

Erzeugung und Optimierung einer Proteinoligomerisierungsdomäne

**Produktion und Untersuchung von Antikörperfragmenten
in rekombinanter Fusion mit α -Helixbündeln**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von

Anette Klinger
aus Oestrich-Winkel

Frankfurt am Main, 2002

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig
2. Gutachter Prof. Dr. H. Michel

Datum der Disputation:

*für meine Eltern
et
pour
le piano ...*

... welt ich han ... gesogen ...

Walther v. d. Vogelweide (12./13. Jahrhundert)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Struktur von Antikörpern	3
1.1.1 Antikörperfragmente	4
1.1.2 Multivalenz natürlicher Immunglobuline.....	6
1.2 Antikörper-Design	8
1.2.1 Oligomerisierung von Antikörperfragmenten	9
1.3 α-Helixbündel	11
1.3.1 Struktureller Aufbau	11
1.3.2 Die strukturgebenden Wechselwirkungen.....	12
1.4 Im vorliegenden Projekt eingesetzte α-Helixbündel	14
1.4.1 Das Coil-Ser-Peptid.....	14
1.4.2 Das Jun-Dimer	15
1.4.3 Die Oligomerisierungseinheit des SNARE-Komplexes.....	16
1.5 Cytochrom-<i>c</i>-Oxidase aus <i>Paracoccus denitrificans</i> und das gegen sie gerichtete Fv-Antikörperfragment Fv7E2	18
1.6 Analytische Ultrazentrifugation	20
1.7 Ziel des vorliegenden Projektes	23
2 Material	25
2.1 Chemikalien	25
2.2 Allgemeine Puffer und Lösungen	27
2.3 Gele	30
2.4 Proteine und Enzyme	31
2.5 Antikörper	31
2.6 Standards und Kits für die Biochemie	32
2.7 Säulenmatrizen und fertige Säulen	32
2.8 Geräte und Sonstiges	32
2.8.1 Zentrifugen und Rotoren	33
2.8.2 Chromatographiestationen.....	33
2.8.3 Filter und Konzentrationseinheiten	33

2.9	Mikrobiologische und molekularbiologische Materialien	34
2.9.1	Puffer und Medien	34
2.9.2	Vektoren	35
2.9.3	Kits.....	36
2.9.4	Oligodesoxynukleotide.....	37
2.9.5	DNA.....	37
2.9.6	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	37
3	Methoden.....	38
3.1	Mikrobiologische Methoden	38
3.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung von <i>Escherichia coli</i>	38
3.1.2	Ernte von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen.....	38
3.1.3	Aufschluß von <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	39
3.1.4	Generierung kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i>	39
3.1.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	39
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	Fällung von Nukleinsäure.....	40
3.2.2	Agarosegel-Elektrophorese	40
3.2.3	Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	40
3.2.4	Gensynthese.....	41
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	41
3.2.6	Amplifizierung von DNA mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.2.7	Restriktion von DNA.....	42
3.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
3.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
3.2.10	DNA-Sequenzierung	43
3.3	Allgemeine biochemische Methoden	43
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
3.3.2	Coomassie-Färbung von Gelen aus der SDS-PAGE.....	44
3.3.3	Silberfärbung von Gelen aus der SDS-PAGE	44
3.3.4	<i>Western Blot</i>	44
3.3.5	Aufbewahrung der Proteine.....	46
3.3.6	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	46
3.4	Präparation der Fv-Antikörperfragmente.....	47
3.4.1	Herstellung von Streptavidin-Säulenmaterial.....	47
3.4.2	Produktion der Fv-Fragmente und Präparation des Periplasmas.....	47
3.4.3	Streptavidin-Affinitätsreinigung der Fv-Antikörperfragmente	48
3.5	Mischungen von Fv7E2-CS bzw. Fv7E2 mit Cytochrom-c-Oxidase	49
3.6	Gelfiltration (Größenausschluß-Chromatographie)	49
3.7	Analytische Ultrazentrifugation	51
3.7.1	Präparation der Proben	51
3.7.2	Dichtekompensation des Detergenz	52
3.7.3	Optimierung der Zentrifugationsbedingungen	53
3.7.4	Datenanalyse.....	53

4	Ergebnisse.....	59
4.1	Strategie für die Konstruktion einer Oligomerisierungseinheit.....	59
4.1.1	Die Fusionspartner der α -Helixbündel.....	59
4.1.2	Der C-Terminus als Fusionsstelle.....	60
4.1.3	Die α -Helixbündel.....	60
4.1.4	Die <i>Linker</i> der Fusionsproteine.....	61
4.1.5	Die Expressionssysteme und die Reinigungsmethode.....	62
4.1.6	Herstellung der Expressionsvektoren.....	62
4.2	Produktion der Fusionsproteine.....	66
4.3	Charakterisierung des Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteins Fv7E2-CS.....	68
4.3.1	Produktion und optimierte Reinigung.....	68
4.3.2	Gelfiltrationsanalysen mit Fv7E2-CS und seinen Gemischen mit Antigen.....	70
4.3.3	Analyse der oligomeren Zustände mit analytischer Ultrazentrifugation.....	74
4.3.4	Stabilität des Fv7E2-CS und des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes.....	82
4.4	Charakterisierung der Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteine Fv11H9-CS und Fv17F8-CS.....	83
4.5	Charakterisierung des Fv-Fragment-Jun-Fusionsproteins Fv7E2-Jun.....	86
4.6	Charakterisierung einiger Antikörperfragment-SNAREs-Fusionsproteine.....	87
4.6.1	Die Fv-Fragment-SNAREs-Fusionsproteine „Fv7E2-SNAREs“.....	87
4.6.2	Die Schwerketten-Fragment-SNARE-Fusionsproteine „F44-SNAREs“.....	88
4.6.3	Untersuchung der Produktion der SNARE-Fusionsproteine.....	90
5	Diskussion.....	93
5.1	Herstellung funktionsfähiger Antikörperfragment-Peptid-Fusionsproteine.....	93
5.1.1	Produktion.....	93
5.1.2	Proteolyse.....	94
5.1.3	Die unterschiedliche Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine.....	95
5.2	Wahl der Methoden zur Bestimmung der oligomeren Zustände.....	97
5.3	Das Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsprotein Fv7E2-CS.....	98
5.3.1	Analyse des oligomeren Zustandes von Fv7E2-CS.....	98
5.3.2	Analyse des oligomeren Zustandes des Antigen-Komplexes von Fv7E2-CS.....	99
5.3.3	Konzentrationsanteil des trimeren Antigen-Komplexes am Gemisch.....	103
5.3.4	Stöchiometrie der eingesetzten Proteinmengen.....	105
5.3.5	Weitere Aspekte zu den Ultrazentrifugationsexperimenten.....	106
5.3.6	Antiparallelität des Coil-Ser-Bündels.....	108
5.3.7	Stellenwert des Fusionsproteins Fv7E2-CS im Vergleich zur aktuellen Literatur.....	109
5.4	Ausblick.....	111
5.4.1	Weiterführende Charakterisierung.....	111
5.4.2	Weiter- und Neuentwicklungen.....	112

6	Anhang	115
6.1	Oligodesoxynukleotide	115
6.1.1	Oligodesoxynukleotide für die Gensynthese	115
6.1.2	Oligodesoxynukleotide zur Vermehrung von DNA mit PCR	117
6.2	Verwendete Sequenzbereiche aus den SNARE-Proteinen	118
6.3	DNA-Sequenzierungen	119
6.3.1	DNA-Sequenzierung von pASK68Fv7ES-CS	119
6.3.2	DNA-Sequenzierung der SNARE-Peptide	120
6.3.3	Die DNA-Sequenzierung des Jun-Peptids in pASK68Fv7E2-Jun	124
7	Verwendete Abkürzungen	125
8	Literatur	127
	Danksagung	135
	Lebenslauf	137

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden Antikörperfragmente, um sie zu oligomerisieren, an α -Helixbündel rekombinant fusioniert und die Fusionsproteine sowie deren Produktion untersucht. Dabei wurde durch Fusion eines Fv-Antikörperfragmentes an das trimere α -Helixbündel „Coil-Ser“ das Fusionsprotein „Fv7E2-CS“ entwickelt. Wegen der Fusion an Coil-Ser liegt das Fv-Fragment selbst in trimerem Zustand vor und kann auch sein Antigen, eine Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*, binden und dadurch trimerisieren.

Antikörper gehören zur Immunabwehr der Wirbeltiere und sind Proteine, die in den Organismus eingedrungene, fremde Moleküle als „Antigene“ spezifisch binden, sowie dadurch weitere Immunfunktionen auslösen. Im sogenannten „Antikörper-Design“, einem momentan stark expandierenden, für die Entwicklung medizinischer Diagnostiken und Therapien vielversprechenden Forschungsgebiet, werden Antikörper und ihre Fragmente strukturell modifiziert, um sie an spezielle Anwendungen anzupassen. Eines der vielen Ziele ist die Steigerung der Bindungsaffinitäten, was unter anderem über die Vervielfältigung der natürlichen Bindestellen innerhalb eines künstlichen Antikörpermoleküls erreicht werden kann. Weiterhin möchte man Bindestellen gegen unterschiedliche Antigene in einem einzigen Antikörpermolekül vereinen, um dem Antikörper komplexere Funktionsfähigkeiten zu verleihen. Beide Ziele können durch Oligomerisierung der bindenden Antikörperfragmente verwirklicht werden.

Zur künstlichen Oligomerisierung von Proteinen wurde schon vielfach der Ansatz verwendet, sie an α -Helixbündel zu fusionieren. Auch für einige wenige Antikörperfragmente war dies bereits erfolgreich. α -Helixbündel bestehen aus zwei bis etwa acht α -helikalen Peptidketten, die über ihre hydrophoben Längsseiten miteinander oligomerisieren. Solche Bündel besitzen ebenso in natürlichen Proteinen, neben vielen anderen Funktionen, auch die von Oligomerisierungseinheiten.

In der vorliegenden Dissertation wurden drei Fv-Antikörperfragmente und ein Schwereketten-Antikörperfragment mit drei verschiedenen α -Helixbündeln in unterschiedlichen Kombinationen rekombinant fusioniert und anschließend ihre Produktion und Funktion untersucht. Als Helixbündel zum Einsatz kamen das heterotetramere α -Helixbündel des neuronalen „SNARE“-Komplexes, die homo- als auch mit „Fos“ heterodimerisierende Helix des AP-1-Transkriptionsfaktors „Jun“ und das synthetische, antiparallel homotrimerisierende Peptid „Coil-Ser“.

Die Expressionsprodukte einiger Fusionen konnten in Zellaufschlüssen mit *Western Blots* gefunden werden und ließen sich mit Affinitäts-Chromatographie in Mengen vergleichbar den Ausbeuten unmodifizierter Fv-Antikörperfragmente reinigen. Andere Produkte, bzw. bei einigen Fv-Fragmenten die Untereinheiten mit Peptid, waren durch die Fusion in ihrer Produktion deutlich gestört bis gar nicht vorhanden.

Alle drei an Coil-Ser fusionierten Fv-Fragmente wiesen deutliche bis gute Produktion auf und zeigten sich in der Gelfiltration mit vollständig assoziierten Untereinheiten, als auch mit vergrößerter, apparenter Molmasse im Vergleich zu den Fv-Fragmenten ohne fusioniertes Peptid. Von zweien der Coil-Ser-Fusionsproteine konnte Antigenbindung beobachtet werden und davon bei Fv7E2-CS die Entstehung eines Fv-Antigen-Komplexes mit einer gegenüber dem ursprünglichen Antigen-Komplex sehr stark vergrößerten apparenten Molmasse.

Mit analytischer Ultrazentrifugation wurde die Oligomerisierungsfähigkeit von Fv7E2-CS näher untersucht und für das ungebundene Fv-Fragment sowie für seinen Antigen-Komplex eine Massenkomponente mit im Vergleich zum jeweiligen Monomer dreifacher Molmasse gefunden. Für die Probe des Fv7E2-CS alleine wurde dabei ein Anteil an Komponenten trimerer Größenordnung von gut 95 % ermittelt, also nahezu Homogenität, und in der Probe des Antigen-Komplexes zu 35 – 50 % Komponenten trimerer, sonst monomerer Größenordnung. Die Ursache für den niedrigeren Anteil an trimeren Komponenten in der Probe des Komplexes könnte hauptsächlich das hier vorhandene Detergenz sein, welches für das als Antigen fungierende Membranprotein Cytochrom-*c*-Oxidase nötig ist. Denn schon für das Fv7E2-CS alleine wurde in Kontrollen mit Detergenz eine Verringerung des Anteils an trimerer Komponente bzw. seiner mittleren Molmasse festgestellt. Das Fv-Fragment Fv7E2 ohne Peptid als auch dessen Antigen-Komplex zeigten in der Ultrazentrifuge keine bzw. nur unbedeutende Anteile an trimeren Massenkomponenten.

Die Experimente deuten somit daraufhin, daß durch die Fusion des trimerisierenden Peptides Coil-Ser an Fv7E2 sowohl die Trimerisierung des Fv-Fragmentes, als auch bei Bindung des Antigens dessen Trimerisierung bewirkt wird. Das α -Helixbündel Coil-Ser ist folglich potentiell in der Lage, als Oligomerisierungseinheit für Fv-Antikörperfragmente eingesetzt zu werden. Wegen der aus Röntgenstrukturanalysen bekannten und für in Lösung prognostizierten Antiparallelität der Peptide im Coil-Ser-Bündel werden für die drei Fv-Fragmente bzw. die drei Bindestellen im Coil-Ser-Fusionsprotein einander entgegengesetzte Orientierungen vermutet, was für spätere Anwendungen von Bedeutung ist.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Struktur von Antikörpern

Das Immunsystem der Vertebraten dient der Verteidigung gegen Krankheitserreger sowie deren Toxine und teilt sich in ein spezifisches und ein unspezifisches System ein. Antikörper sind Proteine des spezifischen Systems, innerhalb dessen sie die spezifische Erkennung körperfremder Strukturen übernehmen. Ein Molekül, was von einem bestimmten Antikörper gebunden werden kann, wird als dessen Antigen bezeichnet. Die Antikörper gehören zu den Immunglobulinen und werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert, auf deren Oberfläche präsentiert oder in den Blut- und Lymphkreislauf abgegeben. Eine ausgelöste Immunreaktion läuft in mehreren Phasen ab, in denen verschiedene Immunglobulinklassen in unterschiedlichen Regionen oder Kompartimenten des Körpers spezielle Aufgaben erfüllen. Die unterschiedlichen Funktionen bedingen strukturelle Unterschiede, nach denen die humanen Immunglobuline des Blutserums in die fünf verschiedene Klassen IgG, IgA, IgM, IgD und IgE eingeteilt werden.

Die IgGs stellen mit etwa 80 % den größten Anteil an den Serum-Immunglobulinen und werden von durch Antigenkontakt differenzierten B-Lymphozyten produziert. Die Struktur von Antikörpern wird meist anhand der IgG1-Moleküle beschrieben (s. Abb. 1.1), die eine Molmasse von etwa 150 kD besitzen. Ihre symmetrische Anordnung wird von zwei identischen „schweren Ketten“ („H“) und zwei identischen „leichten Ketten“ („L“) gebildet, die durch insgesamt vier Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Die Ketten lassen sich in strukturell sehr ähnliche Domänen (je etwa 110 Aminosäuren) einteilen, die aus gegenläufigen β -Faltblattstrukturen bestehen und je durch eine Disulfidbrücke stabilisiert werden. Die vier N-terminalen, variablen Domänen bilden paarweise zwei identische Antigenbindestellen, deren Spezifität durch die in bestimmten Bereichen sehr hohe Sequenzvariabilität erreicht wird. Die übrigen Domänen bauen den in seiner Aminosäuresequenz hoch konservierten, konstanten Bereich des Immunglobulins auf. Er bestimmt die Effektorfunktionen des Antikörpers, wie beispielsweise Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren von Zellen der Immunabwehr. Gelenkregionen in den schweren Ketten sorgen für flexible Anpassungsmöglichkeiten des IgGs an die räumliche Struktur von Antigenen.

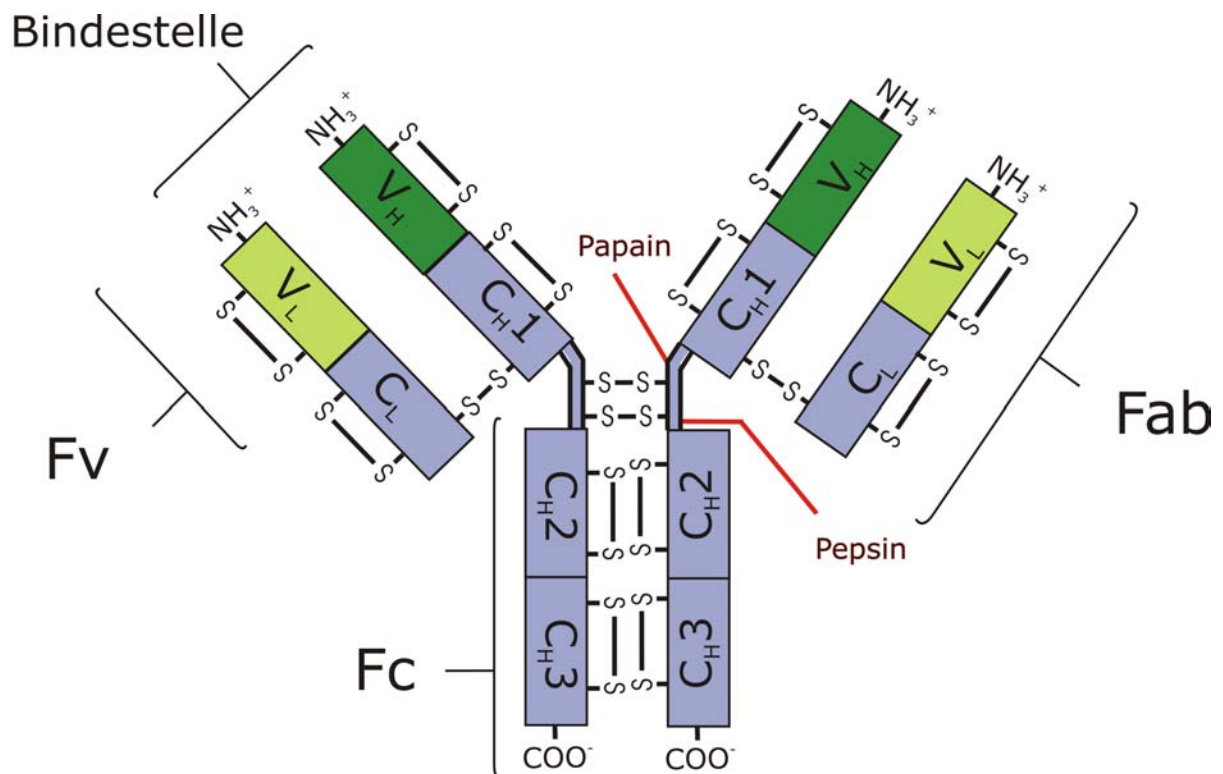


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Immunoglobulinmoleküls IgG1. Lila: Konstante Domänen von schwerer bzw. leichter Kette (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_L). Dunkel- und hellgrün: Variable Domänen von schwerer bzw. leichter Kette (V_H , V_L). Rot: Schnittstellen der Proteasen Papain und Pepsin. Die Klammern geben die Einteilung in die Fragmente Fv, Fab und Fc an, sowie die Bindestelle der variablen Region an. Alle in den Proteinketten enthaltenen Disulfidbrücken sind eingezeichnet. Sie verbinden kovalent die vier Ketten des IgG untereinander und stabilisieren die einzelnen Domänen. (Abbildung aus der Homepage der Belmont University, verändert)

1.1.1 Antikörperfragmente

Die strukturelle Gliederung eines Antikörpers in Domänen wird deutlich, wenn man ihn einer gerichteten Proteolyse unterzieht. Die Protease Pepsin spaltet den Antikörper in das F_c -Fragment und das $(Fab)_2$ -Fragment, das beide Bindestellen trägt. Mit Papain erhält man das F_c -Fragment und die zwei Fab-Fragmente in getrennter Form. Die variable Domäne des Fab kann als sogenanntes Fv-Antikörperfragment durch gentechnische Methoden separat hergestellt werden. Beide Fragmente erreichen oft dieselbe Bindungsaffinität wie die einzelne Binde- und Bindungsstelle im ursprünglichen Antikörper.

Ein vom ursprünglichen Antikörper getrennt vorliegendes Fv-Fragment besitzt eine dimere Proteinstruktur, da zwischen den zwei Domänenuntereinheiten V_H und V_L keine kovalente Verbindung besteht. Die für die Antigenbindung notwendige Sequenzvariabilität liegt zwischen den Strängen der strukturegebenden β -Faltblätter in genau lokalisierten Schleifen, den hypervariablen Regionen oder auch komplementaritäts-determinierende Regionen („CDR“). Je drei CDRs liegen in V_L und drei in V_H , wobei ein CDR aus 5 – 10 Aminosäuren besteht. Gemeinsam bilden die CDR-Schleifen das Paratop, die Kontaktstelle zum Antigen. In seiner Nähe enden die beiden N-Termini von V_H und V_L . Die zum Paratop komplementäre Erkennungstelle am Antigen wird Epitop genannt.

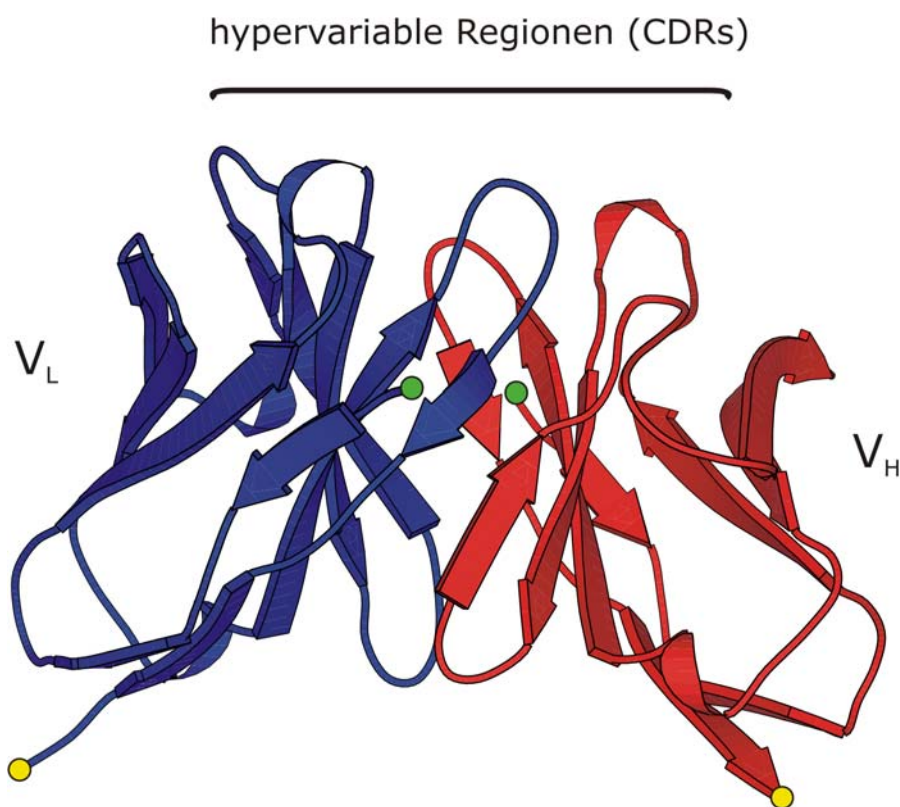


Abb. 1.2: Strukturmodell eines Fv-Antikörperfragmentes. Die beiden Domänenuntereinheiten sind in blau (V_L) und rot (V_H) abgebildet und besitzt jeweils eine Molmasse von etwa 13 – 14 kDa. Die Klammer umfaßt die sechs Schleifen der hypervariablen Regionen. Sie werden auch komplementaritäts-determinierende Regionen (engl. CDR) genannt. Die Kontaktpunkte zum Antigen bilden zusammen das Paratop. Die N-Termini sind grün und die C-Termini gelb markiert (Abbildung nach Daten von Fuchs *et al.*, 1997).

Schwerketten-Antikörperfragmente

Lange Zeit galten die dimer aufgebauten Fv-Antikörperfragmente als die kleinstmöglichen Antigen-Bindungseinheiten eines Antikörpers. Dennoch waren bereits Hinweise auf Antikörper vorhanden, deren Bindung hauptsächlich auf der schweren Kette der variablen Domäne beruht (z. B. Davies *et al.*, 1995). Hamers-Casterman *et al.* entdeckten 1993 eine neue Klasse von IgG-Immunglobulinen in *Camelidae* (Kameltieren), denen die leichten Ketten vollständig fehlen. Das Paratop einer Antigenbindungsstelle wird ausschließlich von der variablen Domäne der schweren Kette gebildet, so daß sie in isolierter Form natürlicherweise monomer ist und somit die kleinste, heute bekannte funktionelle Antigen-Bindungseinheit darstellt. Die Domäne kompensiert das Fehlen von V_L durch eine extreme Verlängerung der CDR3-Schleife und einige hydrophile Aminosäuresubstitutionen auf der normalerweise mit V_L wechselwirkende Seite (Muyldermans *et al.*, 1994).

1995 fanden Greenberg *et al.* eine Antigen-Rezeptorklasse (*new antigen receptor* = NAR), die in den variablen Domänen ebenso nur eine schwere Kette enthält. Sie werden von den innerhalb der Wirbeltiere nicht näher mit den *Camelidae* verwandten *Elasmobranchii* (Haie und Rochen) produziert. Man muß deswegen annehmen, daß in der Evolution die Herstellung von V_H -Ketten ohne V_L -Ketten zumindest ein zweites Mal entwickelt wurde.

1.1.2 Multivalenz natürlicher Immunglobuline

Als Multivalenz eines Antikörpers wird seine Eigenschaft bezeichnet, mit mehreren Bindestellen gleichzeitig mehrere Antigen-Moleküle binden zu können (Plückthun und Pack, 1997), Immunglobuline sind immer mindestens bivalent, dabei aber ausschließlich monospezifisch, d. h. ein monomeres Ig-Molekül kann mindestens zwei, aber immer nur identische Antigenmoleküle binden. Der Sinn der Multivalenz besteht einerseits in der Vernetzung der Antigene andererseits aber auch in der Steigerung der Avidität (resultierende Affinität für den gesamten Antikörper). Der Steigerungseffekt kann nur bei polymeren oder oberflächengebundenen Antigenen erreicht werden, ist aber sehr wahrscheinlich der Grund für die Bildung von oligomeren Immunglobulin-Komplexen im Serum, etwa von IgM und IgA. Die Affinität der Bindestellen beispielsweise von IgM ist nicht sehr hoch, weil es als Immunglobulin der ersten Phase der Immunreaktion noch keiner Reifung unterworfen wird. Dafür bilden die IgM-Moleküle pentamere Komplexe und kompensieren durch die Multivalenz ihre geringere Affinität.

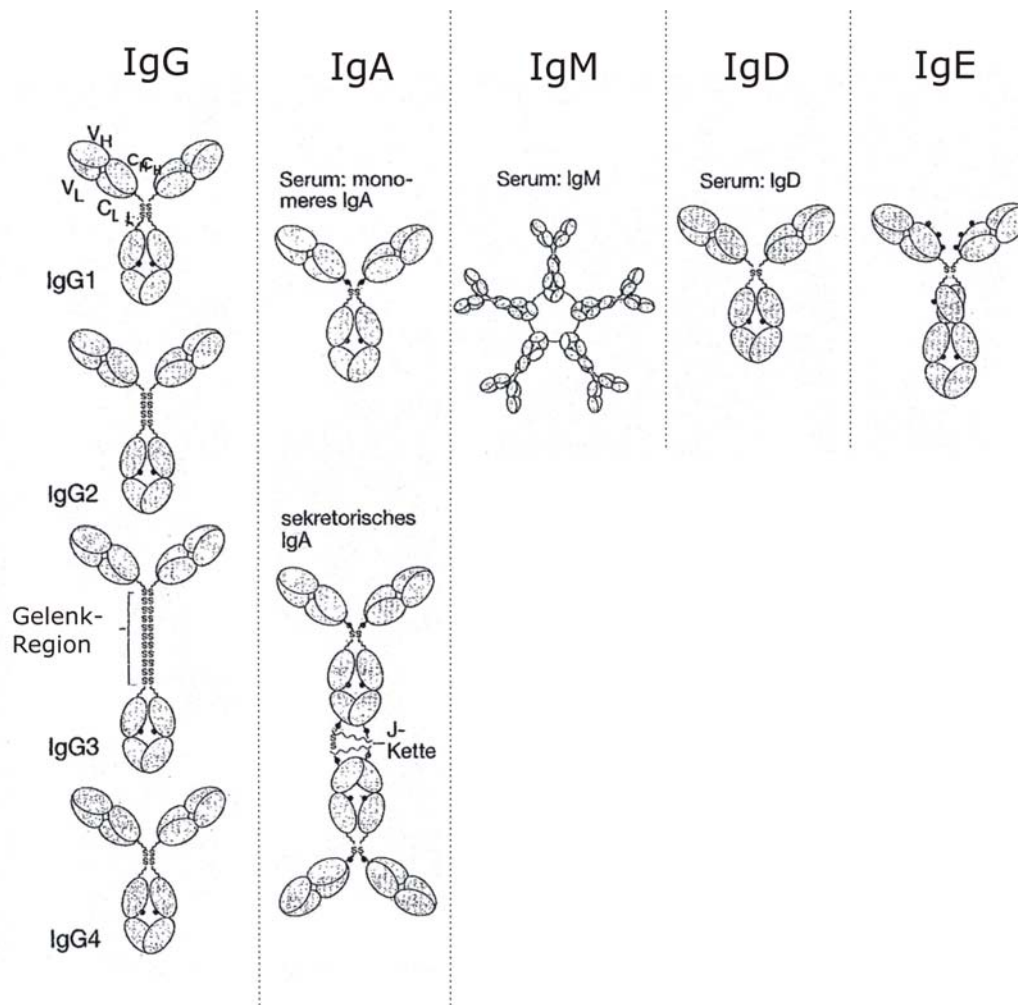


Abb. 1.3: Oligomere Formen von löslichen Immunoglobulinen verschiedener Familien. Die Familien sind angeordnet in Spalten. IgG: vier unterschiedliche monomere Strukturen (IgG1-4). IgA: monomere Form im Serum und eine dimerische Form als Sekret. IgM: pentamere Form im Serum. IgD und IgE: monomere Formen im Serum. Die oligomeren Strukturen werden durch zusätzliche J-Peptidketten zusammengehalten (verändert aus: Burmester und Pezzutto, 1998, S. 27).

1.2 Antikörper-Design

„Antikörper-Design“ ist ein Forschungsgebiet, das die Anpassung und Optimierung von Antikörpern für gezielte Anwendungen anstrebt. Einsatzgebiete liegen in biochemischen Labortechniken sowie besonders in der medizinischen Diagnostik und Therapie. Entscheidend für ihr vielversprechendes Potential ist ihre Fähigkeit, mit hoher Spezifität bestimmte Moleküle erkennen und binden zu können.

Vor etwa hundert Jahren gab es die ersten Versuche, Infektionskrankheiten mit Antisera aus Tier oder auch Mensch zu heilen („Serum-Therapie“), die aber bald aufgrund von Unverträglichkeiten und der Entdeckung von Antibiotika weitgehend aufgegeben wurden. Mit der Entwicklung der „Hybridoma-Technologie“ (Köhler und Milstein, 1975) wuchs das Interesse an den Proteinen der Immunabwehr erneut. Nun konnten monoklonale Antikörper, d. h. identische Antikörper aus einer einzigen B-Zelllinie, in Zellkultur vermehrt und in Reinform isoliert werden. Mit der Entwicklung der Molekularbiologie, die die rekombinante Herstellung und Modifizierung von Proteinen erlaubt, eröffneten sich vielfältige Möglichkeiten (Hayden *et al.*, 1997, Gavilondo und Larrick, 2000, Cluster und Hawkins, 1995).

Die strukturelle Organisation eines Immunglobulins in Domänen erleichtert seine Modifizierung erheblich, da sich so die Funktionen voneinander separieren, neu kombinieren oder auch mit Molekülen anderer Art verbinden lassen. Beispiele für Modifikationen von Antikörpern sind die Optimierung ihrer Bindestellen, die Erhöhung der Stabilität oder die Fusion an Proteine anderer Funktion. Inzwischen ist es sogar möglich, Antikörperfragmente mit neuer Antigen-Spezifität *in vitro* zu generieren (z. B. mit *phage display*). Für medizinische Anwendungen wird auch die humane Immunverträglichkeit von Antikörpern aus Tieren oder von *in vitro* hergestellten Antikörpern erhöht.

Da die Gewebedurchdringung für kleinere Proteine leichter ist, werden in vielen Fällen Fv-Antikörperfragmente gegenüber anderen Antikörperfragmenten vorgezogen, besonders für Entwicklungen mit diagnostischer Anwendung. Auch ist die Produktion von Fv-Antikörperfragmenten in Bakterien einfacher gegenüber größeren Fragmenten. So ist die Anzahl bereits existierender Modifikationen von Fv-Fragmenten in der Literatur groß und wächst beständig.

Die erst seit kurzem bekannten Schwerketten-Antikörperfragmente aus *Camelidae* scheinen wegen ihrer geringen Größe und ihres monomeren Aufbaus grundsätzlich gut für ähnliche Anwendungen im Antikörper-Design geeignet oder teilweise gar vorzuziehen sein. Die Erforschung ihrer Modifizierbarkeit und Einsetzbarkeit wurde bereits in einigen Fällen begonnen und ist vielversprechend.

1.2.1 Oligomerisierung von Antikörperfragmenten

Eines der vielen Ziele des Antikörper-Designs ist es, multivalente und multispezifische Antikörper zu entwickeln. Durch Multivalenz soll meist eine Erhöhung der Avidität medizinisch interessanter Antikörper erreicht werden (s. 1.1.2, S. 6). Die Herstellung multispezifischer Antikörper aber ermöglicht es, auch unterschiedliche Antigenmoleküle miteinander zu verknüpfen, was besonderes Interesse bei der Entwicklung therapeutischer Antikörper findet. Beispielsweise sehen viele Ansätze zur Tumor-Behandlung die Aktivierung von Immunzellen und gleichzeitige Erkennung entarteter Zellen vor, indem ein bispezifischer Antikörper an Rezeptoren beider Zellarten bindet.

Die ersten Ansätze künstliche Multivalenzen oder Multispezifitäten zu generieren, wurden durch Verbinden mehrerer vollständiger Antikörper-Moleküle umgesetzt, beispielsweise durch Verbinden über chemische Substanzen. Die Herstellung bispezifischer Antikörper durch Verschmelzen zweier verschiedener Hybridomazelllinien, sowie die Herstellung bispezifischer (Fab)₂-Fragmente durch chemisches Verbinden wird inzwischen standardmäßig durchgeführt. Mit der Fortentwicklung der molekularbiologischen Methoden können nun aber bereits die kodierenden Genabschnitte miteinander kombiniert werden und Antikörper oder ihre Fragmente durch rekombinante Fusion an andere Proteine oligomerisiert werden.

Einen Überblick über rekombinant hergestellte, multivalente Fv-Fragmente gibt Abb. 1.4., in der neben einigen anderen Möglichkeiten zur Erreichung von Multivalenz (B und C) auch die Oligomerisierung durch Fusion an α -Helixbündel dargestellt (D 3 und 4) ist. Die Methode α -Helixbündel als Oligomerisierungseinheiten zu benutzen, wurde bereits bei vielen Proteinen erfolgreich eingesetzt (Müller *et al.*, 2000). Auf Fv-Fragmente wurde sie als erste von Pack und Plückthun (1992) angewandt, die dafür die Dimerisierungseinheit des Transkriptionsfaktors GCN4 sowie ein dimerisierendes, synthetisches Peptid benutzten. Inzwischen sind weitere Fusionen mit Helix-Bündeln durchgeführt und dabei auch einige tetravalente Fusionsproteine entwickelt worden.

