abgeschätzt werden ($A_{260} = 1$ entspricht etwa 33 µg ssDNA). Es sind etwa 1 µg ssDNA pro ml Übernachtskultur zu erwarten.

2xYT-Medium:	16 g/l	Bacto Trypton
	10 g/l	Bacto Yeast Extrakt
	5 g/l	NaCl
	mit NaOH auf pH 7.4 einstellen und autoklavieren	
PEG-Lösung:	20 %	PEG 6000
	2.5 M	NaCl
	sterilfiltrieren	

7.4.3 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide werden in sterilem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 pmol/µl gelöst. Zu 200 pmol eines Oligonukleotids werden 10 µl 3x Kinase-Mix sowie 4.5 U T4-Polynukleotidkinase gegeben, der Ansatz wird mit Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C wird die Kinase durch 10 min Behandlung bei 65 °C inaktiviert. Die Lösung wird mit 70 µl Wasser aufgefüllt (Endkonzentration der phosphorylierten Oligonukleotide 2 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert.

3x Kinase Mix:	300 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	60 mM	DTT
	30 mM	MgCl ₂
	3 mM	ATP
	zu 10 µl aliquotiert bei -20 °C gelagert	

7.4.4 Restriction Selection (nach Wirtz *et al.*, 2003)

Diese Methode erlaubt eine effiziente ortsspezifische Mutagenese nach (Kunkel, 1985) an mehreren Stellen eines Vektors in einem Experiment. Dazu wird ein spezieller Vektor verwendet, der nur innerhalb der zu mutierenden Genabschnitte ausgewählte Restriktionsendonuklease-Schnittstellen trägt, hier pTscFv-AR (siehe dazu auch Kap. 9.1.1). Nach *annealing* der mutierenden Oligonukleotide und Auffüllreaktion des einzelsträngigen Vektors werden unvollständig mutierte Gene (in denen nicht alle Oligonukleotide hybridisierten) spezifisch fragmentiert. Die Transformation des verbleibenden Ansatzes erzielt demzufolge Klone, die aufgrund der Heteroduplex-DNA nur zur Hälfte für das mutierte Gen positiv sind. Ein weiterer Dau der aus diesen Zellen präparierten Plasmid-DNA erlaubt eine nahezu 100 %ige Selektion auf vollständig mutiertes Gen.

Für die ortsspezifische Mutagenese werden 5'-phosphorylierte Mutagenese-Oligodesoxynukleotide (Kap. 7.4.3) eingesetzt. 0.2 pmol Einzelstrang-DNA und mit je 2 pmol der Mutagenese-Oligonukleotide werden mit 1.5 µl 10x *annealing*-Puffer gemischt und mit H₂O auf 15 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der DNA zu lösen. Anschließend wird für 15 min bei der Oligo-spezifischen Hybridisierungstemperatur (T_M) inkubiert und danach auf Eis gestellt. Ein Ansatz ohne Zugabe eines Primers dient zur Kontrolle.

Zur *in-vitro*-Polymerisation werden dem Ansatz 3 µl 10x Synthese-Puffer, 10 µl H₂O, 1 µl T4-DNA-Polymerase (3 U) und 1 µl T4-DNA-Ligase (6 U) zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wird 5 min auf Eis und 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Enzyme 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Anschließend wird der Ansatz einem Restriktionsendonukleasedau unterzogen. Nach Zugabe von geeignetem Puffer werden je 5 U der im parentalen Vektor schneidenden Nukleasen *HincII* und *PmlI* sowie 1 U Alkalische Phosphatasen (AP) zugesetzt. Der Ansatz wird 3 h bei 37 °C und 20 min bei 75 °C (zur Inaktivierung) inkubiert. Nach Dialyse gegen H₂O werden damit *E. coli* XLI-Blue-Zellen elektroporiert. Zum Vergleich dient eine Kontrolle unverdaute DNA und die Mutagenese-Kontrolle ohne Oligonukleotide. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wird ein Teil der Zellen (1/10) plattiert, der Rest in einer 100 ml Übernachtskultur angezogen.

Aus dieser Kultur präparierte Plasmid-DNA wird einem zweiten Restriktionsverdau unterzogen, um die aus der Hetero-Duplex-DNA entstandene gemischte Plasmidpopulation auf vollständig mutierte Gene zu selektieren. Dazu werden 0.5 µg Plasmid-DNA mit den selektierenden Enzymen wie oben beschrieben behandelt und erneut in *E. coli* elektroporiert oder transformiert. Von den erzielten Klonen präparierte Plasmide werden durch analytischen Verdau oder Sequenzierung auf das mutierte Gen hin untersucht.

10x annealing-Puffer:

500 mM	NaCl
200 mM	Tris/HCl, pH 7.4
20 mM	MgCl ₂

10x Synthese-Puffer:

100 mM	Tris/HCl, pH 7.9
50 mM	MgCl ₂
20 mM	DTT
10 mM	ATP
5 mM	jedes dNTP
sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt	

Die Hybridisierungstemperatur T_M berechnet sich nach (Wu *et al.*, 1991):

$$[T_M] = 22 + 1.44 * (\sum(A+T) + 2 * \sum(G+C)).$$

7.4.5 DNA-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird zur einfachen Amplifikation eines Gens, zur Mutagenese oder zur Einführung neuer Restriktionsendonuklease-Schnittstellen durchgeführt, um ein Gen in einen Vektor klonieren zu können.

Ein 50 µl Ansatz ist meist für eine einfache Amplifikation ausreichend.

PCR-Standard-Ansatz:

1-10 ng	Templat-DNA
50 pmol	<i>sense</i> -Oligo
50 pmol	<i>antisense</i> -Oligo
5 µl	dNTPs (je 10 mM)
5 µl	10x Reaktionspuffer
2 µl	100 mM MgSO ₄
1 µl	<i>Vent</i> -Polymerase (2 U)
ad 50 µl	H ₂ O steril

Die Lösung wird in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt und mit 1 Tropfen dünnflüssigen Paraffinöls überschichtet.

Die Reaktion findet in einen Thermocycler nach folgendem Schema statt. Zur Amplifikation des Templats wird die Doppelstrang-DNA aufgeschmolzen, das Oligonukleotid bei der spezifischen T_M (vgl. Kap. 7.4.4) hybridisiert und durch die Polymerase zur Doppelstrang-DNA aufgefüllt.

PCR-Programm, Muster

1. Zyklus:	120 s	94 °C
	30 s	T_M
	60 s	72 °C
2.-30. Zyklus	30 s	94 °C
	30 s	T_M
	60 s	72 °C
31. Zyklus:	30 s	94 °C
	30 s	T_M
	300 s	72 °C, danach 4 °C

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt entweder direkt nach der Reaktion oder nach Abtrennung parentaler DNA und möglicher Nebenprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese mit dem Qiagen[®] DNA-Purification Kit.

Zur Einführung von Mutationen und Schnittstellen werden Oligonukleotide verwendet, die 3' einen perfekt mit dem Templat hybridisierenden Bereich aus 16-20 Nukleotiden (nt) besitzen. Ihr 5'-Bereich enthält die in das Gen einzuführenden Veränderungen. Zur Klonierung der PCR-Produkte enthält dieser Bereich in der Regel die Sequenz einer Restriktions-Schnittstelle. Die nach Herstellerangaben oft eingeschränkte Effizienz dieser Enzyme nahe von DNA-Enden ist hierbei zu beachten.

7.4.6 Zweistufige PCR

Zur Herstellung von Genfusionen und für spezielle Mutagenesen wird eine modifizierte PCR-Methode genutzt. Unter Verwendung von zueinander komplementären "inneren" Oligonukleotiden und je einem "äußeren" Primer werden in zwei getrennten Reaktionen primäre PCR-Produkte hergestellt, die einen überlappenden homologen Bereich besitzen. In der zweiten Stufe der PCR werden diese Produkte gemischt und mit den "äußeren", zueinander nicht komplementären Oligonukleotiden amplifiziert. Dies führt zur Strangverlängerung an den überlappenden Bereichen. Als Produkt entsteht eine Fusion der Primärampifikate, die sich analog zu normalen PCR-Produkte klonieren läßt.

7.4.7 Restriktionsendonukleaseverdau von Plasmid-DNA

Die Restriktionsenzyme werden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verwendet. Bei Doppelverdau mit unterschiedlichen Enzymen, für die der Hersteller keinen gemeinsamen Reaktionspuffer empfiehlt, wird zunächst mit dem Enzym geschnitten, das niedrigere Salzkonzentrationen benötigt. Nach Hitzeinaktivierung, meist 20 min bei 65 °C, werden die Pufferbedingungen angeglichen und mit dem zweiten Enzym verdaut.

Analytisch:

Zu etwa 1 µg Plasmid-DNA werden 1-2 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, 1 µl des empfohlenen 10x Reaktionspuffers und 1 µl einer BSA-Lsg. (1 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml) gegeben. Der Ansatz wird mit sterilem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mindestens 1 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Präparativ:

Zur Kombination von DNA-Fragmenten bzw. Umklonierung entsprechende Gene wird etwa 500 ng DNA eingesetzt, sodaß die entstehenden Fragmente im Agarose-Gel gut erkennbar sind. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch Auftrag eines Aliquots auf ein analytisches Agarosegel überprüft.

Die gewünschten Banden werden unter langwelligen UV-Licht (366 nm) sorgfältig mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein zuvor abgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Masse des Gelbrösels wird das DNA-Fragment mit dem Qia-gen[®] DNA-Purification Kit extrahiert und für weitere Verwendungen (Ligation, vgl. Kap. 7.4.9) bei -20 °C aufbewahrt.

7.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Verdaute DNA-Proben werden nach Zugabe von 6x Auftragspuffers in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Zum Größenvergleich dient ein DNA-Längenstandard. Bei Trennung von Fragmenten < 500 bp wird ein 1.4-1.7%iges Gel, für größere Fragmente ein 1%iges Agarose-Gel verwendet.

Zur Herstellung von Agarose-Gelen wird trockene Agarose im entsprechenden Volumen TBE-Puffer in einem Mikrowellenherd aufgeköcht, bis eine homogene, viskose

Lösung entsteht. Dieser heißen Lösung wird ein 1/10 000 Vol. Ethidium-bromid-(EtBr)-Lsg. (10 mg/ml) zugegeben, um DNA durch die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes im UV-Licht (254 oder 366 nm) sichtbar zu machen. Nach Abkühlen auf unter 50 °C kann das Gel in die entsprechende Apparatur gegossen und ein Taschenformer eingeschoben werden. Nach Erstarren können die Proben aufgetragen werden. Gele der Größe 10 x 15 cm werden bei 80-100 V, Gele der Größe 6 x 8 cm bei ca. 50 V in TBE-Puffer gefahren. Die Laufzeiten betragen zwischen 30 und 60 min. Die Gele werden mit einem Eagle Eye II dokumentiert.

TBE-Puffer:	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
6x Auftragspuffer:	1.5 mg/ml	Bromphenolblau
	1.5 mg/ml	Xylencyanol
	50 %	Glycerin

7.4.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Umklonierung werden das gewünschte Vektorplasmid und Insert präparativ mit den gleichen Enzymen gespalten und die DNA-Fragmente isoliert (vgl. Kap. 7.4.7). Die gewünschte Kombination von Vektor und Insert wird in einem molaren Verhältnis von etwa 1:10 gemischt (Endvolumen 20 µl). Nach kurzem Erwärmen zum Schmelzen der homologen DNA-Überhänge werden auf Eis 1/10 Volumen 10x Ligasepuffer des Herstellers und ca. 2 U T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei 20 °C inkubiert und danach in kompetente *E. coli* JM109 oder XLI Blue transformiert. Als Kontrolle dient ein Ligationsansatz mit Vektor-DNA ohne Insert.

7.4.10 DNA-Sequenzierung

Für Sequenzierreaktionen werden unphosphorylierte Oligodesoxynukleotide eingesetzt. Diese sind so zu wählen, daß der Abstand zwischen dem 3'-Ende des Primers und dem ersten Nukleotid von Interesse etwa 30-50 bp beträgt. Die Sequenzier-Oligonukleotide sollten einen T_M -Wert von 54-56 °C besitzen. (vgl. Kap. 7.4.4)

Die Sequenzierreaktionen werden vom hauseigenen Sequenzierservice des Genzentrums, AG Blum, mit einem Cycle-Sequencing-Kit und fluoreszenzmarkierten Terminatoren nach der Kettenabbruch-Methode durch Didesoxynukleotide durchgeführt. Die Detektion und Sequenzanalytik erfolgt mit einem Automatischen DNA-Sequenzer ABI Prism 373 XL96.

7.5 Das *phage-display*-Verfahren

Die Vorschriften für Experimente zum *phage display* orientieren sich überwiegend an den von (Kay *et al.*, 1996) publizierten Protokollen.

7.5.1 Infektion von *E. coli* mit Phagen

E. coli Stämme, die mit F' gekennzeichnet sind, besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung von F-Pili. Über diese erfolgt eine Infektion mit M13-Bakteriophagen bzw. Derivaten davon. *E. coli* mit F-Pilus lassen sich in der exponentiellen Wachstumsphase hoch effizient infizieren.

Zur Herstellung phagen-kompetenter *E. coli* läßt man TG 1-Zellen (alternativ XL 1-blue oder JM 109) mit oder ohne Phagemid in 2xYT-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.5 wachsen. Bei OD₆₀₀ > 0.5 ist die Infektionseffizienz deutlich reduziert.

Für die Infektion werden z.B. 1.5 ml (aus dem *panning* gewonnener) Phagenlösung zur Bakterienkultur gegeben und 30 min bis 1 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Die Bakterien werden bei 3 300 *rcf*, 10 min abzentrifugiert, in 1 ml 2xTY Medium zur weiteren Verwendung resuspendiert.

i) Zur Vermehrung von Bibliotheken werden die Zellen auf großen Agarplatten entsprechenden Mediums zur Selektion auf das Phagemid (hier mit Ampicillin) plattiert.

ii) Nach Infektion mit Helferphage zur Herstellung von Phagen, welche das Phagemid enthalten, werden die Zellen über Nacht unter Selektion sowohl auf das Phagemid als auch den Helferphagen in Flüssigkultur inkubiert.

2xYT-Medium:	16 g/l	Bacto Trypton
	10 g/l	Bacto Yeast Extrakt
	5 g/l	NaCl
	mit NaOH auf pH 7.4 einstellen und autoklavieren	

PEG-Lösung:	20 %	PEG 6000
	2.5 M	NaCl
	sterilfiltrieren	

7.5.2 Herstellung und Reinigung von Bakteriophagen

Zum Herstellen von Phagen werden die ein Phagemid enthaltenden Bakterien von LB-Platten mit 5-10 ml 2xTY/15% Glycerin vorsichtig abgespült. Ein Teil davon kann als Glycerinstock bei -80 °C gelagert werden. Eine der Komplexität der Bibliothek entsprechende Menge der Bakterienbibliothekstocklösung (ca. 100 µl) wird in 50 ml 2xYT-Medium/Amp/0.5 % Glukose angimpft. Die OD₆₀₀ sollte anfangs bei 0.05-0.1 liegen. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.4-0.5 wird die Kultur mit Helferphagen M13K07 im Verhältnis 20:1 Phagen:Bakterien (8x10⁸ Zellen/ml bei OD₆₀₀ = 1, also 2x10¹⁰ tu) infiziert (s.o.). Die Bakterien werden bei 3 300 *rcf*, 10 min abzentrifugiert, vorsichtig in 100 ml 2xTY-Amp-Kan Medium resuspendiert. Die Kultur wird über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert.