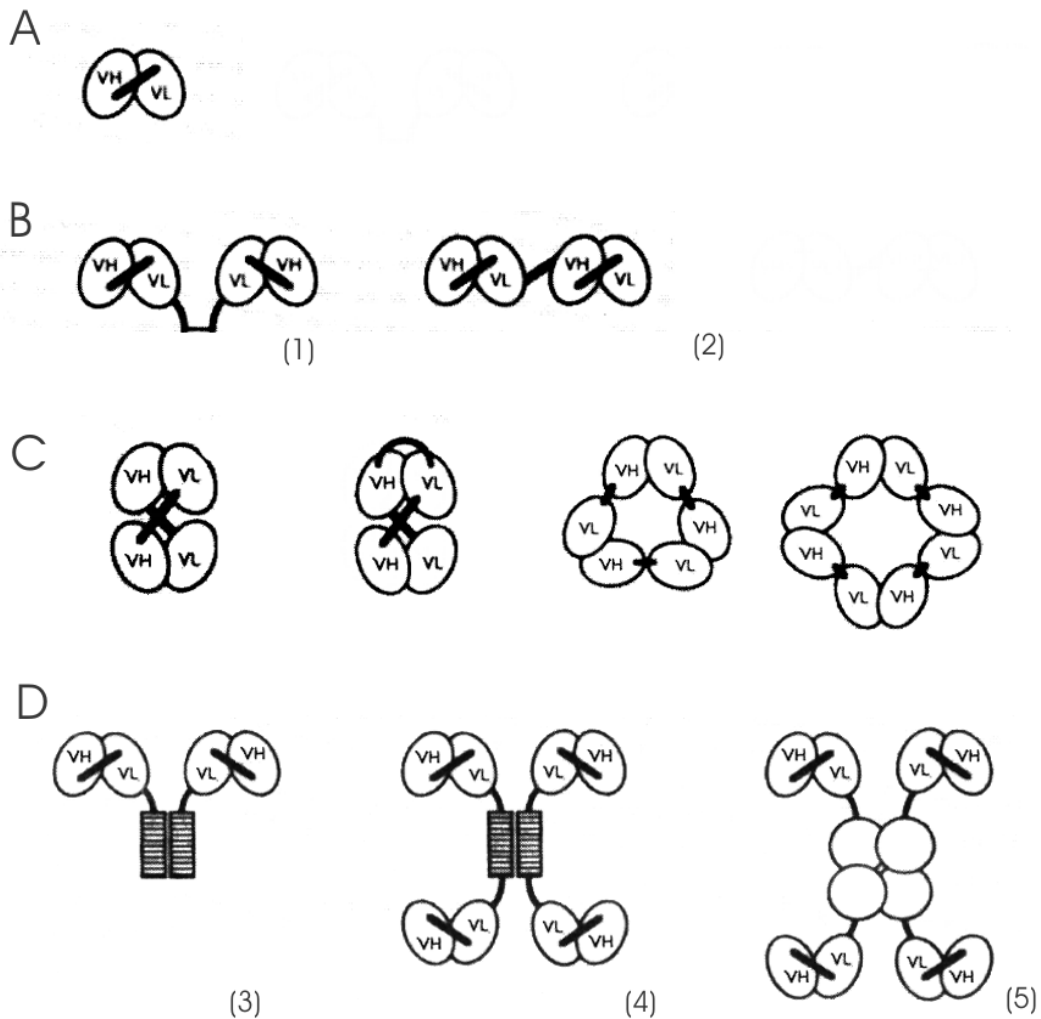


Abb. 1.4: Rekombinant hergestellte, multivalente Fv-Antikörperfragmente (nach Dübel und Kontermann, 2001). Alle gezeigten *Designs* beruhen auf den sogenannten *single-chain* Fvs (*scFv*, (A)), bei denen V_H und V_L durch einen Peptid-*Linker* (schwarzer Balken) fusioniert wurden. B: Bivalente *scFvs*, hergestellt durch Einführen einer Disulfid-Brücke (1) bzw. eines weiteren *Linkers* (2). C: Durch Verkürzen des *Linkers* in *scFvs* entstehen in spontaner Zusammenlagerung bi- bis tetravalente Oligomere (*diabodies*, *triabodies*, ...). D: Multivalente *scFvs* hergestellt durch Fusion an oligomere Proteine wie dimere Helixbündel (D 3 u. 4) oder tetramere, globuläre Proteine wie Streptavidin oder p53.

1.3 α -Helixbündel

Als α -Helixbündel wird ein Oligomer aus sich längs aneinander lagernden α -helikalen Peptidketten bezeichnet, wobei die Laufrichtung der Ketten identisch sein kann (parallel) oder entgegengesetzt (antiparallel). Es gibt homomere Bündel identischer Peptide gleichwie heteromere, in denen unterschiedliche Peptide miteinander interagieren. Bündel in natürlichen Proteinen können 2 bis etwa 8 Helices umfassen und besitzen spezielle Funktionen, wie beispielsweise die Bildung transmembraner Transportkanäle oder die Bindung von Ionen und Kofaktoren. Durchgehend aus Helixbündeln bestehende Proteine bilden stabilisierende, filamentöse Strukturproteine (Keratin, Kollagen) und Bewegung generierende Proteine (Myosine, Kinesine). Für das vorliegende Projekt von Bedeutung ist die Fähigkeit von Helixbündeln als Oligomerisierungseinheit zwischen Untereinheiten eines Proteins zu agieren. Bekannte Beispiele für solche Einheiten sind viele Transkriptionsfaktoren wie die AP-1-Familie (Wisdom *et al.*, 1999), die SNARE-Komplexe (s. 1.4.3) oder das hSP-D (*human lung surfactant protein D*, Hakansson *et al.*, 1999).

Eine Untergruppe bilden die als „*coiled coils*“ bekannten α -Helixbündel, die aus höchstens 4 Helices bestehen. Sie werden durch besonders starke Wechselwirkungen zusammengehalten, wodurch die einzelnen Helices und das gesamte Bündel leicht um ihre Längsachsen gewunden werden. Sie unterliegen damit dem sogenannten „*coiling*“ bzw. „*supercoiling*“ und besitzen in ihrer räumlichen Struktur leicht veränderte geometrische Parameter im Vergleich zu freien α -Helices bzw. locker zusammengehaltenen Bündeln. Im weiteren Text wird die allgemeine Bezeichnung „ α -Helixbündel“ verwendet.

1.3.1 Struktureller Aufbau

Der Aufbau von α -Helixbündeln lässt sich gut in der schematischen Darstellung als *helical wheel*-Diagramm veranschaulichen (Abb. 1.5). Wegen des bei der Proteinen grundsätzlich wirkenden Prinzips, hydrophile Bereiche der wässrigen Umgebung zu nähern und hydrophobe in das Innere zu wenden, sind zur Bildung von Bündeln α -Helices sinnvoll, die auf der einen Längsseite hauptsächlich hydrophobe Aminosäurereste besitzen und auf der anderen hydrophile. Für die einzelne Helix resultiert ein Sequenzmuster aus einem sich wiederholenden Motiv von 7 Aminosäuren, das seit Hodges *et al.* (1972) als „*heptad repeat*“ bezeichnet wird. Bei der Wiederholung des Motivs, dessen Positionen mit a - f nummeriert werden, müssen sich nicht exakt gleiche Aminosäuren wiederholen, sondern an gleicher Position Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften. Notwendigerweise

ergeben sich hydrophobe Aminosäurereste an den Positionen a und d sowie hydrophile in b, c und f, wogegen in e und g alle Arten von Aminosäureresten enthalten sein können. Erstere und letztere Positionen nehmen entscheidenden Einfluß auf die Eigenschaften des Bündels, wie nachfolgend beschrieben wird.

1.3.2 Die strukturebenden Wechselwirkungen

Neben den genannten hydrophoben Wechselwirkungen spielen elektrostatische Kräfte sowie geometrische Gesichtspunkte eine Rolle bei der Festlegung von Oligomerisierungsgrad (Anzahl der interagierenden Helices), Spezifität (Bevorzugung von Heterooligomeren) und Stabilität eines α -Helixbündels. Aus experimentellen Untersuchungen kennt man inzwischen einige direkte Zusammenhänge zwischen den genannten strukturellen Eigenschaften und der Art eines Aminosäurerestes an einer bestimmten Position im *heptad repeat*.

Die Positionen e und g spielen eine wesentliche Rolle bei der Festlegung der Anzahl der α -Helices und deren Orientierung innerhalb des Bündels (Betz *et al.*, 1995). Je mehr hydrophobe Reste sie tragen, um so stärker ist die Tendenz zur Bildung eines höheren Oligomers, da die hydrophobe Kontaktfläche zunimmt. Polare Reste an dieser Position bilden oft ionische Kontakte untereinander und tragen so zur Stabilität bei oder bestimmen die Spezifität. Beispielsweise wird das Heterodimer zwischen den Transkriptionsfaktoren Jun und Fos aufgrund ionischer Wechselwirkungen bevorzugt gebildet und aufgrund elektrostatischer Abstoßungen das Fos/Fos Homodimer vollständig verhindert (O'Shea *et al.*, 1992).

Weiterhin wurde an mehreren Beispielen gezeigt, daß eine durchgehende Besetzung aller Positionen a und d mit Leucinen die Ausbildung eines Dimers verhindert. Man nimmt an, daß ihre Seitenketten in einer dimeren Kontaktstelle keinen Platz finden würden und sich deswegen Trimere bilden. Tauscht man in d die Leucine gegen Isoleucine aus, bilden sich dagegen Tetramere (Harbury *et al.*, 1993, Zhu *et al.*, 1993).

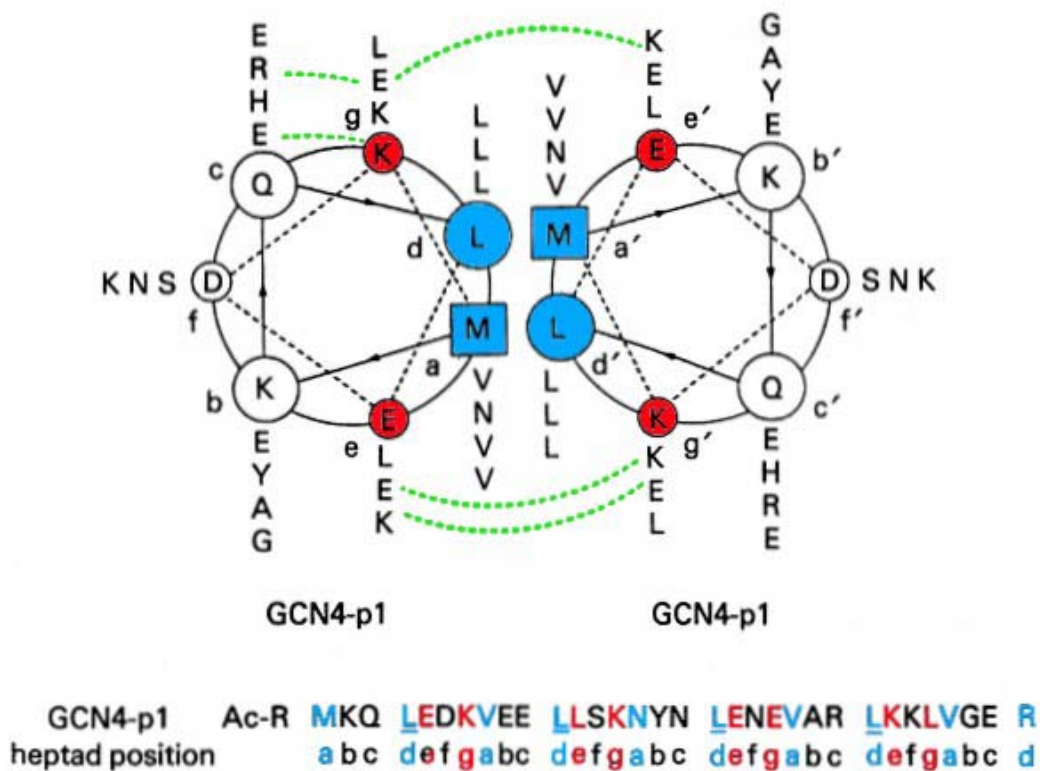


Abb. 1.5: Grundschemata (*helical wheel*-Diagramm) eines homodimeren α -Helixbündels typischen Aufbaus (nach O'Shea *et al.*, 1991). Als Beispiel ist das Peptid GCN4-p1 gezeigt, das die 33 Aminosäuren der Dimerisierungszone des Transkriptionsfaktors GCN4 umfaßt. Die Aminosäuresequenz einer jeden Helix startet N-terminal mit Methionin (M) in Position a bzw. a' und läuft dann im Uhrzeigersinn. An den Positionen a und d befinden sich hydrophobe Aminosäurereste (blau), an b, c und f hydrophile (weiß). e und g können entweder hydrophob, aber auch hydrophil (rot) sein. Sie sind dann oft polar und bilden untereinander ionische Kontakte (grün). Abweichungen vom Grundschemata gibt es besonders in höher oligomerisierenden Peptiden, sowie in bei manchen Bündeln, die in einzelnen Positionen Aminosäuren für speziellen Funktionen besitzen.

1.4 Im vorliegenden Projekt eingesetzte α -Helixbündel

1.4.1 Das Coil-Ser-Peptid

Das Peptid „Coil-Ser“ wurde in einer Reihe verschiedener Untersuchungen zum Studium von helikalen Proteinstrukturen entwickelt. Hodges leitete 1981 aus dem homodimeren, parallelen Tropomyosin des Kaninchens die Sequenz „LEALEGK“ als *heptad repeat* ab und stellte auch an künstlichen Peptiden mit Wiederholungen dieses Motivs Oligomerisierung fest. Basierend auf diesem Motiv entwickelten O'Neil *et al.* (1990) eine ganze Serie von Peptiden, die zur Untersuchung des Einflusses eines bestimmten Aminosäurerestes auf die helikale Faltung des Peptids dienten. Außer der variablen Position X wurden aufgrund struktureller Überlegungen zusätzlich einige räumlich benachbarte Reste eingeführt, sowie ein Tryptophan und ein Histidin für spektroskopische Untersuchungen. Es resultierte die unten angegebene Sequenz „Coil-X“:

	g	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdef
Hodges:	K	LEALEGK	LEALEGK	LEALEGK	LEALEGK	LEALEG
O'Neil („Coil-X“):	E	WEALEKK	LAALE <u>X</u> K	LQALEKK	LEALEHG	

Das im vorliegenden Projekt verwendete Peptid besitzt an Position X ein Serin und wird als „Coil-Ser“ bezeichnet. Da die Positionen a und d durchgehend mit Leucinen besetzt sind, bilden die Peptide laut Theorie Trimere (s. S. 12), was unter anderem in Sedimentations-Gleichgewichtsexperimenten vielfach bestätigt wurde (Lovejoy *et al.*, 1993, Betz *et al.*, 1995). Die Stabilität einiger der Bündel ist sehr hoch; beispielsweise existieren sie auch bei mikromolaren Konzentrationen in bis zu 7 M Harnstoff (O'Neil *et al.*, 1990).

Für das Coil-Ser-Peptid wurde mit Röntgenstrukturanalyse ein dreidimensionales Modell seines trimeren Zustandes erhalten (Abb. 1.6, Lovejoy *et al.*, 1993), in dem einer der drei Helixstränge entgegengesetzt, d. h. antiparallel zu den beiden anderen orientiert ist.

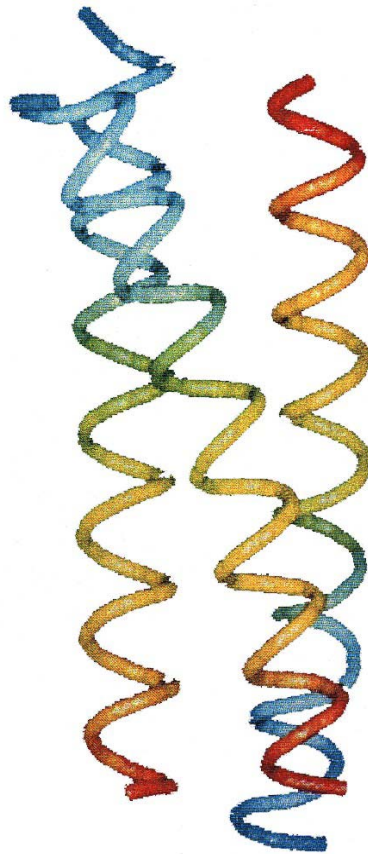


Abb. 1.6: Strukturmodell des homotrimeren, antiparallelen α -Helixbündels aus Coil-Ser-Peptiden. Das Modell wurde mit Röntgen-Kristallographie mit einer Auflösung von 2,5 Å (Lovejoy *et al.*, 1993) erhalten. Der N-Terminus jeder Helix ist rot dargestellt, der C-Terminus blau. Eines der drei Peptide ist antiparallel zu den anderen beiden orientiert, das heißt, die Laufrichtung seines Peptid-Rückgrates ist entgegengesetzt.

1.4.2 Das Jun-Dimer

Jun ist ein Mitglied der AP-1-Familie von Transkriptionsfaktoren, für deren Bindung an die DNA unter anderem die Dimerisierung notwendig ist. Die helikalen Dimerisierungszonen enthalten ein *Leucine Zipper*-Motiv (Landschulz *et al.*, 1988), benannt nach der Bevorzugung von Leucinen in Position d des *heptad repeat*. Im vorliegenden Projekt wurde ein Sequenzbereich aus Jun verwendet, der in Glover *et al.* (1995) als helikale Region angegeben ist. Er besteht aus den 40 Aminosäuren R IARLEEK VKTLKAQ NSELAST ANMLREQ VAQLKQK VMNH und wird im Folgenden mit Jun-Peptid bezeichnet.

1.4.3 Die Oligomerisierungseinheit des SNARE-Komplexes

Eine natürliche Oligomerisierungseinheit aus α -Helices befindet sich in den sogenannten SNARE-Komplexen („Soluble NSF Attachment protein Receptor“, Söllner *et al.*, 1993, Südhof, 1995). Unter diesem Begriff wird eine ganze Superfamilie von etwa 60 Proteinkomplexen zusammengefaßt, die in allen eukaryontischen Zellen in verschiedenen Varianten vorhanden sind und dort die funktionelle Grundlage für Membranfusionen bilden. Die membranständigen oder membrangebundenen Proteine enthalten in ihren löslichen Domänen helicale Bereiche von ca. 60 Aminosäuren, die als Oligomerisierungseinheit des Komplexes fungieren (s. Abb. 1.7). Von den meisten Autoren wird angenommen (Fasshauer *et al.*, 2002, Ferro-Novick und Jahn, 1994), daß durch die Komplexbildung der SNARE-Proteine die Membranen einander angenähert werden und dadurch ihre spontane Verschmelzung ermöglicht wird.

Der am besten charakterisierte SNARE-Komplex ist in Neuronen an der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligt, die Transmitter in den synaptischen Spalt entlassen. Der Komplex wird vom membranständigen Synaptobrevin-II des Vesikels sowie vom membranständigen Syntaxin-1A und membrangebundenen SNAP25 der Neuronenmembran gebildet. Durch limitierte Proteolyse des SNARE-Komplexes mit Trypsin, Chymotrypsin und Proteinase K kann aus dem rekombinant hergestellten SNARE-Komplex ohne Membrananker der *minimal core complex* gewonnen werden, von dem Sutton *et al.* (1998) ein Röntgenkristallographisches Strukturmodell erstellten. Er enthält auch die Oligomerisierungseinheit und ist in seiner hypothetischen Funktion innerhalb des SNARE-Komplexes in Abb. 1.7 dargestellt. Syntaxin-1A und Synaptobrevin-II tragen je mit einer Helix zum Oligomerisierungsbündel bei, SNAP25 mit zweien. Alle Helices laufen in dieselbe Richtung und bilden ein 120 Å langes, heterotetrameres α -Helixbündel, dessen zentraler Bereich in seiner Geometrie einer *Leucine Zipper*-Struktur folgt (s. 1.4.2).

Der *minimal core complex* erweist sich *in vitro* als extrem stabil. Seine Dissoziationsrate wurde zu $4,2 \times 10^{-18} \text{ s}^{-1}$ bestimmt, was eine Halbwertszeit von über eine Milliarden Jahre bedeutet. Seine Schmelztemperatur T_m liegt bei 82 °C und der Komplex bleibt in 2 % SDS erhalten (Fasshauer *et al.*, 2002).

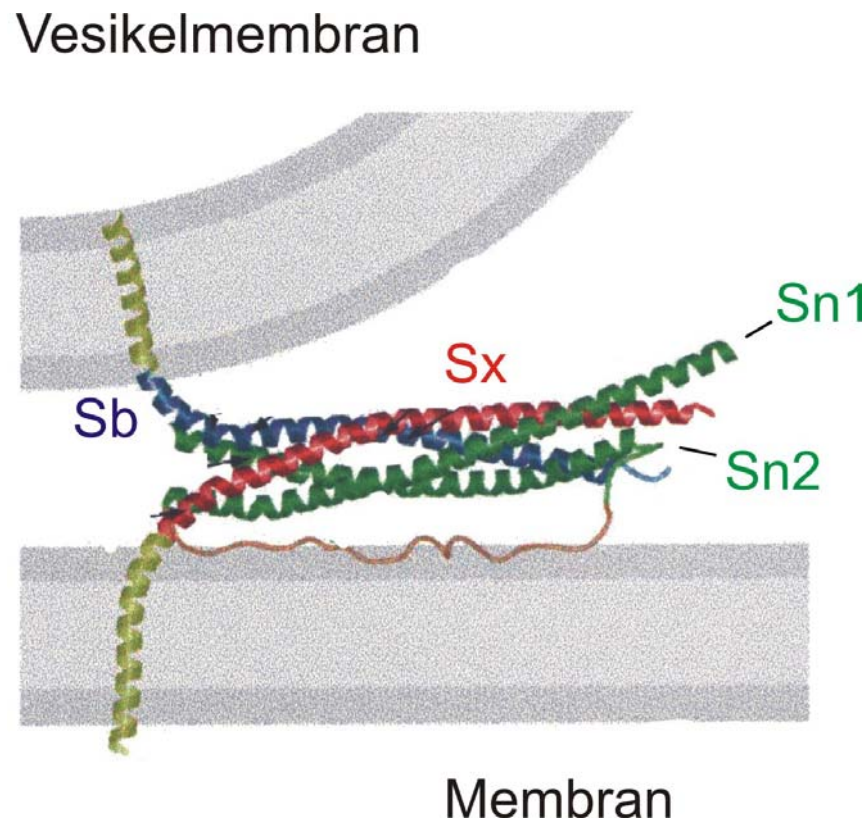


Abb. 1.7: Hypothetische Funktion des neuronalen SNARE-Komplexes aus Ratte. Der Komplex besteht aus Syntaxin-1A, Synaptobrevin-II und SNAP25. Die Proteine komplexieren über etwa 60 Aminosäure lange Bereiche. Syntaxin und Synaptobrevin steuern je eine zur Oligomerisierungseinheit bei (rot bzw. blau). SNAP25 ist mit zwei parallelen Helices beteiligt (grün), die über eine membranengebundene Schleife (orange) miteinander verbunden sind. Die Darstellung beruht auf das durch Röntgen-Kristallographie von Sutton *et al.* (1998) gewonnene Modell des proteolytisch erhaltenen *minimal core complexes*. Die Membranen (grau) und transmembranen Regionen (gelb) sind hypothetisch zugefügt, die N-Termini nicht abgebildet. Es wird angenommen, daß die Komplexbildung der Proteine die Annäherung der beiden Membranen bewirkt und so eine Fusion bewirkt oder ermöglicht. Die Bezeichnung der vier Helices ist dieselbe wie in der vorliegenden Dissertation. (veränderte Abbildung nach Sutton *et al.*, 1998).

1.5 Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* und das gegen sie gerichtete Fv-Antikörperfragment Fv7E2

Die Cytochrom-*c*-Oxidase vom Typ Cytochrom *aa*₃ aus *Paracoccus denitrificans* ist eine der drei terminalen Oxidasen der aeroben Atmungskette des Bodenbakteriums und entspricht in ihrer Funktion und in essentiellen Strukturen Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette (Michel *et al.*, 1998). Das Membranprotein katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser und trägt dabei zur Generierung eines elektrochemischen Potentials von Protonen über die Membran bei. Der Komplex besteht aus den Untereinheiten I, II, III und IV mit den Molmassen von 62,4 kDa, 28,1 kDa, 30,7 kDa und 5,4 kDa (ohne Kofaktoren).

Das Fv-Fragment des monoklonalen Antikörpers 7E2C50S wurde für die Kokristallisation mit der Oxidase entwickelt (Ostermeier, 1995a, Ostermeier *et al.*, 1995b und c) und bindet an einem diskontinuierlichen Epitop der periplasmatischen Seite von Untereinheit II (Ostermeier *et al.*, 1996). Die Kokristallisation ermöglichte die Bestimmung der Raumstruktur der Oxidase mit einer Auflösung von 2,8 Å (Iwata *et al.*, 1995). Eine Auflösung von 2,7 Å wurde mit einer Präparation der Oxidase erreicht, in denen die Untereinheiten III und IV des Enzyms entfernt wurden (Ostermeier *et al.*, 1997). Entscheidende Proteinkontakte zwischen den monomer kristallisierenden Proteinkomplexen werden vom Fv-Fragment ausgebildet und in den Kristallen mit der vollständigen Oxidase sogar alle Kontakte.

Im vorliegenden Projekt wurden unter anderem das Fv-Fragment Fv7E2C50S und sein Antigen-Komplex als Testsystem verwendet. Nachfolgend wird das Fv-Fragment „Fv7E2“ genannt und synonym zur Bezeichnung „*aa*₃ Cytochrom-*c*-Oxidase“ auch „Cytochrom-*c*-Oxidase“ oder „Oxidase“ verwendet.

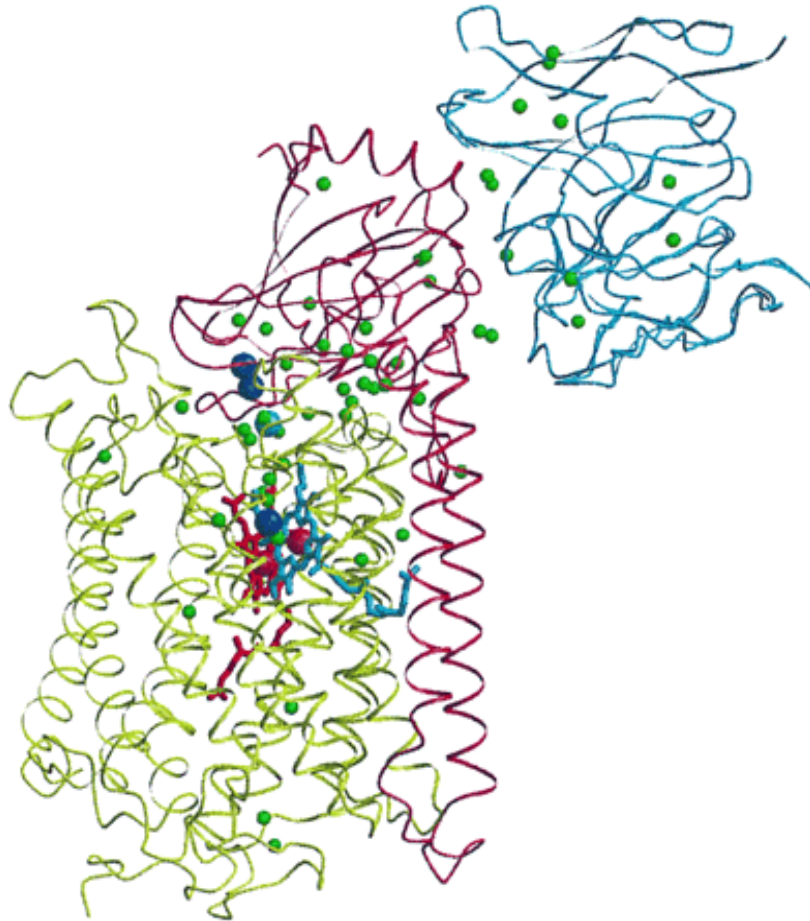


Abb. 1.8: Strukturmodell der Cytochrom-*c*-Oxidase (Untereinheiten I und II) aus *Paracoccus denitrificans* mit gebundenem Fv7E2. Das Modell wurde nach Kokristallisation des Fv7E2 mit der *aa*₃ Cytochrom-*c*-Oxidase durch Röntgen-Kristallographie mit einer Auflösung von 2,7 Å erhalten (Ostermeier *et al.*, 1997). Die Oxidase wurde dafür ohne die Untereinheiten III und IV präpariert. Gelbgrün: Untereinheit I der Oxidase, Dunkelrot: Untereinheit II der Oxidase und in blau: Fv-Antikörperfragment 7E2. Hellrot: Häm *a*, blau: Häm *a*₃, blaue Kugeln: Kupferatome und grüne Kugeln: Wasser.

1.6 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation wird die Bewegung gelöster Partikel oder Moleküle während ihrer Sedimentation oder ihre Konzentrationsverteilung im erreichten Gleichgewicht untersucht. Als Ergebnis erhält man Informationen über die Molekülmassen oder über die Massenverteilung unterschiedlicher Moleküle in einem Gemisch. Da bei der Methode die untersuchten Moleküle keiner Modifizierung unterliegen, lassen sich von Proteinen im nativen Zustand Aussagen über Homogenität, Stöchiometrie, Aggregationen und komplexes Assoziationsverhalten gewinnen. Kennt man die monomere Molmasse eines Proteins, eignet sich die Analyse in der Ultrazentrifuge zur Bestimmung oligomerer Zustände und zählt zu den wenigen etablierten und genauen Methoden zur Untersuchung dieser Fragestellung.

Eine analytische Ultrazentrifuge besitzt neben der Zentrifugationseinrichtung ein optisches System zur Messung von Absorptionsspektren (Abb. 1.9), welches die lichtdurchlässigen Zentrifugengefäße parallel zur Achse des Rotors durchstrahlt und zu jeder Zeit des Laufes Spektren in Abhängigkeit vom Radius aufnehmen kann. Es steht monochromatisches Licht aus einem Wellenlängenbereich von 200 – 800 nm zur Verfügung.

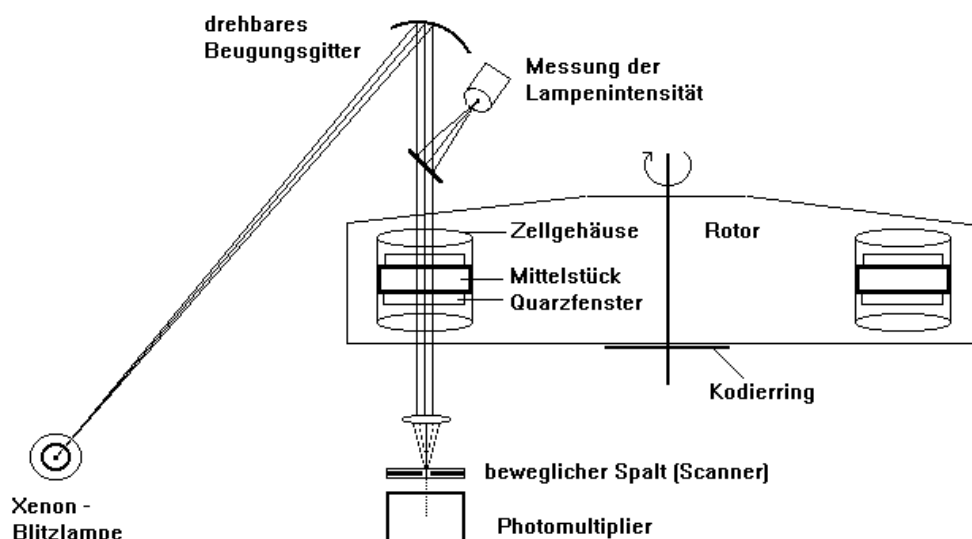


Abb. 1.9: Schema des optischen Systems und Rotors der analytischen Ultrazentrifuge „Optima XL-A“ der Firma Beckman (Tziatzios, 1997).

Sedimentations-Gleichgewichtsläufe

Unter Voraussetzung idealer Bedingungen wirken bei der Zentrifugation ausschließlich die Zentrifugalkraft, Auftriebskraft sowie Reibungskraft auf die Partikel in der Probe ein. Bei Analysen mit den sogenannten Sedimentations-Gleichgewichtsläufen kann die Fragestellung allein auf die Masse und ihre Konzentration in der Probe reduziert werden, indem die Rotorgeschwindigkeit nur so hoch gewählt wird, daß sich nach einer Weile ein *stationäres Gleichgewicht* einstellt. Das Gleichgewicht entsteht dadurch, daß sich die Partikel einerseits angetrieben von der Zentrifugalkraft bewegen und andererseits die sich dabei bildenden Konzentrationsgradienten durch Diffusion wieder abgebaut werden. Ist der stationäre Zustand in der Probe erreicht, hängt die Verteilung der Partikel nur noch von ihrer Masse und ihrem Auftrieb ab.

Die mathematische Beschreibung des Konzentrationsprofils $c(r)$ in Abhängigkeit vom Abstand r vom Rotationszentrum für eine Probe mit nur einer Masse entspricht einer Boltzmann-Verteilung:

$$c(r) = c(r_0) e^{\frac{M(1-\bar{v}\rho)}{2RT} (r^2 - r_0^2) \omega^2}$$

mit	$c(r), c(r_0)$: Konzentration des Partikels an der Stelle r_0 bzw. r
	r_0	: Referenzradius (hier 7 cm)
	ω	: Winkelgeschwindigkeit [s^{-1}]
	ρ	: Lösungsmitteldichte [g/cm^3]
	M, \bar{v}	: Masse [g] bzw. partialspezifisches Volumen [cm^3/g] des Partikels

Der Term $M(1 - \bar{v}\rho)$ ist die effektive Masse des Partikels und wird aus der Differenz seiner absoluten Masse und seiner archimedischen Auftriebsmasse gebildet. Sind Zentrifugationsbedingungen, Lösungsmitteldichte ρ und partialspezifisches Volumen \bar{v} bekannt, kann aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes ($c(r) \sim A_{\text{exp}}(r)$) aus den experimentellen Absorptionsdaten die absolute Masse M des Partikels ermittelt werden. Befindet sich in einer Lösung eine Mischung von Partikeln unterschiedlicher Massen, erhält man aus der Addition der Beiträge der einzelnen Partikel und mit $c(r) \sim A_{\text{exp}}(r)$ die Gesamtverteilung:

$$A_{\text{exp}}(r) = \sum_{k=1}^n A_k(r_0) e^{\frac{M_k(1-\bar{v}_k\rho)}{2RT} (r^2 - r_0^2) \omega^2} \quad (\text{Glg. 1})$$

mit	$A_{\text{exp}}(r_i)$: experimentell gemessene Absorption an der Stelle r_i
	$A_k(r_0)$: Absorptionsbeitrag des Partikels k an der Stelle des Referenzradius r_0

Handelt es sich nur um einige wenige Partikel und sind wenigstens $k - 1$ ihrer Massen bekannt, kann die fehlende Masse und die Konzentrationsanteile aller Massen am Gemisch ermittelt werden.