Zur Aufreinigung der Phagen wird die *E. coli*-Kultur mit 3 300 *rcf* für 10 min und der anfallende Überstand erneut 10 min bei 10 800 *rcf* zentrifugiert. Alle weiteren Schritte werden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Zum Überstand wird 1/5 des Volumens PEG/NaCl-Lösung gegeben, die Lösung geschüttelt und 1 h auf Eis gelegt. Die präzipitierten Phagen werden 30 min bei 10 800 *rcf* und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in 40 ml Wasser resuspendiert. Zur Abtrennung unlöslicher Substanzen wird die Lösung 10 min bei 10 800 *rcf* zentrifugiert und der Überstand mit den Phagen erneut einer Fällung mit 8 ml PEG/NaCl-Lösung unterzogen. Nach einstündiger Fällung auf Eis wird 30 min bei 10 800 *rcf* zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS gelöst und sterilfiltriert. Von dieser Phagenlösung wird der Titer (s. Kapitel 3.9.1.) bestimmt. Für längere Aufbewahrung können die Phagen auch mit 15 % Glycerol bei -70 °C gelagert werden.

7.5.3 Bestimmung des Phagentiters einer Lösung

Die Anzahl von Phagen in einer Lösung wird indirekt über die Anzahl der Bakterien ermittelt, die sich durch die Phagen infizieren lassen und damit eine phagenkodierte Anti-

Röhrchen sind direkt für *panning*-Runden im *phage display* einsatzfähig, lassen sich aber auch über einige Wochen verschlossen bei -20 °C lagern.

7.5.5 *Panning* von Phagen-Bibliotheken

Bindung

Ca. 10^{13} Phagen in 2 ml PBS/RotiBlock-Lsg. werden in Nunc-Maxisorb-Röhrchen (mit immobilisiertem *target*) gegeben, die Röhrchen verschlossen und 2 h bei 4 °C im Überkopffrotor inkubiert.

Waschen

Die Phagenlsg. wird nach der Inkubation verworfen und die gebundenen Phagen mit unterschiedlicher Stringenz von der immobilisierten Substanz gewaschen. Dazu wird das Gefäß mit 4 ml Waschlösung befüllt, verschlossen, invertiert und entleert. Die Entfernung von Lösungsresten kann durch Ausklopfen erfolgen. Typischerweise erfolgt das Waschen durch 10 aufeinanderfolgende Zugaben von PBS/0.1 % Tween-20 (PBST) und 5-30 Zugaben von PBS. Je nach Stringenz wird hierbei die Gesamtwaschdauer von wenigen Minuten bis auf mehrere Stunden ausgedehnt. Die Selektionen mit Azobenzol-Derivaten erfolgen prinzipiell unter Lichtausschluß in einer Dunkelkammer, um Isomerisierung des des Haptens zu vermeiden.

Es sollte möglichst so stringent gewaschen werden, daß 10^3 bis 10^5 Phagen eluiert werden können. Nach der ersten *panning*-Runde befinden sich in der eluierten Phagen-Lösung nur sehr wenige Phagen, die eine besonders hohe Affinität zur immobilisierten Zielsubstanz aufweisen, während mit steigender Zahl von *panning*-Runden Phagen mit größerer Affinität angereichert werden und sich somit die intrinsische Stringenz erhöht.

Zur Überprüfung der Waschschritte (und der Elution) werden die Phagentiter der letzten Waschlösung und der Elutionslösung bestimmt. Die *panning*-Runde wird so häufig wiederholt, bis Waschbedingungen gefunden werden, die bei der Elution die gewünschte Zahl von Phagen freisetzen; z.B. durch Variation der Waschschritzahl, Dauer, Detergenzkonzentration. Ein erfolgreiches Waschen läßt sich also nur *ex eventu* nach Bestimmung der Phagentiter nachweisen.

Elution

Nach dem letzten Waschen wird Elutionslösung zugegeben und für wenige Minuten bis 1 h im Überkopffrotor inkubiert. Für gewöhnlich läßt man 1 ml 100 mM Triethylamin einwirken. Durch den pH-Wechsel auf ca. 10 und das sterisch große Triethylammonium als Gegenion werden die Bindungen der Phagenproteine an die immobilisierten Substanzen kompetitiert bzw. aufgelöst. Die Elutionslösung wird durch Entleeren in ein Gefäß mit 1/10 Vol. 1 M HCl sofort neutralisiert.

Bei Selektionen an Azobenzol erfolgt die Elution der bindenden Phagen nach Zugabe von 1 ml PBS durch *trans*→*cis*-Isomerisierung infolge UV-Belichtung (siehe Kap. 7.10.5) und Konkurrenz mit in PBS gelöstem Hapten (siehe Kap. 2.1.2.1). Bindende Phagen, die sich kompetitieren lassen, werden so von den immobilisierten Zielsubstanzen gelöst. Die Elutionslösung wird in ein Reaktionsgefäß überführt und zur erneuten Infektion von Bakterien verwendet.

Nähere Angaben zu den Bedingungen bei einzelnen Experimenten finden sich im Ergebnisteil (Kap. 2.1.2.1).

7.5.6 ELISA zur Bestimmung der Spezifität selektierter Klone

In einem ELISA-Test (*enzyme linked immuno-sorbent assay*) wird die Bindung einer Molekülspezies aus der Lösung an eine andere im Teströhrchen immobilisierte nachgewiesen. Erstere wird über eine sekundäre Antikörperreaktion nachgewiesen. Diese ist daher bei sonst gleichen Bedingungen von der Konzentration des immobilisierten und der des daran bindenden Moleküls, sowie der Affinität der beiden zueinander abhängig.

Mit den hier beschriebenen ELISA-Tests werden Vergleiche der Spezifität und Affinität verschiedener selektierter scFvs gegen Azobenzolderivate durchgeführt. Biotingekoppelte Azobenzolderivate werden in Streptavidin-beschichteten ELISA-Platten (Prenova) immobilisiert. scFvs aus Kulturüberständen entsprechender Bakterienstämme (Kap. 7.7.1) werden nach ihrer Bindung an die Oberfläche über einen murinen FLAG-tag-spezifischen Antikörper (α -FLAG-mAB M2) nachgewiesen, dieser wiederum durch ein sekundäres anti-Maus::HRP-Konjugat (aus Ziege). Der Umsatz eines chromogenen Substrats der Peroxidase (HRP) ist somit ein Maß für die Wechselwirkung der scFvs mit an

der Oberfläche immobilisierten Substanzen. Er läßt sich durch Quotientenbildung der Extinktionen bei 450 und 650 nm nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure bestimmen. Hier werden nur relative Messungen durchgeführt. Zur Eichung des Systems würde ein Antikörper bekannter Affinität benötigt.

Ablaufschema eines ELISA-Experimentes

Angegeben sind jeweils Endkonzentrationen, wenn im einzelnen nicht anders beschrieben. Nach jedem Schritt ist die Lösung durch invertieren und ausklopfen zu entfernen.

mind. 1 h	100 µl	PBS, 0,25 % DMSO, 6 µM Azobenzol-Biotin
kurz	100 µl	PBS
mind. 1 h	200 µl	RotiBlock
3x kurz	200 µl	PBS

mind. 30 min	100 µl	Kulturüberstand, 1/10 RotiBlock
3x kurz	100 µl	PBS
mind. 1 h	100 µl	AK-Mix
3x kurz	100 µl	TBST
	50 µl	HRP-Substratlösung
	50 µl	1 M H ₂ SO ₄

Auslesen der Extinktion bei 450 nm und 650 nm im ELISA-Plattenreader

AK-Mix	3 ml	RotiBlock
	1 µl	1° AK α-FLAG mAB M2 (Maus)
	4 µl	2° AK α-Maus::HRP (Ziege)

HRP-Substratlösung 1 Tablette		TMB (Pierce) in
	100 µl	DMSO lösen
	9.9 ml	0.1 M NaAc
		bei 4 °C dunkel lagern,

Vor Gebrauch einem Aliquot		
	1/333	30 % iges H ₂ O ₂ zusetzen.

7.6 in vivo-Interaktionstests

7.6.1 *Yeast2Hybrid* (Y2H)-Interaktionstest

Die Vorbereitung der Konstrukte für diesen Interaktionstest (Klonierung der Gene, Hefetransformation) erfolgte nach den bisher beschriebenen Methoden (Kap. 7.3, 7.4).

Für einen *yeast2hybrid*-Interaktionstest werden Hefezellen des Stamms MaV203 gleichzeitig mit einem pDBleu und einem pPC86AD Plasmid-Derivat transformiert (siehe Kap. 7.3). Zum Vergleich der Interaktion von Fusionsproteinen an der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) und der Gal4-DNA-bindenden Domäne (DB) mit einer möglichen Hinter-

grund-Aktivierung werden parallel Transformationen mit Kontrollplasmiden durchgeführt, welche die unfusionierten Domänen enthalten.

Ein Transformationsschema für zwei zu untersuchende Proteine X und Y kann folgendermaßen aussehen:

#	DB-Fusion	AD-Fusion
1	-	-
2	X	-
3	-	Y
4	X	Y
5	Y	-
6	-	X
7	Y	X

Frisch gewachsene Kolonien der transformierten Linien können nochmals auf frische Agarplatten (SCdropout-Medium, siehe Kap. 7.3) umgestrichen werden. So erhält man auch gleichmäßig wachsende Hefelinien.

Pro Linie wird eine Kolonie in sterilem H₂O resuspendiert, seriell verdünnt, um einen Zelldichtebereich um 1 *cfu*/μl zu überstreichen. Aliquots dieser Verdünnungsstufen werden auf großen Agarplatten gespottet. Sinnvollerweise ordnet man dabei Reihen der verschiedenen Konstrukte und der jeweiligen Kontrollen zum besseren Vergleich übereinander an.

Bei Untersuchung einer Interaktion der Fusionsproteine auf Histidin-freiem Medium werden zur Selektion mindestens 5 mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3AT) zugegeben. Dieser Inhibitor der Histidin-Biosynthese unterdrückt eine Hintergrund-Enzymaktivität. Bei höheren Konzentrationen an 3AT bis 250 mM lassen sich besonders starke Interaktoren von schwächeren unterscheiden. Zur optimalen Detektion ist die jeweilige 3AT-konzentration auszutesten.

Unterschiedliches schnelles Wachstum der Zelllinien auf Selektivmedium innerhalb von 2-7 Tagen läßt auf entsprechend verschiedene Affinität der Fusionsproteine zueinander schließen. Dabei ist ein möglicher Hintergrund in Linien ohne bzw. mit nur einer Fusion zu berücksichtigen.

Um den Einfluß von Liganden auf die Interaktion von Proteinen zu testen, werden diese in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt. Azobenzol bzw. Stilben-Derivate werden zwischen 10 nM und 100 µM eingesetzt. Ein Vergleich des Wachstums auf ligandenfreiem und -haltigem Medium erlaubt nur dann den Rückschluß auf eine mögliche Affinitätsveränderung der Interaktoren in Gegenwart eines solchen Haptens, wenn die Kontrolllinien unbeeinflusst bleiben.

7.6.2 Bacteriomatch[®]-Interaktionstest

Die Vorbereitung (Klonierung der Gene, Transformationen in den Reporterstamm) für den Interaktionstest erfolgt ebenfalls nach den in Kap. 7.3 und 7.4 beschriebenen Methoden.

Die Durchführung des 2Hybrid-Tests mit diesem System richtet sich weitgehend nach den entsprechenden Herstellerangaben (siehe dazu auch Stratagene,).

Da die verwendeten Plasmide für Chloramphenicol- bzw. Tetracyclin-Resistenz codieren, werden die Transformationen nach Kap. 7.2.3 durchgeführt. Zellen, die beide Plasmide tragen, müssen entsprechend auf Selektivmedium mit mehreren Antibiotika angezogen werden. Für den Interaktionstest werden die Bakterien in Verdünnungsreihen (analog zum Y2H, Kap. 7.6.1) auf Indikator-Platten mit LB-CTCK-Agar gespottet. Die Kontrollen werden ebenfalls wie in Kap. 7.6.1 durchgeführt. Wenn keine positive Interaktion der Fusionsproteine aufgrund zu schwachen Wachstums detektiert werden kann, läßt sich die Konzentration an Carbenicillin bis 150µg/ml verringern.

Unterschiede im Wachstum der Zelllinien, welche klonierte Konstrukte exprimieren, gegenüber entsprechenden Kontrolllinien sollten nach bei 30 °C 17-24 h sichtbar sein. Eine längere Inkubation ist wegen des Auftretens von Satellitenkolonien nicht sinnvoll.

LB-CTCK Agar:	1 l	LB-Agar (siehe 7.1)
	25 ml	Carbenicillin 10 mg/ml
	1.5 ml	Tetracyclin 10 mg/ml in 50% Ethanol
	3.4 ml	Chloramphenicol 10 mg/ml in 100% Ethanol
	5.0 ml	Kanamycin 10 mg/ml

7.7 Expression rekombinanter Ig-Domänen und deren Fusionen

Antikörper-Domänen können nach drei Methoden exprimiert werden: Disulfid-intakte, also oxidierte Domänen erhält man durch Sekretion der Polypeptidketten in das bakterielle Periplasma, wo die beiden Cysteine aufgrund des positiven Redoxpotentials spontan zur Disulfidbrücke oxidiert werden (Skerra & Plückthun, 1988). Zur gezielten Reinigung der Proteine aus diesem Kompartiment, erfolgt die Expression der an ein ompA- oder phoA-Signalpeptid fusionierten Domänen unter der Kontrolle des *tet*-Promoters in den pT-Vektoren. Die periplasmatische Überexpression als Fusion mit einem pelB-Signalpeptid (pHEN-Derivate) führt zur partiellen Lyse der Bakterien unter Freisetzung der Proteine in den Kulturüberstand, welcher sich z.B. für ELISA-Experimente direkt einsetzen läßt.

Disulfidfreie Domänen werden cytoplasmatisch unter der Kontrolle des T7- (pET-Vektor) oder *tet*-Promoters (pT-Vektoren) exprimiert. Die Proteine liegen dann abhängig von ihrer Faltungseffizienz und den experimentellen Bedingungen überwiegend löslich (*tet*-Promoter, gut faltend) oder unlöslich als *inclusion bodies* (T7-Promoter, schlecht faltend) vor. Letzteres wird zur Expression von Fusionen mit Zinkfinger-Domänen genutzt. Lösliche Domänen müssen nach Zellaufschluß lediglich gereinigt, unlösliche Proteine zusätzlich solubilisiert und rückgefaltet werden.

7.7.1 Periplasmatische Expression von Immunglobulin-Domänen

1-2 l auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium werden mit Ampicillin versetzt (100 µg/ml) und 1/30 mit einer Übernachtskultur von *E. coli* JM83 überimpft, die das gewünschte Plasmid trägt. Nach etwa 2 h haben die Zellen eine OD₆₀₀ von 0.8 erreicht. Bei größeren Volumen sollte vorher die Temperatur auf 20 °C reduziert werden. Alternativ läßt sich die Kultur vor Induktion auch auf Eis abkühlen. Zur Induktion der Expression wird nun a-Tet zu 430 nM zugesetzt. Die Zellen werden 3-4 h bei 20 °C weiter inkubiert, in gewogene Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 4 °C, 6 000 *rcf* zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig dekantiert und das feuchte Bakterienpellet gewogen.

Das Bakterienpellet wird in Periplasma-Aufschlusspuffer (2 ml/g Feuchtgewicht) suspendiert und über Nacht bei 4 °C kräftig gerührt. Durch die Komplexbildung divalenter

Kationen wird so die Zellwand durchlässig gemacht. Die Sphäroblasten werden scharf abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 50 000 *rcf*). Der Überstand des Periplasma-Aufschlusses kann direkt auf Säulen zur Affinitätschromatographie aufgetragen (vgl. Kap. 7.8.1) oder bei -20 °C eingefroren werden.

Zur Expression selektierter Antikörper-Fragmente der ETH-2-Bibliothek aus den pHEN-Derivaten wird prinzipiell analog verfahren. Es können direkt die phagemidhaltigen TG1-Zellen der Selektion verwendet werden. Die Überexpression wird durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert und kann über Nacht erfolgen. Zur Analyse der Affinitäten wird direkt der Kulturüberstand nach einer effizienten Pelletierung der Bakterien (20 min, 4 °C, 50 000 *rcf*) verwendet.

a-Tet-Stock	2 mg/ml (4.3mM)	anhydro-Tetracyclin in DMF, 1/10 000 eingesetzt
IPTG-Stock	1 M	Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) 1/2000 eingesetzt
Periplasma-Aufschlusspuffer:		
	1M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1mM	EDTA

7.7.2 Expression in *inclusion bodies*

Unlösliche, Disulfid-freie Immunglobulin-Domänen erhält man durch Expression unter dem T7-Promoter in pET-Vektoren. Hierzu werden 0.2-2 l vorgewärmtes LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und einer Übernacht-Kultur von *E. coli* BL21(DE3) überimpft, die das gewünschte Plasmid trägt. Die Kultur wird bei 37 °C mit 180 Upm geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 1.0 wird die Expression der T7-Polymerase durch Zugabe von IPTG zu 0.5 mM induziert. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C geschüttelt und dann durch Zentrifugation (10 min, 4 000 *rcf*, GSA-Rotor) geerntet. Man erhält etwa 5 mg Bakterien pro Kulturliter, in deren unlöslicher Fraktion sich die fehlgefalteten bzw. aggregierten Proteine befinden.

IPTG	1M	in Wasser, sterilfiltrieren
Sonifizier-Puffer	300 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH 8
IB-Puffer I	50 mM	EDTA
	10 mM	Tris/HCl pH 8
	1 %	Triton X-100
IB-Puffer II	500 mM	GdmCl
	100 mM	Tris/HCl pH 7.5
	20 mM	EDTA

7.7.3 Cytoplasmatische Expression löslicher Immunglobulin-Domänen

Zur löslichen, cytoplasmatischen Expression wird eine stationäre Übernachtskultur des Stamms *E. coli* BL21(DE3) mit dem entsprechenden Plasmid (pT-Vektoren) 1:20-50 auf 100 ml - 2 l vorgewärmtes Medium (LB, 100 µg/ml Ampicillin) überimpft und bei 37 °C und 200 upm (145 upm bei 5 l-Kolben) geschüttelt. Nach etwa 2 h haben die Kulturen eine OD_{600} von 0.8 erreicht und werden mit 430 nM α -Tet induziert. Bei größeren Volumen sollte vorher die Temperatur auf 20 °C reduziert werden. Alternativ läßt sich die Kultur vor Induktion auch auf Eis abkühlen. Die Kulturen werden nun weitere 3-4 h bei 20 °C geschüttelt. Zur Ernte werden die Kulturen in Zentrifugenbecher überführt und 20 min bei 4 000 *rcf* zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig dekantiert. Die Pellets können bei -80 °C eingefroren werden.

Um Ausbeuteverluste durch die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken während der Aufreinigung zu vermeiden, werden die Zellen unter reduzierenden Bedingungen aufgeschlossen. Hierzu werden die Pellets in reduzierendem Sonifizierpuffer mit 2 mM β -Mercaptoethanol (β -ME), 2-5 ml/g Zellen, resuspendiert und in der *french press* aufgeschlossen. danach 20 min bei 18 000 *rcf* und 4 °C zentrifugiert. Alternativ kann der Aufschluß auch analog Kap. 7.7.2, unter Verwendung des Überstands nach dem ersten Sonifizieren erfolgen. Der Überstand (lösliche Fraktion) wird zur Reinigung der His-tag-Proteine anschließend auf eine Nickel-NTA-Säule aufgetragen (vgl. Kap. 7.8.1).

7.7.4 Expression eines anti-His-*tag*-scFv-Fragments

Zum Nachweis von His-*tag*-Proteinen im Western-Blot ist von Lindner *et al.* (1997) ein anti-His-*tag*-scFv-Fragment entwickelt worden, das genetisch mit der Alkalischen Phosphatase (AP) verbunden ist. Das Expressionsplasmid für dieses Konstrukt (pAK100_15L) codiert außerdem für die Chloramphenicol-Resistenz und wurde von Dr. Peter Lindner freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Anwendung im Western-Blot ist es ausreichend, einen Zellextrakt herzustellen, der das Fusionsprotein enthält. Hierzu wird das Plasmid zunächst in *E. coli* JM83 transformiert und die Zellen in LB-Medium mit Chloramphenicol (30 µg/ml) bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0.8 wird die Expression mit IPTG (0.5 mM) induziert und über Nacht bei 25 °C weitergeschüttelt. Die Zellen werden geerntet, in 20 ml TBS aufgenommen und zweimal in der *french press* lysiert. Das Lysat wird in 200 µl-Aliquots bei -20 °C eingefroren. Das Fusionsprotein wird nicht weiter aufgereinigt.

TBS	130 mM	NaCl
	4 mM	KCl
	25 mM	Tris/HCl pH 7.0

7.8 Proteinchemische Methoden

7.8.1 Reinigung von Ig-Domänen aus dem Periplasma-Extrakt

Proteine mit einem C-terminalen His-*tag* können durch Affinitäts-Chromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) in einem Schritt zu hoher Reinheit aufgereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1987). Für die Reinigung Disulfid-intakter Domänen aus dem Periplasma (vgl. Kap. 7.7.1) wird als Säulenmaterial *chelating-Sepharose fast flow* und als Metallion Zink verwendet (Lindner *et al.*, 1992). Das Säulenvolumen (SV) richtet sich nach der zu erwartenden Proteinmenge, die Kapazität liegt laut Herstellerangaben bei 5-10 mg His₆-Protein pro ml Material. Eine Säule wird zunächst mit folgenden Lösungen vorbereitet:

4 SV	Regenerationspuffer	
8 SV		H ₂ O
4 SV		0.5 M NaOH
8 SV		H ₂ O
4 SV		Zn ²⁺ -Lösung
8 SV		H ₂ O
4 SV		Äquilibrierpuffer (ÄP)

Der Periplasma-Aufschluss wird nun aufgetragen und unspezifisch bindende Proteine mit 4 SV Waschpuffer (ÄP mit 25 mM Imidazol) entfernt. Die spezifisch über den His-*tag* gebundenen Immunglobulin-Domänen werden schließlich mit 4 SV Elutionspuffer (ÄP mit 200 mM Imidazol) eluiert. Die erhaltenen Fraktionen (Auftrag, Durchlauf, Waschfraktion, Eluat) werden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) auf Gehalt und Reinheit des exprimierten Proteins überprüft (vgl. Kap. 7.8.4).

Regenerationspuffer		
	5 M	GdmCl
	100 mM	EDTA
	100 mM	Tris/HCl, pH 8.0
Äquilibrierpuffer (ÄP)		
	1 M	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
Zn ²⁺ -Lösung		
	5 g/l	ZnCl ₂ , mit 2 Tropfen 2 M HCl ansäuern

7.8.2 Reinigung cytoplasmatisch exprimierter löslicher Proteine

Cytoplasmatisch exprimierte, lösliche Proteine werden auf eine äquilibrierte Nickel-NTA-Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Die hier angewandte Methode ist analog zu Kap. 7.8.1, die Chromatographie wird jedoch unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Puffer enthalten eine niedrigere NaCl-Konzentration (300 mM) und Reduktionsmittel (5 mM β -ME), um eine mögliche Vernetzung von Proteinen über freie Thiole der Cysteine zu verhindern. Die Wasch- und Elutionsbedingungen sind entsprechend.

Gut exprimierende His₆-*tag*-Protein liegen im Eluat meist zu über 98% Reinheit vor.

7.8.3 Reinigung und Faltung von Proteinen aus *inclusion bodies*

Für die Reinigung wird eine fraktionierte Solubilisierung der unlöslichen Zellbestandteile angewandt. Das Zellpellet (vgl. Kap. 7.7.2) wird in Sonifizier-Puffer (5 ml/g)

resuspendiert und unter Eiskühlung durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen ("sonifiziert", Spitzengröße 1 cm², Intensität Stufe 6, 10-20% Zeitkonstante, 5-20 min). Der Aufschluß ist erfolgreich, wenn die zunächst trübe Suspension durchscheinend wird und die erhöhte Viskosität infolge Freisetzung genomischer DNA durch Fragmentierung wieder sinkt. Die Suspension wird zentrifugiert (10 min, 20 000 *rcf*), der Überstand dekantiert und der Aufschluss wiederholt. Nach einer zweiten Zentrifugation sollten alle löslichen Zellbestandteile vom Pellet, das die *inclusion bodies* enthält getrennt sein. Nun wird das Pellet nacheinander je zweimal in 10 ml IB-Puffer I, IB-Puffer II und schließlich Wasser suspendiert, dazwischen jeweils kurz sonifiziert und 10 min bei 20 000 *rcf* zentrifugiert (Freund, 1994). Nach der letzten Zentrifugation kann das Pellet solubilisiert bei -20 °C eingefroren werden.

Die Pellets der *inclusion bodies* (vgl. 3.2.2) werden in denaturierendem Puffer (6 M GdmCl, 50 mM NaPO₄ pH 8.0, 5 mM β-ME) zunächst aufgeschwemmt und durch Inkubation im Überkopffrotor gelöst, danach 15 min bei 18 000 *rcf* zentrifugiert. Die Proteinfraction des Überstands enthält bei guten Expressionsausbeuten zu über 95 % die exprimierten Proteine in denaturiertem Zustand.

Das aus *inclusion bodies* gereinigte Material wird durch Verdünnen zu unter 5 µM Protein in Puffer ROAMG gefaltet. Zu 10 ml Puffer werden unter Rühren auf Eis tropfenweise 200 µl des in 6 M GdmCl-Lösung solubilisierten Proteins gegeben und 1 h Stunde ruhen gelassen. Dabei präzipitierendes Material wird anschließend durch 20 min Zentrifugation bei 30 000 *rcf*, 4 °C abgetrennt.

Reinigung sowie Proteinausbeute nach Rückfaltung können durch Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE (Kap. 7.8.4) überprüft werden. GdmCl-haltige Proben sind dazu nicht geeignet. Das Guanidin aus solchen Proteinfractionen kann durch eine Fällung mit 1 Vol. 10%iger Trifluoressigsäure, 10 min Inkubation auf Eis, 10 min Zentrifugation bei 18 000 *rcf*, 4 °C, Waschen des Pellets mit kaltem Aceton und Aufnahme in SDS-Probenpuffer entfernt werden.

Der Überstand wird entweder direkt für weitere Experimente eingesetzt (Kap. 7.9.2) oder einer Dialyse (Kap. 7.8.6) zum Austausch des Faltungspuffers unterzogen.

Puffer ROAMG	0.5 M	GdmCl
	0.5 M	Arginin-HCl
	250 mM	NaCl
	10 mM	KCl
	50 mM	Tris/HCl
	2 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	1 mM	ZnCl ₂
	0.05 %	PEG 4000
	1 mM	DTT

7.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteine können in Polyacrylamid-Gelen nach Denaturierung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Reduktion nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Immunglobulin-Domänen (ca. 12 kDa) werden gut durch ein 17%-iges Gel unter den Pufferbedingungen von (Fling & Gregerson, 1986) aufgelöst. Für die größeren scFv-Fragmente und Fusionen mit Zinkfingerdomänen verwendet man ein 12.5%-iges Gel.

7.8.4.1 Herstellen der Gele

Das folgende Rezept genügt zum Gießen von vier Gelen. Für das 17%-ige Trenngel werden 13.6 ml Ultrapure Protogel (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), 6 ml 4x *lower-tris*-Puffer und 4.2 ml Wasser gemischt, mit 30 µl TEMED und 45 µl 10 % APS versetzt und die Gelkammern bis ca. 2 cm unter dem Rand gefüllt. Um Eintrocknung während der Polymerisation zu vermeiden, wird mit etwa 1 ml 50 % 2-Propanol überschichtet, welches nach erfolgter Polymerisation mit Wasser herausgespült wird. Für das 5%-ige Sammelgel werden 1.9 ml Ultrapure Protogel, 3 ml 4x *upper-tris*-Puffer und 7 ml Wasser mit 20 µl TEMED und 40 µl 10 % APS-Lösung angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Nach dem Einsetzen des Taschenformers und erfolgter Polymerisation können die Gele in feuchten Zellulosetüchern bei 4 °C ca. 2 Wochen gelagert werden.

4x lower-tris-Puffer: 3 M	Tris/HCl, pH 8.85
0.4 %	SDS
4x upper-tris-Puffer: 0.5 M	Tris/HCl, pH 6.8
0.4 %	SDS

7.8.4.2 Elektrophorese

Zur Elektrophorese werden die Gele in die Vertikal-Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben werden mit 1/4 Vol. an 5x SDS-Auftragspuffer versetzt und zur Denaturierung 5 min auf 95 °C erhitzt. Vor dem Auftragen der Proben werden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-150 V. Zur Visualisierung der Proteinbanden werden die Gele mit Coomassie gefärbt.

5x SDS-Auftragspuffer:

50 %	Glycerin
7.5 %	SDS
250 mM	Tris/HCl, pH 8.0
0.5 %	Bromphenolblau
12.5 mM	2-Mercaptoethanol

Laufpuffer nach Fling&Gregerson

50 mM	Tris
190 mM	Glycin
0.1 %	SDS

7.8.4.3 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung dient dem Nachweis von Proteinen bis 0.1 µg nach Auftrennung in einem Gel. Für die Färbung wird das Gel zunächst in einer Lösung von 0.125 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in 50 % Ethanol, 7 % Essigsäure 30 min geschwenkt. Zur Entfärbung wird es zunächst 10 min in 10 % Ethanol / 7 % Essigsäure und danach in 7 % Essigsäure geschwenkt.

Das gefärbte Gel kann zwischen Polyacetat-Folien (*gel drying film*) getrocknet werden.

7.8.5 Western-Blots

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können im elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Darauf lassen sich beispielsweise His-tag-Proteine durch eine spezifische Immunfärbung nachweisen. Hierzu wird das SDS-Gel luftblasenfrei auf eine zuvor in technischem Ethanol und Transferpuffer behandelte PVDF-Folie gelegt, dies zusammen dann auf beiden Seiten mit drei Lagen feuchtem Whatman-Filterpapier und

je einem Filterschwamm belegt und in einen mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Tank überführt. Nach dem Blot (9 h bei 40 V oder 14 h bei 25 V) kann die Membran direkt blockiert oder bei -20 °C eingefroren werden.

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wird die Membran 30 min mit 5 % Milchpulver in hTBST inkubiert. Die folgenden Schritte sind

1'	waschen mit hTBST
30'	10 ml hTBST + 0.5 % Milchpulver + 200 µl anti-His-tag scFv-Lysat (vgl. Kap. 7.7.4)
3 x 10'	waschen mit hTBST
kurz	in AP-Puffer schwenken
1-20'	färben in 5 ml AP-Puffer + 16 µl BCIP-Lösung + 33 µl NBT-Lösung.

Die Färbung wird durch Zugabe von Wasser gestoppt.