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe

Bei Sedimentations-Geschwindigkeitsläufen wird die Rotorgeschwindigkeit so hoch gewählt, daß die Partikel am Zentrifugengefäßboden sedimentieren können. Während der Sedimentation der Teilchen wird ihre zeitabhängige Bewegung in der Probenkammer gemessen, die durch die Svedberg-Gleichung beschrieben wird:

$$\frac{\frac{M_k}{N_A} (1 - \bar{v}_k \rho)}{f_k} = \frac{v_k}{\omega^2 r} = s_k \quad (\text{Glg. 2})$$

N_A	: Avogadrozahl	v_k	: Geschwindigkeit des Partikels k [cm/s]
f_k	: Reibungskoeffizient [Einheit g/s]	r	: Abstand vom Rotorzentrum [cm]
s_k	: Sedimentationskoeffizient [Einheit S = 10^{-13} s]		

Aus den Experimenten erhält man den Sedimentationskoeffizienten s_k als eindeutig bestimmbarer Parameter. Die Bewegung des Partikels bzw. s_k ist im Vergleich zur Verteilung im stationären Gleichgewicht außer von der effektiven Masse zusätzlich von der Reibung abhängig, deren Koeffizient f_k in der Regel nicht bekannt ist. Will man mit Geschwindigkeitsläufen die Massen M_k und nicht nur s_k bestimmen, muß gleichzeitig eine Analyse von f_k als zweitem freien Parameter vorgenommen werden. Geschwindigkeitsläufe besitzen gegenüber Gleichgewichtsläufen andere Analysemöglichkeiten, besonders wenn es sich um die Untersuchung von Gemischen mit sehr vielen, unterschiedlich großen Partikeln handelt (Massenverteilung).

1.7 Ziel des vorliegenden Projektes

Die Aufgabenstellung für die vorliegende Dissertation lautete, ein neues Antikörperfragment-Fusionsprotein zu entwickeln, das drei einander gegenüber fixierte, möglichst unterschiedliche Antigene miteinander verbinden kann. Eine vorstellbare Anwendung ist die Verknüpfung von unterschiedlichen Zellen über Strukturen auf ihren Oberflächen, wie sie in vielen Ansätzen bereits getestet wird (s. 1.2, S. 9). Als weitere Anforderungen an das Fusionsprotein wurden gestellt, daß es mit einfachen Methoden in reiner Form und in großen Mengen produzierbar und seine Anpassung an neue Antigene leicht möglich ist.

Die Abbildung veranschaulicht beispielhaft die Forderungen an die räumliche Struktur des Antikörperfragment-Fusionsproteins. Durch in entgegengesetzte Richtungen weisende Bindestellen werden drei einander gegenüberliegende Antigene verbunden.

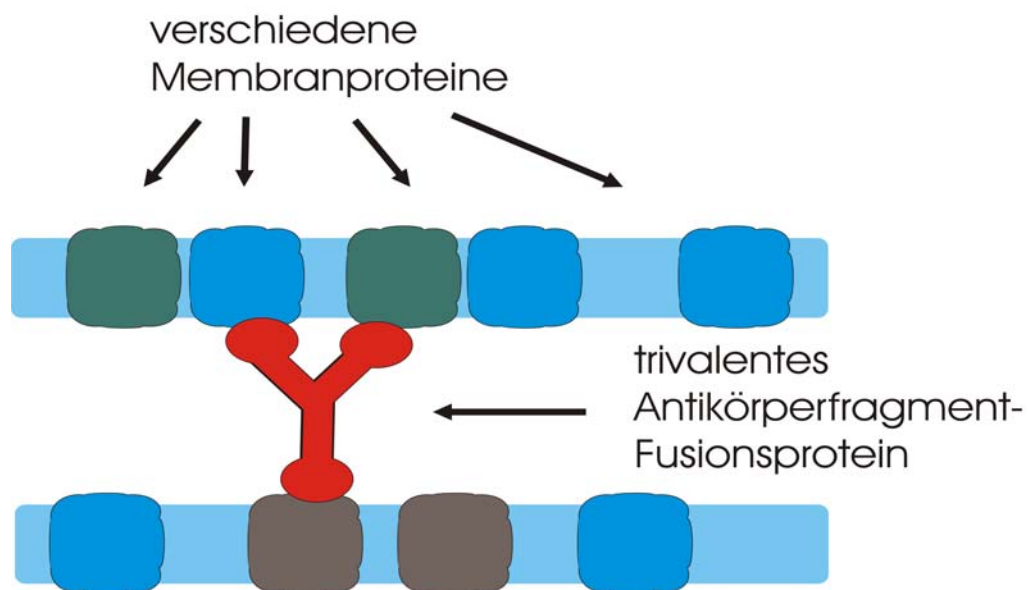


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des im vorliegenden Projekt zu entwickelnden trivalenten Antikörperfragmentes in einer beispielhaften Anwendung. In hellblau sind zwei gegenüberliegende Membranen beispielsweise von zwei benachbarten Zellen abgebildet. In der Membran befinden sich verschiedene Membranproteine. Drei unterschiedliche Membranproteine werden von einem hypothetischen, trivalenten Antikörperfragment-Fusionsprotein (rot) miteinander verbunden und damit ein Kontakt zwischen den beiden Zellen hergestellt.



2 Material

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien für den grundlegenden Laborbedarf wurden mit dem Reinheitsgrad p. A. von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Fluka Chemie AG (CH-Buchs), Gerbu Biotechnik GmbH (Gaiberg), Merck & Co. (Darmstadt), Difco und Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim) bezogen. Darüberhinaus verwendete Substanzen sind nachfolgend aufgelistet.

Aminoethylbenzylsulfonylfluorid (Pefabloc, Proteaseinhibitor)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin (Na-Salz)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Avidin (aus Hühnereiweiß)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto Trypton (für Bakterienkultur)	Difco USA-Kansas City
Bacto Yeast Extract (für Bakterienkultur)	Difco USA-Kansas City
Bromphenolblau	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Chloramphenicol	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM)	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts.
D-Desthiobiotin (DBT)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2 Material

4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid (HABA, für Streptavidin-Affinitäts- chromatographie)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropylthio- β -D-Galactosid (IPTG)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Kanamycin (Sulfat)	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Magermilchpulver „Alevita“	Nestlé, München
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Koch-Light LTD, Haverhill, Suffolk, U.K.
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nitroblautetrazolium, Toluidinsalz (NBT)	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Paraffinöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Pepton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Koch-light LTD, Haverhill, Suffolk, England
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Rotiphorese Gel30	30 %ige Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid (37,5:1) Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sequagel TM Konzentrat	National Diagnostics, USA-Atlanta

Sequagel™ Verdünner	National Diagnostics, USA-Atlanta
Silbernitrat (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Koch-light LTD, Haverhill, Suffolk, England

2.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

In Klammern gesetzte Angaben hinter Stammlösungen in der rechten Spalte beziehen sich auf deren Konzentrationen und nicht auf die Endkonzentration in der Gesamtlösung. Wenn nicht anders vermerkt sind die Prozentangaben „Gewichtsprozent pro Volumen (w/v)“.

Ampicillin-Stammlösung, 1000 ×	100 mg/ml H ₂ O (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)
AP-Färbelösung (für <i>Western Blot</i>)	5 µl BCIP-Lösung 10 µl NBT-Lösung pro ml AP-Puffer
AP-Puffer (für <i>Western Blot</i>)	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Aufschlußpuffer (für Zellaufschluß)	100 – 150 mM Tris/Cl, pH 8 1 mM EDTA
BCIP-Lösung (<i>Western Blot</i>)	50 mg/ml DMF (Lagerung bei -20 °C)
Blotpuffer (für <i>Western Blot</i>)	38 mM Glycin 10 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Chloramphenicol-Stammlösung, 1000 ×	34 mg/ml EtOH (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)

2 Material

Coomassie-Entfärbelösung (für SDS-Gele)	250 ml Methanol 250 ml H ₂ O 50 ml Essigsäure
Coomassie-Färbelösung (für SDS-Gele)	1,25 g Coomassie-Brilliantblau R250 250 ml Methanol 250 ml H ₂ O 50 ml Essigsäure
Dichtekompensationspuffer (für Ultrazentrifugation)	62 mM Phosphat-Puffer, pH 7,45, 150 mM NaCl 0,05 % DDM 95 % D ₂ O 29 % Saccharose
DNA-Auftragspuffer, 10 ×	20 % Ficoll 400 100 mM EDTA pH 8,0 1 % SDS 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25 Xylencyanol
Elutionspuffer (für Streptavidin-Affinitäts- chromatographie)	20 mM Tris/pH 7,4 150 mM NaCl
Entwicklungslösung (für Silberfärbung)	5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ (wasserfrei) 80 µl/100 ml Formaldehyd (37 %)
Fixierlösung (für Silberfärbung)	30 % Ethanol 10 % Essigsäure
Fv-Puffer (für Fv-Fragmente)	20 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
IPTG-Stammlösung	1 M (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)
Kanamycin-Stammlösung, 1000 ×	30 mg/ml H ₂ O (sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C)
Konditionierlösung (für Silberfärbung)	400 mM Natriumacetat, pH 6,0 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd 0,1 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ × H ₂ O 30 % (v/v) Ethanol
Laufpuffer (für SDS-PAGE), 10 ×	0,5 M Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS

2 Material

NBT-Lösung (für <i>Western Blot</i>)	50 mg/ml DMF (70 %) (Lagerung bei -20 °)
Oligodesoxynukleotid-Auftragspuffer	98 % Formamid 2 % 0,5 M EDTA, pH 8,0 0,2% (w/v) Bromphenolblau
Pefabloc (100x)	100 mM in H ₂ O (frisch angesetzt)
Periplasma-Aufschlußpuffer 1	100 mM Tris/Cl pH 8,0 500 mM Saccharose 1 mM EDTA
Periplasma-Aufschlußpuffer 2 (TES-Puffer, Witholt, 1976))	200 mM Tris/Cl pH 8,0 500 mM Saccharose 1 mM EDTA
Ponceau S-Lösung (für <i>Western Blot</i>)	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % (w/v) TCA
Protein-Auftragspuffer, 5 × (für SDS-Gele)	4 ml Glycerin 800 mg DTT 1 g SDS 1 mg Bromphenolblau ad 10 ml mit 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Sammelgelpuffer (für SDS-PAGE), 4 ×	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % SDS
Silberlösung (für Silberfärbung)	0,1 % (w/v) AgNO ₃ 25 µl/100ml Formaldehyd (37 %)
Streptavidin-Säulenpuffer (für Streptavidin-Affinitätschromatographie)	20 mM Tris/pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
TAE-Puffer, 50 × (für Agarosegel-Elektrophorese)	2 M Tris 1 M Essigsäure 50 mM EDTA, Dinatriumsalz
TA-Puffer 50 × (für DNA-Restriktion)	33 mM Tris/HCl, pH 7,9 66 mM K-Acetat 10 mM Mg-Acetat 0,5 mM Dithiothreitol 100 µg/ml BSA

2 Material

TBE-Puffer, 10 × (für Oligodesoxynukleotid-Reinigung)	0,9 M Tris 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA, Dinatriumsalz
TBS-Puffer, (für <i>Western Blot</i>)	50 mM Tris/HCl pH, 7,4 150 mM NaCl
TBST-Puffer, 10 × (für <i>Western Blot</i>)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
TBST/T-Puffer, 10 × (für <i>Western Blot</i>)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 0,2 % Triton X-100
TE-Puffer (für DNA)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, Dinatriumsalz, pH 8,0
Tetracyclin-Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O (sterilfiltriert, bei -20°C gelagert)
Transferpuffer (für <i>Western Blot</i>)	150 mM Glycin 25 mM Tris 10 % MetOH
Trenngelpuffer (für SDS-PAGE), 4 ×	3 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % SDS

2.3 Gele

Agarosegel, X %	X g Agarose (0,8 < X < 2,0) 100 ml TAE-Puffer (1 ×) 10 µl Ethidiumbromid (0,1 %)
Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele: für 6 Trenngele, 18 % (15 %, 10 %)	4,1 (7,1, 12,1) ml H ₂ O 7,5 ml SDS-PAGE-Trenngelpuffer 18 (15, 10) ml Rotiphorese Gel30 10 µl TEMED 200 µl APS (10 %)
für 6 Sammelgele, 5 %	9,4 ml H ₂ O 4,1 ml SDS-PAGE-Sammelgelpuffer 2,6 ml Rotiphorese Gel30 8 µl TEMED 50 µl APS (10 %)

Polyacrylamidgel (für Oligodesonukleotid-Reinigung) 8 % (16 %)	32 (64) ml Sequagel™Konzentrat 58 (26) ml Sequagel™Verdünner 10 ml TBE (10 ×) 1 ml APS (10 %) 40 µl TEMED
--	---

2.4 Proteine und Enzyme

Avidin aus Hühnereiweiß	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
CD28Fc (T-Zell-Rezeptor, lösliche Domäne an IgG-Fc fusioniert)	Cornelia Münke (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt)
aa ₃ -Cytochrom-c-Oxidase	AG Prof. Bernd Ludwig (Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt)
Pfu-DNA-Polymerase (für PCR)	Stratagene GmbH, Heidelberg
Lysozym	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Amersham Biosciences, Freiburg, MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
RNAse A	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
SNARE _{Ratte} -Peptide: Sx _{Ratte} , Sb _{Ratte} , und SNARE-Protein _{Ratte} : SNAP25b _{Ratte}	Dr. Dirk Fasshauer (Max-planck-Institut für biophysikal. Chemie, Göttingen)
Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4-Polynucleotide-Kinase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.5 Antikörper

Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase- Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-Maus-IgG- <i>horseradish</i> -Peroxidase- Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-His Antikörper	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Anti-His Antibody Selector Kit	Qiagen GmbH, Hilden

2.6 Standards und Kits für die Biochemie

DNA-Längenstandard (für Agarosegel): 100 bp- bzw. 1 kb-Leiter	New England BioLabs GmbH, Schwalbach
ECL+Plus Western blotting detection system	Amersham Biosciences AB, SE-Uppsala
Protein Assay (für Proteinkonzentrationsbestimmung)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein-Größenstandards (für SDS-PAGE): Protein Marker – Low Range Prestained Protein Marker - Broad Range	New England BioLabs GmbH, Schwalbach

2.7 Säulenmatrizen und fertige Säulen

Aktivierete CH Sepharose 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Ni-NTA Agarose	Qiagen GmbH, Hilden
Superose 12 PC 3.2/30	Amersham Biosciences, Freiburg
Superose 6 PC 3.2/30	Amersham Biosciences, Freiburg

2.8 Geräte und Sonstiges

ALFexpress-System (für DNA-Sequenzierung)	Amersham Biosciences, Freiburg
Curix 60 (für ECL-Entwicklung v. <i>Western Blots</i>)	AGFA-Gevaert N. V., B-Mortsel
Power Wave X (ELISA-Reader für Proteinbestimmung)	Bio-Tek Kontron Instruments, Inc., USA-Vermont
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf GmbH, Hamburg
Fluoreszenz-Monitor RF 535	Shimadzu
Schüttelinkubator (für Bakterienanzucht)	Infors AG, CH-Bottmingen
Spektralphotometer: Lumineszenz Spektrometer LS50B UV/VIS Spectrometer Lambda 40 LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer	Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt Amersham Biosciences, Freiburg
TB1 Thermoblock	Whatman Biometra, Göttingen
Filterpapier (Whatman Chr 3 MM, 0,34 mm)	Whatman Biometra, Göttingen
Immobilon™, PVDF-Membran, 0,45 µm (für <i>Western-Blot</i>)	Millipore GmbH, Eschborn

2.8.1 Zentrifugen und Rotoren

Analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A (AG Prof. Schubert, Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt)	Beckman Instruments, München
Centrikon T-1065	Kontron Instruments
DMA 02 Paar-Densitometer (AG Prof. Schubert, Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt)	
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg
Labofuge-200	Heraeus Sepatech
Sigma-3K12 und -4K10 Laborzentrifuge	Sigma, Osterode
Sorvall RC5B u. RC3B	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
Rotoren: Ti45, Ti60, Ti70, Ti70.1	Beckmann Instruments, München

2.8.2 Chromatographiestationen

FPLC System	Amersham Biosciences, Freiburg
HiLoad	Amersham Biosciences, Freiburg
Smart System	Amersham Biosciences, Freiburg
Streptavidin-Affinitätschromatographie-Station:	
Control Unit UV-1	Amersham Biosciences, Freiburg
Optical Unit UV-1	Amersham Biosciences, Freiburg
Rec 102 (Schreiber)	Amersham Biosciences, Freiburg
Minipuls2 (Pumpe)	Bimed Gilson

2.8.3 Filter und Konzentrationseinheiten

Centricon 3000 und 10000	Millipore Corporation, USA-Bedford
Centriprep 3000 und 10000	Millipore Corporation, USA-Bedford
Ultrafree-MC Millipore 0,2µm, 0,5 ml	Millipore Corporation, USA-Bedford
Vivaspin 0,5 ml Concentrator 10000 u. 30000	Vivascience, MA-Acton
Zentrifugenfilter Microspin 0,22 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Filtropur S 0,2 µm u. 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht

2.9 Mikrobiologische und molekularbiologische Materialien

2.9.1 Puffer und Medien

RF1-Puffer (für Kompetente Zellen)	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM K-Acetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin vor Zugabe des MnCl ₂ mit Essigsäure auf ca. pH 6,3 eingestellt. Nach Zugabe des MnCl ₂ pH auf Endwert 5,8 eingestellt.
RF2-Puffer (für Kompetente Zellen)	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin mit NaOH pH 6,8 eingestellt
LB-Medium (hitzeesterilisiert), für 1 l:	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl 1 ml 1 M NaOH 15 g Bacto Agar (nur für Festmedium)
TP-Medium (hitzeesterilisiert), für 1 l:	20 g Bacto Trypton 15 g Bacto Yeast Extract 8 g NaCl 1 ml 1 M NaOH 2 g Na ₂ HPO ₄ 1 g KH ₂ PO ₄

2.9.2 Vektoren

Verwendete Vektoren

Bezeichnung in der vorliegenden Dissertation	Referenz oder Erläuterung	Herkunft
pET-26b(+)		<i>Novagen, Inc., USA-Madison</i>
pEGFP-N1		Clontech Laboratories, Inc., CA-Palo Alto
pASK68	Kleymann <i>et al.</i> , 1995	Dr. Gerald Kleymann, MPI für Biophysik, Frankfurt
pASK68Fv7E2	Fv7E2C50S in pASK68, (Ostermeier, 1995a)	Dr. Christian Ostermeier, MPI für Biophysik, Frankfurt
pASK68Fv11H9	Fv11H9 in pASK68	Cornelia Münke, MPI für Biophysik, Frankfurt
pASK68Fv17F8	Fv17F8 in pASK68	w. o.
pASK68cyt ₂	pASK68 ohne die Signalsequenzen <i>phoA</i> bzw. <i>ompA</i>	Dr. Miro Venturi, MPI für Biophysik, Frankfurt
pF44	F44 in pCB (Polej, 2000)	Dr. Stefanie Polej, MPI für Biophysik, Frankfurt
pSx _{Ratte} ET15	Syntaxin-1A aus Ratte (AS 180-262) in pET15b	Dr. Dirk Fasshauer, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen
pSb _{Ratte} ET28	Synaptobrevin II aus Ratte (AS 1 – 96) in pET28a	w. o.
pSn1 _{Ratte} ET15	SNAP25A aus Ratte (AS 1 – 83) in pET15b	w. o.
pSn2 _{Ratte} ET15	SNAP25A aus Ratte (AS 120 – 206) in pET15b	w. o.

Während der Arbeiten für das vorliegende Projekt hergestellte Vektoren

Die Bezeichnungen beginnen jeweils mit dem Namen des Vektors, auf dem das Derivat basiert. Die Vektoren, die für SNARE-Fusionsproteine mit gleichem Fusionspartner kodieren, wurden zusätzlich gruppenweise zusammengefaßt (Klammern) und beispielsweise alle SNARE-Fusionsproteine in Fusion mit F44 gemeinsam als pASK68F44-SNAREs bezeichnet.

pASK68Fv7E2-CS		pASK68F44-Sx	} pASK68F44-SNAREs
pASK68Fv11H9-CS		pASK68F44-Sb	
pASK68Fv17F8-CS		pASK68F44-Sn1	
pASK68Fv7E2-Jun		pASK68F44-Sn2	
pASK68Fv7E2-Sx	} pASK68Fv7E2-SNAREs	pASK68cyt ₁ Sx	} pASK68cyt ₁ -SNAREs
pASK68Fv7E2-Sb		pASK68cyt ₁ Sb	
pASK68Fv7E2-Sn1		pASK68cyt ₁ Sn1	
pASK68Fv7E2-Sn2		pASK68cyt ₁ Sn2	
pASK68Sx	} pASK68-SNAREs	pET26F44-Sn1	
pASK68Sb		pASK68cyt ₂ EGFP-Sn1	
pASK68Sn1		pASK68cyt ₂ F44-Sn1	
pASK68Sn2			
pASK68EGFP-Sx	} pASK68EGFP-SNAREs		
pASK68EGFP-Sb			
pASK68EGFP-Sn1			
pASK68EGFP-Sn2			

2.9.3 Kits

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Kits nach Herstellerangaben verwendet.

Qiagen Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Alfexpress™ AutoRead™ Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

2.9.4 Oligodesoxynukleotide

Die Oligodesoxynukleotide wurden von H. Müller (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand erhalten. Die Sequenzen sind im Anhang (S. 115 - 114) angegeben.

2.9.5 DNA

Human Brain, whole Marathon-Ready™ cDNA Clontech Laboratories, Inc.,
CA-Palo Alto

2.9.6 *Escherichia coli*-Stämme

JM83	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (Str ^r) [Φ80Δ <i>lac</i> Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15</i>]	Yanish-Peron <i>et al.</i> , 1985
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻ gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	<i>Novagen, Inc.</i> , USA-Madison
HM174(DE3)pLysS	F ⁻ <i>RecA hsdR(r_{K12}⁻m_{K12}⁺) Rif^R</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)	<i>Novagen, Inc.</i> , USA-Madison
Origami™	Δ <i>ara-leu7697</i> Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoAPvuII</i> <i>phoR araD139 galE galKrspL F'[lac⁺(lacI^f)pro] gor522 ::Tn10 (Tc^R) trxB::kan</i>	<i>Novagen, Inc.</i> , USA-Madison

3 Methoden

Materialien wie Enzyme oder Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt.

3.1 Mikrobiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen, mit hitzesterilisierten Materialien oder sterilfiltrierten Substanzen durchgeführt. Optische Dichten von Kulturen wurden bei 595 nm gemessen ($OD_{595 \text{ nm}}$, LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer, Amersham Biosciences, Freiburg).

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von *Escherichia coli*

Anzuchten zur Vermehrung wurden in LB-Medium (pro Liter: 10 g Bacto Trypton, 5 g Bacto Yeast, 5 g NaCl, 1 ml 1 M NaOH) mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C unter Schütteln (ca. 190 – 220 rpm) durchgeführt. Dazu wurden sterile, maximal zu 1/5 des Volumens mit Medium befüllte Erlenmeyerkolben mit Vorkultur (max. 1/20 des Gesamtkulturvolumens), mit einer einzelnen Plattenkolonie oder mit einer geringen Menge einer Glycerin-Dauerkultur (s. u.) beimpft.

Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurden 100 µl einer etwa zehnfach verdünnten Kultur auf einer LB-Agarplatte (pro Liter LB-Medium: 15 g Bacto Agar) mit Antibiotikum ausgestrichen, bei 37 °C über Nacht inkubiert und dann bei 4 °C wenige Wochen aufbewahrt. Für langfristige Aufbewahrung wurde 0,3 ml frische Kultur in verschraubbaren Eppendorf-Gefäßen (1,5 ml) mit 0,7 ml 30%igem Glycerin versetzt und sofort bei – 80 °C eingefroren (Glycerin-Dauerkultur).

3.1.2 Ernte von *Escherichia coli*-Kulturen

Zur Ernte von Zellkulturen wurden die Anzuchten 10 – 15 min bei 3000 bis 7000 g und 4 °C zentrifugiert, das Medium verworfen und der Zellschlag bei 4 °C für die jeweilige Anwendung weiterverarbeitet.

3.1.3 Aufschluß von *Escherichia coli*-Zellen

Für einige Fusionsproteine wurden Reinigungen mit Streptavidin-Affinitätschromatographie (3.4.3, S. 48) aus dem kompletten Zellmaterial oder Sphäroblastenmaterial ausgetestet. Für die vollständigen Zellaufschlüsse bzw. Aufschlüsse von Sphäroplastenmaterial von *E. coli*-Zellen wurde das Niederschlag nach der Ernte der Zellen, bzw. nach Abtrennen des Periplasmas mit Ultraschall in einem Aufschlußpuffer wie (100 – 150 mM Tris/Cl pH 8, 1 mM EDTA) aufgeschlossen und der Zelldebris mit erneuter Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde dann wie die Periplasmaaufschlüsse in 3.4.3 behandelt.

Für den Auftrag von Zellaufschluß auf SDS-PAGE wurden entweder wie eben beschrieben vorgegangen oder wenige µl Zellkultur mit Protein-Auftragungspuffer (Stammlösung (5 ×) enthält: 4 ml Glycerin, 800 mg DTT, 1 g SDS, 1 mg Bromphenolblau ad 10 ml mit 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8) und fünffacher Menge Puffer und DNaseI versetzt und der Debris durch Zentrifugation abgetrennt.

3.1.4 Generierung kompetenter Zellen von *Escherichia coli*

Die Kompetenz von *Escherichia coli*-Zellen wurde verändert nach Hanahan (1983) generiert. Dazu wurde eine Kultur von 100 ml ohne Antibiotikum bei OD_{595 nm} von ca. 0,5 auf Eis 10 min inkubiert und dann geerntet. Der Zelleniederschlag wurde vorsichtig in RF1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH5,8) resuspendiert und weitere 15 min auf Eis gehalten. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Niederschlag in 670 µl RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin, pH 6,8) resuspendiert, zu 10 bis 50 µl in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) aliquotiert und sofort bei – 80 °C eingefroren.

3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation von Vektoren in kompetente Zellen wurde leicht verändert nach Hanahan (1983) durchgeführt. Kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, zu je 20 µl aliquotiert und mit 180 µl RF2-Puffer (s. o.) gemischt. Nach Zugabe von Plasmid (ng-Mengen) oder 10 µl Ligationsansatz (s. 3.2.9) wurden die Zellen weitere 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C und 90 s lang durchgeführt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde 90 min bei 37 °C inkubiert und danach die Ansätze auf LB-Platten zur Anzucht ausgestrichen. Transformationsansätze mit Ligationen wurden vor dem Ausstreichen zehnfach konzentriert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Fällung von Nukleinsäure

Zur Reinigung oder Konzentrierung von Vektoren sowie Oligodesoxynukleotiden wurde eine Fällung mit Acetat durchgeführt. Dazu wurden zu je 100 µl Ansatz 50 µl 7,5 M NH₄O-Acetat sowie 3,75 ml – 20 °C kaltes Ethanol zugegeben und mindestens 30 min bei - 20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g wurde der Niederschlag mit 50 µl 75 %igem Ethanol durch mehrfaches Pipettieren gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min wurde der Niederschlag 10 min an der Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge an TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert.

3.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte im Agarosegel in einer Flachbettapparatur bei 60 – 80 V in TAE-Puffer (Stammlösung (50 ×) enthält: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA). Für kleine Fragmente (< 200 bp) wurde ein 2 %iges-Gel (s. 2.3) gegossen, für größere Fragmente (> 4000 bp) bis zu 0,8 %ige. Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer (Stammlösung (10 ×) enthält 20 % Ficoll 400, 100 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 Xylencyanol) versetzt und als Größenstandard eine 100 bp- oder 1 kb-Leiter aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente im Gel auf einem Durchlichttisch mit 254 nm oder 365 nm zur Fluoreszenz angeregt, um sie sichtbar zu machen. Die lange Wellenlänge wurde gewählt, um die Fragmente nicht zu stark zu schädigen, wenn sie anschließend weiterverarbeitet wurden,.

3.2.3 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide mit mehr als 40 Basen wurden nach der Synthese einer Reinigung im Polyacrylamidgel unterzogen. Dazu wurde ein 8 bzw. 16 %iges (für Oligodesoxynukleotide mit 60 - 90 Basen bzw. 40 – 50 Basen) Gel der Größe 20 cm × 40 cm mit einer Dicke von 1,5 mm gegossen. Die Hälfte eines lyophilisierten Syntheseansatzes von 0,2 µmol wurde mit 40 µl Oligodesoxynukleotid-Auftragspuffer (98 % Formamid, 2 % 0,5 M EDTA, pH 8,0, 0,2% (w/v) Bromphenolblau) und 40 µl Wasser resuspendiert, 5 min auf 95 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Je 20 µl der Lösung wurden in eine Geltasche (sechs pro Gel) pipettiert. Das Gel wurde bei 40 W drei bis vier Stunden elektrophoriert bis die Front des Bromphenolblau die Gesamtlänge durchlaufen hatte. Anschließend wurde es zusammen mit einer durchsichtigen Küchenfolie auf eine DC-Fluorescein-Indikator-Platte gelegt und unter

Licht der Wellenlänge 254 nm die Oligodeoxynukleotide als absorbierende, dunkle Flecken sichtbar gemacht. Das entsprechende Gelstück wurde ausgeschnitten und zur Zerkleinerung durch eine Einwegspritze (1 ml) gedrückt, deren Öffnung zuvor zugeschmolzen und mit vielen kleinen Löchern perforiert worden war. Die Gelbruchstücke wurden dann über Nacht in 2 ml TE-Puffer bei 37 °C geschüttelt. Nach Abtrennen der Feststoffe mit Hilfe einer Filtrationseinheit (0,2 µm, 2 ml) eine Nukleinsäure-Fällung durchgeführt. Der gewonnene Nukleinsäure-Niederschlag der 60 – 90 Basen langen Oligodesoxynukleotide wurde in 50, die kürzeren in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

3.2.4 Gensynthese

Die DNA-Fragmente zur Kodierung des Coil-Ser-Peptids, das Jun-Peptids sowie des *Linkers* Lnk1 wurden mit „Gensynthese“ hergestellt und dabei nach Guillemette *et al.* (1991) vorgegangen. Dazu wurden Oligodesoxy-nukleotide entworfen, die aneinandergereiht und komplementär assoziiert, den gewünschten DNA-Abschnitt ergeben, wobei auf ein Überlappen komplementärer Enden um wenigstens 20 Basen geachtet wurde. Je 100 pmol aller Oligodesoxynukleotide außer den beiden, die die 5'-Enden des synthetischen DNA-Fragmentes bilden, wurden zusammen gegeben und in einem 50 µl-Ansatz mit 10 U T4-Polynucleotide-Kinase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) sowie 0,5 µl 100 mM ATP in Kinase-Puffer (MBI Fermentas GmbH) phosphoryliert. Nach Zugabe der beiden restlichen Oligodesoxynukleotide wurde der Ansatz sofort für 3 min auf 90 °C in einem TB1 Thermoblock (Whatman Biometra, Göttingen) erhitzt, um die Nukleinsäuren zu denaturieren und die Kinase zu inaktivieren. Zur Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide wurde der Ansatz über einen Zeitraum von 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt, was durch Herausnehmen des Blockkerns aus dem Thermoblock geschah. 10 µl des Ansatzes wurden ligiert und das generierte DNA-Fragment in einem neuen Ansatz in einen geschnittenen Vektor ligiert (s. 3.2.9). Die Coil-Ser- und Jun-DNA-Fragmente wurden zuvor nach Hitzeinaktivierung (60 °C, 10 min) der Ligase mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Xho*I geschnitten und mit dem PCR-Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Produktion von Plasmid-DNA (*low copy*) wurde der entsprechend transformierte *Escherichia coli*-Stamm in einer Kultur von 10 ml in einem Erlenmeyerkolben (50 ml) angezogen und nach Ernte der Zellen die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) isoliert.

3.2.6 Amplifizierung von DNA mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein Reaktionsansatz (10 – 50 μ l) enthält:

0,4 μ M pro Oligodesoxynukleotid

1,5 mM MgCl₂

0,1 mM dNTPs

ca. 250 pg DNA

1 \times *Pfu*-Puffer (Stratagene GmbH, Heidelberg)

Jeder Ansatz wurde mit Paraffinöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) überschichtet, um der Verdunstung vorzubeugen.

Eine Reaktion wurde in Zyklen wie folgt durchgeführt:

1 \times Denaturierung: 94 °C, 5min *

25 – 30 \times Denaturierung: 94 °C, 30 s, *Annealing*: T_x °C 30 s, Synthese: 72 °C

1 \times Synthese: 72 °C

Gegen Ende des ersten Denaturierungsschrittes (*) wurde 0,05 U/ μ l *Pfu*-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) zugegeben. Die Temperatur T_x wurde den verschiedenen Oligodesoxynukleotiden hauptsächlich nach deren Länge angepaßt. Die Ansätze wurden nach der Reaktion mit dem PCR-Purification-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt.

3.2.7 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA (Plasmide, PCR-Fragmente und synthetische DNA-Fragmente) wurde mit Restriktionsendonukleasen der angegebenen Hersteller durchgeführt. Die Enzyme wurden in bis zur doppelten der empfohlenen Mengen und in selbst hergestelltem TA-Puffer (33 mM Tris/HCl, pH 7,9, 66 mM K-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 0,5 mM Dithiothreitol, 100 μ g/ml BSA) eingesetzt.

3.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um aus einem PCR-Ansatz oder einem Restriktionsansatz von Plasmid-DNA das gewünschte DNA-Fragmente abzutrennen, wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, anhand der Größenauftrennung im Gel das erwünschte Fragment identifiziert und das entsprechende Gelstück ausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) wurde anschließend die DNA aus dem Gelstück isoliert.

3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Generell wurden nach Restriktion von etwa je 2 – 5 µg Vektor und/oder PCR-Produkt die gewünschten Fragmente aus einem Agarosegel isoliert und das spätere Vektor-Fragment in einem 50 µl Ansatz desphosphoryliert. Der synthetisch hergestellte *Linker* Lnk1 wurde direkt in pASK68Fv7E2 ligiert, die synthetisch hergestellten Coil-Ser- und Jun-Fragmente erst geschnitten und gereinigt. Für die Ligation wurden zuerst die DNA-Fragmente zusammen gegeben, dann 2 min bei 50 °C erhitzt und anschließend mit T4-DNA-Ligase in Ansätzen von 20 µl über Nacht bei 16 °C ligiert.

3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von Elisabeth Uloth (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) mit dem System ALFexpress und dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle Sequencing Kit oder AlfexpressTM AutoReadTM Sequencing Kit (alles Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt.

3.3 Allgemeine biochemische Methoden

Zum Schutz gegen Proteolyse während der Reinigung wurden sämtliche Proben in allen Schritten auf 4 °C und in EDTA sowie Pefabloc als Proteaseinhibitoren gehalten.

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) genutzt. Dazu wurden Gele (15 oder 18 %) der Gesamtgröße 8 cm × 8 cm sowie der Dicke von 0,75 mm gegossen und bei 4 °C feucht aufbewahrt. Die Proteinproben wurden mit Protein-Auftragspuffer (Stammlösung (5 ×) enthielt je 10 ml: 4 ml Glycerin, 800 mg DTT, 1 g SDS, 1 mg Bromphenolblau ad 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8) versetzt, je nach Zusammensetzung einige Minuten auf 95 °C erhitzt und mit einem Volumen von bis zu 20 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Laufstrecke im Sammelgel betrug etwa 1 cm, die Trennstrecke 6 cm. Beide Kammern der Vertikal-Elektrophoreseapparatur (Eigenbau des MPI für Biophysik) wurden mit SDS-PAGE-Laufpuffer (Stammlösung (5 ×) enthielt 0,5 M Tris, 1,9 M Glycin, 1 % SDS) gefüllt, die Auftrennung bei einem Stromfluß von 20 bis 25 mA pro Gel durchgeführt und bei Erreichen der gewünschten Laufstrecke beendet. Anschließend wurden die Gele sofort gefärbt, fixiert oder in einem *Western Blot* (3.3.4) weiterverarbeitet.

3.3.2 Coomassie-Färbung von Gelen aus der SDS-PAGE

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung (1,25 g Coomassie-Brilliantblau R250, 250 ml Methanol, 250 ml H₂O, 50 ml Essigsäure) unter Schwenken für mindestens 30 min inkubiert und anschließend in Coomassie-Entfärbelösung (250 ml Methanol, 250 ml H₂O, 50 ml Essigsäure) entfärbt bis der Hintergrund weitgehend von Coomassie befreit war. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf ein Filterpapier unter Küchenfolie getrocknet und in ein Bildverarbeitungsprogramm eingelesen. 18 %ige Gele werden im Folgenden beispielsweise mit SDS-PAGE (18 %, Coomassie) bezeichnet.