Transferpuffer	150 mM 10 %	Glycin Methanol
hTBST-Puffer	500 mM 50 mM 0.2 %	NaCl Tris pH 7.0 Tween 20
AP-Puffer	100 mM 100 mM 5 mM	Tris pH 9.5 NaCl MgCl ₂
BCIP-Lösung	5 % in DMF	
NBT-Lösung	5 % in 70 % DMF	

7.8.6 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen

Proteinlösungen werden zweifach gegen das hundertfache Volumen des gewünschten Puffers (meist PBS, *phosphate buffered saline*) entweder 3 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht dialysiert. Hierzu werden Dialyseschläuche (Spectra Por 1 aus regenerierter Cellulose mit einer Ausschlußgröße von 6-8 kDa) verwendet, die zuvor zweimal in jeweils frischem TE-Puffer aufgekocht und bis zur Verwendung bei 4 °C in TE-Puffer steril aufbewahrt werden. Nach der Dialyse werden die Proteine sterilfiltriert und nach Zugabe von 1/100 Vol. 2%-iger NaN₃-Lösung bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgt durch Ultrafiltration an einem Membranfilter. Dazu wird eine Amicon 8400 bzw. 8050 Ultrafiltrationszelle mit Magnetrührer und einer YM10 Membran (Ausschlußgröße 10 kDa) verwendet, in der die Proteine unter Stickstoffatmosphäre von 3-4.5 bar bei 4 °C konzentriert werden. Volumina bis 4 ml

können mittels Ultrafiltration durch Zentrifugation in membraspin-micro-Gefäßen bei 5 000 *ref*, 4 °C aufkonzentriert werden.

PBS	4 mM	KH ₂ PO ₄
	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	115 mM	NaCl
	ergibt pH 7.4	

7.8.7 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Bei der Bindung von Coomassie BrilliantBlau G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm (freier Farbstoff) nach 595 nm (peptidgebunden). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration einer Lösung. Die Reaktion läuft im sauren Milieu ab. Stark basische Lösungen und Seifen wie Triton X-100 oder SDS stören die Messung.

Bradford-Stocklösung (Bio-Rad Protein Assay) wird 1/5 mit H₂O verdünnt. Die zu bestimmende Proteinlösung wird mit Puffer (z.B. PBS) auf ein Volumen von 100µl gebracht und mit 900 µl der verdünnten Bradford-Lösung gemischt. Eine Lösung mit proteinfreiem Puffer dient jeweils als Referenz. Zur Erhöhung der Genauigkeit sind hier Doppelbestimmungen angebracht. Nach 15 min kann die Extinktion der Lösung bei 595 nm gemessen werden. Für den interessierenden Konzentrationsbereich (1-20 µg) ist jeweils eine Eichkurve mit Protein bekannter Konzentration aufzunehmen.

Für den Zusammenhang von Proteinkonzentration und Extinktion bei 595 nm in der vermessenen Lösung gilt hier folgende Gleichung:

$$[c] = (\Delta E + 0.044) / 0.0855 \quad \text{in } [\mu\text{g/ml}].$$

Eine alternative Bestimmung der Konzentration einer Lösung mit einem reinen Protein ist nach Kap. 7.10.1.3 möglich.

7.9 Analyse und Präparation von Protein-DNA-Komplexen

1.1.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zu hybridisierende Oligonukleotide werden stöchiometrisch gemischt (z.B. 100 µM) und in einem Reaktionsgefäß mit 1/10 Endvol. 10x Hybridisierungspuffer versetzt. Nach

5 min Denaturierung bei 95 °C im Wasserbad läßt man die Proben über mehrere Stunden langsam abkühlen, um eine optimale Hybridisierung zu gewährleisten.

10x Hybridisierungspuffer		
	4.5 M	NaCl
	0.24 M	Na-Citrat
		pH 7.06 (NaOH)

7.9.2 Präparation von Protein-DNA-Komplexen

Hybridisierte Oligonukleotide (DNA-Doppelstränge) werden in Verhältnissen zwischen 1:5 bis 5:1 mit rückgefalteten Proteinen direkt in deren jeweiligen Puffer (10-50 µl) gemischt und mindestens 1 h, besser über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Analyse der Komplexbildung erfolgt nach 20 min Mikrodialyse gegen Gellaufpuffer durch native Gelelektrophorese (Kap. 7.9.3).

7.9.3 Native Gelelektrophorese

Sowohl die Hybridisierung von DNA-Strängen (Oligonukleotiden) als auch deren Komplexierung durch Proteine kann durch Auftrennung nach elektrophoretischer Mobilität in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert werden. Zur Gewährleistung reduzierender Bedingungen wird 1 mM DTT in allen Puffern verwendet, für Zinkfingerproteine weiterhin 1 µM ZnCl₂.

Dazu werden 8%-ige Gele in einer Vertikal-Gelkammer gegossen (analog Kap. 7.8.4.1). Es wird jedoch 1/5 Vol. Laufpuffer (5x) ohne SDS sowohl zum Gießen des Gels, als auch zur Elektrophorese verwendet. Ein Sammelgel wird nicht hergestellt. Die Proben werden nach Dialyse gegen Laufpuffer und Mischen mit 1/10 Vol. Glycerin / 0.1 % Bromphenolblau aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 50 V, bis der Farbstoff etwa 2/3 der Trennstrecke durchquert hat.

dsDNA kann nach Auftrennung durch Färben mit EtBr visualisiert werden, proteinhaltige Komplexe lassen sich mit Coomassie (Kap. 7.8.4.3) anfärben.

Nach Excision entsprechender Banden und Zerkleinerung lassen sich die Komplexe mit 1-2 Vol. Laufpuffer aus dem Gel extrahieren.

5x Laufpuffer	250 mM	Tris
	1.9 M	Glycin
		pH 8.5

7.10 Spektroskopische Methoden

7.10.1 Absorptionsspektroskopie

Die Methode dient der Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung insbesondere aromatischer Verbindungen, zur Abschätzung der Anregungsmaxima fluoreszenter Proben, aber auch zur Charakterisierung der Azobenzol-Isomerisierung.

7.10.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben erfolgt durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) in 100 μ l-Quarzglas-Mikroküvetten und Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ($\lambda = \epsilon \cdot \chi \cdot c$). Bei dsDNA entspricht eine Absorptionseinheit 50 μ g/ml, für ssDNA 40 μ g/ml.

7.10.1.2 Aufnahme von Absorptionsspektren

Absorptionsspektren (von Protein-, Stilben-, Azobenzol-, Fluoreszeinlösungen) werden durch Messung der Extinktion über den jeweils angegebenen Wellenlängenbereich in 500 μ l-Quarzglas-Küvetten bestimmt. Als Referenz wird eine gleiche Lsg. ohne die zu untersuchende Verbindung bzw. ohne das Protein (Dialysepuffer) in den zweiten Strahlengang des Photometers gestellt.

7.10.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen, intrinsische Absorption

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt für reine Proteine durch Messung der Absorption bei 280 nm in 1 ml Quarzglas-Küvetten nach Denaturierung in konzentrierter GdmCl-Lösung (5-6 M) gegen eine Referenz mit dem gleichen Lösungsmittel ohne Protein (meist Dialyse-Puffer). Da in vollständig denaturierten Proteinen alle Chromophore die gleiche chemische Umgebung besitzen, gilt für ihren molaren Absorptionskoeffizienten folgende Relation (Gill & Hippel, 1989):

$$\epsilon_{280} = 5690 \cdot n_W + 1280 \cdot n_Y + 120 \cdot n_{SSBr}$$

n_W	Anzahl der Tryptophane
n_Y	Anzahl der Tyrosine
n_{SSBr}	Anzahl der Disulfidbrücken im Molekül

Experimentell kann ein Faktor zur Korrelation des molaren Absorptionskoeffizienten für natives und denaturiertes Protein in jedem Einzelfall bestimmt werden, um auch eine Abschätzung der Konzentration nativen Proteins vorzunehmen.

Die Methode ist nur mit Puffern möglich, welche bei 280 nm keine signifikante Eigenabsorption besitzen. Eine alternative Methode ist die Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Kap. 7.8.7)

7.10.2 Fluoreszenzspektroskopie

Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen werden alle Lösungen partikelfiltrierte und entgast. Das Probenvolumen beträgt mindestens 1 ml. Die Proben werden in eine Quarzglas-Fluoreszenzküvette überführt und im Küvettenhalter des Fluoreszenzspektrometers unter Rühren und Thermostatierung bei 20 °C mindestens 30 s äquilibriert. Um Linearität der Detektorempfindlichkeit zu gewährleisten, sollte die Probenkonzentration so gewählt werden, daß ein Meßsignal von 1 000 (willkürlichen) Fluoreszenzeinheiten nicht überschritten wird. Wenn im einzelnen nicht anders angegeben, werden die Fluoreszenzeigenschaften der Lösungen mit folgenden Geräteeinstellungen vermessen:

Excitations-Schlitzbreite	2.5 nm
Emissions-Schlitzbreite	10 nm
Vorspannung Photomultiplier	700 V

7.10.2.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenz-Emissionsspektren werden bei konstanter Excitationswellenlänge durch Abtasten der Emission über einen jeweils angegebenen Wellenlängenbereich aufgenommen. Durch Aufnahme von Spektren eines Chromophors in unterschiedlichen Zuständen bzw. Umgebungen läßt sich das Maximum der Signaländerung für den entsprechenden Übergang finden.

7.10.2 Fluoreszenztitration der Affinität von Ig-Fragmenten

Zur Bestimmung der Affinität eines Proteins zu seinem Liganden kann Fluoreszenzspektroskopie herangezogen werden. Wenn die Bindung Einfluß auf die Umgebung der aromatischen Seitenketten des Proteins nimmt, läßt sich eine Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften feststellen. Andererseits wird auch die Umgebung eines autofluoreszenten Liganden bei Komplexbildung am Protein beeinflusst. Beide Prozesse führen zu Signaländerungen, die sich zur Titration der Affinität heranziehen lassen.

Zur Messung werden die Lösungen ohne Bläschenbildung und Erwärmung in die Rührküvette pipettiert. Bei der Wellenlänge mit maximaler Signaländerung wird für jede Probe das Fluoreszenzsignal über fünf einzelne Meßintervalle von je 20-45 s aufgenommen und gemittelt. In Doppelbestimmungen werden über Nacht äquilibrierte Lösungen von je 1 ml mit aufsteigender Konzentration der variablen Komponente vermessen.

7.10.3 Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie³

Die Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) erfolgt mit einem Setup zur Einzelmoleküldetektion (Kolb, 2002). Hierbei wurde die Emission von Cy5 in Abhängigkeit des angeregten Chromophors aufgezeichnet. Die Anregung der verwendeten Chromophore TMR und Cy5 erfolgte nahe ihrer Excitationsmaxima (siehe Tabelle 7.1); für TMR wurde die 532 nm Linie eines frequenzverdoppelten Nd:YVO₄-Laser, für Cy5 die 632 nm Linie eines HeNe-Lasers verwendet.

Die Verdünnung der chromophorhaltigen Proben auf etwa 10^{-9} M ist durch das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen der Geräte bedingt. Über einen Zeitraum von bis zu 10 s wird in Meßintervallen von jeweils 500 μ s bis 10 ms die Fluoreszenz beider Chromophore für einzelne Proben in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge aufgezeichnet. Aus diesen Daten kann die FRET-Effizienz für detektierte Moleküle errechnet und gegen die Häufigkeit aufgetragen werden (Abb. 2.39, Abb. 2.40). Aufgrund der ver-

³ Sämtliche Untersuchungen mit dieser Methode wurden von Frau Pamela Kolb, AG von Prof. Christoph Bräuchle, Institut für Physikalische Chemie, Department Chemie der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchgeführt und ausgewertet (Kolb, 2002).

wendeten Korrekturfunktionen können sich auch negative Werte für die FRET-Effizienzen ergeben.

Tabelle 7.1 Photophysikalische Daten der Fluoreszenzchromophore Tetramethylrhodamin (TMR) und Cyanin5 (Cy5).

Farbstoff	TMR	Cy5
Excitation λ_{MAX} / [nm]	544	649
Emission λ_{MAX} / [nm]	572	670
ϵ [l/(mol*cm)] bei λ_{MAX}	90 000	250 000

7.10.4 Surface plasmon resonance-Spektroskopie⁴

Um molekulare Architekturen auf Oberflächen zu charakterisieren, lässt sich Plasmonspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) nutzen. Bindungsvorgänge an einer totalreflektierenden optischen Grenzschicht (LaSFN₉-Glas/Gold/ Dielektrikum) können nahezu in Echtzeit beobachtet werden. Bei dieser Spektroskopie wird die Intensität der Lichtreflexion in Abhängigkeit vom Einfallswinkel betrachtet. Bei Kopplung des eingestrahlt Lichts mit einem Oberflächenplasmon unter einem bestimmten Einfallswinkel ergibt sich ein Intensitätsminimum des reflektierten Lichts. Ändert sich dieser Winkel durch Änderung des Brechungsindex an der Grenzfläche, so verschiebt sich auch das Minimum. Ist die Goldschicht ausreichend dünn, setzt sich das vom einfallenden Licht angeregte elektrische Feld des Plasmons durch das Metall hindurch auf der rückseitigen Grenzfläche fort. Dort kann das Plasmon zur Detektion von molekularen Schichten verwendet werden, die durch ihre Adsorption an dieser Oberfläche den Brechungsindex ändern. Bei Messung der Reflektivität an einem festgelegten Winkel im linearen Steigungsbereich der Resonanzkurve als Funktion der Zeit lässt sich eine Reaktion (Bindung eines Moleküls) an der Oberfläche verfolgen.

⁴ Nach Schmidt (Schmidt, 1998). Die Experimente wurden in der Abt. Membranbiochemie, MPI für Biochemie, Martinsried, mit freundlicher Unterstützung durch Dr. Eva-Kathrin Sinner durchgeführt.

Für die Untersuchungen wird ein HeNe-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) verwendet, diese Wellenlänge interferiert nicht mit der Isomerisierung verwendeter Azobenzolderivate. Mit einer Anordnung nach Schmidt (1998) kann in einer optisch zugänglichen Meßküvette die Bindung von Molekülen aus physiologischen Puffern an die Goldoberfläche bzw. zuvor immobilisierte Substanzen verfolgt werden. Eine UV-Belichtung der Oberfläche kann wie unter Kap. 7.10.5 erfolgen.

7.10.5 Photo-Isomerisierung von Azobenzol-Derivaten

Azobenzol kann durch Anregung des π - π^* -Übergangs aus dem *trans*- in den *cis*-Zustand isomerisiert werden. Substituierte Derivate zeigen eine bathochrom verschobene Absorption für diesen Übergang. Durch Belichtung im *trans*-Absorptionsbereich bei 350 nm läßt sich ein photostationäres Gleichgewicht erzeugen, das einen hohen *cis*-Anteil (> 80 %) aufweist (Rudolph-Böhner *et al.*, 1997). Zur *trans*→*cis*-Isomerisierung wird eine Quecksilberdampfampe (Abt. Moroder, MPI für Biochemie, Martinsried) verwendet. Das Licht wird durch einen UG1-Filter mit einem Transmissionsmaximum bei 356 nm und einen Lichtleiter mysteriösen Ursprungs geleitet. Eine schnelle *cis*→*trans*-Isomerisierung kann analog unter Verwendung des BG12-Filters bei 450 nm angeregt werden. Auch diese Reaktion ist nicht quantitativ (> 95 % *trans*). Wenn nicht anders angegeben, wird die verdünnte Probe mit Azobenzol-Derivaten (bis 20 μM) in einer Quarzglas-Küvette für mindestens 5 min belichtet.

Thermisch aktiviert kann im Dunkeln das *trans*-Derivat quantitativ gewonnen werden. Dazu ist eine Inkubation über Nacht bei 50 °C hinreichend. Bei RT kann nach 24 h eine quantitative Ausbeute erwartet werden. (persönliche Mitteilung, Raymond Behrendt, MPI für Biochemie)

7.11 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die bei einer Assoziationsreaktion von Proteinen untereinander oder mit Liganden freiwerdende Wärme läßt sich bei genügend hohen Konzentrationen mit einem Isothermalen Titrationskalorimeter direkt messen.