3.3.3 Silberfärbung von Gelen aus der SDS-PAGE

Nach SDS-PAGE wurde das Gel für mindestens 15 min in Fixierlösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) gelegt und dann in Konditionierlösung (400 mM Natriumacetat, pH 6,0, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd, 0,1 % (w/v) Na₂S₂O₃ × H₂O, 30 % (v/v) Ethanol) überführt. Nach 15 min wurde 4 bis 5 mal in reichlich H₂O_{MP} für jeweils einige Minuten gewaschen und das Gel in Silberlösung (0,1 % (w/v) AgNO₃, 25 µl/100ml 37 %iges Formaldehyd) gelegt. Nach ca. 45 min wurde das Gel zweimal wenige Sekunden in H₂O gewaschen und in Entwicklungslösung (5 % (w/v) Na₂CO₃, 80 µl/100 ml 37 %iges Formaldehyd) gegeben. Die Entwicklung wurde mit 50 mM EDTA gestoppt, wenn die Proteinbanden ausreichend gefärbt waren. 18 %ige Gele werden im Folgenden mit SDS-PAGE (18 %, Silber) bezeichnet. Zur Aufbewahrung siehe 3.3.2.

3.3.4 *Western Blot*

Die Proteine wurden für immunologische Nachweise nach der Halbtrocken-Methode (Towbin, 1979) auf eine PVDF-Membran (ImmobilonTM, 0,45 µm, Millipore GmbH, Eschborn) transferiert. Nach der SDS-PAGE wurde die mit Methanol benetzte Membran, das Gel und Filterpapiere gleicher Größe in Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris, 10 % MetOH) getränkt. In eine horizontale Blot-Apparatur (Eigenbau, MPI für Biophysik) wurden erst drei der Filterpapiere gelegt, darüber das SDS-Gel, die Membran und wieder drei Papiere. Der Transfer wurde mit 1,5 mA pro cm² Membran durchgeführt und nach etwa einer Stunde beendet. Der Transfer wurde anhand des Transfers eines vorgefärbten Protein-Größenstandard oder, wenn dieser nicht verfügbar war, durch eine Ponceau S-Färbung kontrolliert. Dazu wurde die Membran einige Minuten in Ponceau S-Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA) gelegt und dann mit H₂O gewaschen bis nur noch Proteinbanden

Farbe trugen. Banden der Protein-Größenstandards wurden mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet. Ponceau S-Farbe wurde vor der Weiterbehandlung weitgehend gewaschen.

Immunologischer Nachweis mit AntiHis-Antikörpern (Vorgehensweise nach QIAGEN):

Nach dem Proteintransfer (3.3.4) wurde die Membran mit folgenden Schritten behandelt:

1. zur Entwicklung mit enzymkatalysierter Farbreaktion:

TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH, 7,4, 150 mM NaCl) mit 3 % BSA, über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei RT

2 × waschen mit TBST/T (TBS-Puffer mit 0,05 % Tween 20 und 0,2 % Triton X-100),
10 min

1 × waschen mit TBST (TBS-Puffer mit 0,05 % Tween), 10 min

Inkubation in Anti-His-Antikörper (1:1000) in TBS-Puffer mit 3 % BSA, 1 Stunde

2 × waschen mit TBST/T, 10 min

1 × waschen mit TBST, 10 min

Inkubation mit Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma-Aldrich
Chemie GmbH, Deisenhofen, 1:1000) in TBS-Puffer mit 3 % BSA, 1 Stunde

3 × waschen mit TBST/T

3 × waschen mit AP-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)

Inkubation in AP-Färbelösung (5 µl BCIP-Lösung, 10 µl NBT-Lösung, pro ml AP-Puffer, BCIP-Lösung enthielt 50 mg/ml DMF und NBT-Lösung 50 mg/ml 70 %igem DMF)

Die Entwicklung wurde mit 50 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt, die Membran getrocknet und in Aluminiumfolie lichtgeschützt aufbewahrt.

2. zur Entwicklung mit enzymkatalysierter Lumineszenzreaktion:

wie unter 1.) aber in allen Schritten TBS-Puffer mit 5 % Milchpulver als Grundlage und Anti-Maus-IgG-*horseradish*-Peroxidase-Konjugat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) statt Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, sowie zusätzlich 1 mM EDTA ab der Reaktion mit dem Konjugat.

Nach dem Abwaschen des Konjugats wurde die Entwicklung genau nach Anleitung des ECL+Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt und im Curix 60 (AGFA-Gevaert N. V., B-Mortsel) entwickelt.

Immunologischer Nachweis mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat:

Die wie in (3.3.4) beschrieben geblottete Membran wurde mit folgenden Schritten behandelt. Für die Puffer siehe vorigen Abschnitt.

Inkubation in TBST-Puffer mit 3 % BSA und Avidin (2 µg/ml), ü. Nacht bei 4 °C oder
2 Stunden bei RT

3 × waschen mit TBST, 10 min

Inkubation in TBST mit Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (2 µl/ml) und
Avidin, 1 Stunde

3 × waschen mit TBST

3 × waschen mit AP-Puffer

Inkubation in AP-Färbelösung

Die Entwicklung wurde mit 50 mM EDTA (pH 8,0) gestoppt, die Membran getrocknet und in Aluminiumfolie lichtgeschützt aufbewahrt.

3.3.5 Aufbewahrung der Proteine

Die Fv-Antikörperfragmente wurden für längere Lagerung mit 0,03 % NaN₃ versetzt und bei 4 °C aufbewahrt. Die aa₃ Cytochrom-*c*-Oxidase, FHP und CD28Fc (s. 2.4, S. 31) wurden in Aliquots bei - 20°C eingefroren.

3.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen fand im Allgemeinen mit „Protein Assay“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Anleitung des Herstellers statt. Für die aa₃ Cytochrom-*c*-Oxidase von *Paracoccus denitrificans* wurde ihre spezifische Absorption bei 425 nm gemessen und die Konzentration über ihren spezifischen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{425\text{ nm}} = 158\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Kannt und Michel, 2001) ermittelt.

3.4 Präparation der Fv-Antikörperfragmente

3.4.1 Herstellung von Streptavidin-Säulenmaterial

Nach Schmidt *et al.* (1994) wurde *core*-Streptavidin hergestellt und das rückgefaltete *core*-Streptavidin an Sepharose (activated Sepharose[®] 4B oder NHS-activated Sepharose[®] 4 Fastflow, Amersham Biosciences, Freiburg) den Angaben des Herstellers folgend gekoppelt.

3.4.2 Produktion der Fv-Fragmente und Präparation des Periplasmas

Für die Produktion der Fv-Antikörperfragmente wurde eine Vorkultur von *Escherichia coli* JM83 mit dem entsprechenden Expressionsplasmid in LB-Medium und 50 mg/l Ampicillin (Ampicillin-Stammlösung, 1:1000) über etwa 15 Stunden bei 30 °C und 190 upm angezogen. 1 liter Hauptkultur desselben Mediums wurde mit 25 ml Vorkultur angeimpft und bei 22.5 °C und 200 upm inkubiert. Die Produktion großer Mengen fand in Erlenmeyerkolben (5 l) mit je 2 l Medium statt. Für kleinere Testproduktionen (meist 50 ml) wurden alle Volumina entsprechend verringert. Bei Erreichen einer OD_{595 nm} von etwa 0,5 wurde die Produktion mit 0,5 mM IPTG (1 M IPTG-Stammlösung oder frisch) gestartet. Nach drei Stunden weiterer Inkubation wurden die Kulturen zur Ernte für 15 min bei 5000 g zentrifugiert. Die Ernte und alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Für die Präparation des Periplasmas wurde entweder der Zellniederschlag mit 10 ml Periplasmaaufschlußpuffer 1 (100 mM Tris/Cl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) für 1 l Kultur resuspendiert und Pefabloc (240 µg pro ml Aufschluß) zugegeben, 30 min auf Eis inkubiert, nochmals zentrifugiert (23000 g, 30 min) und der Überstand eingefroren (Periplasma). Oder der Periplasmaaufschluß erfolgte nach Witholt (1976). Dabei wird statt Periplasmaaufschlußpuffer 1 10 ml Periplasmaaufschlußpuffer 2 (200 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 M Saccharose, 0,5 mM EDTA) zur Resuspension des Niederschlags verwendet und vor der Inkubation außer Pefabloc Lysozym (60 µg pro ml Aufschluß) zugegeben, 20 ml Wasser eingerührt (osmotischer Schock) und erst dann für 30 min auf Eis inkubiert. Vor der Zentrifugation (23000 g, 30 min) wird zur Stabilisierung der Sphäroplasten 20 mM MgCl₂ zugegeben und der Überstand (Periplasmaaufschluß) ebenso bei -20 °C aufbewahrt.

3.4.3 Streptavidin-Affinitätsreinigung der Fv-Antikörperfragmente

Die Fv-Antikörperfragmente wurden mit Streptavidin-Affinitätschromatographie aus dem Periplasmaaufschluß (3.4.2) gereinigt und alle Schritte bei 4 °C durchgeführt. Der Periplasmaaufschluß wurde langsam unter Rühren aufgetaut und DNaseI (20 µg/ml), Pefabloc (240 µg/ml) und Avidin (50 µg/ml) zugesetzt. Avidin fällt das im Aufschluß vorhandene Biotin aus, was sonst die Bindestellen des *core*-Streptavidins irreversibel blockieren würde. Nach 30 min Inkubation wurde das Präzipitat durch Zentrifugation bei 5000 g abgetrennt und der Überstand gefiltert (0,2 µm). Die Streptavidin-Säule wurde mit Streptavidin-Säulenpuffer (20 mM Tris/Cl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) equilibriert und die Probe mit 0,5 – 0,7 ml/min aufgetragen. Große Probenvolumen (20 – 200 ml) wurden auf eine Säule von etwa 15 ml Volumen gegeben, kleine Proben (5 – 20 ml) auf eine Säule mit etwa 1,5 ml Volumen. Anschließend wurde mit dem genannten Puffer gewaschen bis kein Protein mehr im Durchlauf nachweisbar war (etwa 2 Säulenvolumen) und anschließend leicht bindende Kontaminationen mit dem Elutionsmittel D-Desthiobiotin (DTB, Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg) in niedriger Konzentration (etwa 0,075 mM) in Elutionspuffer (20 mM Tris/pH 7,4, 150 mM NaCl) entfernt. Die Elution erfolgte mit 2,5 mM DTB in Elutionspuffer. Für die analytischen Ultrazentrifugationsläufe von Fv7E2-CS wurden die Waschzeiten stark verlängert. Die Elution wurde weitgehend von DTB befreit, in dem mit Elutionspuffer verdünnt wurde und in Konzentratoren (Centriprep 10 kD cutoff, Amicon) auf Volumina von ca. 0,2 - 0,5 ml eingeengt wurde.

Die Säule wurde nach der Reinigung mit einigen Säulenvolumen KH₂PO₄ (50 mM, pH 4,6) oder 1 mM HABA (4-Hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) regeneriert und dann in Streptavidin-Säulenpuffer bei 4 °C kurzzeitig gelagert.

Die angegebenen Puffer sind die zum Ende des Projektes und besonders für Fv7E2-CS verwendeten Standardbedingungen. Sie wurden oft, hauptsächlich für die übrigen Fv-Fragmente, variiert, um eventuell bessere Bedingungen zu finden oder an nachfolgende Experimente anzupassen.

3.5 Mischungen von Fv7E2-CS bzw. Fv7E2 mit Cytochrom-c-Oxidase

Zur Bindung der Fv-Fragmente Fv7E2-CS bzw. Fv7E2 an ihr Antigen, die Cytochrom-c-Oxidase, wurde das jeweilige Fv-Fragment mit der Oxidase in 20 mM Tris/Cl pH 7,4, 150 mM NaCl und 0,05 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) gemischt und wenigstens 15 min auf Eis inkubiert. Das Detergenz DDM ist wegen des Membranproteins nötig.

3.6 Gelfiltration (Größenausschluß-Chromatographie)

Die Gelfiltration wurde zur Qualitätskontrolle der Proteinproben, für Bindungsexperimente und als Größenausschlußchromatographie zur vorläufigen Ermittlung von Molmassen bei Oligomerisierungsexperimenten eingesetzt, sowie zur Vorbereitung auf die analytische Ultrazentrifugation (s. 3.7.1). Sie wurde mit den Gelfiltrationssäulen Superose 6 PC 3.2/30, Superose 12 PC 3.2/30 und dem SmartTM Chromatographiesystem (alles Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Die Säulen wurden vor dem ersten Lauf eines Versuchstages mit dem entsprechenden Laufpuffer (2 Volumina) equilibriert. Alle Laufpuffer enthielten mindestens 150 mM NaCl, um ionische Wechselwirkungen der aufgetragenen Proteine mit dem Säulenmaterial zu verhindern. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit einer Filtrationseinheit (Ultrafree-MC Millipore 0,2 μ m, 0,5 ml, Millipore Corporation, USA-Bedford oder Zentrifugenfilter Microspin 0,22 μ m, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) bei 4 °C gefiltert. Wenn nicht anders vermerkt, fanden die Läufe bei 6 °C statt. Über die Absorption bei bis zu drei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig wurden die Elutionsprofile aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden Abständen von 50 μ l gesammelt. Die Retentionsvolumina waren bis auf etwa \pm 0,03 ml reproduzierbar.

Tab. 3.1: Standardtabellen für Größenausschlußchromatographie. A) Retentionsvolumina löslicher Proteine auf Superose 12 (Bettvolumen 2,5 ml) B) Retentionsvolumina solubilisierter Membranproteine auf Superose 6 (Bettvolumen 2,5 ml) in Detergenz sowie löslicher Proteine (gekennzeichnet mit*) für den kleinen Molmassenbereich. Die Tabellen wurden für eine erste Einordnung der Molmassen von Proteinen genutzt, besonders um oligomere Zustände erkennen zu können.

A) Superose 12, lösliche Proteine

Elutionsvolumen [ml]	Interpolierte Molmasse [kD]
1,24	124
1,25	116
1,26	109
1,27	103
1,28	97
1,29	91
1,30	86
1,31	81
1,32	76
1,33	71
1,34	67
1,35	63
1,36	60
..	..
1,45	34
1,46	32
1,47	30
1,48	29
1,49	27
1,50	25
1,51	24
1,52	22

B) Superose 6, solubilierte Membranproteine und lösliche Proteine*

Elutionsvolumen [ml]	Interpolierte Molmasse [kD]	lösliche Proteine
1,24	736	
1,25	694	
1,26	655	
1,27	618	
1,28	584	
1,29	551	
1,30	520	
1,31	491	
1,32	463	
1,33	437	
1,34	413	
..	..	
1,45	219	
1,46	206	
1,47	195	
1,48	184	
1,49	174	
1,50	164	
1,51	155	
1,52	138	
..
1,68	58	89*
1,69	55	83*
1,70	52	76*
1,71	49	72*
1,72	46	68*

3.7 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation fand in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schubert (Institut f. Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) statt. Die Experimente wurden von Dr. C. Tziatzios (w. o.) in einer Optima XL-A (Beckman Instruments, CA-Palo Alto) bei 4 °C durchgeführt. Untersucht wurden die oligomeren Zustände von Fv7E2-CS sowie seines Komplexes mit der *aa₃* Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* (Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase oder Fv7E2-CS/Oxidase). Als Kontrollen dienten das unmodifizierte Fv-Fragment Fv7E2, die Cytochrom-*c*-Oxidase und der Komplex aus beiden (Fv7E2/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex).

3.7.1 Präparation der Proben

Mit den für die analytische Ultrazentrifugation vorgesehenen Proteinproben wurde zunächst eine Gelfiltration (s. 3.6, S. 49) zur Filtrierung der Proben als auch zur Abtrennung von überschüssigem Protein (s. u.) durchgeführt. Die Gelfiltrationen für die Fv-Fragmente fanden auf der Superose 12 in Gegenwart von 150 mM NaCl, 20 mM Tris/Cl, pH 7,4 statt und die Gelfiltrationen für Proben mit dem Membranprotein Cytochrom-*c*-Oxidase auf der Superose 6 und mit zusätzlich 0,05 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) im genannten Puffer.

Für die Untersuchung des Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes wurde eine Mischung aus Fv7E2-CS und Oxidase hergestellt, die im Elutionsprofil der Gelfiltration eine leichte Schulter an ungebundener Oxidase zeigte (Abb. 3.1). Dieses Vorgehen sollte alle Bindestellen eines eventuell oligomeren Fv-Fragmentes absättigen. In der mit Ultrazentrifugation untersuchten Fraktion kann deswegen ein geringer Überschuß an Oxidase nicht ausgeschlossen werden. Für die Kontrollprobe mit dem Fv7E2/Oxidase-Komplex wurde dagegen ein Überschuß an Fv-Fragment in der für die Gelfiltration hergestellten Mischung gewählt, um alle vorhandene Oxidase zu binden. Die Trennung der Maxima von Komplex und freiem Fv-Fragment in der Gelfiltration ist hier eindeutig (nicht gezeigt), so daß überschüssige Fv-Fragmente im Komplexmaximum nicht zu erwarten sind.

Aus dem Zentrum der erhaltenen Elutionsmaxima wurden einzelne Fraktionen für die Analyse ausgewählt. Sie umfaßten 50 μ l und wurden auf optische Dichten von 0,3 – 0,5 bei der jeweils in der Ultrazentrifugation für die Analyse benutzten Wellenlänge mit Puffer verdünnt (OD_{230 nm} bzw. OD_{280 nm}). Die Probenvolumina in einer Analysezelle waren 130 μ l für Sedimentations-Gleichgewichtsläufe bzw. 200 μ l für Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe.

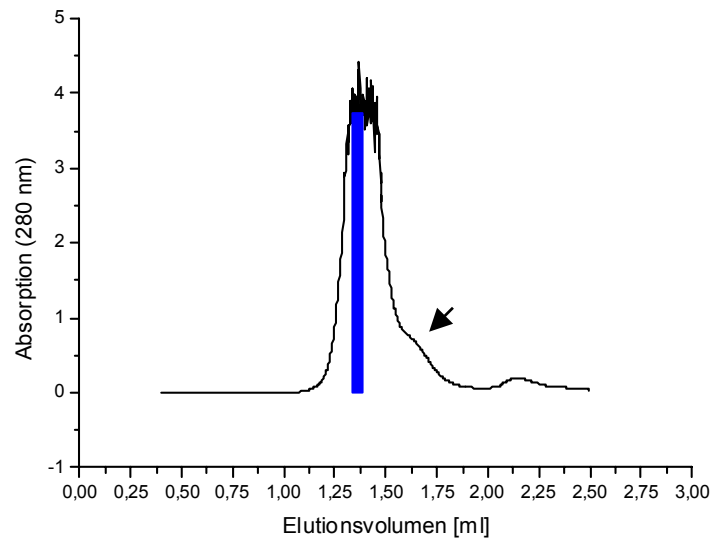


Abb. 3.1: Elutionsprofil einer präparativen Gelfiltration von einer Mischung von Fv7E2-CS mit aa_3 Cytochrom-*c*-Oxidase für die analytische Ultrazentrifugation. Auf die Superose 6 wurde eine Mischung von Fv7E2-CS mit Cytochrom-*c*-Oxidase mit einer Gesamtmenge an Protein von etwa 0,55 mg aufgetragen. Die von ungebundener Oxidase produzierte Schulter ist mit einem Pfeil markiert. Das zweite kleine Maximum ist ein in diesem Bereich oft auftretendes Artefakt. Eine für die Ultrazentrifugationsanalyse ausgewählte Fraktion (50 μ l) ist als blauer Balken eingetragen. Die Unregelmäßigkeit des Absorptionsprofils im Maximum ist darauf zurückzuführen, daß die Nachweisgrenze des optischen Systems nahezu erreicht wurde. Die Ladekapazität der Säule (0,5 – 3 mg) wurde dennoch nicht überschritten.

3.7.2 Dichtekompensation des Detergenz

Für die Ultrazentrifugationsexperimente mit Oxidase wurde eine sogenannte „Dichtekompensation des Detergenz“ (*density matching*) durchgeführt (Mayer *et al.*, 1999, Kleinekofort *et al.*, 1992). Dies ist nötig, wenn die Dichte der Detergenzmizellen verschieden ist von der sie umgebenden Lösungsmitteldichte. Für die Kompensation überführt man den Protein/Detergenz-Komplex in ein Lösungsmittel, das dieselbe Dichte wie das Detergenz in diesem Lösungsmittel besitzt. Ohne die Kompensation würde die Detergenzhülle um das Membranprotein bei der Analyse einen Beitrag zur Masse des Proteins liefern. Die Zusammensetzung des Dichtekompensationspuffers (62 mM Phosphat-Puffer, pH 7,45, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) DDM, 95 % (v/v) D_2O , 29 % (w/v) Saccharose) für die Kompensation des hier verwendeten Detergenz *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) wurde aus Mayer *et al.* (2002) entnommen. Die Proben wurden vor der Zentrifugation über Nacht gegen den Puffer dialysiert.

3.7.3 Optimierung der Zentrifugationsbedingungen

Die Optimierung der Bedingungen für die Ultrazentrifugationsläufe betrifft im Wesentlichen die Rotorgeschwindigkeit, die für ein optimales Auflösungsvermögen an die interessierende Partikelmasse angepaßt werden muß. Für kleinere Massen sind höhere Geschwindigkeiten zur Sedimentationsbewegung notwendig als für größere. Sind die Massendifferenzen unterschiedlicher Partikel in einem Gemisch sehr groß, muß je nach Fragestellung entschieden werden, ob eine mittlere Geschwindigkeit ausreicht oder auf einen bestimmten Massenbereich fokussiert werden soll. Interessiert man sich für größtmögliche Genauigkeit in allen Massenbereichen, müssen mehrere Messungen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durchgeführt werden. In der vorliegenden Dissertation wurde wegen der Fragestellung immer eine für die trimeren Massen optimale Geschwindigkeit gesucht und dann auch auf die Kontrollen angewandt. Deswegen sind besonders bei den sehr unterschiedlich großen Komponenten der Proben des Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes die monomeren und dimeren Massenbereiche nicht gut aufgelöst. Das heißt, die statistische Signifikanz sowohl der Massen als auch des Konzentrationsanteils von Komponenten dieses Massenbereiches sind nicht gut genug für eindeutige Aussagen.

Da wegen der Optimierung die verschiedenen Datensätze für eine Probe mit unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten gewonnen wurden, können von in der Analyse ermittelten Konzentrationsanteilen der einzelnen Komponenten in den Proben keine Durchschnittswerte errechnet werden. Stattdessen werden die wahrscheinlichsten Anteile sowie die statistisch möglichen Anteile angegeben.

3.7.4 Datenanalyse

Die Analyse der einzelnen Datensätze wurde von Dr. C. Tziatzios vorgenommen. Für die Berechnungen wurden vorab folgende Informationen benötigt:

Das partialspezifische Volumen \bar{v} (= Volumen/Masse = $1/\rho$) wurde aus der jeweiligen Aminosäurezusammensetzung nach Durchschlag (1986) und Durchschlag *et al.* (1994) errechnet. Dabei gilt bei 4 °C in Wasser:

$$\bar{v}(4\text{ °C}) = \frac{\sum \bar{v}_{\text{Aminosäure}_i} M_{\text{Aminosäure}_i}}{\sum M_{\text{Aminosäure}_i}} - 21 \frac{\Delta \bar{v}}{\Delta T} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$\text{mit: } \frac{\Delta \bar{v}}{\Delta T} = 5 \times 10^{-4} \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$$

Weiterhin wurde der Einfluß des im Dichtekompensationspuffer vorhandenen D₂O bzgl. Masse und partialspezifischem Volumen des Proteins berücksichtigt. Am Protein locker gebundene H-Atome können mit Deuteriumatomen aus dem Puffer austauschen. Nach Edelstein und Schachmann (1966) besitzt dadurch ein wasserlösliches Protein in 100 % D₂O eine 1,0155-fache Masse im Vergleich zum selben Protein in Wasser. Die Molmassen der monomeren Proteine ergeben sich dann aus den Aminosäurezusammensetzungen wie folgt:

$$\text{Fv-Fragment Fv7E2-CS: } 30070 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1,0155 = 30536 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

*aa*₃ Cytochrom-*c*-Oxidase, einschließlich Kofaktoren und Metallzentren:

$$128500 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1,0155 = 130492 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex:

$$30536 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 130492 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 161028 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

Die Volumenänderung des Proteins durch eingetauschte Deuteriumatome ist vernachlässigbar gering. Für das partialspezifische Volumen ergibt sich deswegen bei 95 % D₂O:

$$\bar{v}(4^\circ\text{C}, 95\% \text{ D}_2\text{O}) = \frac{V_{\text{Protein}}}{M_{\text{Protein in D}_2\text{O}}} = \frac{V_{\text{Protein}}}{1,0147 M_{\text{Protein in H}_2\text{O}}} = \frac{\bar{v}(4^\circ\text{C}, \text{H}_2\text{O})}{1,0147}$$

Folgende Werte wurden in den Analysen verwendet (für 4 °C und 95 % D₂O):

$$\text{Fv-Fragment 7E2-CS, errechnet: } \bar{v}_{\text{Fv7E2-CS}} = (0,7081 \pm 0,0106) \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$$

$$\text{Fv-Fragment 7E2, in Näherung: } \bar{v}_{\text{Fv7E2}} \approx \bar{v}_{\text{Fv7E2-CS}}$$

Der Wert für die Cytochrom-*c*-Oxidase wurde Mayer *et al.* (2002) entnommen, wo er unter den selben Bedingungen experimentell bestimmt wurde: $\bar{v}_{\text{Oxidase}} = (0,7820 \pm 0,0040) \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$

Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex nach Glg. 3:

$$\bar{V}_{\text{Komplex}} = \bar{V}_{\text{Oxidase}} \times \frac{130,492 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{161,028 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} + \bar{V}_{\text{Fv7E2-CS}} \times \frac{30,536 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{161,028 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = (0,7680 \pm 0,0038) \frac{\text{cm}^3}{\text{g}}$$

Fv-Puffer (20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl), mit dem Programm *Sednterp* für 4 °C errechnet:

$$\rho_{\text{Fv-Puffer}} = (1,0062 \pm 0,0151) \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Dichtekompensationspuffer (62 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) DDM, 95 % (v/v) D₂O, 29 % (w/v) Saccharose), von Dr. C. Tzatzios experimentell mit einem DMA 02 Paar-Densitometer bei 4 °C bestimmt:

$$\rho_{\text{DDM-Komp}} = (1,2065 \pm 0,0060) \frac{\text{g}}{\text{ml}}$$

Sedimentations-Gleichgewichtsläufe

Die experimentellen Absorptionsdaten der Gleichgewichtsläufe wurden mit dem Programm *Discreeq* (Schuck, 1994) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate analysiert. Dabei werden Daten von homogenen Proben an Modelle mit einer einzigen Masse angepaßt, oder Daten von Gemischen mit Partikeln unterschiedlicher Massen an Modelle mit mehreren Massenkomponenten. Die Molmasse kann in einem Modell immer nur für eine einzige Massenkomponente, für die sogenannte „freie“ Masse, errechnet werden. Bei der Datenanalyse von Gemischen aus mehreren Partikeln müssen für die weiteren Massen feste Werte als Annahmen vorgegeben werden („feste“ Massen). Für die Bestimmung oligomerer Zustände eines Proteins gibt man als Werte die Vielfachen seiner monomeren Molmasse vor. Wenn die Hintergrundabsorption („Basis“) hoch war, wurde sie bei der Analyse wie eine weitere, nicht sedimentierende Partikelmasse von 1 kDa einbezogen.

Bei der Auswertung der Gleichgewichtsläufe werden zwei verschiedene Kriterien für die Güte der Anpassung berücksichtigt:

a) Die Residuen-Darstellung

Die Residuen $\Delta A(r)$ sind die Differenzen zwischen errechneten Daten $A_{\text{fit}}(r)$ und gemessenen Daten $A_{\text{exp}}(r)$. Für eine gute Anpassung sollen sie sehr klein sein und keine systematischen Abweichungen von der Nulllinie $\Delta A(r) = 0$ aufweisen.

b) χ^2 (Standardisierte Fehlerquadratsumme S):

Die Fehlerquadratsumme S ist die Summe der quadrierten Differenzen zwischen angepaßten Datenpunkten $A_{\text{fit}}(r_i)$ und experimentellen Datenpunkten $A_{\text{exp}}(r_i)$.

$$S = \sum_{i=1}^N [A_{\text{exp}}(r_i) - A_{\text{fit}}(r_i)]^2 \quad \text{mit Gl. 1 (S. 21)}$$

Um die Anpassungen unterschiedlicher Datensätze miteinander vergleichen zu können, wird S auf die Anzahl der Datenpunkte sowie die Standardabweichung σ_i eines Datenpunktes i bezogen und damit ergibt sich χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{S}{N\sigma_i^2} = \frac{S}{N\bar{\sigma}^2} = \sum_{i=1}^N \frac{[A_{\text{exp}}(r_i) - A_{\text{fit}}(r_i)]^2}{N\bar{\sigma}^2} \quad (\text{Standardisierung})$$

Wobei für σ_i ein mittlerer Wert $\bar{\sigma}$ für alle N Datenpunkte angenommen wird.

Für die Anpassung eines Datensatz wird nach einem Minimum von χ^2 gesucht (χ^2_{min} = „reduziertes χ^2 “). Denn je größer χ^2 , um so größer sind die Residuen und damit schlechter die Anpassung bzw. um so unwahrscheinlicher das Modell. Für akzeptable Modelle sollte χ^2_{min} nicht viel größer als Null sein ($\chi^2_{\text{min}} \ll 1$). Ein Modell mit einem $\chi^2_{\text{min}} > \text{ca. } 10\%$ als χ^2_{min} eines anderen Modelles wird als unwahrscheinlich ausgeschlossen.

Für ein akzeptiertes Modell läßt sich an der Parabeldarstellung der Werte χ^2 in Abhängigkeit von der Konzentration c der einzelnen Komponenten die Signifikanz ihrer Konzentrationsanteile veranschaulichen. Bei Variation eines Parameters innerhalb des akzeptierten Modells wird eine Vergrößerung von χ^2 um 3 % zugelassen, womit eine Aussage über die Signifikanz des Parameterwertes erhalten wird. Je enger der Minimalbereich für eine Komponente definiert ist, also je weniger sich c variieren läßt, ohne daß $\chi^2(c)$ auf $\chi^2_{\min} + 3\%$ ansteigt, um so signifikanter ist der Konzentrationsanteil der Komponente in der Probe. Ist sein Minimum sehr flach, ist der Konzentrationsanteil der Komponente am Gemisch nicht gut definiert. Ist aber beispielsweise $\chi^2(c \approx 0)$ für eine Komponente deutlich größer $\chi^2_{\min} + 3\%$, dann wird angenommen, daß der Partikel im Gemisch vorhanden ist.

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe

Sind die zwei Eigenschaften Masse und Reibung eines Partikels k unbekannt, hängen in Gl. 2 (S. 22) die aus Geschwindigkeitsläufen ermittelbaren Werte S_k bzw. v_k von den zwei freien Parametern M_k und f_k ab, die hier nicht unabhängig von einander errechnet werden können. Analysen dieser Werte sind möglich über numerische Lösungen der Lamm'schen Differentialgleichung, die mit dem Programm *Sedfit* (Schuck, 2000 und Schuck *et al.* 2002) ebenso nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate erhalten werden. Die Konzentration $c_k(r,t)$ eines Partikels k am Ort r zur Zeit t steht dabei wieder mit den experimentellen Absorptionwerten in einfacher Beziehung:

$$\frac{\partial A_{\text{exp } k}(r,t)}{\partial t} \equiv \frac{\partial c_k(r,t)}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[\left(D_k \frac{\partial c_k(r,t)}{\partial r} - s_k \omega^2 r c_k(r,t) \right) r \right]$$

mit r : Abstand vom Rotationszentrum
 $c_k(r,t)$: Konzentration der Komponente k im Abstand r bei der Zeit t
 D_k : Diffusionskoeffizient der Komponente k
 s_k : Sedimentationskoeffizient der Komponente k
 ω : Winkelgeschwindigkeit des Rotors

Im Diffusionskoeffizienten D_k ist der Reibungskoeffizient f_k enthalten:

$$D_k = \frac{KT}{f_k} \quad (\text{Einstein-Relation}) \quad \text{mit } K = \text{Boltzmann-Konstante}$$

In die Berechnungen geht jedoch nicht direkt der Reibungskoeffizienten f_k eines Partikels ein, sondern das Reibungskoeffizientenverhältnis f_k/f_{Kugel} . Dabei wird für den Partikel in Näherung eine ellipsoide Form angenommen und ins Verhältnis zum Reibungskoeffizienten f_{Kugel} einer Kugel gleicher Masse und gleichem partialspezifischen Volumen gesetzt. Für globuläre Proteine hat man für f_k/f_{Kugel} Werte bis 1,1. Als weitere Näherung wird bei einem Gemisch von verschiedenen Partikeln ein durchschnittliches \bar{f} für alle Partikel angenommen.

In den für das Projekt untersuchten Proben wurden Proteine mit eher weniger globulärer Form erwartet und mit $\bar{f}/f_{Kugel} = 1,1$ durchgeführten Auswertungen ergaben keine verwertbaren Ergebnisse. Deshalb wurde aus den Daten der Geschwindigkeitsläufe die Minima von χ^2 unter Variation von \bar{f}/f_{Kugel} gesucht und dazu mit dem Programm eine Serie von Auswertungen mit verschiedenen \bar{f}/f_{Kugel} getestet. Das Paar aus Masse und \bar{f}/f_{Kugel} mit dem kleinsten χ^2 innerhalb dieser Serie wurde als das wahrscheinlichste angenommen.

Die Geschwindigkeitsläufe wurden zur Untersuchung des Einflusses des Detergenz DDM auf Fv7E2-CS und Fv7E2 durchgeführt, sowie zur zusätzlichen Kontrolle der aus den Gleichgewichtsläufen erhaltenen Masse von Fv7E2-CS.

4 Ergebnisse

4.1 Strategie für die Konstruktion einer Oligomerisierungseinheit

Für die beschriebene Aufgabenstellung des vorliegenden Projektes wurde auf die bereits von einigen Autoren erprobte Strategie zurückgegriffen, α -Helixbündel als Oligomerisierungseinheiten mit molekularbiologischen Methoden an Fv-Antikörperfragmente zu fusionieren (s. 1.2, S. 9). Zusätzlich sollte die Eignung von Schwereketten-Antikörperfragmenten innerhalb dieser Strategie getestet werden. Der Aufbau der hergestellten Fusionsproteine, die Auswahl ihrer Bestandteile sowie die Auswahl der Expressions- und Reinigungssysteme wird in den nächsten Kapiteln beschrieben.

4.1.1 Die Fusionspartner der α -Helixbündel

Als einer der Fusionspartner diente das Fv-Fragment Fv7E2 (Ostermeier, 1995a, b) das gegen die *aa₃* Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* gerichtet ist. Dieses in 1.5 (S. 18) beschriebene Fv-Fragment/Antigen-System wurde ausgewählt, weil es in seinen Eigenschaften bereits gut charakterisiert ist und seine Handhabung im Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt) etabliert war.

Als weitere Fv-Fragmente in Fusionsproteinen kamen Fv11H9 und Fv17F8 zum Einsatz, die gegen den löslichen Teil des humanen T-Zell-Rezeptors CD28 gerichtet sind. Die Fragmente wurden mit dem heterolog produzierten Rezeptor als Antigen entwickelt, der für seine Reinigung an ein IgG-Fc-Fragment fusioniert worden war. Das Antigen wird deswegen in der vorliegenden Dissertation als CD28Fc bezeichnet und wurde wie die für die Fv-Fragmente kodierenden Vektoren von C. Münke (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Als Schwereketten-Antikörperfragment wurde das F44 (Polej, 2000), das gegen das Flavohämprotein FHP aus *Alcaligenes eutrophus* gerichtet ist, in Fusionsproteinen getestet. FHP wurde von A. Roth zur Verfügung gestellt (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt).

In einigen Fusionsproteinen wurde eine Variante des *green fluorescent protein*, das kommerziell erhältliche EGFP (Cormack *et al.*, 1996), verwendet, mit dessen Fluoreszenzeigenschaften die Proteinproduktion überprüft wurde.

4.1.2 Der C-Terminus als Fusionsstelle

Da bei allen Fv-Fragmenten sowie Schwereketten-Fragmenten der N-Terminus in der Nähe der hypervariablen Regionen liegt (s. 1.1.1, S. 4), könnte eine Verlängerung dieses Terminus leicht eine Störung der Antigen-Bindung bedeuten. Deswegen wurden nur Fusionsproteine hergestellt, in denen die Peptide der α -Helixbündel dem C-Terminus des zu oligomerisierenden Proteins nachfolgen. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß eine einmal erfolgreiche Oligomerisierungseinheit auch auf andere Fv-Antikörperfragmente angewandt werden kann.

4.1.3 Die α -Helixbündel

Aus der Überlegung in 4.1.2 ergibt sich, daß für drei Fv-Antikörperfragmente mindestens drei Helices benötigt werden. Sollen drei unterschiedliche Antigene verbunden werden, könnte die Stöchiometrie am besten durch ein heteromeres Bündel gesichert werden und die in Abb. 1.10 (S. 23) gezeigte räumliche Struktur durch antiparallele Helices verwirklicht werden.

In Datenbanken und in der Literatur wurde deswegen nach einem antiparallelen, heterotrimeren Bündel und Alternativen gesucht und sich dabei auf Bündel beschränkt, die aus separaten Helices, d. h. nicht aus einer einzigen durchgehenden Proteinkette, bestehen und bereits gut charakterisiert sind. Die Literaturrecherche ergab zu Beginn der Arbeiten folgende in Frage kommende Bündel, deren Beschreibung bereits in der Einleitung erfolgte:

- a) Die parallel heterotetramerisierenden Helices des humanen SNARE-Komplexes
- b) Das antiparallel homotrimerisierende, künstlich entwickelte Peptid Coil-Ser
- c) Das dimerisierende Peptid Jun aus einem AP-1-Transkriptionsfaktor

Der heterotetramere SNARE-Komplex eignet sich für die Herstellung eines tetra- oder auch eines trispezifischen Antikörperfragmentes. Die sehr große Stabilität des Komplexes sollte für seine Funktion als Oligomerisierungseinheit vorteilhaft sein. Die nicht vorhandene Antiparallelität seiner Peptide könnte eventuell durch ausreichend lange *Linker* ausgeglichen werden.

Bei dem zwar antiparallelen, aber homotrimeren Coil-Ser-Bündel müßten weitere Modifikationen entwickelt werden, um Trispezifität eines Antikörperfragment-Fusionsproteins zu erreichen (s. Ausblick 5.4.2, S. 112).

Da das Jun-Peptid mit dem Fos-Peptid ein heterodimeres Bündel eingeht, könnte die Trispezifität eventuell durch eine Kombination mit einem bispezifischen Fv-Fragment-Fusionsprotein, wie sie in Abb 1.4 B2 (S. 10) vorgestellt wurde, erreicht werden.

4.1.4 Die *Linker* der Fusionsproteine

Zwischen Protein und C-terminalem Peptid wurde eine kurzes Peptid als *Linker* fusioniert, um einen Abstand zwischen Protein und Peptid zu schaffen und die räumliche Flexibilität der Bindestellen zu erhöhen. Zum einen wurde von Filpula *et al.* (1996) ein *Linker* in modifizierter Form übernommen, der auf den Sequenzen der $(G_4S)_n$ -*Linker* (Huston, 1991) und *Serin-rich-Linker* (Dorai, 1994) basiert. Für das vorliegende Projekt wurde ein Prolin wegen seiner Geometrie durch ein Glycin ersetzt und ein Lysin durch ein Serin, um proteolytischem Abbau vorzubeugen (s. Diskussion, 5.1.2, S. 94). Es resultierte das Peptid GSTSGSGKGGSGEGSTSG (Lnk1). Der zweite *Linker* wurde bereits erfolgreich in einem dimeren Fv-Fragment-Helix-Fusionsprotein verwendet (Pack und Plückthun, 1992) und ist einer natürlichen Gelenkregion des IgG3 aus Maus entnommen (PKPSTPPGSS, Lnk2).

Die gewählte Strategie wird in Abb. 4.1 anhand eines für das vorliegende Projekt entwickelten Fusionsproteins veranschaulicht. Ein Fv-Antikörperfragment trimerisiert über ein an eine Untereinheit fusioniertes, trimerisierendes Peptid. Bei Zugabe des Antigens wird auch dieses trimerisiert.

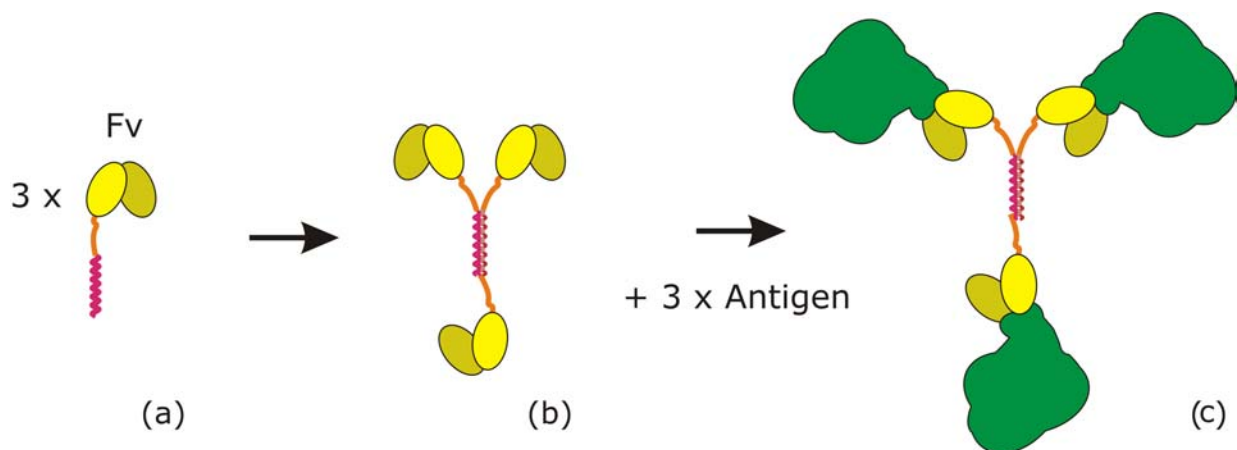


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Strategie zur Oligomerisierung eines Proteins mit Hilfe seines oligomerisierten Fv-Antikörperfragments. Gezeigt am Beispiel des im vorliegenden Projekt hergestellten Antikörperfragments Fv7E2-CS, das gegen die Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* gerichtet ist und das Peptid „Coil-Ser“ als fusionierte Oligomerisierungseinheit trägt. (a) Durch Fusion des Fv-Fragmentes (gelb) an das trimerisierende Peptid (magenta), (b) trimerisiert zunächst das Fv-Fragment selbst und (c) bei Zugabe seines Antigens (grün) auch dieses. Orange: *Linker*.

4.1.5 Die Expressionssysteme und die Reinigungsmethode

Da die Aufgabenstellung die Entwicklung der Oligomerisierungseinheit mit der Anwendung auf Fv-Antikörperfragmente verknüpfte, wurde zur Produktion der Fusionsproteine auf die für Fv-Fragmente etablierte periplasmatische Produktion in *Escherichia coli* (Skerra, 1988) und die Streptavidin-Affinitäts-Reinigung (Schmidt *et al.*, 1993) zurückgegriffen. Für die Methode steht der Expressionsvektor pASK68 (Kleymann *et al.*, 1995) zur Verfügung, in den die beiden Ketten eines Fv-Fragmentes so kloniert werden, daß sie N-terminal die Signalpeptide *ompA* bzw. *phoA* als Proteinfusion erhalten und die schwere Kette C-terminal den *Strep-tag*. Die Signalpeptide sorgen für die Sekretion in den Periplasmaraum, wo sich die beiden Ketten zum vollständigen Fv-Antikörperfragment zusammenfügen. Das Periplasma wird vom Cytoplasma isoliert und das assoziierte Fragment mit Hilfe des *Strep-tag* an der V_H-Kette chromatographisch gereinigt. Der *Strep-tag* dient in *Western Blots* gleichzeitig als spezifische Erkennungstelle der Fusionsproteine im immunologischen Nachweis mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig). Produziert wurden die Fusionsproteine in *E. coli* JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Im Verlauf der Arbeiten wurden zur Erhöhung der Produktionsausbeute einiger Fusionsproteine auch cytoplasmatische Produktionen getestet. Dafür wurde zum einen das zur starken Überproduktion toxischer Proteine in *E. coli* entwickelte System unter Kontrolle der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3)pLysS und HM174(DE3)pLysS (beide Novagen, Inc., USA-Madison) verwendet. Zum anderen wurden einige Fusionsproteine in Derivaten des Vektors pASK68 ohne Signalpeptide in den *E. coli*-Stämmen JM83 und Origami (Novagen, Inc., USA-Madison) getestet.

4.1.6 Herstellung der Expressionsvektoren

Die während dieser Arbeiten hergestellten Genkassetten mit den kodierenden Regionen für die Produktion der Fusionsproteine sind in Abb. 4.2 dargestellt. Die Sequenzen der für ihre Herstellung verwendeten Oligodesoxynukleotide sind im Anhang 6.1, S. 115 angegeben. Zur Überprüfung wurden die Vektoren Restriktionsanalysen unterzogen und die modifizierten Bereiche sequenziert. Zu den DNA-Sequenzierungen s. 6.3 (S. 119).

4.1 Strategie für die Konstruktion einer Oligomerisierungseinheit

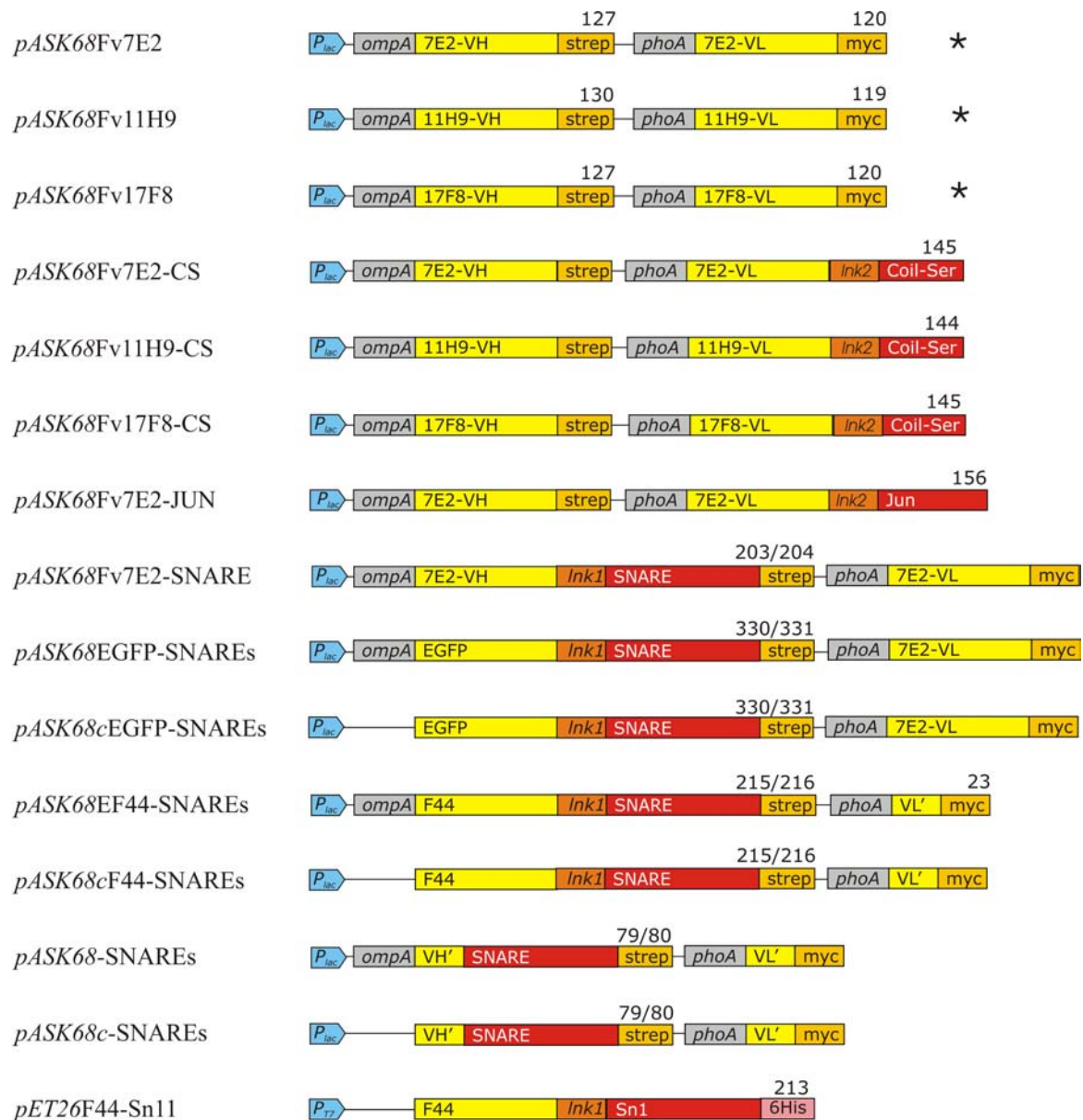


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Genkassetten der Vektoren für die Produktion der Protein-Helix-Fusionsproteine. Die mit * gekennzeichneten Vektoren sind solche, die als Grundlage und Kontrolle dienten. Ihre Bezeichnungen wurden zur besseren Übersicht an die für dieses Projekt hergestellten Vektoren (ohne *) angeglichen (für die ursprünglichen Bezeichnungen s. 2.9.2, S. 35). Die Zahlen über den Kassetten geben für jede Proteinkette einmal die Aminosäureanzahl (ohne Signalsequenzen) an, die Zahlen in Klammern im Text die Aminosäureanzahl für die einzelnen Proteinbestandteile. **Coil-Ser** (Coil-Ser-Peptid, 29): synthetisches, trimerisierendes Peptid; **Jun** (Jun-Peptid, 40): Dimerisierungsdomäne aus c-Jun; **SNAREs**: Peptid Sx (58), Sb (58), Sn1 (58) oder Sn2 (59) aus der Oligomerisierungsdomäne des humanen SNARE-Komplex; **7E2** (117/109), **11H9** (120/108), **17F8** (117/109): Fv-Antikörperfragmente; **VH'**, **VL'**: N-Termini von V_H, V_L; **F44** (129): Kamel-Schwerketten-Fragment; **EGFP** (239): Modifiziertes *Green Fluorescent Protein*; **Ink1**, **Ink2**: *Linker GSTSGSGKGGSGEGSTSG* (synthetisch) bzw. PKPSTPPGSS (Maus-IgG3); **strep** (10): *Strep-tag*; **6His** (6): Hexahistidin-tag; **myc** (11): *c-myc-tag*; **P_{lac}**, **P_{T7}**: Promotor des *lac*-Operons bzw. des T7-Systems; **ompA**, **phoA**: Signalpeptide zur Ausschleusung des Proteins ins Periplasma.

Konstruktion der Vektoren für die SNARE-Fusionsproteine

Das heterotetramere α -Helixbündel des SNARE-Komplexes wurde in Fusion mit dem Fv-Fragment Fv7E2, dem Schwereketten-Fragment F44, der GFP-Mutante EGFP als auch ohne N-terminal fusioniertes Protein erprobt. Die verwendeten Sequenzbereiche entsprechen den helikalen Bereichen aus den Proteinen Syntaxin-1A, Synaptobrevin-II und SNAP25 des SNARE-Komplexes und sind im Anhang 6.2 (S. 118) schematisch dargestellt. Sie werden im Weiteren als Sx, Sb, Sn1 und Sn2 bzw. SNARE-Peptide bezeichnet. Für alle SNARE-Fusionsproteine wurde für jedes der vier SNARE-Peptide ein homologer Vektor konstruiert. So wurde beispielsweise Fv7E2 in vier separaten Vektoren mit Sx, Sb, Sn1 bzw. Sn2 fusioniert. Die vier verschiedenen Serien werden in der Dissertation als Fv7E2-SNAREs, F44-SNAREs, EGFP-SNAREs und SNAREs bezeichnet.

Mit Hilfe von Gensynthese (s. 3.2.4, S. 41) und den Oligodesoxynukleotiden #32 - #37 wurde zunächst in pASK68Fv7E2 (Dr. C. Ostermeier, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) zwischen V_H und dem *Strep-tag* der *Linker* Lnk1 über die Schnittstellen *BstEII* und *NcoI* eingefügt. Sx, Sb, Sn1 und Sn2 wurden aus einer humanen cDNA-Bank (Human Brain, whole Marathon-ReadyTM cDNA, Clontech Laboratories, Inc. CA-Palo Alto) mit PCR und den Oligodesoxynukleotiden #24 - #31 gewonnen und über die dabei eingeführten Schnittstellen *KpnI* und *NheI* jeweils an die V_H -Kette hinter den *Linker* und vor den *Strep-tag* ligiert. Es wurden so die vier Vektoren pASK68Fv7E2-Sx, pASK68Fv7E2-Sb, pASK68Fv7E2-Sn1 und pASK68Fv7E2-Sn2 erhalten, die als Serie mit „Fv7E2-SNAREs“ bezeichnet werden.

Die kodierende Sequenz für das Schwereketten-Fragment F44 wurde in einem Vektor erhalten, der in der vorliegenden Dissertation mit pF44 bezeichnet wird und auf dem Vektor pCB (Dr. S. Polej, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) basiert. F44 wurde zunächst mit den Enzymen *BstEII* und *PstI* aus pF44 ausgeschnitten und in pASK68Fv7E2-Sn1 anstelle der *BstEII/PstI*-7E2 V_H -Kassette eingesetzt. Aus dem so entstandenen Vektor wurde der Bereich F44-Lnk1-Sn1 mit *XbaI* und *NcoI* ausgeschnitten und in pASK68 (Dr. G. Kleymann, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) ligiert. Über die *BstEII*- und *SacI*-Schnittstellen wurden durch Austauschen des Sn1-Fragmentes gegen die Sx-, Sb- bzw. Sn2-Fragmente die übrigen pASK68F44-SNAREs generiert. Für die analogen pASK68EGFP-SNAREs wurde das für EGFP kodierende Fragment aus dem Vektor pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Inc., C-Palo Alto) mit den Oligodesoxyukleotiden #50 und #51 in PCR amplifiziert und jeweils über die dabei eingeführten Schnittstellen *PstI* und *BstEII* in die vier pASK68Fv7E2-SNAREs anstelle der Fv7E2- V_H -Kassette ligiert.

Zur Generierung von Vektoren für die Produktion der SNAREs ohne N-terminal fusioniertes Protein wurden Sx, Sb, Sn1 und Sn2 aus den pASK68Fv7E2-SNAREs mit PCR und jeweils den Oligodesoxyukleotiden #38 und #39 amplifiziert. Über die dabei eingeführten Schnittstellen *PstI* und *NcoI* wurden die Fragmente hinter die Signalsequenz *ompA* in pASK68 ligiert. In Sb wurde eine natürliche *PstI*-Schnittstelle benutzt, durch die zwei Aminosäuren zu Beginn der Sequenz deletiert wurden, der Leserahmen aber erhalten blieb.

Für die cytoplasmatische Produktion wurde zum einen in den pASK68-SNAREs durch Einfügen der Oligodesoxynukleotide #48 und #49 in die Schnittstellen *XbaI* und *PstI* das *ompA* deletiert und so die pASK68cyt₁SNAREs erhalten. Die F44-SNAREs und EGFP-SNAREs dagegen wurden über *NcoI* und *PstI* in den pASK68cyt₂ (Dr. M. Venturi, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) ligiert, in dem auch die Signalsequenz *phoA* für die zweite Fv-Untereinheit deletiert ist.

Für die Produktion des F44-Sn1 unter Kontrolle des T7-Systems und spätere Affinitäts-Reinigung über den His-tag wurden das DNA-Fragment mit der Sequenz des Schwerketten-Fragmentes F44, sowie das DNA-Fragment mit der Sequenz von Sn1 samt vorgeschaltetem linker mit PCR und den Oligodesoxynukleotiden #54 und #55 bzw. #56 und #53 aus den Vektoren pF44 bzw. pASK68Fv7E2-Sn1 amplifiziert. Beide Produkte wurden anschließend in einem einzigen Ligationsansatz über die eingeführte Schnittstelle *BstEII* ligiert und über *NdeI*, *XhoI* in pET26b(+) (Novagen, Inc., USA-Madison) eingefügt.

Konstruktion der Vektoren für die Coil-Ser- und Jun-Fusionsproteine

Das trimerisierende Coil-Ser-Peptid wurde in Fusion mit den Fv-Antikörperfragmenten Fv7E2, Fv11H9 und Fv17F8 erprobt. Für die Aminosäuresequenz des synthetischen Peptids samt vorgeschaltetem *Linker* Lnk2 wurde eine für die Expression in *Escherichia coli* geeignete DNA-Sequenz ermittelt und ein entsprechendes DNA-Fragment aus den Oligodesoxynukleotiden #1 sowie #7 - #11 mit Gensynthese (s. 3.2.4, S. 41) zusammengefügt. Das Ligationsprodukt wurde über *XhoI* und *HindIII* in pASK68Fv7E2 ligiert und pASK68Fv7E2-CS erhalten. Im Gegensatz zu den SNAREs wurde Coil-Ser dabei an die V_L-Untereinheit von Fv7E2 fusioniert und das *c-myc-tag* deletiert.

pASK68Fv11H9-CS und pASK68Fv17F8-CS konnten durch Einfügen des *XhoI/HindIII*-Coil-Ser-Fragmentes aus pASK68Fv7E2-CS in die Vektoren pASK6811H9 und pASK68Fv17F8 (C. Münke, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) gewonnen werden. pASK68Fv7E2-Jun wurde genau dem pASK68Fv7E2CS entsprechend über Gensynthese mit den Oligodesoxynukleotiden #1, #3 - #6, #15 und #16 hergestellt.

4.2 Produktion der Fusionsproteine

Die beschriebenen Vektoren wurden in die entsprechenden *E. coli*-Stämme transformiert, Produktionen durchgeführt und anschließend SDS-PAGE und *Western Blots* von Zellaufschlüssen oder Reinigungsprodukten durchgeführt. Tab. 4.1 gibt einen Überblick über die Ergebnisse zu den einzelnen Fusionsproteinen. Die Coil-Ser-Fusionsproteine Fv7E2-CS und Fv17F8-CS erreichten im Vergleich zu den unmodifizierten Fv-Antikörperfragmenten ähnliche Ausbeuten, dagegen war die Ausbeute von Fv11H9-CS gegenüber Fv11H9 deutlich verringert. Die Ausbeuten aller übrigen nachgewiesenen Fusionsproteine waren wegen der geringen Mengen ($< 0,1$ mg/l Kultur) und wegen Verunreinigungen nicht genau bestimmbar. Die restlichen Fusionsproteine Fv7E2-Sb, Fv7E2-Sn2, F44-Sn2 und die SNAREs ohne N-terminal fusioniertes Protein waren weder im Zellaufschluß noch nach Reinigung im SDS-PAGE oder *Western Blot* nachweisbar. Bei den Fv7E2-Fusionsproteinen war die um die Helix verlängerte Kette in der Ausbeute schwächer bis meist gar nicht vorhanden. Von den SNARE-Fusionsproteinen waren die mit dem Sn1-Peptid am deutlichsten nachweisbar, sowie die mit dem Sn2-Peptid niemals. Außer bei den Coil-Ser- und Jun-Fusionsproteinen wurden Produktionstemperatur (22 °C, 30 °C oder 37 °C) und Produktionsmedium (LB oder TP-Medium) variiert, was keine wesentliche Steigerung der Ausbeuten dafür aber mehr Abbauprodukte ergab (nicht gezeigt).

Bei den Präparationen der Periplasmen wurden sehr häufig schleimige Aufschlüsse und schleimige Sphäroblastenniederschläge erhalten, was auf große Mengen an lysierten Zellen hindeutet. Das Periplasma läßt sich dann nicht mehr sauber von den Sphäroblasten bzw. cytoplasmatischen Proteinen trennen. Bei der Präparation des Periplasmas des Fv7E2-CS-Fusionsproteins wurde wenig oder kein Schleim beobachtet. Das kann darauf hinweisen, daß sich die Produktion der anderen Fusionsproteine ungünstiger auf die Bakterienzellen auswirkte.

Tab. 4.1: Produktions- und Reinigungsergebnisse der Fusionsproteine. In der SDS-PAGE waren aus Zellaufschlüssen niemals deutliche Überproduktionsbanden erkennbar. Die Ergebnisse der SDS-PAGE in der Tabelle beziehen sich immer auf Reinigungsprodukte. „ja“: eine Bande der erwarteten Laufweite wurde angefärbt. Für immunologische Nachweise im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat verwendet, sonst verschiedene Anti-His-Antikörper, gekennzeichnet mit *. Bei BL21 und HM174 handelt es sich um die (DE3)pLysS-Stämme. H, L: Schwere bzw. leichte Kette des Fv-Antikörperfragments; n. n.: Produkt nicht nachweisbar, n. d.: Reinigung nicht durchgeführt, ?: Produkt fraglich, (Z) Nachweis im Zellaufschluß.

Protein	periplasmatische Produktion			cytoplasmatische Produktion		
	Stamm	SDS-PAG	<i>Western Blot</i>	Stamm	SDS-PAG	<i>Western Blot</i>
Fv7E2-CS	JM83	H + L	H			
Fv11H9-CS	JM83	H + L	H			
Fv17F8-CS	JM83	H + L	H			
Fv7E2-Jun	JM83	H + L?	H			
Fv7E2-Sx	JM83	H? + L	H (Z)			
Fv7E2-Sb	JM83	L	n. n.			
Fv7E2-Sn1	JM83	H + L	H			
Fv7E2-Sn2	JM83	L	n. n.			
F44-Sx	JM83	n. d.	positiv (Z)			
F44-Sb	JM83	ja	positiv			
F44-Sn1	JM83	ja	positiv	JM83 Origami BL21 HM174	ja ja n. n. n. n.	positiv positiv n. n.* n. n.*
F44-Sn2	JM83	n. d.	n. n.	JM83		
EGFP-Sn1	JM83	ja	positiv	JM83 Origami	n. d.	positiv (Z)
SNAREs	JM83	n. d.	n. n.	JM83	n. n.	n. n.

Tab. 4.2: Durchschnittliche Ausbeuten der produzierten Coil-Ser-Fusionsproteine nach Reinigung im Vergleich zum unveränderten Fv-Antikörperfragment.

Protein:	Fv7E2	Fv7E2-CS	Fv11H9	Fv11H9-CS	Fv17F8	Fv17F8-CS
mg/l Kultur:	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0	0,2	< 0,1	< 0,2	0,2

4.3 Charakterisierung des Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteins Fv7E2-CS

4.3.1 Produktion und optimierte Reinigung

Das Fusionsprotein Fv7E2-CS ließ sich mit der in 3.4 (S. 47) beschriebenen, etablierten Methode für Fv-Fragmente produzieren und aus dem Periplasmaaufschluß mit Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie präparieren. Es stellte sich jedoch als günstig heraus, nach dem Auftrag des Periplasmas auf die Streptavidin-Säule vor der eigentlichen Elution einen langen Waschschrift von etwa 25 Säulenvolumina mit niedrig konzentriertem Elutionsmittel (etwa 0,075 mM DTB, s. 3.4) zur Entfernung von Verunreinigungen durchzuführen. Die SDS-PAGE in Abb. 4.3 vergleicht Elutionen der so optimierten Reinigung (B) gegenüber solchen einer Reinigung mit Bedingungen, wie sie beispielsweise auf das unmodifizierte Fv7E2 angewandt wird (A). Die V_H -Kette und die verlängerte V_L -Kette treten mit den erwarteten Größen von 14,1 bzw. 16,1 kDa auf und sind in B ohne sichtbare Verunreinigungen. Obwohl die das *Strep-tag* für die Affinitäts-Reinigung tragende V_H -Kette generell in SDS-PAGE eine stärkere Anfärbung mit Coomassie zeigt, überwiegt sie in den späten Fraktionen immer deutlich, bis V_L gar nicht mehr nachweisbar ist (A, Spur 18). Die Produktion von gut 0,5 mg gereinigtem Fv7E2-CS pro Liter Kultur ist ähnlich gegenüber der des ursprünglichen Fv-Antikörper-fragmentes Fv7E2.

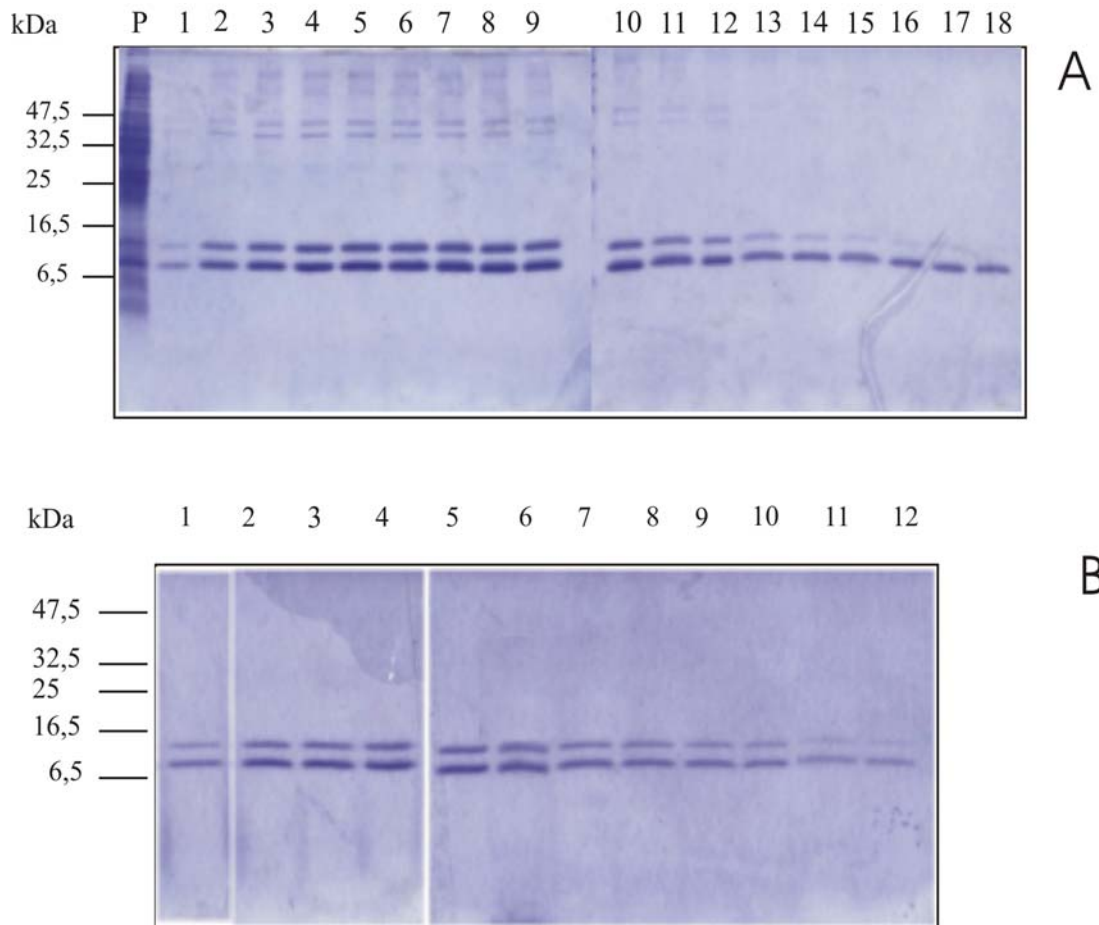


Abb. 4.3: SDS-PAGE (18 %, Comassie) von Elutionsfraktionen von Fv7E2-CS nach Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie unter A) Standardbedingungen und B) unter optimierten Bedingungen. Die Elutionsproben sind von links beginnend aufgetragen. Gereinigt wurde aus präpariertem Periplasma, das in A in Spur P zu sehen ist. Für B wurden mit der gezeigten Probe nach jeweils Entfernen des Elutionsmittels zwei weitere Streptavidin-Affinitätschromatographien angeschlossen. In den späten Fraktionen von A ist das Überwiegen der V_H -Kette deutlich, wobei die Elutionen 13 – 18 mehr als 40 ml beinhalten, gegenüber 20 ml der Elutionen 10 - 12 in B. Entsprechende Fraktionen wurden für B nach der ersten Reinigung verworfen.

4.3.2 Gelfiltrationsanalysen mit Fv7E2-CS und seinen Gemischen mit Antigen

Führt man mit dem gereinigten Fv7E2-CS eine Gelfiltration durch, erhält man im Elutionsprofil ein gut definiertes Maximum, in dessen Fraktionen sich die beiden Banden des Fv7E2-CS befinden (nicht gezeigt). Die Abbildung Abb. 4.4 zeigt das Elutionsprofil von Fv7E2-CS im Vergleich zu dem von Fv7E2. Deutlich ist zu sehen, daß Fv7E2-CS als erstes eluiert, was den Erwartungen für ein größeres Partikelvolumen von Fv7E2-CS gegenüber Fv7E2 entspricht. Für ein trimerisiertes Fv7E2-CS werden 90,3 kDa erwartet, gegenüber 27,4 kDa des monomeren Fv7E2. Die Elutionswerte der Maxima schwanken in verschiedenen Läufen etwa von 1,30 – 1,33 ml bzw. 1,49 – 1,52 ml, was bei einem Vergleich mit Standardwerten aus Tabelle 3.1 (S. 50) etwa 72 – 86 kDa für Fv7E2-CS bzw. 22 - 27 kDa für Fv7E2 ergibt. Auch wenn dies nur Richtwerte sein können (s. Diskussion), hat sich das Partikelvolumen von Fv7E2 durch die Fusion mit Coil-Ser offensichtlich vergrößert und könnte dem Volumen eines trimerisierten Fv-Fragment entsprechen.

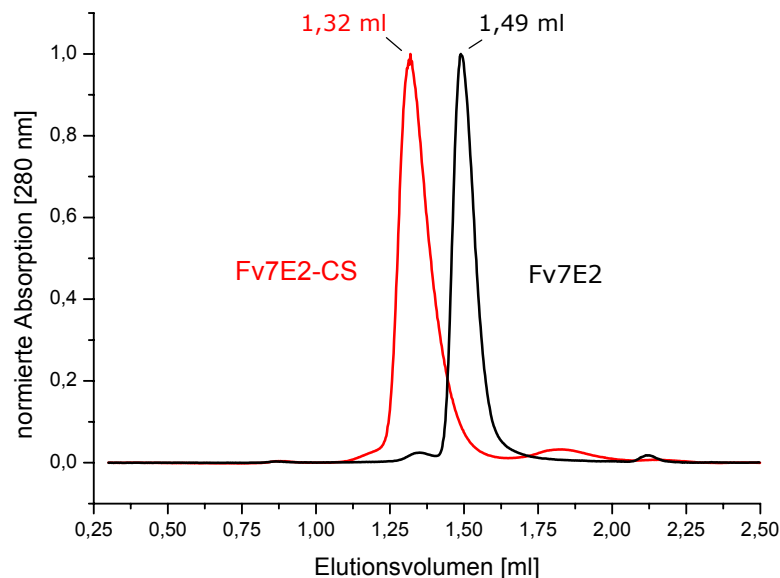


Abb. 4.4: Gelfiltrationsprofile von gereinigtem Fv7E2-CS und Fv7E2. In der Graphik wurden zwei separate Gelfiltrationsexperimente von Fv7E2-CS (rot) bzw. Fv7E2 (schwarz) überlagert. Bedingungen: Superose 12, 6°C, 20 mM Tris/Cl, pH 7,4, 150 mM NaCl.