Dazu wird eine Proteinlösung von mindestens 20 μM in der Meßzelle (> 1.8 ml) vorgelegt und eine zehnfach höher konzentrierte Lösung des Bindungspartners in die Injektionskanüle (> 400 μl) gefüllt. Eine sinnvolle Auswertung ist möglich, wenn durch Mischen der Reaktanden lediglich eine Reaktion ausgelöst wird. Um Mischungsartefakte zu vermeiden, müssen beide Lösungen alle anderen Bestandteile wie Pufferkomponenten zu identischen Konzentrationen enthalten. Die Lösungen sollten partikelfrei sein und werden vor Verwendung in der zugehörigen Vakuumkammer entgast.

Die Messung selbst führt das Gerät automatisch durch. Nach Vorlauf unter sehr exakter Temperierung der Meßkammer werden festgelegte Volumina im μl -Bereich injiziert und aus der Thermostatfunktion die jeweils freigewordene Wärme berechnet. Das zugehörige Programm erlaubt nach Eingabe der Reaktanden-Konzentrationen eine Auswertung inklusive Ermittlung von Affinität, Enthalpie und Entropie für die Reaktion.

7.12 Computer-Analysen

Kristallstrukturen von Proteinen werden mit dem Programmpaket *InsightII* 2.3. (Biosym Technologies Inc.) oder RasMac visualisiert.

DNA- und Proteinsequenz-Analysen, wie die Erstellung der Restriktionsanalysen, Planung von Oligodesoxynukleotiden für ortsspezifische Mutagenesen sowie Sequenzvergleiche, werden mit Hilfe des *sequence analysis package* der Genetics Computer Group, University of Wisconsin (UWGCG, Devereux *et al.*, 1984) durchgeführt.

Spektren, Titrationsexperimente usw. (und SPR-Experimente) werden mit dem *Kalaidagraph*-Programmpaket (Abelbeck Software) dargestellt und ausgewertet. Die Darstellung der spFRET-Ergebnisse erfolgt mit Origin.

8 Literaturverzeichnis

- Andreas, R. P., Datta, S., Janes, D. B., Kubiak, C. P. und Reifenberger, R. (1998). The Handbook of Nanostructured Materials and Nano-technology. San Diego, Academic Press.
- Arai, R., Ueda, H., Tsumoto, K., Mahoney, W. C., Kumagai, I. *et al.* (2000). "Fluorolabeling of antibody variable domains with green fluorescent protein variants: application to an energy transfer-based homogeneous immunoassay." Protein Engineering **13**(5): 369-376.
- Armstrong, N., DeLencastre, A. und Gouaux, E. (1999). "A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase." Protein Science **8**(7): 1475-1483.
- Asanuma, H., Tamaru, D., Yamazawa, A., Liu, M. und Komiyama, M. (2002). "Photoregulation of the Transcription Reaction of T7 RNA Polymerase by Tethering an Azo-benzene to the Promotor." ChemBioChem **3**(8): 786-789.
- Auerbach, D., Thaminy, S., Hottiger, M. und Stagljar, I. (2002). "The post-genomic era of interactive proteomics: Facts and perspectives." Proteomics **2**(6): 611-623.
- Barnikow, J., Kolb, P., Korndörfer, I., Chen, Y., Bräuchle, C. *et al.* (2002). "Rational design and single-molecule characterization of functional biomolecular nanoassemblies." in Vorbereitung.
- Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W. *et al.* (1999). "Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **96**(3): 1013-1018.
- Bashir, R. (2001). "DNA-mediated artificial nanobiostructures: state of the art and future directions." Superlattices and Microstructures **29**(1): 1-16.
- Bedzyk, W. D., Johnson, L. S., Riordan, G. S. und Voss, E. W. (1989). "Comparison of Variable Region Primary Structures within an Anti-fluorescein Idiotypic Family." Journal of biological Chemistry **264**(3): 1565-1569.
- Beerli, R. R. & Barbas, C. F. (2002). "Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors." Nature Biotechnology **20**(2): 135-141.
- Berezovsky, I. & Trifonov, E. (2001). "Protein structure and folding: A new start." Journal of biomolecular Structure & Dynamics **19**(3): 397-403.
- Beste, G., Schmidt, F. S., Stibora, T. und Skerra, A. (1999). "Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **96**(5): 1898-1903.
- Birnboim, C. A. K. (1979). "Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**: 1513-1523.

- Boireau, W., Bombard, S., Sari, M.-A. und Pompon, D. (2001). "Bioengineering and characterization of DNA-protein assemblies floating on supported membranes." Biotechnology and Bioengineering **77**(2): 225-231.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.
- Bradshaw, R. A., Brickey, W. W. und Walker, K. W. (1998). "N-Terminal processing: the methionine aminopeptidase and N[alpha]-acetyl transferase families." Trends in Biochemical Sciences **23**(7): 263-267.
- Carlson, J. (1988). "A New Means of Inducibly Inactivating a Cellular Protein." Molecular and Cellular Biology **8**: 2638-2646.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J. und Liu, D. (1999). "Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals." Science **284**(5415): 760-765.
- Cattaneo, A. & Biocca, S. (1997). Intracellular Antibodies: Development and Applications. New York, USA, Springer-Verlag.
- Cattaneo, A. & Biocca, S. (1999). "The selection of intracellular antibodies." Trends in Biotechnology **17**: 115-121.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **88**(21): 9578-9582.
- Cochet, O., Gruel, N., Fridman, W. und Teillaud, J. (1999). "Ras and p53 intracellular targeting with recombinant single-chain Fv (scFv) fragments: A novel approach for cancer therapy?" Cancer Detection and Prevention **23**(6): 506-510.
- Craig, D. B., Arriaga, E. A., Wong, J. C. Y., Lu, H. und Dovichi, N. J. J. (1996). "Studies on single alkaline phosphatase molecules: Reaction rate and activation energy of a reaction catalyzed by a single molecule and the effect of thermal denaturation - The death of an enzyme." Journal of the American Chemical Society **118**(22): 5245-5253.
- Cronin, C. A., Gluba, W. und Scrable, H. (2001). "The lac operator-repressor system is functional in the mouse." Genes & Development **15**(12): 1506-1517.
- Cruz, F. G., Koh, J. T. und Link, K. H. (2000). "Light-activated gene expression." Journal of the American Chemical Society **122**(36): 8777-8778.
- Darwin, C. (1881). The Power of Movements in Plants. New York, Appleton.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. C. (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX." Nucleic Acids Research **12**: 387-395.
- Dove, S., Joung, J. und Hochschild, A. (1997). "Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts." Nature **386**(6625): 627-630.
- Fields, S. & Song, O. (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**: 245-246.

- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986). "Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea." Analytical Biochemistry **155**: 83-88.
- Ford, G. P. & Herman, P. S. (1992). "Relative stabilities of nitrogen ions derived from polycyclic aromatic amines. Relationship to mutagenicity." Chemico-Biological Interactions **81**(1-2): 1-18.
- Förster, T. (1946). "Energieumwandlung und Fluoreszenz." Zeitschrift für Naturwissenschaften **33**: 166-175.
- Freund, C. (1994). NMR-spektroskopische Charakterisierung Antigen-bindender Immunglobulinfragmente. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Furuya, M. & Song, P.-S. (1994). . Photomorphogenesis in Plants. Kendrick, R. E. und Kronenberg, G. H. M. Dordrecht, Netherlands, Kluwer: 105-140.
- Gavilondo, J. V. & Larrick, J. W. (2000). "Antibody engineering at the millennium." Biotechniques **29**(1): 128-145.
- Geisselsoder, J., Witney, F. und Yuckenberg, P. (1987). "Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis." Biotechniques **8**: 786-791.
- Geva, E. & Skinner, J. L. (1998). "Two-state dynamics of single biomolecules in solution." Chem Phys Lett **288**(2-4): 255-229.
- Gibson, A. I., Herron, J. N., He, X.-M., Patrick, V. A., Mason, M. L. *et al.* (1988). "Differences in Crystal Properties and Ligand Affinities of an Antifluorescyl Fab (4-4-20) in Two Solvent Systems." Proteins: Structure, Function, and Genetics **3**: 155-160.
- Gilbert, H. F. (1990). "Molecular and Cellular Aspects of Thiol-Disulfide Exchange." Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology **63**: 69-172.
- Gill, S. C. & Hippel, P. H. v. (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Analytical Biochemistry **182**: 319-326.
- Glockshuber, R. (1989). Das Fv-Fragment des Phosphorylcholin bindenden Antikörpers McPC603: Expression in *Escherichia coli* und Charakterisierung. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992). "Tight control of Gene-Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **89**(12): 5547-5551.
- Gressel, J. (1979). "Blue-Light Photoreception." Photochemistry and Photobiology **30**(6): 479-754.
- Guo, Z. H., Zhou, D. M. und Schultz, P. G. (2000). "Designing small-molecule switches for protein-protein interactions." Science **288**(5473): 2042-2045.

- Ha, T., Enderle, T., Ogletree, D. F., Chemla, D. S., Selvin, P. R. *et al.* (1996). "Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **93**(13): 6264-6268.
- Hanahan, D. (1983). "Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**: 521-563.
- Harada, M., Sisido, M., Hirose, J. und Nakanishi, M. (1991). "Photoreversible Antigen-Antibody reactions." FEBS Letters **286**(1, 2): 6-8.
- Harada, M., Sisido, M., Hirose, J. und Nakanishi, M. (1994). "Photocontrolled uptake and release of Photochromic Haptens by monoclonal-antibodies - evidence of Photoisomerization inside the Hapten-Binding Site." Bulletin of the Chemical Society of Japan **67**(5): 1380-1385.
- Hellinga, H. W. (1996). "Metalloprotein design." Current Opinion in Biotechnology **7**(4): 437-441.
- Higaki, J. N., Haymore, B. L., Chen, S., Fletterick, R. J. und Craik, C. S. (1990). "Regulation of serine protease activity by an engineered metal switch." Biochemistry **29**(37): 8582-8586.
- Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987). "New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues." Journal of Chromatography **411**: 177-184.
- Hoess, R. H. (1993). "Phage display of peptides and protein domains." Current Opinion in Structural Biology **3**: 572-579.
- Hoogenboom, H. R., A.P., d. B., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W. *et al.* (1998). "Antibody phage display technology and its applications." Immunotechnology **4**(1): 1-20.
- Ikeda, T., Tsutsumi, O. und Wu, Y. (2000). "Optical switching and image storage by means of photochromic liquid crystals." Molecular Crystals and Liquid Crystals **347**: 245-257.
- Ikeda, T., Yoneyama, S., Yamamoto, T. und Hasegawa, M. (2002). "Refractive-index modulation by means of photosensitive liquid crystals." Molecular Crystals and Liquid Crystals **375**: 45-60.
- Jäger, M. & Plückthun, A. (1999). "Domain interactions in antibody Fv and scFv fragments: effects on unfolding kinetics and equilibria." FEBS Letters **462**(3): 307-312.
- Jiang, Z., Swem, L., Rushing, B., Devanathan, S., Tollin, G. *et al.* (1999). "Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes." Science **285**(5426): 406-409.
- Jones, P., Dear, P., Foote, J., Neuberger, M. und Winter, G. (1986). "Replacing the Complementarity-Determining Regions in a Human-Antibody with those from a Mouse." Nature **321**(6069): 522-525.

- Joung, J. K. (2001). "Identifying and modifying protein-DNA and protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid selection system." Journal of Cellular Biochemistry **37**(Suppl.): 53-57.
- Kabat, E. A. (1978). "The structural basis of antibody complementarity." Advances in Protein Chemistry **32**(1): 1-75.
- Kaplan, B. E. (1985). "The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides." Trends in Biotechnology **3**: 253-256.
- Kay, B. B., Winter, J. und McCafferty, J. (1996). Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual. San Diego, London, Academic Press, Inc.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**: 495-497.
- Kolb, P. (2002). Einzelmolekül-FRET-Spektroskopie ausgewählter biologischer Komplexe. Institut für Physikalische Chemie. München, LMU.
- Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Gotze, K., Stevens, F. J. *et al.* (1994). "Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an *Escherichia coli* promoter to the association constant of REI V." Biological Chemistry Hoppe Seyler **375**(1): 61-70.
- Kraemer-Pecore, C. M., Wollacott, A. M. und Desjarlais, J. R. (2001). "Computational protein design." Current Opinion in Chemical Biology **5**(6): 690-695.
- Kunkel, T. A. (1985). "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **82**: 488-492.
- Lemeulle, C., Chardès, T., Montavon, C., Chaabihi, H., Mani, J.-C. *et al.* (1998). "Anti-digoxin scFv fragments expressed in bacteria and in insect cells have different antigen binding properties." FEBS Letters **423**(2): 159-66.
- Li, W.-H., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G. und Tsien, R. Y. (1998). "Cell-permeant caged InsP3 ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression." Nature **392**(6679): 936-941.
- Likhtenshtein, G. I., Bishara, R., Papper, V., Uzan, B., Fishov, I. *et al.* (1996). "Novel fluorescence-photochrome labeling method in the study of biomembrane dynamics." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **33**(2): 117-133.
- Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E. *et al.* (1997). "Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions." Biotechniques **22**(1): 140-149.
- Lindner, P., Guth, B., Wülfing, C., Krebber, C., Steipe, B. *et al.* (1992). "Purification of Native Proteins from the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli* Using IMAC and Histidine Tails: A Comparison of Proteins and Protocols." Methods: A Companion to Methods in Enzymology **4**: 41-56.
- Lu, H. P., Xun, L. und Xie, X. S. (1998). "Single-molecule enzymatic dynamics." Science **282**(5395): 1877-1882.

- MacCallum, R., Martin, A. und Thornton, J. (1996). "Antibody-antigen Interactions: Contact analysis and Binding site Topology." Journal of Molecular Biology **262**: 732-745.
- Miyake, J. & Hara, M. (1997). "Protein-based nanotechnology: Molecular construction of proteins." Materials Science and Engineering: C **4**(4): 213-219.
- Moghaddam, A., Loberli, I., Gebhardt, K., Braunagel, M. und Marvik, O. J. (2001). "Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries." Journal of Immunological Methods **254**(1-2): 169-181.
- Moon, J. & Howe, W. (1991). "Computer design of bioactive Molecules - A Method for Receptor-based denovo Ligand Design." Proteins - Structure Function and Genetics **11**(4): 314-328.
- Muranaka, N., Hohsaka, T. und Sisido, M. (2002). "Photoswitching of peroxidase activity by position-specific incorporation of a photoisomerizable non-natural amino acid into horseradish peroxidase." FEBS Letters **510**(1-2): 10-12.
- Nicklas, W. (1993). "Fundamental Aspects of the Immunization of Laboratory-Animals." Tierärztliche Umschau **48**(3): 166.
- Niemeyer, C., Adler, M., Gao, S. und Chi, L. (2001). "Nanostructured DNA-protein aggregates consisting of covalent oligonucleotide-streptavidin conjugates." Bioconjugate Chemistry **12**(3): 364-371.
- Niemeyer, C. M. (2002). "The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates." Trends in Biotechnology **20**(9): 395-401.
- Ohage, E. C. (1999). Cytoplasmatische Expression von Immunglobulin Domänen durch rationales Protein -engineering. Genzentrum. München, LMU.
- Ohage, E. C. & Steipe, B. (1999). "Intrabody Construction and Expression. I. The Critical Role of VL Domain Stability." Journal of Molecular Biology **291**: 1119-1128.
- Ohage, E. C., Wirtz, P., Barnikow, J. und Steipe, B. (1999). "Intrabody Construction and Expression. II. A Synthetic Catalytic Fv Fragment,." Journal of Molecular Biology **291**(5): 1129-1134.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L. *et al.* (1998). "Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel." Journal of Biological Chemistry **273**(34): 21769-21776.
- Pope, B. & Kent, H. M. (1996). "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*." Nucleic Acids Research **24**: 536-537.
- Quail, P. (2002). "Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms?" Current Opinion in Cellular Biology **14**(2): 180-188.
- Radulescu, R. (1995). "Synthetic inducible biological response amplifiers (SIBRAS) - Rational peptides at teh crossroads between molecular evolution and structure-based drug design." Medical Hypotheses **44**(1): 32-38.

- Rebar, E. J. & Pabo, C. O. (1994). "Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities." Science **263**(5147): 671-673.
- Rudolph-Böhner, S., Kruger, M., Oesterhelt, D., Moroder, L., Nagele, T. *et al.* (1997). "Photomodulation of conformational states of p-phenylazobenzyloxycarbonyl--proline and related peptides." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **105**(2-3): 235-248.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlehuber, S., Beste, G. und Skerra, A. (2000). "A Novel Type of Receptor Protein, Based on the Lipocalin Scaffold, with Specificity for Digoxigenin." Journal of Molecular Biology **297**(5): 1105-1120.
- Schlichting, P., Duchscherer, B., Seisenberger, G., Basche, T., Brauchle, C. *et al.* (1999). "A bichromophore based on perylene and terrylene for energy transfer studies at the single-molecule level." Chemistry - A European Journal **5**(8): 2388-2395.
- Schmidt, E.-K. (1998). Charakterisierung thiopeptidunterstützter Lipidschichten zur Inkorporation von Membranproteinen. Fachbereich Biologie. Hannover, Universität Hannover.
- Schmitz, U., Versmold, A., Kaufmann, P. und Frank, H. (2000). "Phage display: A molecular tool for the generation of antibodies - A review." Placenta **21**(Suppl. A): 106-112.
- Schwede, T., Combet, C., Peitsch, M. C. und Guex, N. SWISS-MODEL - An Automated Comparative Protein Modelling Server. (<http://www.expasy.org/swissmod/>)
- Seeman, N. (1998). "DNA nanotechnology: Novel DNA constructions." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **27**: 225-248.
- Selvin, P. R. (1995). "Fluorescence Resonance Energy Transfer." Methods in Enzymology **246**: 300-334.
- Simeonov, A., Matsushita, M., Juban, E., Thompson, E., Hoffman, T. *et al.* (2000). "Blue-fluorescent antibodies." Science **290**(5490): 307-313.
- Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J. und Köster, H. (1984). "Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleotides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product." Nucleic Acids Research **12**: 4539-4557.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988). "Assembly of a Functional Immunoglobulin F_v Fragment in *Escherichia coli*." Science **240**: 1038-1041.
- Steinbacher, S. (1993). Stabilisierung der V_L-Domäne des Antikörpers McPC603. Fakultät für Chemie und Pharmazie. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Steipe, B. (a) The canonical sequence approximation. (<http://biochemistry.med.utoronto.ca/steipe/research/canonical.html>)
- Steipe, B. (1998). Protein design concepts. The Encyclopedia of Computational Chemistry. Schleyer, P. v. R., Allinger, N. L., Clark, T. *et al.* Chichester, John Wiley & Sons.

- Steipe, B. (1999). Evolutionary Approaches to Protein Engineering. Current Topics in Microbiology and Immunology. Famulok, M. und Winnacker, E.-L.
- Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A. und Steinbacher, S. (1994). "Sequence Statistics Reliably Predict Stabilizing Mutations in a Protein Domain." Journal of Molecular Biology **240**: 188-192.
- Stratagene, Bacteriomatch Two-Hybrid System Vector Kit - Instruction Manual (<http://www.stratagene.com/manuals/240065.pdf>)
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." Journal of Molecular Biology **189**: 113-130.
- Suzuki, C., Ueda, H., Mahoney, W. und Nagamune, T. (2000). "Open sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of Small Haptens." Analytical Biochemistry **286**(2): 238-246.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H., Zhang, M., Gao, H. *et al.* (1994). "The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*." Nucleic Acids Research **22**: 2857-2858.
- Tang, Y., Hicks, J. B. und Hilvert, D. (1991). "In vivo catalysis of a metabolically essential reaction by an antibody." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **88**: 8784-8768.
- Tomlinson, I., Cox, J., Gherardi, E., Lesk, A. und Chothia, C. (1995). "The structural repertoire of the human V kappa domain." EMBO Journal **14**(18): 4628-4638.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." Nature **302**(5909): 575-581.
- Trifonov, E. N. & Berezovsky, I. N. (2002). "Proteomic Code." Molecular Biology **36**(2): 239-243.
- Tsien, R. (1981). "A Non-Disruptive Technique for loading Calcium Buffers and Indicators into Cells." Nature **290**(5806): 527-528.
- van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A. und Wigler, M. (1993). "Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases." Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A. **90**(13): 6213-6217.
- Van Gelder, R. N. (2002). "Tales from the crypt(ochromes)." Journal of Biological Rhythms **17**(2): 110-120.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." Methods in Enzymology **153**: 3-11.
- Visintin, M., Settanni, G., Maritan1, A., Graziosi, S., Marks, J. D. *et al.* (2002). "The Intracellular Antibody Capture Technology (IACT): Towards a Consensus Sequence for Intracellular Antibodies." Journal of Molecular Biology **317**(1): 73-83.

- Wahyono, D., Piechaczyk, M., Mourton, C., Bastide, J. M. und Pau, B. (1990). "Novel Antidigoxin Monoclonal-Antibodies with different Binding Specificities for Digoxin Metabolites and other Glycosides." Hybridoma **9**(6): 619-629.
- Wald, G. (1968). "Molecular basis of visual excitation." Science **162**(850): 230-239.
- Willner, I., Rubin, S. und Riklin, A. U. (1991a). "Photoregulation of Papain Activity through Anchoring Photochromic Azo Groups to the Enzyme Backbone." Journal of the American Chemical Society **113**(9): 3321-3325.
- Willner, I., Rubin, S. und Zor, T. (1991b). "Photoregulation of [alpha]-Chymotrypsin by Its Immobilization in a Photochromic Azobenzene Copolymer ." Journal of the American Chemical Society **113**(10): 4013-4014.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. und Hoogenboom, H. R. (1994). "Making antibodies by phage display technology." Annual Reviews in Immunology **12**: 433-455.
- Wirtz, P. (2002). Rationales Antikörperengineering über die Methode der Consensus Sequenz Approximation. Ein Weg zur Darstellung von stabilisierten und humanisierten Antikörpern. Genzentrum. München, LMU: 200.
- Wirtz, P., Barnikow, J., Reinisch, A., Buchen, C. und Steipe, B. (2002). "A highly stable intrabody framework as acceptor for antibody specificities by *Restriction Selection* - a new loop grafting method." in Vorbereitung.
- Wirtz, P. & Steipe, B. (1999). "Intrabody construction and expression III: Engineering hyperstable VH domains." Protein science **8**: 2245-2250.
- Wolfe, S. A., Greisman, H. A., Ramm, E. I. und Pabo, C. O. (1999). "Analysis of Zinc Fingers Optimized via Phage Display: Evaluating the Utility of a Recognition Code." Journal of Molecular Biology **285**(5): 1917-1934.
- Wörn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A. *et al.* (2000). "Correlation between in Vitro Stability and in Vivo Performance of Anti-GCN4 Intrabodies as Cytoplasmic Inhibitors." Journal of Biological Chemistry **275**(4): 2795-2803.
- Wörn, A. & Plückthun, A. (2001). "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments." Journal of Molecular Biology **305**(5): 989-1010.
- Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Quian, J. und Wallace, R. B. (1991). "The Effect of Temperature and Olinucleotide Primer Length on the Specificity and Efficiency of Amplification by the Polymerase Chain Reaction." DNA and Cell Biology **10**(3): 233-238.
- Yang, R., Manuel Serrano, Slater, J., Leung, E. und Koeffler, H. P. (1995). "Analysis of p16INK4a and Its Interaction with CDK4." Biochemical and Biophysical Research Communications **218**(1): 254-259.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.
- Yokozeki, T., Ueda, H., Arai, R., Mahoney, W. und Nagamune, T. (2002). "A Homogeneous Noncompetitive Immunoassay for the Detection of Small Haptens." Analytical Chemistry **74**(11): 2500-2504.

9 Anhang

9.1 Klonierungsschemata

9.1.1 Konstruktion von scFv-Fragmenten durch restriction-selection

Plasmid	Oligonukleotide
pT-FlaK	AstH1-3.as, AstH1-3.as
pT-aSt	FlaH1-3.as, FlaL1-3.as
pT-aDX	DigH1-3.as, DigL1-3.as

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung (Icaf.for, Hind.rev) und Restriktionsdaus (AhdI/HincII bzw. EarI/Eco72I) verifiziert.

Fv-Dimer-Varianten (nicht scFv) wurden durch Klonierung einer RBS über SstI/PstI hergestellt. Aus den Dimer-Konstrukten ließen sich die einzelne Domänen über NcoI/BpiI (VI) bzw. NcoI/NcoI (Vh) klonieren. Periplasmatisch exprimierbare Varianten wurden durch Umklonierung in einen Vektor mit ompA^M-leader über NcoI/BpiI hergestellt.

pT-scFv-AR und Derivate: tet-Promotor, Amp-Resistenz

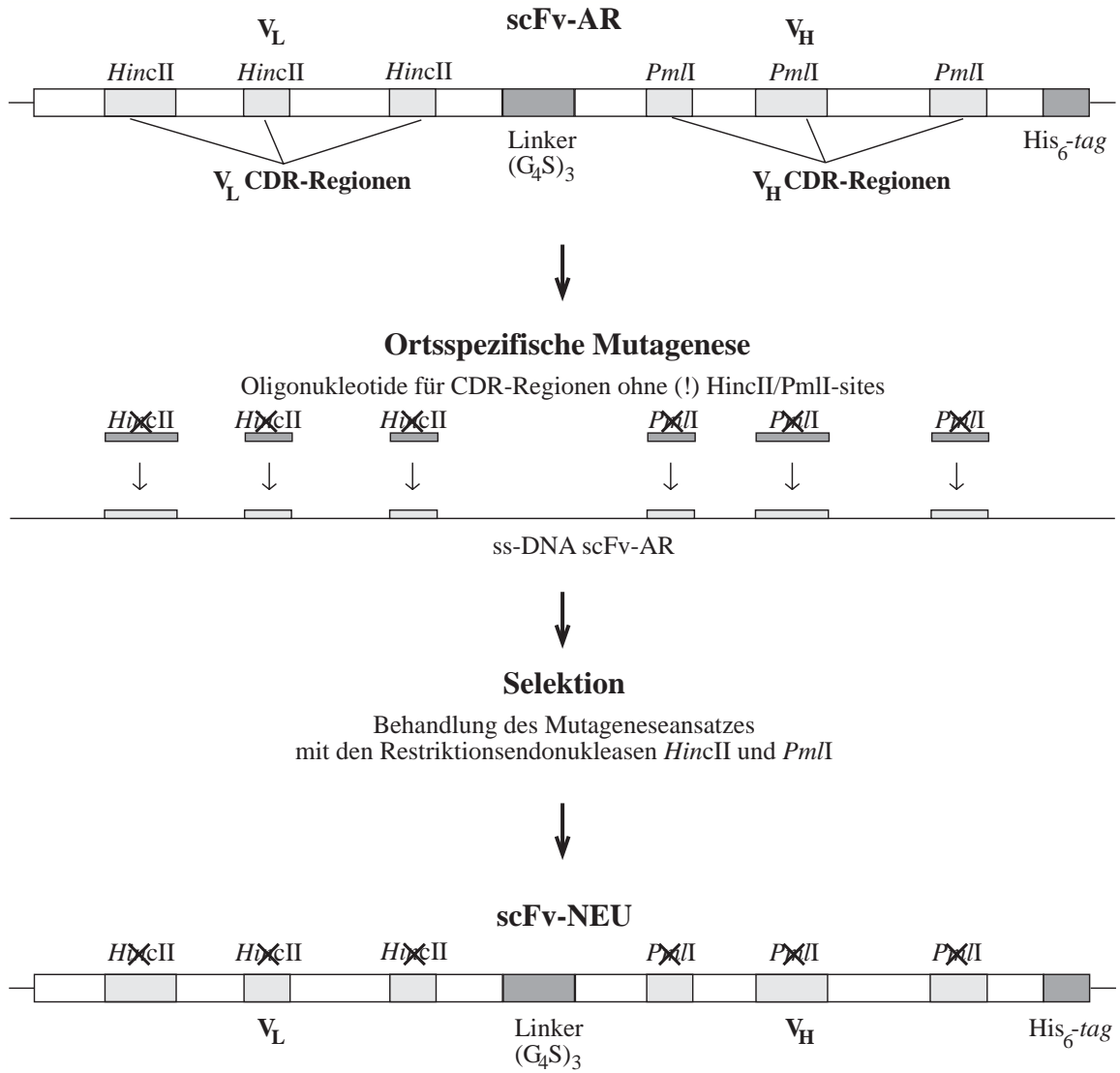


Abb. 9.1 Schema der Restriction selection (nach Wirtz, 2002).

9.1.2 pT-ph-AP

Vektor zur Fusionierung selektierter scFvs der ETH2-Bibliothek an alkalische Phosphatase

Die Mutagenese wurde durch Restriktionsdau (NotI, PstI, NcoI) und nach Umklonierung durch Sequenzierung (IcaF.for, Hind.rev) überprüft.

tet-Promotor, Amp-Resistenz

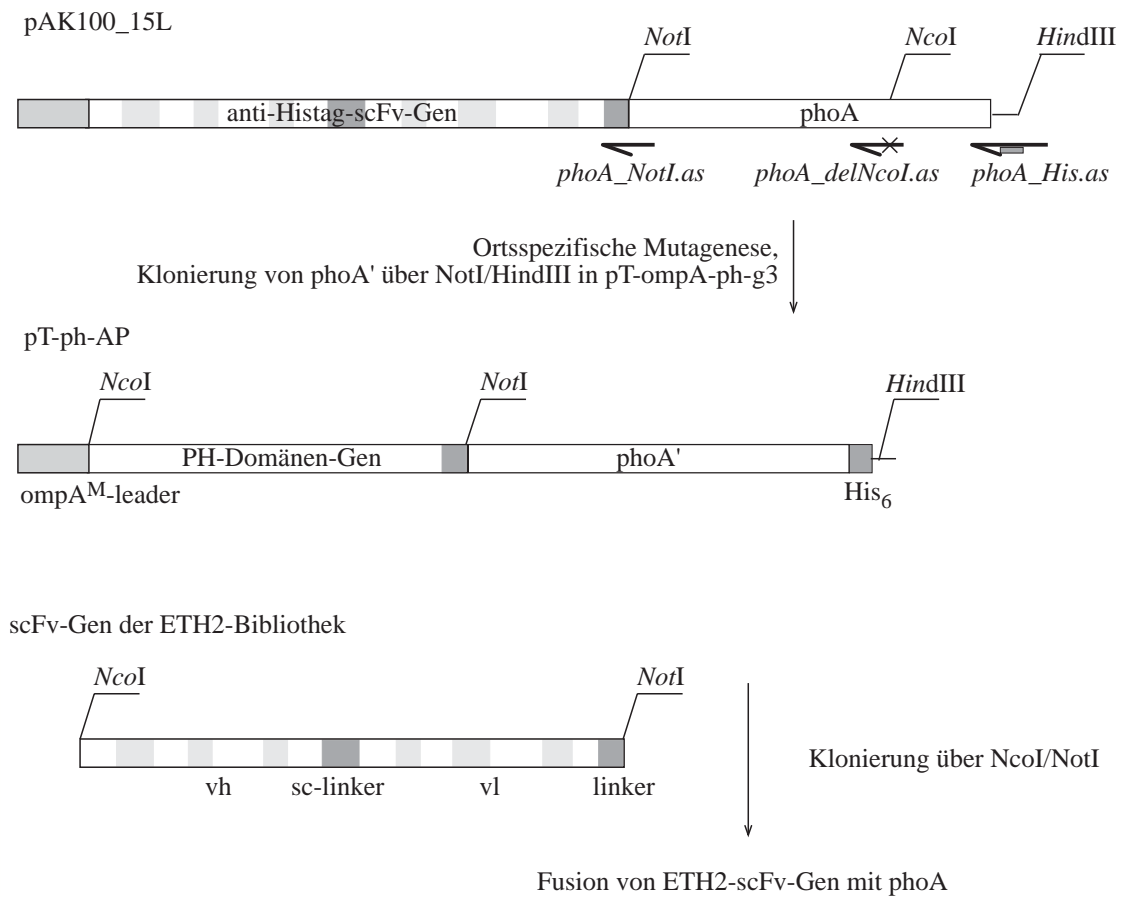


Abb. 9.2 Herstellung des Vektors pT-ph-AP zur Fusionierung von scFvs an AP.