Zur Überprüfung der Fähigkeit von Fv7E2-CS, das Antigen zu binden und zu oligomerisieren, wurden Mischungen des Fusionsproteins mit dem Antigen des Fv-Fragmentes, der Cytochrom-*c*-Oxidase, in Gegenwart von 0,05 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) hergestellt (s. 3.5, S. 49) und anschließend eine Gelfiltration durchgeführt. Die Graphik A in Abb. 4.5 zeigt das Elutionsprofil eines solchen Gemisches, in dem zwei deutlich voneinander getrennte Maxima zu sehen sind. Das Maximum bei 1,53 ml entspricht dem Retentionsvolumen der Cytochrom-*c*-Oxidase, wogegen das Maximum bei 1,27 ml neu ist und einem Protein mit sehr großer Molmasse entsprechen sollte (s. unten). Beide Maxima enthalten in der SDS-PAGE die Banden der Oxidase und im neu entstandenen Maximum zusätzlich die Banden des Fv7E2-CS (Abb. 4.5 B). Da Fv7E2-CS auf dieser Säule normalerweise um 1,70 ml eluiert (C), hat also eine Bindung des Fv7E2-CS an einen Teil der Oxidase stattgefunden.

Durch Verringern der Menge an Oxidase im Gemisch konnte eine vollkommene Reduktion des Maximums bei 1,54 ml im Profil erhalten werden, ohne das Maximum bei 1,27 ml zu beeinflussen. Das so erhaltene, einzelne Maximum ist in Abb. 4.6 im Vergleich zum Elutionsmaximum der Oxidase und des ihres Komplexes mit dem unveränderten Fv7E2 dargestellt. Die beiden letzteren lassen sich auf der verwendeten Säule in ihrem Retentionsvolumen kaum unterscheiden, obwohl der Molmasse von 128 kDa der ungebundenen Oxidase eine Molmasse von 155 kDa des Komplexes gegenüberstehen. Das Retentionsvolumen des „neuen“ Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes ist jedoch extrem zu größeren Molmassen verschoben. Die Retentionsvolumina bei verschiedenen Läufen schwanken zwischen 1,24 und 1,32 ml, was nach den Standardwerten (Tab. 3.1, S. 50) gleichbedeutend mit Molmassen von ca. 740 bis 460 kDa wäre. Für einen trimeren Komplex aus Oxidase und Fv7E2-CS werden 474 kDa erwartet. Die Ergebnisse deuten also auf eine Molmasse des eluierten Proteins hin, die mindestens dem dreifachen eines Fv-Fragment/Oxidase-Komplexes entsprechen könnte. Eine Molmasse in monomerer Größenordnung ist erfahrungsgemäß und besonders durch den Vergleich mit dem Komplex der Oxidase mit dem ursprünglichen Fv7E2 ausgeschlossen.

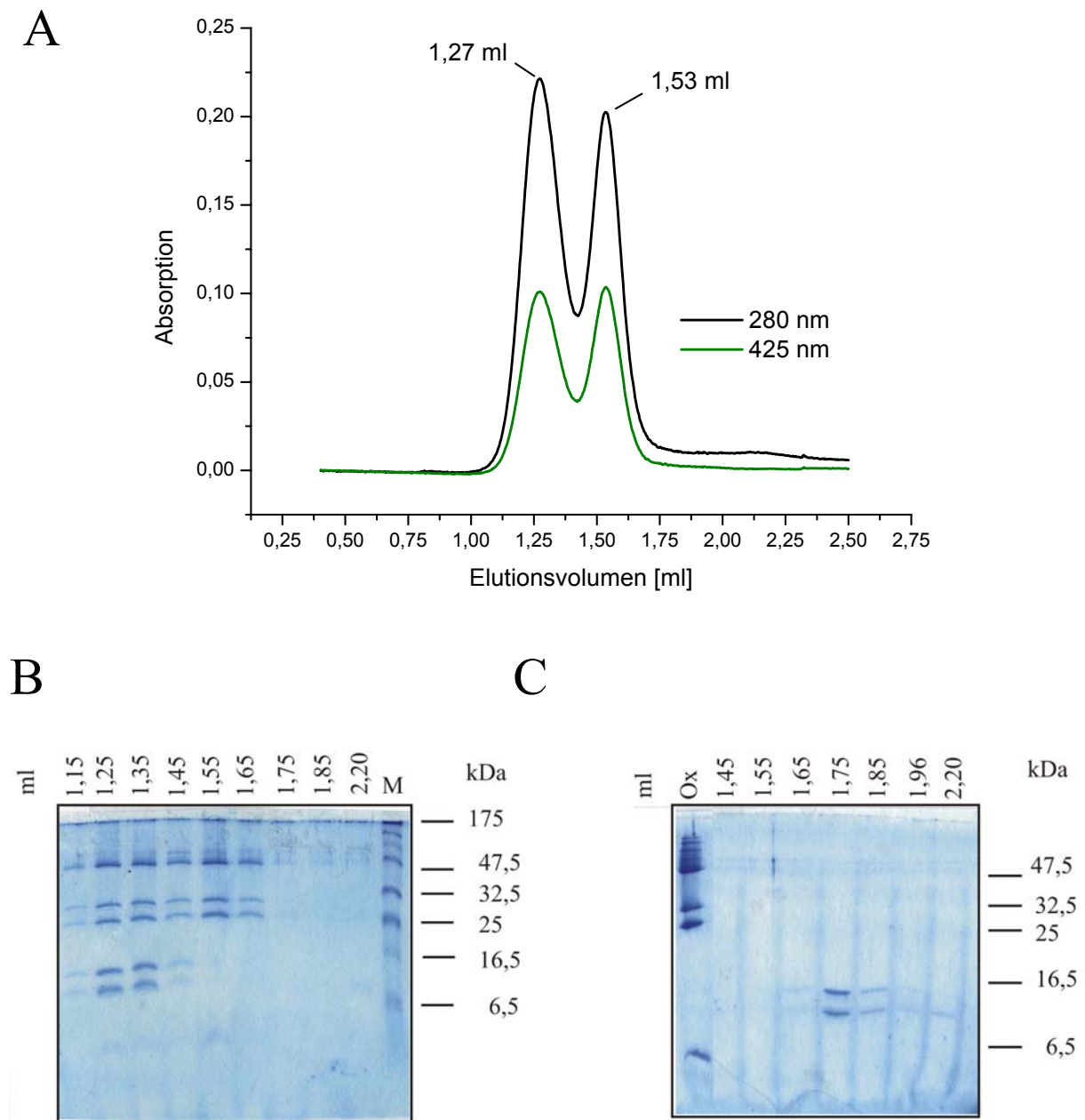


Abb. 4.5: Gelfiltration eines Gemisches der Cytochrom-*c*-Oxidase mit Fv7E2-CS auf der Säule Superose 6. A) Elutionsprofil, aufgenommen bei 280 nm sowie der Wellenlänge 425nm, bei der die Oxidase spezifisch absorbiert. Bedingungen: Superose 6, 6 °C, 20 mM Tris/Cl, pH 7,4, 150 mM NaCl. B) SDS-PAGE (18 %, Coomassie) mit Fraktionen der Gelfiltration in A. Die SDS-PAGE zeigt, daß in A das Maximum bei 1,27 ml die Oxidase und das Fv7E2-CS enthält, das Maximum bei 1,53 ml dagegen nur Oxidase. C) SDS-PAGE (18 %, Coomassie) von Fraktionen einer nicht gezeigten Gelfiltration des Fv7E2-CS ohne Oxidase auf derselben Säule, sowie in Spur Ox eine Präparation der Cytochrom-*c*-Oxidase mit ihren vier Untereinheiten. Fv7E2-CS eluiert alleine deutlich um 1,75 ml und nicht um 1,30 ml wie in A bzw. B. Das Maximum des Komplexes in A zeigt durch das zusätzlich vorhandene Fv7E2-CS deutlich ein vergrößertes Verhältnis der Absorption bei 280 nm zur Absorption bei 425 nm.

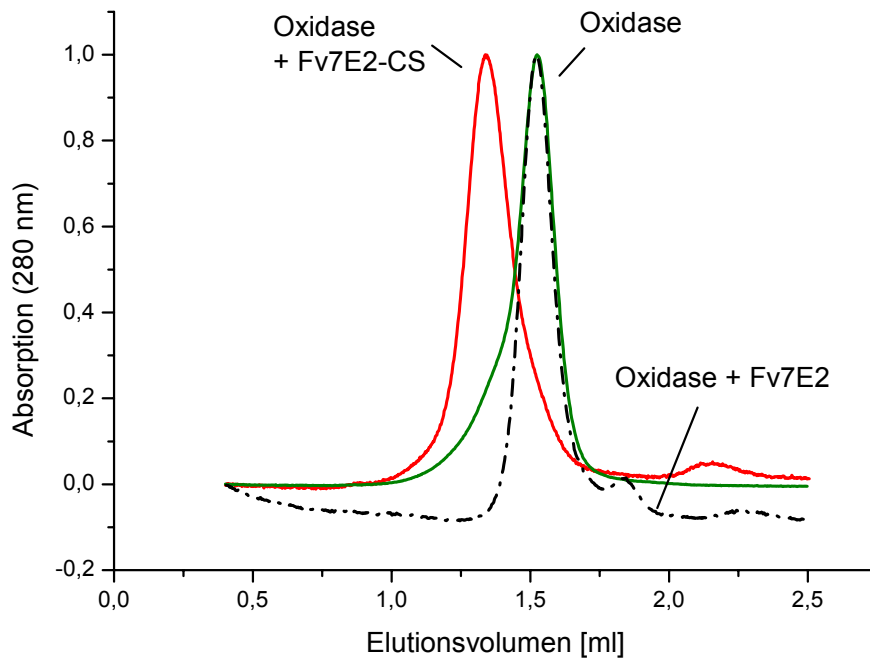


Abb. 4.6: Gelfiltrationsprofil des Komplexes aus Cytochrom-*c*-Oxidase und Fv7E2-CS im Vergleich zu Kontrollen. Gezeigt sind drei überlagerte Elutionsprofile verschiedener Läufe. Rot: Der Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex; Die Mengen von Fv7E2-CS und der Oxidase wurden für diese Mischung so gewählt, daß kein Überschuß einer der beiden Komponenten vorhanden war. Grün: Oxidase allein. Schwarz punktiert: Fv7E2/Oxidase-Komplex. In der Mischung war ein leichter Überschuß an Fv7E2 vorhanden (s. kleines Maximum bei etwa 1,85 ml). Das Retentionsvolumen des Fv7E2/Oxidase-Komplexes ist kaum von dem der ungebundenen Oxidase zu unterscheiden (beide etwa bei 1,52 ml). Der Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex dagegen eluiert viel eher, bei ca. 1,27 ml, wie in Abb. 4.5 das frühe Maximum.

4.3.3 Analyse der oligomeren Zustände mit analytischer Ultrazentrifugation

Zur Analyse der oligomeren Zustände des Fusionsproteins Fv7E2-CS sowie seines Antigen-Komplexes mit der Oxidase wurden mehrere, unterschiedliche Ultrazentrifugationsexperimente durchgeführt. Zur Präparation der Proben siehe 3.7.1 (S. 51). Die Zentrifugationsläufe sowie die Auswertung der einzelnen Datensätze wurden von Dr. C. Tziatzios (AG Prof. Dr. D. Schubert, Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) vorgenommen.

Analyse des Fv7E2-CS

Analysiert man die experimentellen Datensätze aus Gleichgewichtsläufen von Proben mit Fv7E2-CS anhand von Modellen, die nur eine einzige Massenkomponekte enthalten, dann ergeben sich als wahrscheinlichstes Ergebnis Werte um (85 ± 2) kDa für die Molmasse des Fusionsproteins. Zur Anschauung ist in Abb. 4.7 für einen der Datensätze die standardisierte Fehlerquadratsumme χ^2 in Abhängigkeit von vorgegebenen Molmassen dargestellt. Das Minimum der Kurve bei 86,4 kDa ist das der wahrscheinlichsten Molmasse entsprechende reduzierte χ^2_{\min} (s. Methoden, S. 55). Beim erwarteten Wert der dreifachen Molmasse des Fv7E2-CS von 90,3 kDa steigt das χ^2 um mehr als 3 % im Vergleich zu χ^2_{\min} an (s. dazu auch die Ergebnisse S. 76 – 77).

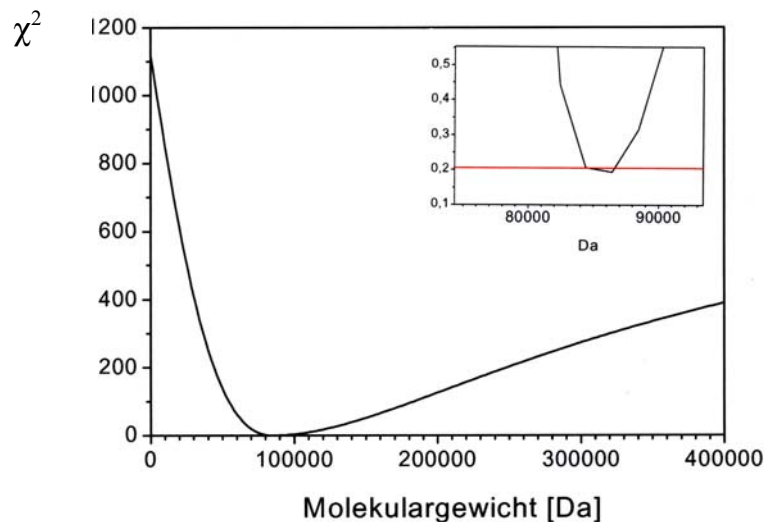


Abb. 4.7: Analyse eines Sedimentations-Gleichgewichtslaufes mit Fv7E2-CS. Anpassung an eine einzige freie Masse. Aufgetragen ist das χ^2 gegen die Variation der freien Masse mit der wahrscheinlichsten Masse von $86,4 \pm 2,1$ kDa im Minimum mit $\chi^2_{\min} = 0,1944$. Rechts oben im Diagramm ist eine Vergrößerung des Bereiches um das Minimum eingeblendet. Unterhalb der roten Markierung liegt der gültige Bereich für Werte von χ^2 mit $\chi^2 < \chi^2_{\min} + 3\%$. Experimentelle Bedingungen: 16000 rpm, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4°C, Messung der Absorption bei 275 nm, $OD_{275\text{ nm}}$ bei Beginn = 0,4.

Mit Fv7E2-CS durchgeführte Geschwindigkeitsläufe bestätigen gut das Ergebnis aus den Gleichgewichtsläufen und zeigen außerdem die große Homogenität der Probe. Bei der Datenanalyse eines solchen Laufes erhält man die in Abb. 4.8 gezeigte Massenverteilung mit einem einzigen Maximum bei etwa 83 bis 85 kDa. Die Fehlerquadratsumme χ^2 erlaubt nur Werte in einem Bereich von etwa 75 – 100 kDa und schließt damit dimere oder tetramere Komplexe von Fv7E2-CS aus.

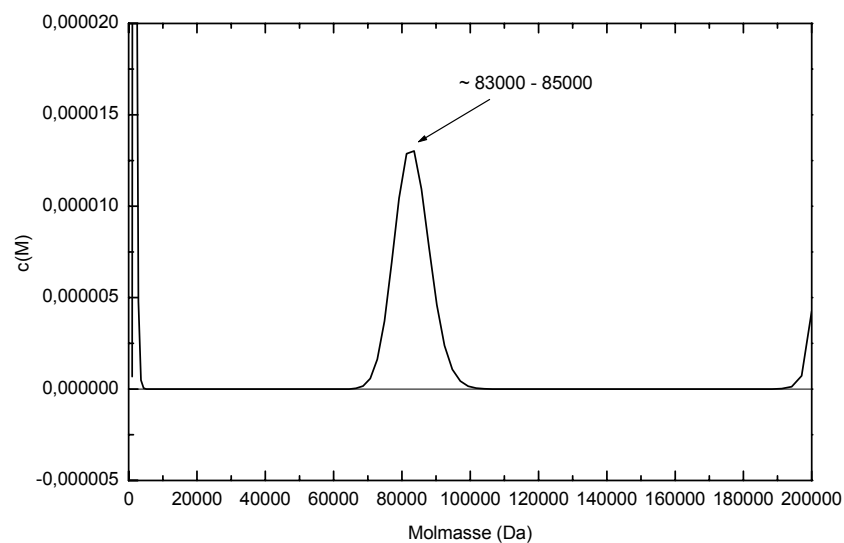


Abb. 4.8: Analyse eines Sedimentations-Geschwindigkeitslaufes einer Probe von Fv7E2-CS als Massenverteilung. Gezeigt ist die Massenverteilung c (Molmasse) der Massen in der Probe, deren einziges Maximum bei 83000 – 85000 Da liegt. Das Ergebnis wurde durch gleichzeitige Variation der Masse und des Reibungskoeffizientenverhältnisses \bar{f}/f_{Kugel} erhalten (s. S. 58). Das kleinste χ^2 wurde für die dargestellte Masse bei einem \bar{f}/f_{Kugel} von 1,47 gefunden. Der Anstieg bei 0 und 200000 ist nicht auf weitere Massen zurückzuführen. Experimentelle Bedingungen: 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 40000 rpm, 4 °C, Messung der Absorption bei 275 nm.

Wie in den vorangegangene Analysen gezeigt, liegt das aus Geschwindigkeits- und Gleichgewichtsläufen erhaltene Ergebnis für die Molmasse des Fusionsproteins Fv7E2-CS geringfügig unterhalb des bei Trimerisierung des Fv-Fragmentes erwarteten Wertes.

Deswegen wurden die Daten aus Gleichgewichtsläufen auch als Modelle mit mehreren Massenkomponten analysiert und dafür angenommen, daß nur monomeres Fv7E2-CS und Oligomere davon in der Probe enthalten sein können. Für die Berechnungen wurden also die Werte 30,1 kDa, 60,2 kDa, 90,3 kDa usw. als feste Massen vorgegeben. Als wahrscheinlichstes Modell erhält man eine Monomer/Dimer/Trimer-Anpassung, wie sie in den Abbildungen Abb. 4.9 dargestellt ist. Graph A zeigt einen experimentellen Datensatz $A_{\text{exp}}(r)$ im Vergleich zu den angepaßten Daten $A_{\text{fit}}(r)$, die sich als Summe aus den angepaßten Daten der einzelnen Komponenten ergeben. Die angepaßten Daten der einem Trimer von etwa 90 kDa entsprechenden Masse machen eindeutig den bestimmenden Anteil an der Absorption aus. Nach der Parabeldarstellung in B besitzt der Partikel von 90 kDa einen recht gut definierten Mengenanteil von 96 %, Werte unter 80 % würden das χ^2 unrealistisch erhöhen. Es können hier sowie in allen folgenden Experimenten keine Mittelwerte der Anteile aus den verschiedenen Datensätzen errechnet werden, da sie wegen der Optimierung der Bedingungen bei unterschiedlichen Rotorgeschwindigkeiten erhalten wurden (s. 3.7.3, S. 53). Es wurde jedoch immer ein Anteil an Trimeren von mehr als 55 % gefunden und konnte nie ausgeschlossen werden. Die restlichen Massenanteile am Gemisch können durch Anwesenheit von dimeren und monomeren Zuständen des Fv7E2-CS erklärt werden, deren Mengen unter den gewählten experimentellen Bedingungen aber nicht bestimmbar sind. Nur das Monomere ist sicher in kleinen Mengen erhalten sowie eine Hintergrundabsorption (Basis, s. S. 54). Die Berücksichtigung der Molmassen ab tetramerer Größe verbessert die Anpassung nicht.

Zur Kontrolle der Ergebnisse zum Coil-Ser-Fusionsproteins Fv7E2-CS wurde ein Geschwindigkeitslauf mit dem unmodifizierten Fv7E2 (ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid) unter gleichen Bedingungen durchgeführt und bei der Analyse ein einziges Massenmaximum von etwa 25 bis 28 kDa gefunden, was sehr gut dem für das monomere Fv-Fragment erwarteten Wert von 27,4 kDa entspricht (nicht gezeigt).

Aus allen Experimenten zu beiden Fv-Fragmenten folgt mit guter Sicherheit, daß die mittlere Masse der Proben des Fv-Fragmentes 7E2 mit fusioniertem Coil-Ser-Peptid (Fv7E2-CS) knapp dreimal so groß ist wie ohne Coil-Ser (Fv7E2), bzw. daß das Fv-Fragment mit fusioniertem Coil-Ser zu gut 90 % Anteil als verdreifachte monomere Masse vorliegt.

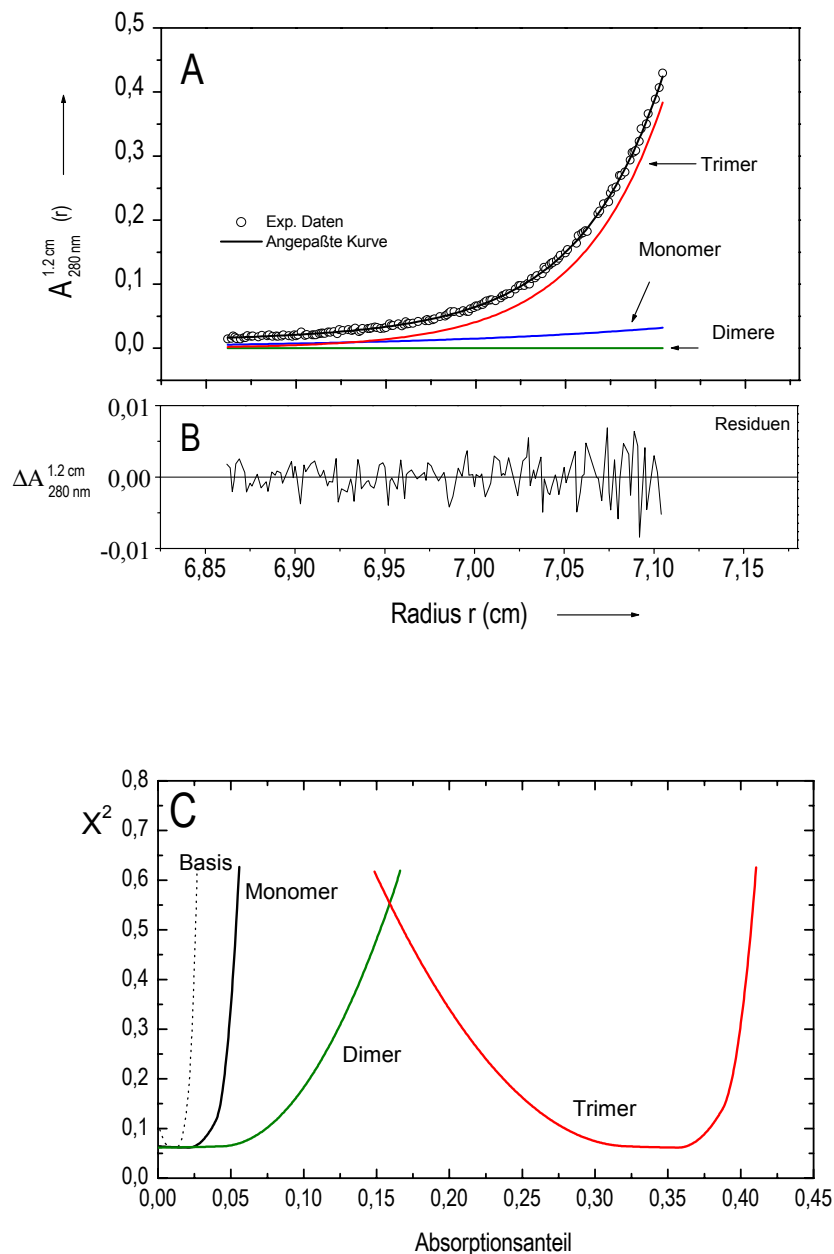


Abb. 4.9: Analyse eines Sedimentations-Gleichgewichtslaufes einer Probe von Fv7E2-CS als Modell mit den drei Massenkomponten Monomer, Dimer und Trimer. Als Molmassen wurden für die monomere Komponente 30,1, für die dimere 60,2, für die trimere 90,3 kDa vorgegeben, die Basis wurde mit 1 kDa berücksichtigt. Höhere oligomere Massen verbessern die Anpassung nicht. A) Anpassung an einen experimentellen Datensatz $A_{\text{exp}}(r)$ (Kreise). Radius r ist der Abstand zur Rotationsachse. Die angepaßten Datenpunkte der einzelnen Komponenten (farbig) ergeben in der Summe die an den experimentellen Datensatz angepaßten Datenpunkte (schwarz). B) Residuen-Verteilung C) Parabeldarstellung von χ^2 in Abhängigkeit der Absorption- bzw. Konzentrationsanteile der einzelnen Massenkomponten. Bedingungen: 16000 rpm, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4°C, Messung der Absorption bei 275 nm, $OD_{275\text{ nm}}$ bei Beginn = 0,4.

Analyse des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes

Die experimentellen Daten aus Sedimentations-Gleichgewichtsläufen mit Proben des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes lassen sich mit einem Modell anpassen, das nur die Masse des trimeren Komplexes (483 kDa) und eine Masse in monomerer Größenordnung benötigt. Dabei ergab sich immer ein Anteil des trimeren Komplexes von über 35 % am Gemisch, im in Graphik A von Abb. 4.10 dargestellten Datensatz beträgt er am wahrscheinlichsten 57%. Die kleine Massenkomponekte kann bezüglich ihrer Molmasse aus dem Datensatz bzw. unter diesen experimentellen Bedingungen nicht genau bestimmt werden. Es könnte sich sowohl um eine Massenkomponekte der Größe monomerer Oxidase als auch des monomeren Komplexes handeln oder auch einer Mischung aus beiden. Der Konzentrationsanteil dieser Komponente ist sogar teilweise austauschbar mit dem recht hohen Anteil an Basisabsorption, der in der Parabeldarstellung in B) mit berücksichtigt wurde. Der Anteil des dreifachen Komplexes wird durch die Einbeziehung der Basis zwar etwas weniger und auch weniger signifikant, liegt aber immer noch sehr deutlich über 50 %. Die Berücksichtigung einer Massenkomponekte in dimerer oder höherer oligomeren Größenordnung verbessert die Anpassung nicht.

Als Kontrollen wurden Sedimentations-Gleichgewichtsläufe mit Cytochrom-*c*-Oxidase allein sowie im Komplex mit dem unmodifizierten Fv7E2 unter denselben experimentellen Bedingungen wie beim Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex durchgeführt und bei der Analyse die selben Parametern verwendet. In beiden Proben wurde jeweils zu etwa 90 % Anteil eine Masse in der Größe von monomerer Oxidase bzw. monomerem Komplex gefunden. Zusätzlich benötigen beide Anpassungen zwar einen kleinen Anteil an größerer Masse, doch kann eine Masse in Größe des trimeren Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes jeweils höchstens mit 4 % enthalten sein.

Die Experimente zeigen, daß durch Mischen des Antigens Cytochrom-*c*-Oxidase mit Fv7E2-CS ein neuer Komplex entsteht, der etwa eine dreifache Größe im Vergleich zum Komplex aus Oxidase mit dem unmodifizierten Fv7E2 besitzt und mit guter Sicherheit insgesamt mindestens ein Drittel, am wahrscheinlichsten die Hälfte der Gemischanteile ausmacht.

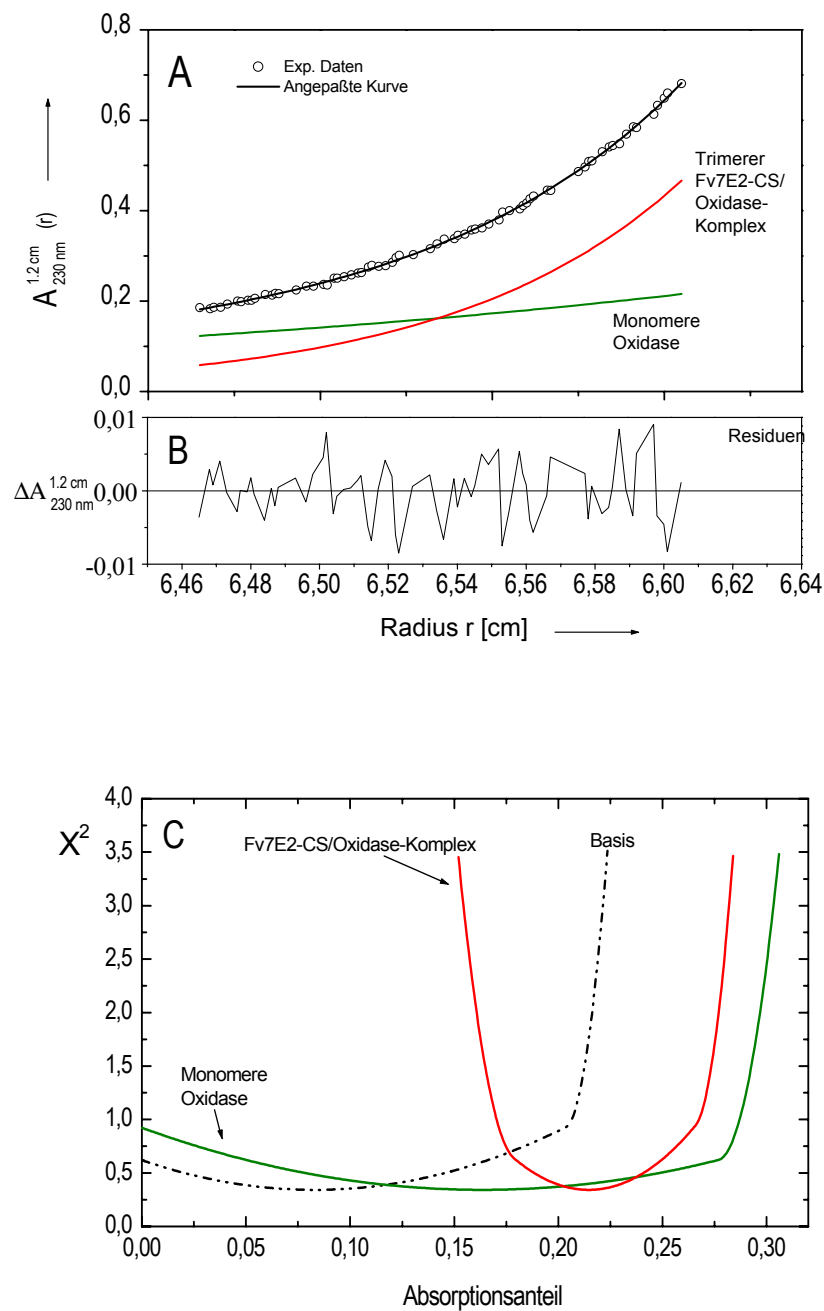


Abb. 4.10: Analyse eines Sedimentations-Gleichgewichtslaufes einer Probe vom Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex als Modell mit den drei Massenkomponten monomere Oxidase, trimerer Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex und freie Basis. Als Molmassen wurden für den trimeren Komplex 483 kDa, für die monomere Oxidase 130,5 kDa und für die Basis 1kDa gesetzt. A) Anpassung an einen experimentellen Datensatz $A_{\text{exp}}(r)$ mit r als Abstand zur Rotationsachse. B) Residuen-Verteilung C) Parabeldarstellung von χ^2 in Abhängigkeit der Absorption- bzw. Konzentrationsanteile der einzelnen Massenkomponten. Experimentelle Bedingungen: 62 mM Phosphat-Puffer, pH 7,45, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) DDM, 95 % (v/v) D₂O, 29 % (w/v) Saccharose, 13000 rpm, 4°C, Messung der Absorption bei 230 nm, OD_{230 nm} bei Beginn = 0,3.

Der Einfluß des Detergenz

Da alle Experimente mit Proben, die das Membranprotein Cytochrom-*c*-Oxidase enthielten, in Gegenwart des Detergenz 0,05 % DDM stattfanden, wurde der Einfluß des Detergenz auf das Fv7E2-CS alleine in einigen Sedimentations-Geschwindigkeitsläufen untersucht (Tab 4.3). Da die Gleichgewichtsläufe des Komplexes das Gleichgewicht erst nach 4 Tagen erreichten, wurde Fv7E2-CS nach mehrtägiger Inkubation in DDM 0,05 % untersucht und eine Verringerung der mittleren Molmasse von 83 kDa auf 55 kDa festgestellt. Nach gleich langer Lagerung ohne DDM war die Molmasse dagegen unverändert. In einem weiteren Lauf zeigte sich nach 1,5 Stunden Inkubation bereits eine Verringerung auf 65 kDa. Die Molmasse von Fv7E2-CS in DDM bleibt aber dennoch auch nach Tagen über der mittleren Masse des Fv-Fragmentes Fv7E2 ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid, das sich nach 7-tägiger Inkubation in 0,05 % DDM unbeeinflusst zeigte.

Ein Gleichgewichtslauf mit Fv7E2-CS nach mehr als 7 Tagen Inkubation in 0,05 % DDM bestätigte die Beobachtung aus den Geschwindigkeitsläufen. Das Modell nimmt für den Anteil an trimerer Massenkomponente im Vergleich zum Resultat ohne Inkubation in DDM statt 96 % nur noch 52% an und läßt aber keine Werte unter 50 % zu. Die restlichen Anteile im Gemisch werden am wahrscheinlichsten mit 31 % der monomeren und 18 % der dimeren Massenkomponente angepasst, sind aber nicht gut definiert.

Tab. 4.3: Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe mit Fv7E2-CS nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in DDM (0,05 %). Die mittleren Massen gehören zu Verteilungen mit einem χ^2_{\min} , das unter Minimierung von χ^2 bei gleichzeitiger Variation des Reibungskoeffizientenverhältnisses \bar{f}/f_{Kugel} gewonnen wurde (s. S. 56). Die möglichen Massen besitzen ein $\chi^2 < \chi^2_{\min} + 3 \%$. Experimentelle Bedingungen: 40 000 rpm, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4°C, OD_{275 nm} bei Start = 0,5.

Zeitpunkt der Zugabe des DDM vor dem Lauf	Fv7E5-CS			Fv7E2	
	0 Stunden	1,5 Stunden	7 Tage	0 Stunden	5 Tage
mittlere Masse $\times 10^{-3}$ [g/mol]	83 - 85	65	55	25	28
mögliche Massen $\times 10^{-3}$ [g/mol]	70 - 110	55 - 100	50 - 65	23 - 27	26 - 29

Zusammenfassung der Ergebnisse aus der analytischen Ultrazentrifugation

Mit analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß das Fv-Antikörperfragment Fv7E2 in Fusion mit dem Coil-Ser-Peptid (Fv7E2-CS) hauptsächlich als Partikel mit der dreifachen Molmasse des monomeren Fv-Fragmentes vorliegt und die Fähigkeit hat, mit seinem Antigen einen Partikel mit der dreifachen Molmasse des monomeren Komplexes zu bilden. Nach Inkubation in 0,05 % DDM verringert sich mit der Zeit die mittlere Molmasse des Fv7E2-CS von etwa dreifacher monomerer Masse auf einen Wert zwischen der einfachen und zweifachen Masse, bzw. der Konzentrationsanteil an Partikeln mit dreifach monomerer Molmasse nimmt ab. In Tab. 4.4 sind die wichtigsten Ergebnisse aus der analytischen Ultrazentrifugation zusammengefaßt.