9.1.3 Bacteriomatch-Konstrukte

Vektoren zum Test der Fv-Domäneninteraktion in Hefe /in Abhängigkeit vom Antigen

Alle Fv-Gene wurden mit demgleichen Primerpaar mittels PCR amplifiziert und über NotI- und EcoRI-sites in die MCS der Vektoren pTRG bzw. pBT kloniert.

pTRG	-aStH	pBT	-aStL
	-aStL		-aStH
	-FlaKH		-FlaKL
	-FlaKL		-FlaKH

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung (pBT.for, pTRG.for) und Restriktionsdauer (Vh: AccI, PstI; Vl: SacI/XbaI) verifiziert.

Fusionsgene unter lac-Promotor, Überexpression durch IPTG induzierbar

Resistenzen:

pTRG-Derivate	Tetracyclin
pBT-Derivate	Chloramphenicol
Teststamm	Kanamycin
Test der Interaktion	Carbenicillin

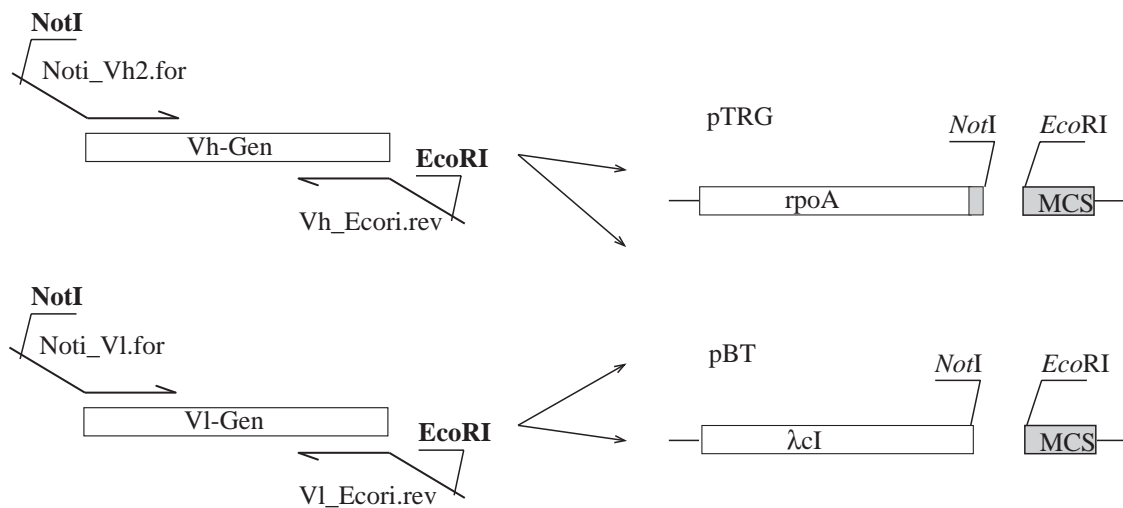


Abb. 9.3 Klonierung der Bacteriomatch-Konstrukte.

9.1.4 Y2H-Konstrukte

zur Überprüfung der Fv-Domäneninteraktion in Hefe /in Abhängigkeit vom Antigen von Stefan Eimer erhalten: pPC86AD (7.1 kbp), pDBleu (9.9 kbp), pPC-"Vl-HA-AD" (enthielt V1703-HA-DB), p"Vh-HA-DB"leu (enthielt Vh401-HA-AD)

Die Gal4-Domänen wurden von Stefan Eimer in ein anderes System (pBlueskript?) zur effizienten Modifikation übertragen (persönliche Mitteilung, Klonierung über HindIII, NotI). Hier erfolgte die N-terminale Fusionierung Vh401-DB, V1703-AD durch PCR. Dabei wurde zwischen den Domänen jeweils ein HA-tag eingefügt. Offenbar kam es bei der Rückklonierung zur Verwechslung der fusionierten Fragmente/Inserts. Es lagen die Vektoren pPC86-x-"AD" mit V1DB und p-x-"DB"leu mit Vh-AD vor, wie durch Sequenzierung festgestellt wurde.

Aus diesen Vektoren wurden die folgenden Derivate hergestellt:

pPC86-Derivate	pDBleu-Derivate
-aStH-DB	-aStL-AD
-aStL-DB	-aStH-AD
-FlaKH-DB	-FlaKL-AD
-FlaKL-DB	-FlaKH-AD
-aDXH-DB	-aDXL-AD
-aDXL-DB	-aDXH-AD
-1C10H-DB	-1C10L-AD
-1C10L-DB	-1C10H-AD
-DB	-AD

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung (SE_tiVh.rev, SE_VL.rev, pPC4200.for) und Restriktionsdau (pPC86: Van911/NotI, AccI; pLeu: PflMI, PvulI) überprüft.

Zur Klonierung anderer Fv-Domänen (Fv-AR-Derivate) in das System wurden jeweils die Vl-Domänen mit Icaf.for und SE_vl-rev bzw. die Vh-Domänen mit SE_tivh-for und SE_vh-rev amplifiziert. Eine analoge Klonierung der 1C10-Domänen erfolgte mit 1C10h.for & 1C10h.rev bzw. 1C10l.rev & 1C10l.rev. Die PCR-Produkte wurden über NcoI und SacI in den pPC-Vektor kloniert (pDBleu besitzt eine intrinsische SacI site). Hieraus wurden NcoI-EcoRI-Fragmente (incl. HA-tag) in den Vektor pleu übertragen.

Um sinnvolle Kontrollkonstrukte herzustellen, wurden die "unfusionierten" DB- bzw. AD-Domänen ausgetauscht. Dazu wurden die BsaBI-NotI-Fragmente der Proquest-Vektoren pPC86AD und pDBleu jeweils vertauscht kloniert zu pPC-DB und pleu-AD.

Resistenzen:

pPC86-Derivate Ampicillin
pDBleu-Derivate Kanamycin

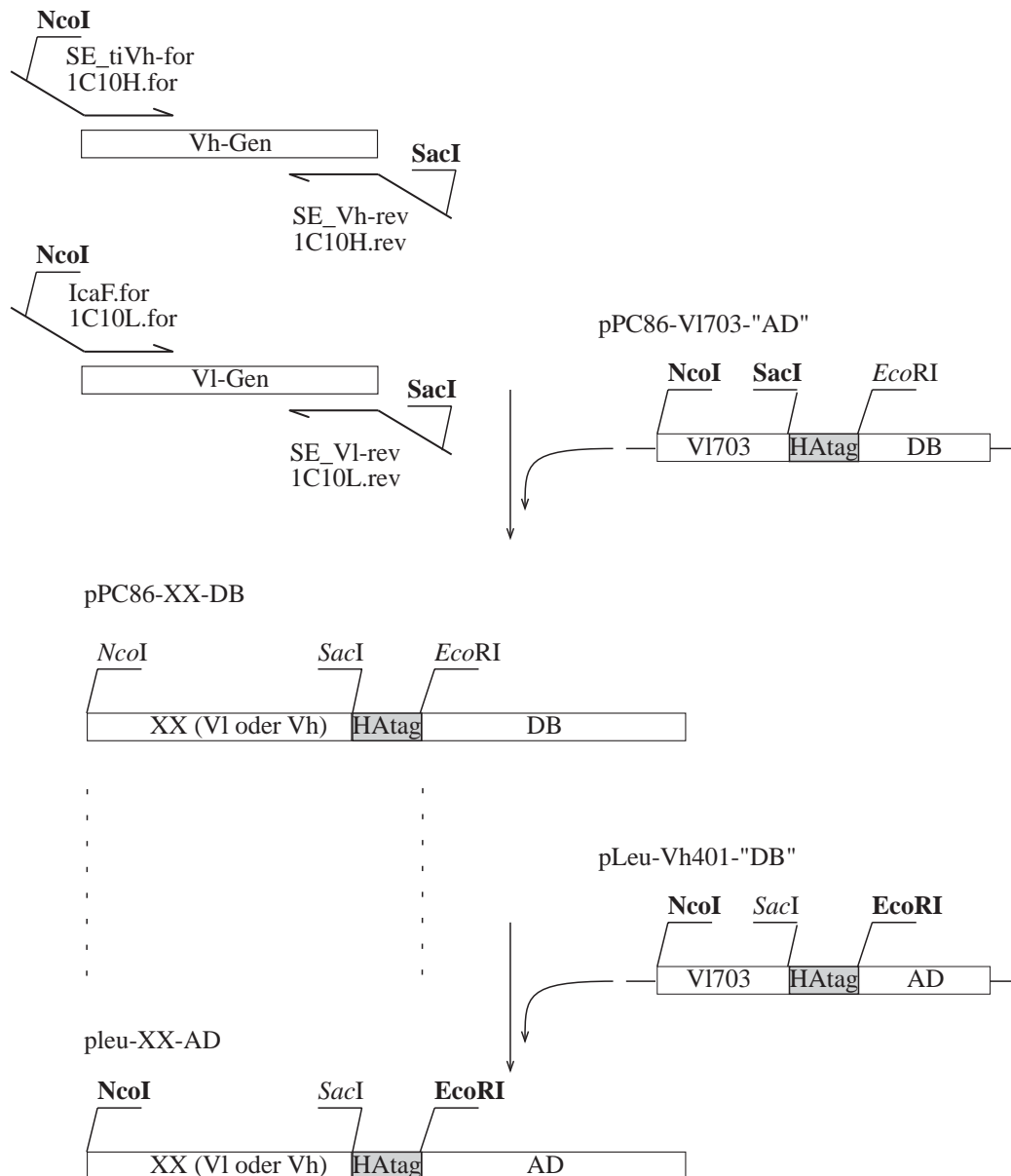


Abb. 9.4 Klonierung der Y2H-Konstrukte.

9.1.5 Konstrukte für die NBAs

zur Expression von Fusionsproteinen von Ig-Domänen mit Zinkfingern

pET15b Derivate wurden von Ingo Korndörfer erhalten:

pET-p53zf-VI, pET-VI-p53zf, pET-Vh-zif268, (jeweils aDX-Domänen).

Zur Herstellung von Fusionen mit den Wildtyp-Ig-Domänen wurden aDX- gegen 1C10-Domänen (aus Y2H-Konstrukten) ausgetauscht. Die entsprechenden Gene wurden dazu mit 1c10I.For, 1C10I_SacI_rev bzw. 1c10h.For, 1C10h_Bpu10I_rev amplifiziert und über NcoI/SacI (VI) bzw. NcoI/Bpu10I (Vh) kloniert: pET-1C10L-p53zf, pET-1C10H-Zif268. Die Konstrukte wurden durch Restriktionsdauer (AflIII) und Sequenzierung (T7) verifiziert.

T7-Promotor, in BL21DE3 IPTG induzierbar, Amp-Resistenz

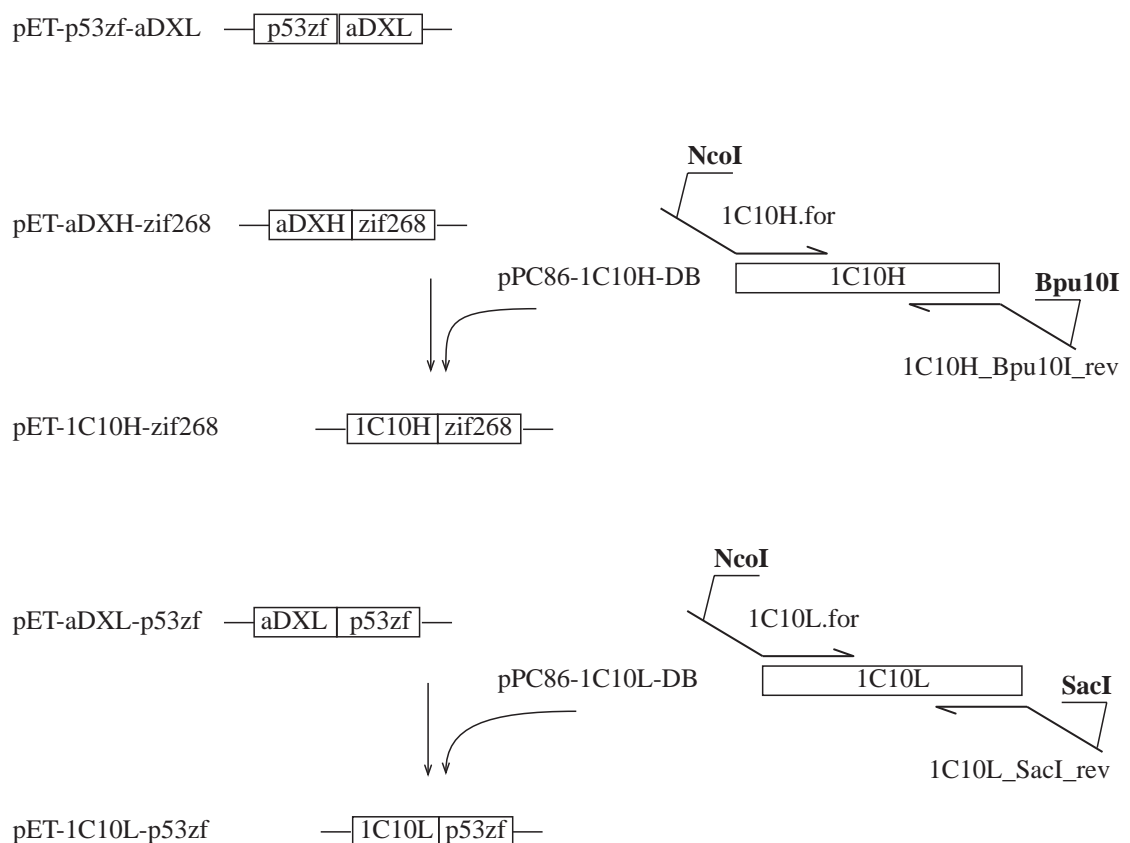


Abb. 9.5 Schema der Konstruktion von Fusionsproteinen für die NBAs

9.2 Plasmidkarten

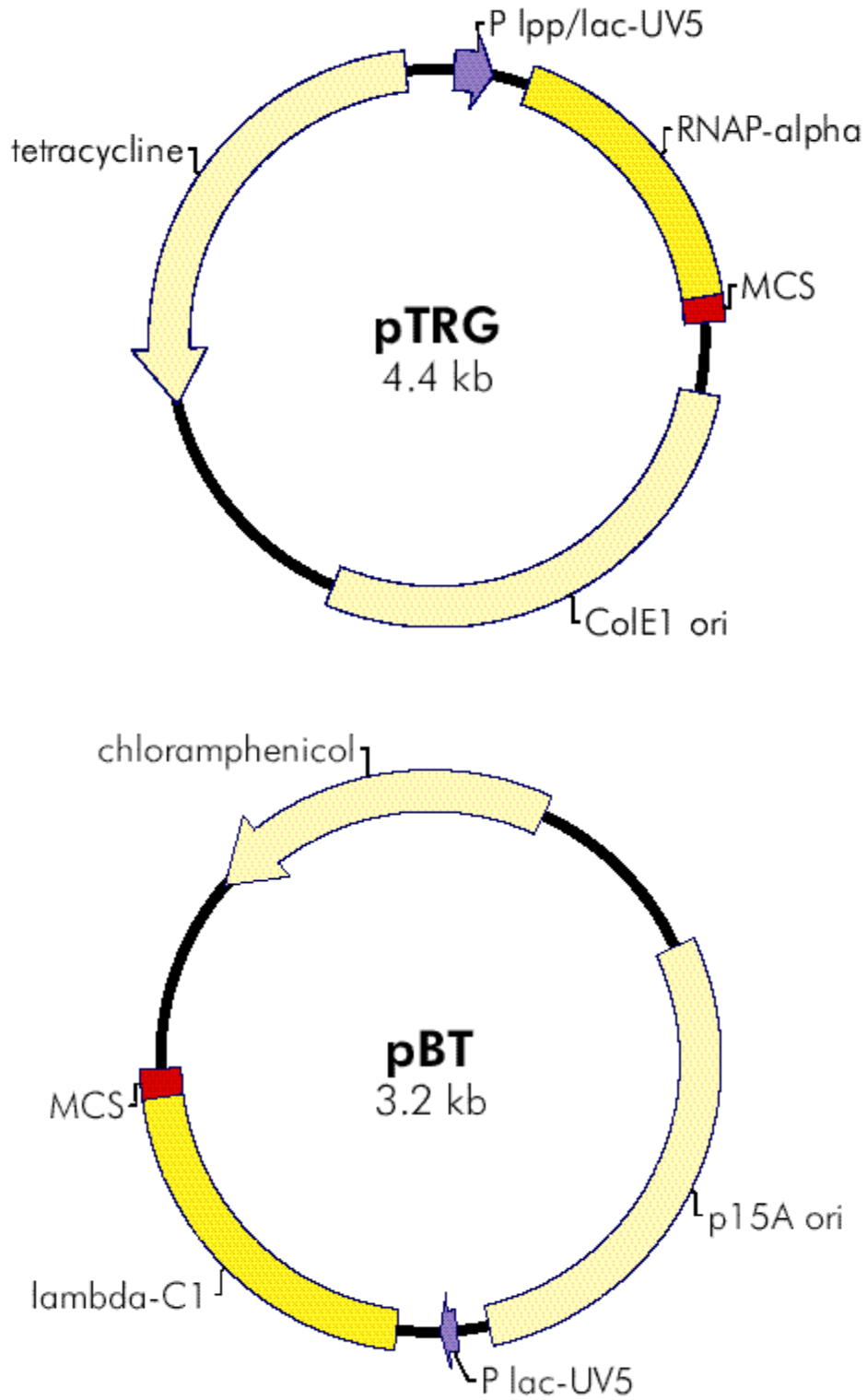


Abb. 9.6 Bacteriophage-Vektoren pTRG und pBT, Abb. mit Genehmigung von Stratagene.

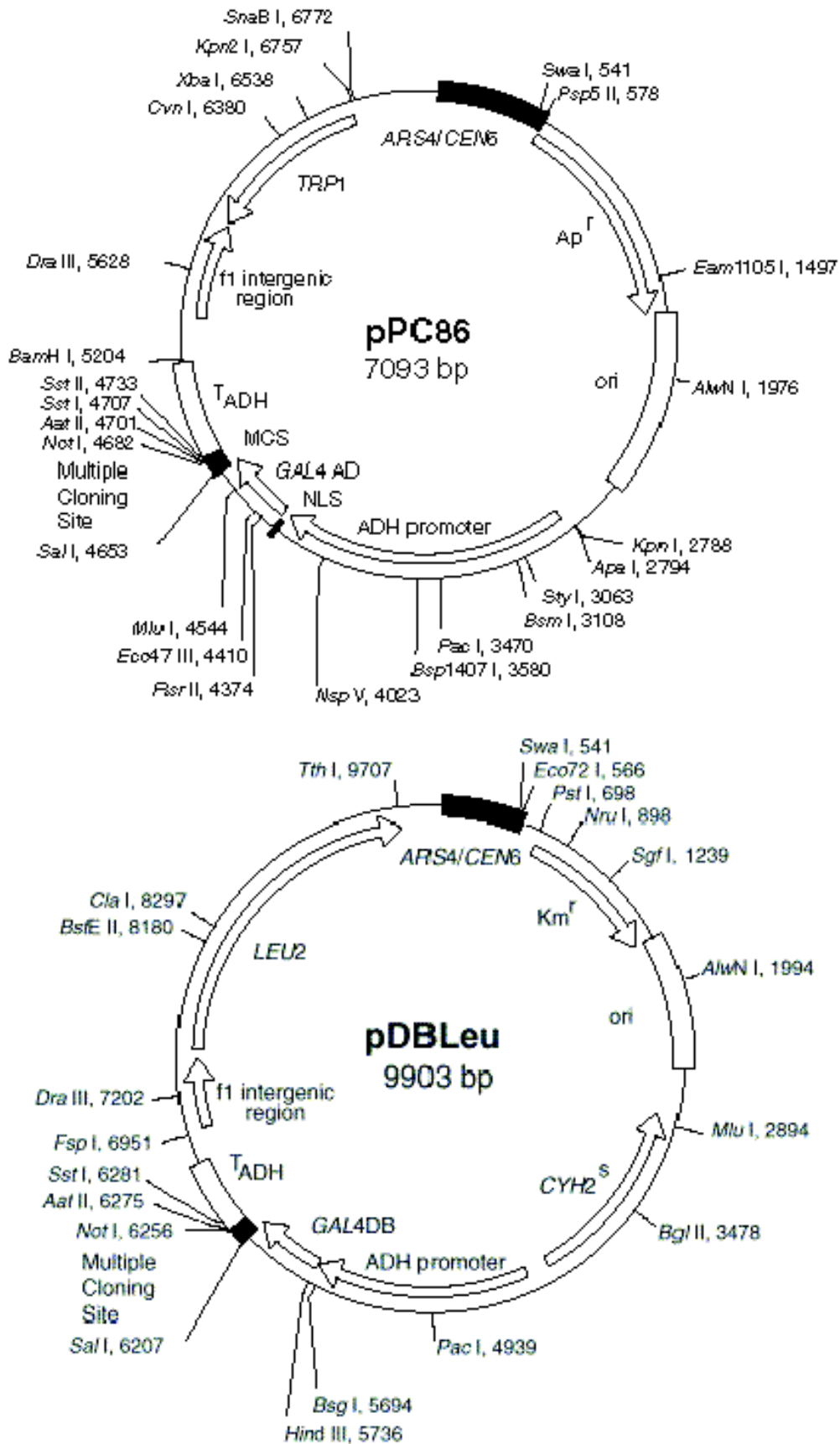


Abb. 9.7 Y2H-Vektoren, Abb. mit Genehmigung von Invitrogen.

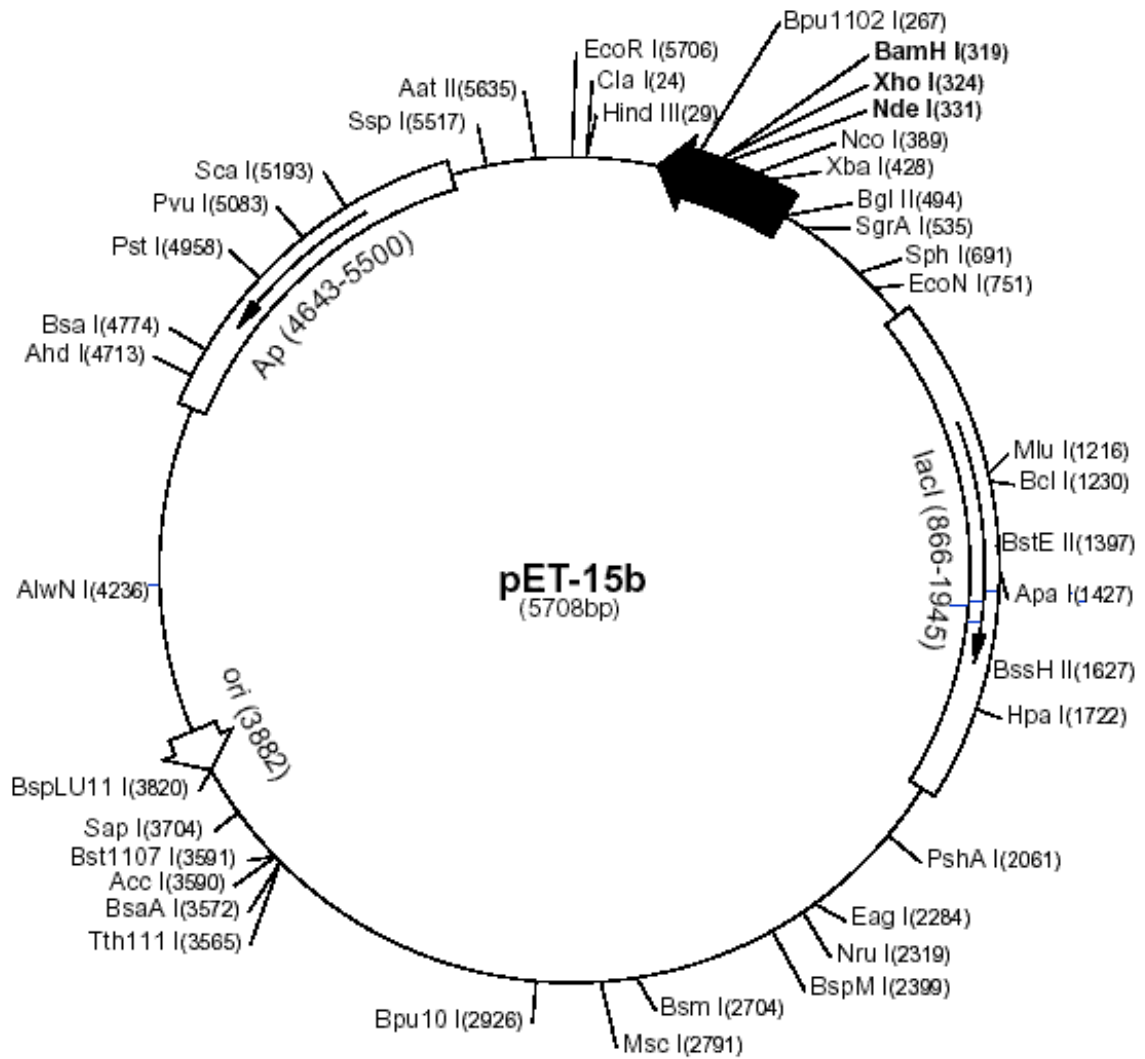


Abb. 9.8 Vektor pET-15b zur Expression unter dem T7-Promotor, Abb. mit Genehmigung von Novagen.

9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
aDX	anti-Digoxin-Fv
AG	Arbeitsgruppe
aSt	anti-Stilben-Fv
AS	Aminosäure
ASGA	4-Aminostilben-N-glutaramid
aSt-scFv	anti-Stilben- <i>single chain</i> Fv-Fragment
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region eines Antikörpers (<i>complementarity determining region</i>)
cons	Konsensussequenz
Cy5	Cyanin5, Fluoreszenzfarbstoff (molecular probes)
DB	DNA-bindende Domäne
Dig	Digoxin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FDA	Fluoresceindiacetat
FLAG-tag	Peptid-Sequenz zum spezifischen Nachweis mit mAB M2
FlaK	Fluoreszein-bindendes Fv
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fv	Fragment der variablen Domänen (VL + VH) eines Antikörpers
Gl.	Gleichung
h	Stunden
HRP	Merrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITC	isothermale Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
Kap.	Kapitel
LC	Lanatosid C
Lsg.	Lösung
mAB	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
min	Minuten
Mut.	Mutation
NBA	nanoskopischer biomolekularer Assembly

nt	Nukleotid(e)
Ou	Ouabain
P53zf	Zinkfingerprotein, welches an die p53-DNA-site bindet (Wolfe <i>et al.</i> , 1999)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	physiologischer Phosphat-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
.pdb	Eintrag in der Proteinstrukturdatenbank (http://www.rcsb.org)
PZGA	4-Amino-phenylazobenzol-N-glutaramid
RB	Gellaufpuffer für native PAGE (<i>running buffer</i>)
scFv	<i>single chain</i> Antikörper Fv-Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Fusionsprotein aus aDX-Vh und Zif268
SIBRA	<i>synthetic inducible biological response amplifier</i> (Radulescu, 1995)
SL	Fusionsprotein aus P53zf und aDX-VI
spFRET	<i>single pair</i> FRET
ssDNA	einzelsträngige DNA
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween-20
T _M	Hybridisierungstemperatur
TMB	Tetramethyl-benzidin
TMR	Tetramethyl-rhodamin
U	zweiarmiges DNA-Scharnier mit einem Linkerstrang
UE	Untereinheit
V	zweiarmiges DNA-Scharnier mit zwei nicht paarenden Linkersträngen
vgl.	vergleiche
VH	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
VL	variable Domäne der leichten Kette
Vol.	Volumen
w.E.	willkürliche Einheiten
WH	Fusionsprotein aus 1C10-Vh und Zif268
WL	Fusionsprotein aus aDX-VI und P53zf
Y2H	<i>yeast2hybrid</i>
Y3	dreiarmiges DNA-Scharnier mit zwei 3 nt-Linkerbereichen
Y10	dreiarmiges DNA-Scharnier mit zwei 10 nt-Linkerbereichen
Zif268	DNA-bindendes Zinkfingerprotein

9.4 Lebenslauf

Jan Barnikow

geboren am 01. 03. 1974 in Berlin-Köpenick, ledig, Nationalität deutsch

- 1980 – 1990 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, Berlin
 ab 1982 mit erweitertem Russischunterricht
- 1990 – 1991 Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium (1991 geschlossen)
 der Martin-Luther-Universität (MLU), Halle/Saale
- 1991 – 1992 Gymnasium am Reileck, Halle/S.
- 1992 Abitur
-
- ab Okt 1992 Studium der Biochemie, MLU, Halle/Saale
- 1994 Vordiplom
- 1996 Diplomprüfungen
- Okt 96 – Jul 97 Diplomarbeit bei Dr. Boris Steipe, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität
 (LMU), München unter Betreuung von Prof. Dr. Rainer Rudolph, Institut für
 Biotechnologie, MLU, Thema "Konstruktion und Charakterisierung eines
 synthetischen, katalytischen Antikörper-Fragments"
29. Juli 1997 Diplomverteidigung
-
- Sep – Dez 97 Wissenschaftl. Mitarbeiter, PIONEER Hi-Bred Int'l, inc., Johnston, Iowa, USA,
 Forschungen zur Verbesserung des Proteingehalts von Maissamen
-
- Jan 98 – Jan 99 Ziviler Wehersatzdienst, Betreuung einer Integrationsklasse, Montessori-Schule,
 "Aktion Sonnenschein, Hilfe für das mehrfach behinderte Kind e.V.", München
-
- Feb 99 – Dez 02 Doktorarbeit bei Dr. Boris Steipe, Genzentrum, LMU, München, Thema:
 "Konstruktion eines optisch schaltbaren genetischen Elements", betreuender
 Hochschullehrer: Prof. Dr. Dieter Oesterhelt
- 2000 – 2002 Mitarbeit im SFB 533 "Manipulation von Materie auf der Nanometerskala"