Tab. 4.4: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zum Fusionsprotein Fv7E2-CS und seines Antigen-Komplexes aus der analytischen Ultrazentrifugation. Angegeben sind die Minimal- und Maximalwerte für die Anteile der jeweiligen monomeren und trimeren Zustände an der Massenverteilung in der Probe sowie in Klammern die wahrscheinlichsten Werte. Läufe in Gegenwart von 0,05 % DDM sind in der zweiten Spalte mit + gekennzeichnet. Die experimentellen Bedingungen der Läufe wurden für die Molmasse der jeweiligen trimeren Zustände optimiert (im Wesentlichen Rotorgeschwindigkeit, s. 3.7.3, S. 53), weswegen die kleineren Massenkomponenten bezüglich ihrer Molmassen und Anteile nicht gut definiert sind, und es können keine Mittelwerte für ein Protein aus den unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Läufen errechnet werden. Für Fv7E2 können keine Anteile angegeben werden, da nur Geschwindigkeitsläufe durchgeführt wurden*.

	DDM	Monomer	Trimer
Fv7E2	-	homogen*	-
Fv7E2	+	homogen*	-
Fv7E2-CS	-	< 5 %	> 94 % (96 %)
Fv7E2-CS	+	< 32 %	> 52 % (50 %)
Oxidase	+	~ 90 %	< 4 %
Fv7E2/Oxidase-Komplex	+	~ 90 %	< 4 %
Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex	+	< 65 %	> ~30 % (57 %)

4.3.4 Stabilität des Fv7E2-CS und des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes

Das mit Coil-Ser fusionierte Fv-Fragment 7E2 und sein Komplex mit der *aa₃* Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* erwiesen sich experimentell unter den getesteten, physiologischen Pufferbedingungen als leicht handhabbar. Fv7E2-CS ließ sich mit Standardmethoden und -bedingungen in Mengen ähnlich dem des unmodifizierten Fv-Fragmentes produzieren. Allerdings mußten die Waschschrte während der Affinitätschromatographie erheblich verbessert werden, um reines Produkt zu erhalten. Alle Präparationen zeigten nach Lagerung bei 4 °C über wenigstens einen Monat Funktionalität, wohl aber traten mit der Zeit gelegentlich Präzipitate auf, wie es für viele Fv-Antikörperfragmente bekannt ist.

Das Fv7E2-CS sowie sein Komplex mit Oxidase eluieren in der Gelfiltration als gut definierte Elutionsmaxima. Der Komplex zeigt sich in der Gelfiltration auch bei 30 °C, nach Einfrieren (für das Fv-Fragment allein nicht getestet) oder mehrwöchiger Lagerung bei 4 °C unverändert. Bei der analytischen Ultrazentrifugation wurde unter den verwendeten Bedingungen weder bei Proben von Fv7E2-CS noch bei Proben des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes unkontrollierte Aggregationen oder Ausfällungen festgestellt.

4.4 Charakterisierung der Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteine Fv11H9-CS und Fv17F8-CS

Die aus Produktionskulturen der Vektoren pASK68Fv11H9-CS und pASK68Fv17F8-CS nach Affinitäts-Chromatographie erhaltenen Produkte werden in der SDS-PAGE in Abb. 4.11 mit den ursprünglichen Fv-Fragmenten ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid und den beiden Fv7E2-Fragmenten verglichen. Alle vier Anti-CD28Fc-Fragmente (Fv11H9, Fv11H9-CS, Fv17F8, Fv17F8-CS) weisen unterhalb von 16,5 kDa mehr als die erwarteten zwei Banden auf. Die Banden unterscheiden sich zudem in verschiedenen Präparationen (nicht gezeigt). Fv11H9-CS besitzt in der gezeigten Präparation (Spur 4) sogar mindestens fünf Banden. Die Lage der schweren Ketten aller Produkte kann im *Western Blot* (B) leicht identifiziert werden. Eine Zuordnung der übrigen Banden zu den erwarteten leichten Ketten ist nicht möglich, da keine immunologische Nachweismöglichkeit besteht. In Fv17F8-CS könnte eventuell die schwächste der drei Banden die V_L -Kette sein, die in Fv17F8 etwa als eine 14 kDa große Bande läuft, in Fv17F8-CS dagegen als 16,5 kDa große. Die teilweise sehr kräftige 16 kDa große Bande in den letzten drei Spuren entspricht von der Laufweite der erwarteten Coil-Ser-Bande, sollte aber dann nicht in Fv17F8 auftreten (Spur 6). Eine Kontamination mit der V_L -Kette aus Fv7E2-CS bei der Streptavidin-Affinitätschromatographie, die für alle Fusionsproteine über das gleiche Säulenmaterial stattfand, konnte ausgeschlossen werden.

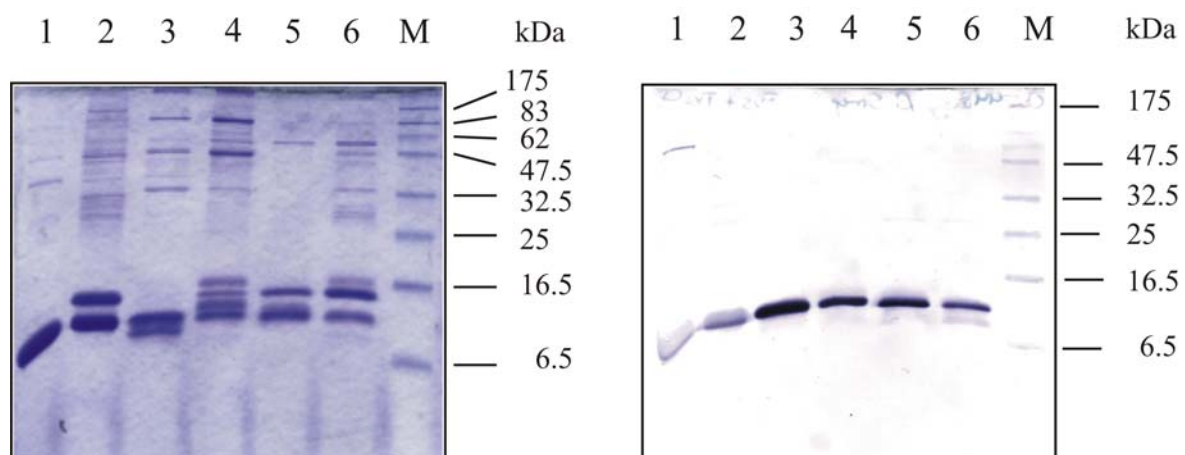


Abb. 4.11: SDS-PAGE (18 %, Comassie) (A) und Westernblot-Analyse (B) je einer Präparation der Fv-Fragmente Fv7E2, Fv11H9 und Fv17F8 mit und ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid. Spur 1: Fv7E2, Spur 2: Fv7E2-CS, Spur 3: Fv11H9, Spur 4: Fv11H9-CS, Spur 5: Fv17F8, Spur 6: Fv17F8-CS und Spur M: Molekulargewichtsstandard. Im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zum Nachweis eingesetzt.

4.4 Charakterisierung d. Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteine Fv11H9-CS und Fv17F8-CS

In der Gelfiltration zeigen Fv11H9-CS und Fv17F8-CS ein Elutionsmaximum ähnlich dem des Fv7E2-CS (1,71 - 1,76 ml), aber daneben oft ein bis zwei ungeklärte Maxima (nicht gezeigt). Bindungstests mit Fv11H9-CS und seinem Antigen CD28Fc fielen in der Gelfiltration eindeutig positiv aus (Abb. 4.12). Das Fv11H9-CS eluiert in denselben Fraktionen wie sein Antigen (B) und dadurch früher als in einer Gelfiltration ohne das Antigen (A). Eine Verschiebung des CD28Fc-Maximums zu größeren Molmassen tritt jedoch nicht ein, womit eine Oligomerisierung des CD28Fc über Fv11H9-CS folglich nicht nachgewiesen werden kann.

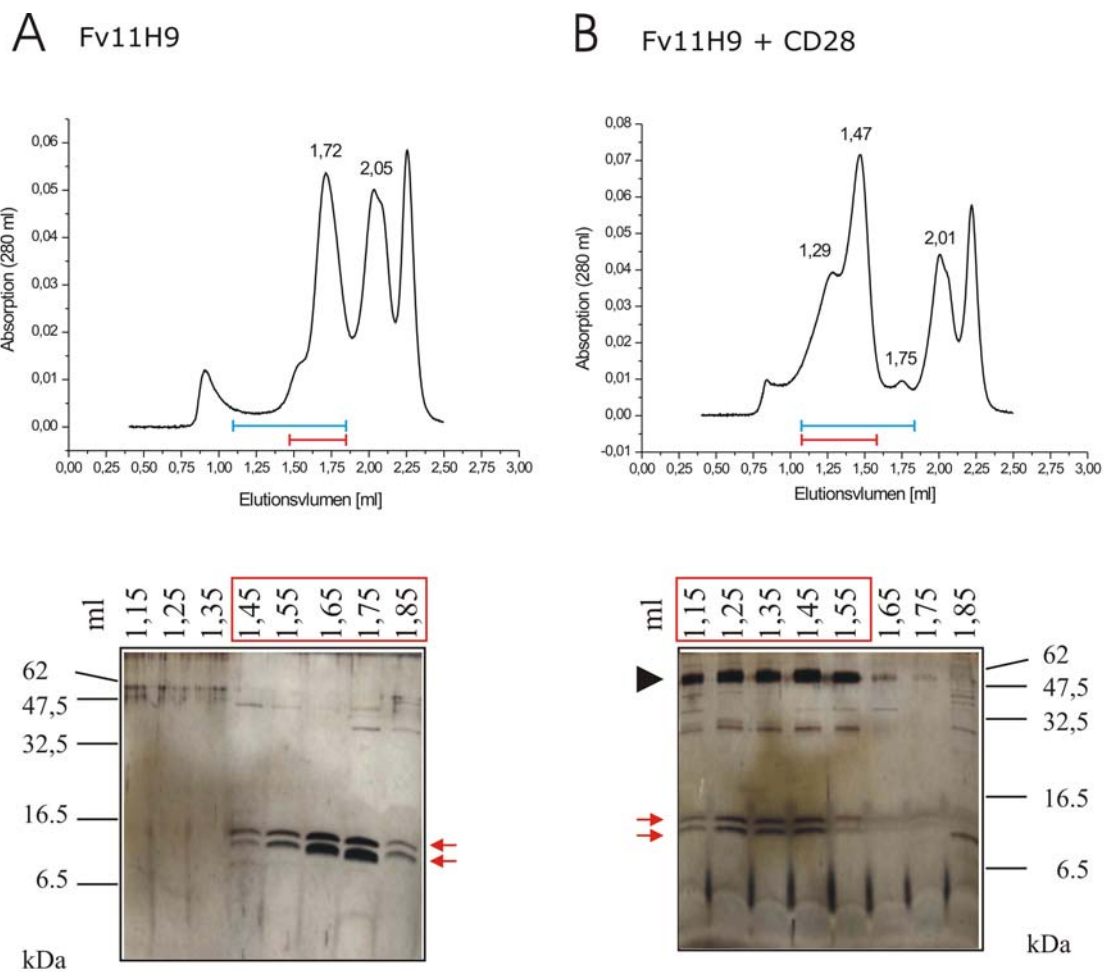


Abb. 4.12: Elutionsprofile von Gelfiltrationen und SDS-PAGE (18 %, Silber) zur Bindungsanalyse von Fv11H9-CS an CD28Fc. A) Gelfiltrationsexperiment von Fv11H9-CS B) Gelfiltrationsexperiment einer Mischung von Fv11H9-CS mit CD28Fc. Die blauen Balken in den Elutionsprofilen geben die im Gel aufgetragenen Fraktionen von 1,15 – 1,85 ml an, die roten Balken sowie die rote Umrahmung die Fraktionen, in denen das Fv-Fragment eluiert. Die Laufhöhen der Proteine sind mit einem schwarzem Pfeil (CD28Fc), bzw. roten Pfeilen markiert (leichte und schwere Kette von Fv11H9-CS). Die Gelfiltration wurde jeweils mit der Superose 6 durchgeführt. Die beiden Maxima mit einem Retentionsvolumen größer 2 ml sind Artefakte.

4.4 Charakterisierung d. Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsproteine Fv11H9-CS und Fv17F8-CS

Um in der Bindungsanalyse eine Verunreinigung mit Fv11H9 auszuschließen, wurde in einer SDS-PAGE (Abb. 4.13). Fv11H9 und Fv11H9-CS mit den an CD28Fc bindenden Banden verglichen. Deutlich ist, daß die bindenden Banden identisch mit den zwei oberen von Fv11H9-CS sind. Dabei sollte es sich in Fv11H9-CS bei der obersten Bande um die veränderte leichte Kette mit 16 kDa handeln, die in Fv11H9 in unverlängerter Form 13 kDa hat. Die Farbgebung der Silberfärbung spricht zusätzlich für diese Zuordnung.

Der gleiche Bindungstest fiel für Fv17F8-CS negativ aus. Bei Mischungen des Fv-Fragmentes mit CD28Fc konnte in der Gelfiltration keine Verschiebung der Elution des Fv in Richtung Antigen festgestellt werden (nicht gezeigt).

- Spur 1: Fv11H9 Präparation A,
- Spur 2: Fv11H9-CS Präp. A (0,5 µl),
- Spur 3: Fv11H9-CS Präp. A (0,25µl) ,
- Spur 4: CD28Fc mit Fv11H9-CS
(identisch mit Gelfiltrationsfraktion
bei 1,45 ml aus Abb. 4.12, B)
- Spur 5: Fv11H9-CS Präp. B (1 µl),
- Spur 6: Fv11H9-CS Präp. B (0,5 µl),
- Spur 7: Fv11H9 Präp. B,
- Spur 8: CD28Fc.

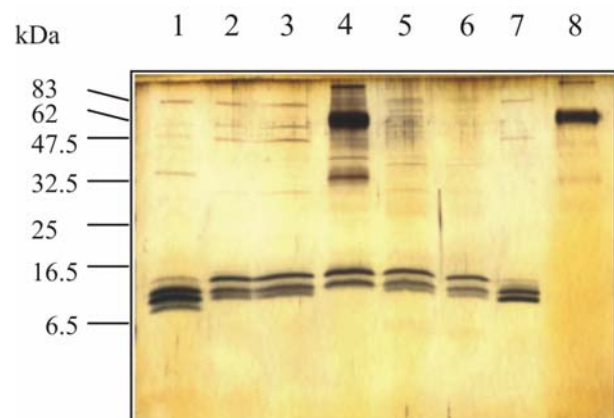


Abb. 4.13: SDS-PAGE (18 %, Silber) verschiedener Proben von Fv11H9-CS und Fv11H9 zum Vergleich mit den an CD28Fc bindenden Banden. In Spur 4 sind die an CD28Fc bindenden Banden auf gleicher Höhe mit den zwei oberen Banden von Fv11H9-CS (2,3,6,7). Die Banden des unveränderten Fv11H9 liegen deutlich unterhalb (vgl. Spur 1 mit 2 bzw. Spur 6 mit 7), womit eine Kontamination in der Bindungsanalyse des Fv11H9-CS mit unverändertem Fv11H9 ausgeschlossen ist.

4.5 Charakterisierung des Fv-Fragment-Jun-Fusionsproteins Fv7E2-Jun

Das nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie erhaltene Produkt des Fusionsproteins Fv7E2-Jun enthält in der SDS-PAGE eine starke und eine kaum sichtbare Bande (Abb. 4.14 A). Erstere ist wegen ihrer Laufweite und ihrem positiven Nachweis im *Western Blot* mit der unmodifizierten schweren Kette des Fv-Antikörperfragmentes (14,1 kDa) zu identifizieren. Die schwache Bande entspricht in ihrer Laufweite etwa der erwarteten V_L-Kette einschließlich fusioniertem Jun-Peptid (17,3 kDa). Eine immunologische Nachweismöglichkeit existiert nicht. Wenn überhaupt vorhanden, wurde folglich im Verhältnis eine viel zu geringe Menge an V_L-Kette gefunden. Eine mit dieser Probe durchgeführte Gelfiltration ergab ein Elutionsmaximum bei 1,90 ml, das nicht einmal einer Größe von Fv7E2 entsprechen würde (1,85 ml), sondern eher nicht assoziierten Fv-Fragmenten (B). Ein Bindungsexperiment mit dem Antigen fiel auf der Gelfiltration negativ aus.

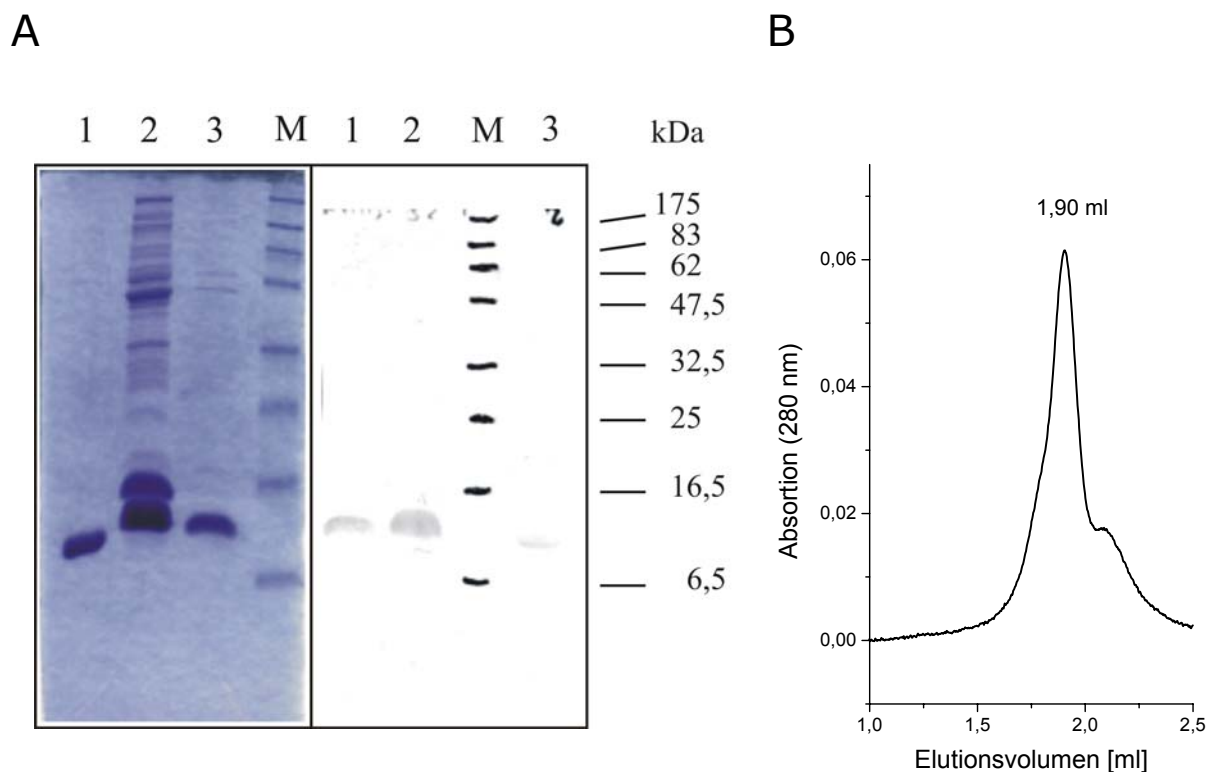


Abb. 4.14: Analyse des Fv7E2-Jun nach Streptavidin-Affinitätschromatographie. A) SDS-PAGE (15 %, Coomassie) und *Western Blot* Spur 1: Fv7E2, Spur 2: Fv7E2-CS, Spur 3: Fv7E2-Jun, M: Molekulargewichtsstandard. Im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zum Nachweis eingesetzt. B) Elutionsprofil einer Gelfiltration (Superose 6). Das Hauptmaximum von Fv7E2-Jun eluiert bei 1,90 ml. Zum Vergleich: Fv7E2-CS eluiert bei ca. 1,70 ml und Fv7E2 bei ca. 1,85 ml.

4.6 Charakterisierung einiger Antikörperfragment-SNAREs-Fusionsproteine

4.6.1 Die Fv-Fragment-SNAREs-Fusionsproteine „Fv7E2-SNAREs“

Aus Zellaufschlüssen von Produktionskulturen der Fv7E2-SNARE-Fusionsproteine konnten eindeutig Signale der V_H -Ketten von Fv7E2-Sx und Fv7E2-Sn1 erhalten werden, während die Nachweise der V_H -Ketten aus Fv7E2-Sb und Fv7E2-Sn2 unklar bzw. negativ blieben (nicht gezeigt). Die gereinigten Fusionsproteine zeigen in der SDS-PAGE (Abb. 4.15) deutliche Proteinbanden mit einer Laufweite, wie sie unveränderten Ketten von Fv-Fragmenten entspricht. Zusätzlich ist in der Präparation von Fv7E2-Sn1 eine schwache Bande sichtbar, die im *Western Blot* deutlich positiv reagiert (s. 4.19, S. 91). Sie läuft weniger weit als eine bei 22,9 kDa erwartete V_H -Kette. Bei den anderen drei Fusionsproteinen zeigte sich im gereinigten Zustand keine Färbung. Die modifizierten Ketten wurden folglich wie bei Fv7E2-Jun (s. 4.5, S. 86) nicht oder nur in geringen Mengen erhalten. Die mit gereinigtem Fv7E2-Sx und Fv7E2-Sn1 durchgeführten Gelfiltrationen zeigten ebenso wie bei Fv7E2-Jun weder bezüglich ihrer Größe noch ihrer Funktion einen Hinweis auf vollständige Fv-Fragmente.

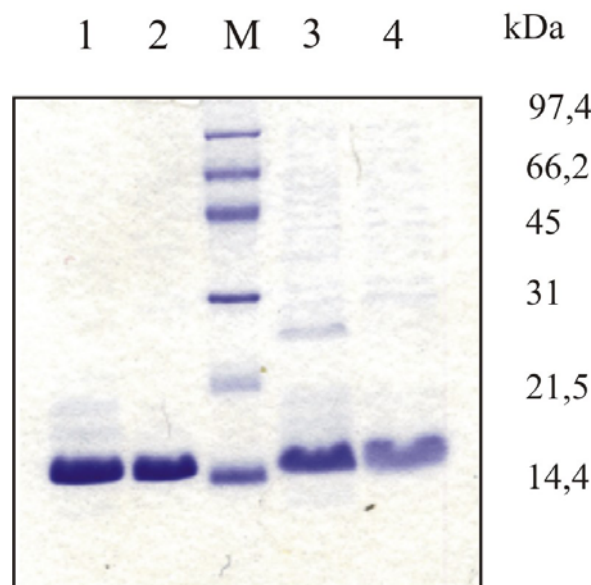


Abb. 4.15: SDS-PAGE (15 %, Comassie) mit Produkten der vier Fusionsproteine der SNARE-Peptide mit dem Fv-Antikörperfragmenten 7E2 (Fv7E2-SNAREs) nach Streptavidin-Affinitätschromatographie. Spur 1: Fv7E2-Sx, Spur 2: Fv7E2-Sb, Spur 3: Molekulargewichtsstandard, Spur 4: Fv7E2-Sn1, Spur 5: Fv7E2-Sn2.

4.6.2 Die Schwerketten-Fragment-SNARE-Fusionsproteine „F44-SNAREs“

Von den vier F44-SNAREs konnten in Zellaufschlüssen die Sx-, Sb- und Sn1-Fusionsproteine im *Western Blot* immunologisch eindeutig nachgewiesen werden, nicht aber das Sn2-Fusionsprotein (Abb. 4.16). Die Hauptbande wurde, wie hier für F44-Sn1 im Zellaufschluß zu sehen, auch in gereinigten Proben manchmal doppelt erhalten. Möglicherweise liegt das Protein in den genannten Fällen einmal ohne und einmal mit Signalpeptid vor, weil während der Produktion die proteolytische Abspaltung nicht vollständig erfolgt sein könnte. Zusätzlich ist im Sn1-Fusionsprotein eine deutlich positive Reaktion in Höhe eines unmodifizierten Fv-Fragmentes erkennbar. Sie wurde sehr oft erhalten und könnte mit proteolytischem Abbau erklärt werden.

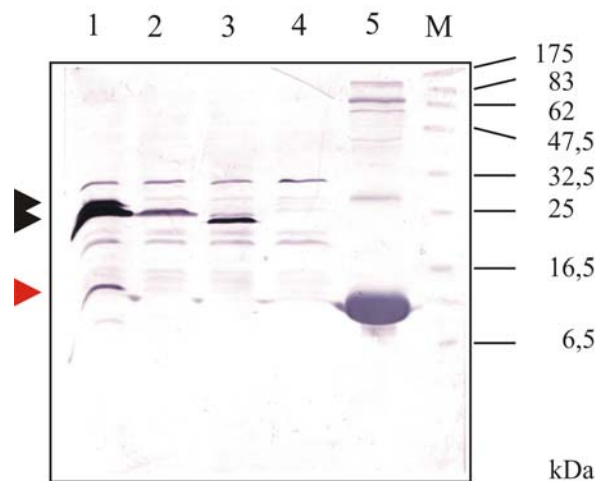


Abb. 4.16: *Western Blot* (15 %iges Gel) von Zellaufschlüssen aus Produktionskulturen der vier F44-SNARE-Fusionsproteine. Spur 1: F44-Sn1, Spur 2: F44-Sx, Spur 3: F44-Sb, Spur 4: F44-Sn2, Spur 5: Fv7E2. Spur M: Molekulargewichtsstandard. Im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zum Nachweis eingesetzt. F44-Sn1 zeigt hier eine Doppelbande (schwarze Pfeile) und eine Abbaubande (roter Pfeil).

F44-Sn1 wurde im Verlauf der Arbeiten am gründlichsten untersucht und ist nach Reinigung aus dem Periplasma in Spur 1 der SDS-PAGE in Abb. 4.17 zu sehen. Weil es nur mit geringen Ausbeuten erhalten werden konnte, wurde versucht, weitere Mengen aus kompletten Zellaufschlüssen oder aus bei der Abtrennung des Periplasmas zurückbleibenden Sphäroblastenmaterial zu gewinnen. Die zweite Spur des Gels zeigt eine solche aus Sphäroblasten präparierte Probe, die im Gegensatz zu Spur 1 starke Verunreinigungen enthält. Im *Western Blot* konnte ein positiver Nachweis des *Strep-tag* in einer Laufhöhe geführt werden (nicht gezeigt), die der Bande in Spur 1 entspricht. Reinigungen aus cytoplasmatischem Material waren wie in diesem Fall auch bei anderen Fv-Fragment-Fusionsproteinen des

vorliegenden Projektes immer sehr stark mit Proteinen aus dem Cytoplasma verunreinigt. Die Verunreinigungen konnten weder durch Verändern der Salzkonzentrationen noch durch Waschen mit geringen Konzentrationen an Elutionsmittel verhindert werden. Auf eine Verbesserung der Reinigung durch einen zweiten Reinigungsschritt wurde verzichtet, da höchstens eine Verdopplung der Ausbeute aus gesamten Zellaufschlüssen im Vergleich zu Präparationen aus Periplasmaaufschlüssen allein zu erwarten gewesen wäre. Eine Erhöhung der Ausbeuten konnte folglich durch Präparation aus cytoplasmatischem Material nicht erreicht werden.

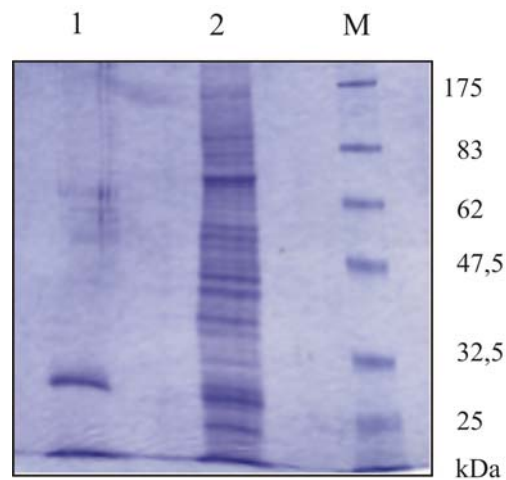


Abb. 4.17: SDS-PAGE (10 %, Coomassie) von unterschiedlichen Präparationen des F44-Sn1. Mit Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigt aus dem Periplasma (Spur 1) sowie aus den verbliebenen Sphäroblasten (Spur 2). Spur M: Molekulargewichtsstandard.

In Gelfiltrationen eluierte F44-Sn1 entsprechend seiner erwarteten Molmasse. Bindungsversuche an sein Antigen FHP auf der Gelfiltration und Oligomerisierungsversuche fielen allerdings negativ aus. Für die Oligomerisierungsversuche wurden Mischungen mit den vorhandenen anderen SNARE-Fusionsproteinen und besonders mit den von Dr. D. Fasshauer (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellten SNARE_{Ratte}-Proteinen hergestellt. Da das SNARE_{Ratte}-Helixbündel ungekocht auf eine SDS-PAGE aufgetragen erhalten bleibt, konnten die beschriebenen Proteinmischungen auch in SDS-PAGE auf Oligomerisierung untersucht werden. Diese Versuche konnten im Gegensatz zur Gelfiltration auch mit Mischungen aus Zellaufschlüssen statt mit gereinigtem Protein durchgeführt werden. Nachfolgend wurde ein *Western Blot* angeschlossen, um eventuell entstandene Komplexe zu identifizieren. Zwar konnten auf diese Weise mit den Sx-, Sb- und Sn1-Fusionsproteinen von F44 einige Hinweise auf Oligomerisierung gewonnen, aber nie vollständig verifiziert werden (nicht gezeigt).

4.6.3 Untersuchung der Produktion der SNARE-Fusionsproteine

Zur Kontrolle der Produktion der SNARE-Fusionsproteine wurden Fusionsproteine aus den SNAREs und EGFP bei gleichem Aufbau untersucht. In Proben aus frischen Produktionskulturen der EGFP-SNAREs wurden mit dem Lumineszenz-Spektrometer LS50B (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm Emissionsspektren gemessen und nahe der Fluoreszenzemissionslinie des EGFP (507 nm) ein deutliches Maximum festgestellt (509,5 nm). Das EGFP wird folglich funktionsfähig produziert; eine Aussage über die Existenz des C-Terminus des Fusionsproteins ist aber dadurch nicht möglich. Die Fluoreszenz, die im Periplasma gemessen wurde, war relativ zu der in der Kultur stark verringert. In *Western Blots* wurde in Zellaufschlüssen, Periplasma oder gereinigtem EGFP-Sn1 immer ein positiver immunologischer Nachweis des *Strep-tag* auf der erwarteten Laufhöhe von etwa 37 kDa gefunden. Sehr häufig wurden jedoch wie in den F44-SNAREs (4.6.2, S. 88) zwei dicht neben einander liegende Banden gefärbt und wie im *Western Blot* in Abb. 4.18 B auch kleinere Banden. Auch hier wird eine unvollständige Abspaltung des Signalpeptids sowie proteolytischer Abbau vermutet. In einer Streptavidin-Affinitätschromatographie von Cytoplasma einer Produktionskultur von EGFP-Sn1 konnte über einen Fluoreszenzmonitor (Fluoreszenz-Monitor RF 535, Shimadzu) verfolgt werden, daß fast alles fluoreszierende Protein nicht auf der Säule gebunden blieb (nicht gezeigt).

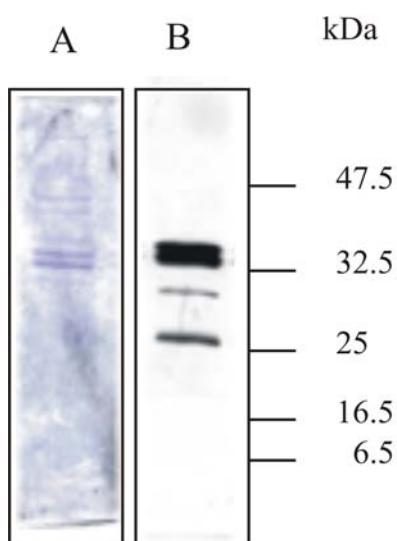


Abb. 4.18: A) SDS-PAGE (15 %, Coomassie) und B) *Western Blot* von EGFP-Sn1 nach Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zum Nachweis eingesetzt.

Bei allen SNARE-Fusionsproteinen wurden über den immunologischen Nachweis des *Strep-tags* in *Western Blots* nach Zentrifugationen von Zellaufschlüssen deutliche Mengen der Proteine in unlöslichen Fraktionen gefunden. Abb. 4.19 zeigt dazu Analysen nach Expression von EGFP-Sn1 und Fv7E2-Sn1 im Vergleich zu Fv7E2. Im *Western Blot* wurden Periplasmaaufschlüsse, sowie die lösliche und unlösliche Fraktion ihrer Zellaufschlüsse auf das jeweilige Produkt untersucht. Die Kontrolle Fv7E2 ist fast ausschließlich in der löslichen Periplasmapräparation zu finden. Die modifizierte, schwere Kette von Fv7E2-Sn1 zeigt sich zwar auch deutlich im löslichen Periplasma, aber ebenso im unlöslichen Zelniederschlag. EGFP-Sn1 ist ausschließlich im unlöslichen Zelniederschlag deutlich.

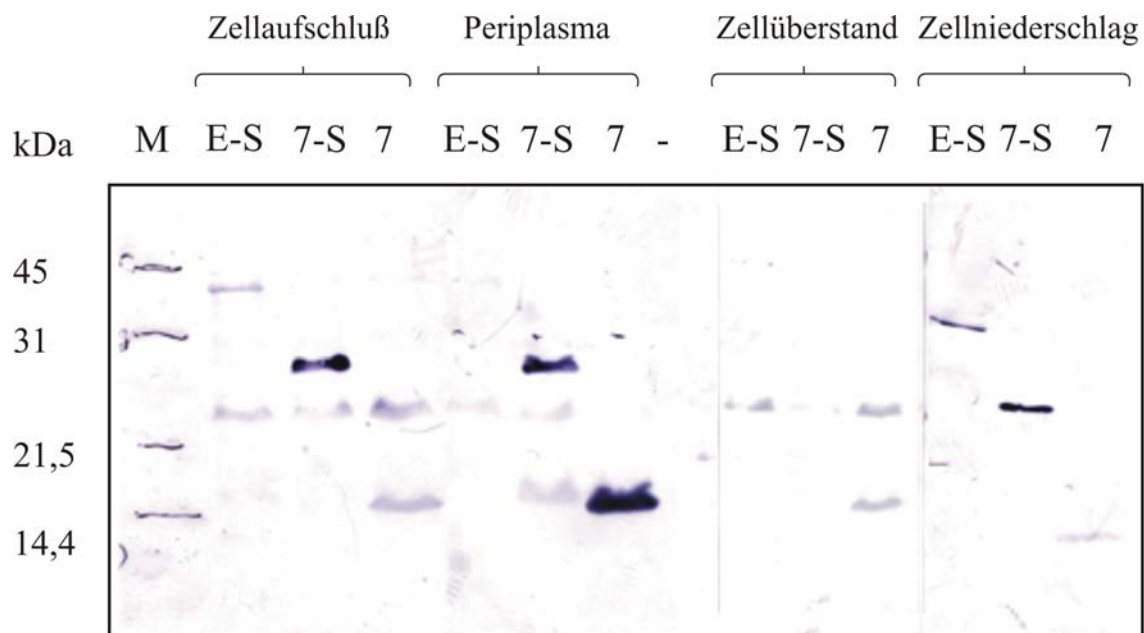


Abb. 4.19: *Western Blot* (15 %iges Gel) von unterschiedlichen Präparationen aus Produktionskulturen verschiedener SNARE-Fusionsproteine. Von den drei Fusionsproteinen EGFP-Sn1, Fv7E2-Sn1 und Fv7E2 wurden jeweils Zellaufschluß, Periplasma, Zellüberstand sowie Zelniederschlag aufgetragen. Dabei handelt es sich um aufgeschlossenes Zellmaterial, Überstand des Periplasmaaufschlusses sowie nach Zentrifugation (60000 g) des Zellaufschlusses sein Überstand und sein Niederschlag. M: Marker, E-S: EGFP-Sn1, 7-S: Fv7E2-Sn1, 7: Fv7E2. Im *Western Blot* wurde Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat zum Nachweis eingesetzt.



5 Diskussion

5.1 Herstellung funktionsfähiger Antikörperfragment-Peptid-Fusionsproteine

5.1.1 Produktion

Die Produktion der gewünschten Fusionsproteine aus Fv-Fragmenten und Peptiden stellte sich im Verlauf des Projektes als schwierig dar. Hauptsächlich wurde mit der für Fv-Fragmente etablierten periplasmatischen Produktion in *Escherichia coli* gearbeitet, mit der die möglichen Produktionsausbeuten mit 0,1 – 2 mg/l Kultur generell niedrig sind (Angaben für *scFvs*, Gram und Ridder, 2001). Besonders zur Untersuchung möglichst vieler rekombinanter Proteine stellt aber die Produktion in *E. coli* wegen seiner guten Handhabbarkeit zunächst das System der Wahl dar. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Fusionsproteine aus Fv-Fragment und Helixbündeln wurden ebenso auf diese Weise entwickelt.

Im vorliegenden Projekt wurden die Coil-Ser-Fusionsproteine Fv7E2-CS und Fv17F8-CS nach der Reinigung mit ähnlichen Ausbeuten wie die entsprechenden Fv-Fragmente ohne das Peptid erhalten. Bei Fv11H9-CS jedoch war die Ausbeute gegenüber Fv11H9 erheblich verringert. Die Verringerung der Ausbeute durch die Fusionierung der Peptide wurde auch an den Ergebnissen der übrigen Fv7E2-Fusionsproteine offensichtlich. Bei Fv7E2-CS überwog die Menge an unmodifizierter Kette deutlich die Menge der Kette mit fusioniertem Coil-Ser-Peptid. Bei Fv7E2-Jun und den Fv7E2-SNAREs war die modifizierte Kette sehr wenig bis gar nicht vorhanden, die unmodifizierte dagegen konnte immer produziert werden. Die Versuche, die unterhalb von 0,1 mg/ml liegenden Ausbeuten durch Variation der Bedingungen oder Produktion im Cytoplasma zu steigern, zeigten keinen merklichen Erfolg.

Daß auch die Art bzw. die Sequenz des fusionierten Peptids die Ausbeuten beeinflusste, machen besonders die Ergebnisse der SNARE-Fusionsproteine deutlich. Die Sn2-Fusionsproteine konnten unabhängig von der Art des N-terminalen Fusionspartners nie als Expressionsprodukte nachgewiesen werden, die Sn1-Fusionsproteine dagegen waren sowohl bei den F44-SNAREs als auch den Fv7E2-SNAREs am stärksten vertreten.

Dem geringen Erfolg der Produktion der SNARE-Peptide und des Jun-Peptides mit Fv-Fragmenten stehen in der Literatur einige erfolgreiche Fusionsproteine mit anderen Proteinen statt Antikörperfragmenten gegenüber. Etwas längere Abschnitte von Syntaxin-1A als die für das vorliegende Projekt gewählten (AS 180 - 264) sowie von Synaptobrevin II (AS 1 – 94) und das SNAP25A in voller Länge wurden beispielweise als C-terminale Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase sowie auch ohne Fusionspartner mit

N-terminalem *Hexahistidin-tag* cytoplasmatisch mit T7-Expressionssystemen produziert (z. B. Pabst *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenzen der hier aus Ratte stammenden Proteine sind in den für die vorliegenden Arbeiten verwendeten Abschnitten aus Mensch identisch. Zwar neigen die Helices ohne Fusionspartner generell zur Präzipitation, doch ist lediglich von Sn1 und Sn2, beides Abschnitte aus SNAP25a, bekannt, daß ihre separate Produktion zu Schwierigkeiten führt (Dr. D. Fasshauer, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, mündl.). Das Jun-Peptid wurde bereits als Dimerisierungsdomäne in einzelnen Fusionsproteinen mit Fab- sowie Fv-Fragmente eingesetzt. Die Fab-Fragment-Fusionsproteine wurden in Maus-Hybridomazellen (Kostelny *et al.*, 1992) produziert, die Fv-Fragment-Fusionsproteine wie im vorliegenden Projekt periplasmatisch in *E. coli*, aber in anderen Stämmen und Vektor-Systemen (Cocca *et al.*, 1999, de Kruif *et al.*, 1996).

5.1.2 Proteolyse

Ein kritischer Punkt für die Produktion der Fv-Fragment-Peptid-Fusionsproteine neben Schwierigkeiten während der Produktion, könnte Proteolyse vor und während der durchgeführten Affinitätsreinigungen sein. Da in den Fv7E2-SNARE-Fusionsproteinen nicht die unmodifizierten, sondern die modifizierten Ketten mit den SNARE-Peptiden den Affinitäts-*tag* trugen, kann anders als mit Proteolyse kaum erklärt werden, daß nach den Reinigungen die unmodifizierten Ketten ohne den Affinitäts-*tag* in der Ausbeute immer stark überwogen. Da die beiden Ketten des Fv-Fragmentes nicht kovalent miteinander verbunden sind, kann eine Reinigung der Kette ohne *Tag* nur über die Assoziation an die Kette mit dem *Tag* stattfinden. Auch das Ergebnis der Fluoreszenzmessung während der Reinigung von EGFP-Sn1 könnte für stattgefundene Proteolyse sprechen. Der Hauptteil der Fluoreszenzaktivität der Probe, die nur vom N-terminalen EGFP verursacht worden sein kann, hat nicht an der Säule gebunden. Das bedeutet, daß der Affinitäts-*Tag* am C-Terminus des Fusionsproteins nicht ausreichend bindefähig oder vielleicht nach Proteolyse nicht mehr vorhanden war.

Längliche oder ungeordnete Strukturen in Proteinen sind für Proteasen angreifbarer als globuläre geordnete Domänen. Gerade bei den fusionierten Peptiden handelt es sich aber um entweder helikal längliche oder ungeordnete Strukturen. In der Literatur geht man davon aus, daß die α -Helixbündel bildenden Peptide im monomeren Zustand hauptsächlich ungeordnet und nicht helikal vorliegen. Dieses Phänomen könnte besonders bei dem heteromeren SNARE-Bündel Schwierigkeiten machen. Die SNARE-Peptide waren mit Abstand die längsten der während dieser Arbeiten getesteten Fusionspeptide (76 Aminosäuren gegenüber 29 des Coil-Ser-Fusionsproteins und 40 des Jun-Fusionsproteins). Je größer aber eine

ungeordnete Struktur im Protein ist, um so eher kann es zu störenden Wechselwirkungen kommen. Die Faltung der anderen Domänen kann gestört werden und die Angriffsmöglichkeit für Proteasen wird stark erhöht.

Die Wahl der Sequenz des *Linkers* zwischen Peptid und Protein innerhalb des Fusionsproteins ist wichtig bezüglich spezifischer Proteolyse. Der *Linker* in den SNARE-Fusionsproteinen basiert auf einem, der zur Herstellung von *single-chain*-Fv-Fragmenten als Verbindung zwischen den beiden Ketten eines Fv-Fragmentes entwickelt worden war. Für die vorliegenden Arbeiten wurden an dem *Linker* zwei Aminosäureaustausche vorgenommen (s. 4.1.4, S. 61). Für das entfernte Prolin wurde aber von Withlow *et al.* (1993) gezeigt, daß es proteolytischen Abbau deutlich verringert.

5.1.3 Die unterschiedliche Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine

Bei den gut produzierbaren und teilweise funktionsfähigen Coil-Ser-Fusionsproteinen handelt es sich um einen *Linker*, der schon in dem dimeren Fv-Fusionsprotein von Pack und Plückthun (1992) erfolgreich eingesetzt worden war. Der Einsatz des gleichen *Linkers* in Fv7E2-Jun bei gleichem Aufbau des Fusionsproteins, brachte aber ähnlich negative Ergebnisse wie die der SNARE-Fusionsproteine.

Da die getesteten Fusionsproteine unterschiedliche Kombinationen derselben Proteine und Peptide darstellen, ist offensichtlich, daß sich nicht beispielsweise eines der Proteine leicht mit allen Peptiden als funktionsfähiges Fusionsprotein herstellen läßt oder umgekehrt. Ganz im Gegenteil war nur eine einzige Kombination im Hinblick auf die erwünschte Oligomerisierungsfunktion erfolgreich, nämlich das Fv-Antikörperfragment-Coil-Ser-Fusionsprotein Fv7E2-CS.

Die beiden anderen Coil-Ser-Fusionsproteine, Fv11H9-CS bzw. Fv17F8-CS, ließen sich zwar in brauchbaren Mengen herstellen, aber in der SDS-PAGE zeigten sich mehr als nur die zwei zu erwarteten Proteinbanden. Außerdem war in den Gelfiltrationsprofilen der beiden Fusionsproteine zwar jeweils ein Maximum mit einer apparenten Molmasse ähnlich der von Fv7E2-CS sichtbar, doch oft zusätzlich ein Maximum wie das eines unmodifizierten Fv-Fragmentes. Die gleichen unerklärlichen Phänomene aus SDS-PAGE und Gelfiltration traten bereits bei den Fv-Fragmenten ohne das fusionierte Coil-Ser-Peptid auf, was generelle Probleme in der Struktur dieser Fv-Fragmente bedeuten und sich dann auch bei der Funktionsfähigkeit der Coil-Ser-Fusionsproteine negativ bemerkbar machen könnte. Widersprüchlich ist besonders, daß trotz eines Gelfiltrationsmaximums mit der erwarteten apparenten Masse und der nachgewiesenen Bindung von Fv11H9-CS an das Antigen, eine

Oligomerisierung des Antigens nicht sichtbar wurde. Eventuell könnte das Fv-Fragment trimerisiert, aber nur eine Bindestelle funktionsfähig sein, weil die beiden anderen sich gegenseitig sterisch behindern. Ultrazentrifugationsexperimente wurden wegen der offensichtlich unvollständigen Funktion nicht unternommen.

Genau wie das Coil-Ser-Peptid war auch das Fv-Fragment Fv7E2 in den anderen Fusionsproteinen außer Fv7E2-CS, nämlich den Fv7E2-SNAREs und dem Fv7E2-Jun, nicht funktionsfähig. In allen diesen Konstrukten konnte kaum oder gar nicht die um das Peptid verlängerten Ketten nachgewiesen werden. In Gelfiltrationen waren keine Maxima vollständig assoziierter Fv-Fragmente sichtbar, sondern nur die Maxima einzelner Ketten. Auch fielen dennoch durchgeführte Bindungstests mit dem Antigen negativ aus. Die geringe oder vielleicht vollkommen fehlende Produktion der modifizierten Ketten können neben proteolytischen Abbau auch deutliche Faltungsschwierigkeiten bedeuten, so daß trotz Vorhandensein geringer Mengen keine Bindung möglich ist. Die selben Faltungsschwierigkeiten können bei F44-Sn1 die Antigen-Bindung verhindert haben. Das Schwereketten-Antikörperfragment F44 ist aber bisher noch wenig charakterisiert und wurde hier zum ersten Mal als lösliches Protein außerhalb des *phage display*-Systems, mit dem es entwickelt worden war, produziert.

Weder bezüglich der Produktion noch bezüglich der Funktion der Fusionsproteine kann eine Abhängigkeit von der Auswahl der schweren oder leichten Kette für die Modifizierung festgestellt werden. Die SNARE-Fusionsproteine mit Fv7E2 fanden über die V_H-Kette statt, das Jun-Peptid wurde wie das Coil-Ser-Peptid an die V_L-Kette fusioniert.

Die niedrigen Produktionsmengen an löslichem Fusionsprotein erschwerten die Untersuchung der Funktion der Antikörper-Peptid-Fusionsproteine sehr. Auf der einen Seite waren die Gesamtausbeuten bei der Produktion bereits sehr gering, zum anderen gehörte ein guter Anteil des produzierten Fusionsproteins bereits in Zellaufschlüssen den Zentrifugationsniederschlägen an. Gereinigte Produkte neigten stark zur Präzipitation. Durch Änderung des Produktions- und Reinigungssystems und Variation der Standardbedingungen der verwendeten Systeme gelang es aber nicht, mehr lösliches Protein zu produzieren.

5.2 Wahl der Methoden zur Bestimmung der oligomeren Zustände

Die naheliegendste Möglichkeit, die Oligomerisierungsfunktion der im Projekt entwickelten Fusionsproteine zu überprüfen, war die Bestimmung ihrer nativen Molmassen.

Für das vorliegende Projekt sind die Anforderungen an die Molmassenbestimmungen gegenüber der Bestimmung oligomerer Zustände natürlicher Proteine erhöht. Denn bei der künstlichen Oligomerisierung eines Proteins durch ein oligomerisierendes Peptid, muß damit gerechnet werden, daß sich durch Fehlfaltungen unerwartete Komplexe bilden. Die Faltung des Fv-Fragmentes und die Assoziierung seiner beiden Untereinheiten kann durch das fusionierte Peptid gestört sein und auch etwa die Tendenz zur Assoziierung gleicher variabler Ketten gefördert werden. Bei der Bildung des Fv-Fragment/Antigen-Komplexes kann es selbst bei korrekt gefaltetem und oligomerisierten Fv-Fragment zu unerwarteter Stöchiometrien kommen, da die Besetzung aller Bindestellen mit Antigenen durch ihre gegenseitige sterische Behinderung gestört sein kann.

Die für Molmassenbestimmungen zur Verfügung stehenden Methoden, beispielsweise die native Gelelektrophorese und die Gelfiltration (Größenausschluß-Chromatographie) liefern meist nur sehr grobe Werte. Die beiden genannten Methoden sind zwar mehr oder weniger ohne großen Aufwand zu bewerkstelligen, zeigen aber neben ihrer generellen Ungenauigkeit auch eine Abhängigkeit von zusätzlichen Eigenschaften des Proteins wie Form oder Ladung. Die Gelfiltration konnte im Projekt aber gut für eine erste Einschätzung der Oligomerisierungsfähigkeit der Fusionsproteine verwendet werden.

Wesentlich genauer und unabhängig von weiteren Proteineigenschaften sind die im Projekt eingesetzten Sedimentations-Gleichgewichtsexperimente in der analytischen Ultrazentrifuge, die standardgemäß zur Bestimmung oligomerer Zustände von Proteinen verwendet werden. Die Methode ist normalerweise mit wenig Aufwand und keiner Modifizierung des Proteins verbunden, so daß da sie ohne Schwierigkeiten an jedes Protein angepaßt werden kann und dessen nativen Zustand in Lösung zeigt. Eine weitere Möglichkeit wären Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung.

Eine Alternative zur Untersuchung des nativen Zustandes stellt dar, die Untereinheiten des Proteins erst chemisch miteinander zu verbinden und dann denaturierende Methoden anzuwenden, wie zum Beispiel SDS-Gelelektrophorese oder Massenspektroskopie.

5.3 Das Fv-Fragment-Coil-Ser-Fusionsprotein Fv7E2-CS

5.3.1 Analyse des oligomeren Zustandes von Fv7E2-CS

Gelfiltration

Während der Gelfiltration erfährt das Fv7E2-CS im Vergleich zum ursprünglichen Fv7E2 ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid eine deutlich geringere Retention. Die Veränderung ist so groß, daß sie normalerweise nicht allein durch den Volumen- bzw. Massenzuwachs des Fragmentes um das Coil-Ser-Peptid allein (2,3 kDa) erklärbar ist. Einen Beweis dafür kann diese Analysemethode aber nicht liefern. Eine geringere Retention könnte bei nicht stattgefundenener Oligomerisierung auch durch Wechselwirkungen des teilweise hydrophoben Peptids mit dem Säulenmaterial begünstigt werden. Nimmt man dagegen die Trimerisierung des Fv-Fragmentes an, liegt nach den Standardwerten eine zu kleine Molmasse vor, was sich außer durch die Ungenauigkeit der Methode nicht systematisch erklären läßt. Eher sollte die erwartete nicht-globuläre Form des trimeren Fv-Fragmentes zu einer scheinbaren größeren Molmasse als dem dreifachen führen (s. im Vergleich dazu den Komplex).

Analytische Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugationsanalyse des Fv7E2-CS lieferte ein Ergebnis, das sehr gut den Erwartungen von einem trimeren Fv-Fragment entspricht und auch statistisch gut abgesichert ist. Die Datensätze lassen sich an Modelle mit nur einem einzigen Partikel anpassen, was eine sehr große Homogenität der Probe bedeutet. Die aus diesem Modell errechnete wahrscheinlichste mittlere Masse von etwa 86 kDa liegt zwar trotz der Fehlertoleranz von ± 2 kDa knapp unterhalb der dreifachen monomeren Molmasse des Fv7E2-CS (90 kDa) und in der Anpassung an eine Massenverteilung mehrerer Partikel wird ein kleiner Konzentrationsanteil von mindestens einigen wenigen Prozent kleinerer Massen benötigt. Insgesamt spricht das Ergebnis aber eindeutig für eine zumindest fast vollständige Trimerisierung des Fv-Fragmentes. Der etwas zu niedrige Wert für die erwartete dreifache Molmasse bzw. der Konzentrationsanteil an kleineren Partikeln könnte am wahrscheinlichsten durch einen geringen Anteil an nicht vollständig assoziierten Fv-Fragmenten erklärt werden. Auf der anderen Seite ist eine 100 % Assoziierung zum Trimer gar nicht zu erwarten, da für das Coil-Ser-Peptid wie für alle Helix-Bündel ein reversibles Gleichgewicht zwischen monomeren Peptiden und oligomerer Form beschrieben wird (s. 5.3.3, S. 103).

Das Kontrollprotein, Fv7E2 ohne fusioniertes Coil-Ser-Peptid, war in Geschwindigkeitsläufen eindeutig von monomerer Größe, weswegen auf Analysen dieses Proteins in

Gleichgewichtsläufen verzichtet wurde. Durch den Vergleich der Ergebnisse beider Fv-Fragmente kann mit Sicherheit ausgesagt werden, daß unter den getesteten Bedingungen das fusionierte Coil-Ser-Peptid beim Fv-Antikörperfragment 7E2-CS einen Zustand mit einer im Vergleich zum Monomer etwa verdreifachten Masse bewirkt.

5.3.2 Analyse des oligomeren Zustandes des Antigen-Komplexes von Fv7E2-CS

Gelfiltration

Das Retentionsvolumen des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes auf der Gelfiltration ist im Vergleich zu dem des Fv7E2/Oxidase-Komplexes so deutlich verkleinert, daß hier die Veränderung unmöglich mit der Molmasse, der Hydrophobizität oder der Form eines angehängten Peptides der Länge von 29 Aminosäuren erklärt werden kann. Das gilt besonders, wenn man die kaum voneinander zu unterscheidenden Retentionsvolumina der Oxidase mit oder ohne gebundenem Fv7E2 bedenkt. Durch diese Vergleiche der sonst strukturell sehr ähnlichen Proteinkomplexe ist es viel eher als nur mit den Standardwerten möglich, einen oligomeren Zustand als Ursache des großen Volumens anzunehmen. Die sich aus den Standardwerten ergebende starke Tendenz zur vierfachen Molmasse des Komplexes könnte außer durch die Ungenauigkeit der Methode durch die nicht-globuläre Form des erwarteten trimeren Komplexes erklärbar sein. Ein Hinweis auf Tetramerisierung oder höhere Oligomerisierung des Coil-Ser-Peptides wurde in der Literatur nicht gefunden und von einer Veränderung seiner Stöchiometrie durch die Fusion an ein Protein ist nicht auszugehen. Insgesamt läßt sich aus den Gelfiltrationsergebnissen selbstverständlich keine Molmasse bestimmen, sie unterstützen aber besonders durch das eher zu große Retentionsvolumen die Erwartungen, die an die Elutionseigenschaften eines trimerisierten Komplexes in der Gelfiltration gestellt werden.

Analytische Ultrazentrifugation

Für die Anpassungen der Daten aus den Sedimentations-Gleichgewichtsläufen der Proben des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes war immer ein deutlicher Anteil (> 35 %) einer Massenkompone mit der dreifachen Molmasse des Komplexes notwendig. Die Verdreifachung der Molmasse wird allein durch die Fusion des Coil-Ser-Peptides an das Fv-Fragment 7E2 bewirkt, da bei derselben Proteinkonzentration sowie derselben Rotorgeschwindigkeit weder in Proben der Oxidase alleine noch ihres Komplexes mit Fv7E2 eine Komponente ähnlicher Molmasse mit bedeutendem Anteil gefunden wurden. Eine solche Massenkompone konnte

in den Kontrollproben zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, war aber mit Sicherheit nur höchstens in Anteilen von 3 - 4 % enthalten.

Für die Analyse der Datensätze wurden hauptsächlich Modellanpassungen mit sechs vorgegebenen Massen untersucht. Die für die Aussage am wichtigsten Modelle sind in Tab. 5.1 nach ihren kleinsten Fehlerquadraten geordnet aufgelistet. Die Fehlerquadrate werden hier χ^2 nicht χ^2_{\min} genannt, da verschiedene Modelle mit einander verglichen werden. Das χ^2 des Modelles, das als wahrscheinlichstes Ergebnis angenommen wird, wird als χ^2_{\min} bezeichnet.

In allen Modellen wird jeweils die vorgeschlagene größte und kleinste Masse bzw. die Masse in trimerer bzw. monomerer Größenordnung angenommen. Es sind keine Mengenteile der dazwischen liegenden Massen notwendig, um die experimentellen Daten zu erklären.

Neben den Vielfachen des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes wurden Vielfache der Oxidase selbst berücksichtigt, da bei der Anpassung der Daten aus Gleichgewichtsläufen ihrer Proben zusätzlich zu ihrer monomeren Masse kleine Mengen an größerer Masse benötigt wurden. Diese größere Massenkomponekte konnte bei Vorgabe der Vielfachen der Molmasse der Oxidase mit 1 % Dimeren und 3 % Trimeren der Oxidase angepaßt werden. Gibt man diese Information als feste Konzentrationsanteile der Vielfachen der Masse der Oxidase in den Modellanpassungen der Daten des Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplexes vor, verringert sich der Anteil des Komplexes nur geringfügig (Modell 3). Dieses Vorgehen soll aber nicht als Nachweis für oligomere Zustände der Oxidase gelten, sondern die Auswertung der Daten des Komplexes absichern. Viel eher wird eine leichte Verunreinigung angenommen, da die Literatur nicht über oligomere Zustände der Oxidase berichtet.

Die größte Komponente im Gemisch läßt sich gut mit der dreifachen Molmasse des Komplexes von Oxidase und Fv7E2-CS korrelieren wie in Modell 2 und 3 zu sehen ist. In zusätzlichen Modellen wurde die Molmasse dieser Komponente variiert, um die Signifikanz des vorausgesetzten Wertes von 483 kDa zu überprüfen, besonders im Hinblick auf die erwähnten möglichen unerwarteten Komplexbildungen. Dabei wurde χ^2 um so größer, also um so unwahrscheinlicher das Modell, je kleiner der Massenwert für den Komplex vorausgesetzt worden war. Subtrahiert man beispielsweise 50 kDa vom vorausgesetzten Wert wird χ^2 mehr als 3 % größer, also nicht mehr akzeptabel (Modell 4). Dagegen hat Modell 1 mit 533 kDa das kleinste χ^2 , was der 3,3fachen Molmasse des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes

entspricht. Das Modell unterstreicht damit die Tendenz zur eher größeren als kleineren Molmasse.

Sehr wichtig ist die Aussage der Modelle 5 und 6, denen mit 353 kDa die Molmasse eines trimerisierten Fv7E2-CS mit nur zwei gebundenen Oxidasen vorgegeben wurde. In Modell 5 wird die dreifache Molmasse der Oxidase (390 kDa) mit 100 % angenommen, da es nun die insgesamt größte Masse im Modell ist. χ^2 ist aber im Vergleich zu Modell 1 und 2 um 26 % erhöht und damit nicht akzeptabel. Die Hauptkomponente im Gemisch muß also größer sein als eine hypothetische trimere Oxidase und deutlich größer als ein nur unvollständig mit Antigen abgesättigter Komplex. Dieser wird auch erst angenommen, wenn der Anteil an trimerer Oxidase gleich Null gesetzt wird (Modell 6). Das χ^2 ist hier vollkommen unrealistisch vergrößert.

Bei Modellanpassungen mit zusätzlich zum dreifachen Komplex höheren oligomeren Massen wurde das vierfache nicht ausgeschlossen, war aber nicht notwendig und χ^2_{\min} wurde dadurch nicht verbessert. Wie bereits bei der Diskussion der Gelfiltration erläutert, wird eine Tetramerisierung über das Coil-Ser-Peptid nicht angenommen.

Aufgrund der beschriebenen statistischen Absicherungen wird der trimere, mit drei Oxidasen abgesättigte Komplex als wahrscheinlichste Erklärung für die experimentellen Daten angesehen. Die Annahme einer Absättigung aller drei Bindestellen wird durch das in der Gelfiltration im Vergleich zu Standardwerten ermittelte, mehr als dreimal große Molmasse unterstrichen.

Die Massen im monomeren Größenbereich sind in den aufgenommenen Datensätzen nicht gut definiert, da die Rotorgeschwindigkeit optimal zur Analyse der Masse des trimeren Komplexes gewählt worden war. Alle Modelle nehmen die ungebundene Oxidase und nicht den monomeren Komplex als monomere Masse an, doch sind beide Massen aufgrund der χ^2 -Werten ihrer Konzentrationsanteile in den Modellen gegeneinander austauschbar (nicht gezeigt). Zu einem kleinen Teil kann die kleine Massenkomponente durchaus von dem leichten Überschuß an ungebundener Oxidase, der dem Gemisch vor der Gelfiltration zugegeben wurde, verursacht sein. Aber der meiste Anteil sollte eher auf monomeren Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex zurückzuführen sein (s. auch 5.3.3). Denn die Bindung des unmodifizierten Fv-Fragmentes Fv7E2 an die Oxidase erweist sich in Experimenten als sehr stabil (Dr. A. Kannt, Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt, mündl.), so daß eine Dissoziation des Fv7E2-CS von seinem Antigen nach geschehener Bindung nicht angenommen wird. Durch die nach der Gelfiltration vorgenommene Selektion der Fraktionen

sollte deswegen hauptsächlich komplexiertes Protein in Ultrazentrifugationsanalyse eingesetzt worden sein. Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß durch die Modifizierung des Fv-Fragmentes, besonders durch eventuelle sterische Behinderungen der Bindestellen im trimeren Fragment die Bindungsaffinitäten verändert sind. Auch dimerer Komplex konnte in der kleinen Massenkomponekte nicht ganz ausgeschlossen werden.

Tab. 5.1: Abschätzung der Signifikanz der Molmasse für die größte Masse in der Probe vom Fv7E2-CS/Cytochrom-c-Oxidase-Komplex. Die Modelle wurden alle für den selben experimentellen Datensatz erstellt und sind zeilenweise notiert, die betrachteten Massenkomponekten spaltenweise. Die rot umrandeten Modelle werden als die wahrscheinlichsten erachtet. Die Vielfachen der Oxidase stellen nur rein rechnerische Massenkomponekten dar und sollen nicht als real existierende Oxidase-Oligomere aufgefaßt werden. Die nächsten drei Spalten beinhalten Komplexe aus Fv7E2-CS und Oxidase. Die in den Modellen vorgegebenen Molmassen der einzelnen Komponekten sind fett gedruckt und die Interpretation der variierten Masse in einer Spalte angegeben. Die in der Modellanpassung erhaltenen Konzentrationsanteile der einzelnen Komponekten sind in Prozent angegeben. Die Werte der unterstrichenen Konzentrationsanteile wurden *vor* der Kalkulation festgesetzt. Die mit * bezeichneten Werte stammen aus der Auswertung des Kontrollexperimentes mit nur Oxidase alleine. Die letzte Spalte gibt das zugehörige reduzierte χ^2 des Modells an. Für den Vergleich der verschiedenen Modelle untereinander wurde χ^2 von Modell 2 als χ^2_{\min} definiert, weil es von den Voraussetzungen her als wahrscheinlichstes Modell angenommen wird.

Modell	Vielfache der Oxidase			Vielfache des Trimers			χ^2	Zuwachs von χ^2 zu χ^2_{\min}
	monomer 130 kD	„dimer“ 260 kD	„trimer“ 390 kD	monomer 161 kD	dimer 322 kD	Trimer oder variabel		
1						533 kD		
	58 %	0 %	0 %	0 %	0 %	42 %	0,3388	-1,1 %
2						483 kD		
	43 %	0 %	0 %	0 %	0 %	57 %	0,3424	χ^2_{\min}
3						483 kD		
	42 %	<u>1 %*</u>	<u>3 %*</u>	0 %	0 %	54 %	0,3441	+ 0,5 %
4						433 kD		
	17 %	0 %	0 %	0 %	0 %	83 %	0,3553	+3,8 %
5						353 kD		
	0 %	0 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0,4316	+ 26 %
6						353 kD		
	0 %	0 %	<u>0 %</u>	0 %	0 %	100 %	4,0549	>> + 100 %

5.3.3 Konzentrationsanteil des trimeren Antigen-Komplexes am Gemisch

Die Konzentrationsanteile der dreifachen Masse lagen je nach Lauf zwischen 35 – 60 %. Für genauere Aussagen müßten die experimentellen Bedingungen weiter optimiert werden. Dennoch liegt der trimere Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex in deutlich geringeren Anteilen am Gemisch vor, als es für den trimeren Zustand des Fv7E2-CS alleine gefunden wurde. Den übrigen Konzentrationsanteil im Gemisch macht hauptsächlich eine Masse in monomerer Größenordnung aus. Wie bereits erwähnt, wird der leichte Überschuß an ungebundener Oxidase höchstens zu kleinen Anteilen im Gemisch vermutet (s. auch S. 101 u.). Sehr viel mehr ins Gewicht könnten zwei andere Effekte fallen, die in den beiden folgenden Abschnitten erläutert werden.

Das Assoziationsgleichgewicht

Die Oligomerisierung von separaten Peptiden zu α -Helix-Bündeln wird auch durch das Assoziationsgleichgewicht zwischen Monomer und oligomerem Bündel bestimmt, weswegen der Anteil an oligomerisiertem Peptid abhängig von dessen Gesamtkonzentration ist. In der Literatur findet man für Helixbündel im allgemeinen Gleichgewichte, die im mikromolaren Konzentrationsbereich noch auf der Seite des Oligomeren liegen. Es werden sehr häufig Sedimentations-Gleichgewichtsexperimente mit Helixbündeln beschrieben, bei denen bei Gesamtkonzentrationen von 1–10 μM noch vollständige Oligomerisierung gefunden wird. Für noch niedrigere Konzentrationen, besonders nicht für das Coil-Ser-Peptid selbst, konnten keine experimentellen Daten, sondern nur kalkulierte Werte aus Denaturierungsexperimenten gefunden werden. Aus der Serie von Coil-Ser-ähnlichen Peptiden wurde beispielsweise für „CoilSer-V_aL_d“ berechnet, daß bei 0,31 μM Peptidkonzentration ohne Denaturans 50 % der Monomere assoziiert sind (Boice *et al.*, 1996). Das bedeutet in der Partikelverteilung des Gemisches existieren 25 % Trimere. Ein Peptid mit nur zwei zu Coil-Ser unterschiedlichen Aminosäuren zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit im meßbaren Bereich ($>7 \mu\text{M}$), so daß die Dissoziationskonstante unterhalb dieses Konzentrationsbereiches liegen muß (Thomas *et al.*, 1995). Andererseits ist aber auch bekannt, daß selbst der Austausch nur einer einzigen Aminosäure zu einer starken Verschiebung der Gleichgewichte bzw. der Stabilität der Bündel führen kann (z. B. Wendt *et al.*, 1995). Für das Coil-Ser-Peptid selbst können deswegen für diesen Konzentrationsbereich nur Vermutungen aus den erwähnten Experimenten abgeleitet werden.

In den Gelfiltrationsexperimenten, die mit Konzentrationen ab etwa $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ durchgeführt worden waren, war weder bei Fv7E2-CS noch bei seinem Antigen-Komplex

eine Konzentrationsabhängigkeit der Oligomerisierung erkennbar. Auch wurden niemals beispielsweise zwei Maxima beobachtet, etwa von monomerem und trimeren Zustand. Oligomere Zustände natürlicher Proteine können auf der Gelfiltration dagegen häufig getrennt werden, da es sich in der Regel nicht um solch schnellen Assoziationsgleichgewichten handelt wie bei α -Helixbündeln. Auffallend ist aber im vorliegenden Fall die deutlich größere Maximumsbreite im Elutionsprofil des Komplexes im Vergleich etwa zu Standardproteinen, was ein Hinweis auf das Gleichgewicht sein könnte.

In den analytischen Ultrazentrifugationsexperimenten war die Proteinkonzentration in den Proben des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes im Vergleich zu denen des Fv7E2-CS alleine etwa 100 mal niedriger. Sie wurden wie die Kontrollen bei ca. 10^{-7} M durchgeführt, da in Läufen mit etwa 1×10^{-6} M Oxidase alleine Aggregation festgestellt wurde. Es könnte in diesen Experimenten zum Komplex durchaus der für die Trimerisierung des Coil-Ser-Peptides kritische Konzentrationsbereich erreicht worden sein. Die analytische Ultrazentrifugation ist im Gegensatz zur Gelfiltration dazu verwendbar, auch kurzlebige Zustände nebeneinander aufzulösen. Zur Überprüfung, ob das konzentrationsabhängige Assoziationsgleichgewicht als Ursache für den bei der Komplexprobe geringeren trimeren Anteiles in Frage kommt, müßten aber weitere Experimente bei unterschiedlichen Konzentrationen in diesem Bereich durchgeführt werden.

Der Einfluß des Detergenz auf die Oligomerisierung

In der Gelfiltration ist höchstens ein geringer Einfluß des Detergenz DDM (0,05 %) auf Fv7E2-CS nach 3 Tage langer Inkubation erkennbar (nicht gezeigt), die aber wegen der Ungenauigkeit der Methode nicht gesichert ist. Dagegen machte sich in Geschwindigkeitsläufen sowie einem Gleichgewichtslauf mit Fv7E2-CS ein deutlicher Einfluß des Detergenz bemerkbar. Bei bis zu 7-tägiger Inkubation in DDM wurde eine verringerte mittlere Molmasse von Fv7E2-CS bzw. eine Veränderung des Monomer/Trimer-Gleichgewichtes festgestellt.

In den Ergebnissen aus den Geschwindigkeitsläufen handelt es sich um einen mittleren Massenwert aller Partikel in der Probe, da eine Aufspaltung in mehrere Massenmaxima nicht beobachtet werden konnte. Allerdings wären für diese Beobachtung deutliche Massendifferenzen der Partikel in der Probe notwendig. Es kann mit den vorliegenden Experimenten folglich nur ausgesagt werden, daß sich die dreifache Molmasse von Fv7E2-CS durch das DDM verringert, aber keine sicheren Aussagen über die oligomeren Zustände gemacht werden.

In den Modellanpassungen der Gleichgewichtsläufe konnten dagegen unterschiedlich große Komponenten festgestellt und einem Monomer/Dimer/Trimer-Gleichgewicht zugeordnet werden. Dabei ist der Konzentrationsanteil an dreifacher Masse im Gemisch zwar deutlich von mehr als 90 % auf etwa 50 % (minimal 35 %) gesunken, dennoch bleibt er auch in dieser Menge innerhalb des Modells notwendig.

Da bei dem unmodifizierten Fv-Fragment Fv7E2 kein Einfluß des DDM erkennbar war, stört das Detergenz vermutlich die Struktur des Coil-Ser-Bündels und wirkt nicht auf das Fv-Antikörperfragment selbst ein. Als Angriffsflächen für die Detergenzmoleküle wären die hydrophoben Innenseiten der Coil-Ser-Peptide denkbar. Da es aber unklar ist, auf welche Weise das Detergenz Einfluß nimmt, wird die Interpretation der Resultate erschwert. Es ist möglich, daß unerwartete Zustände entstanden sein können. Vorher abgedeckte hydrophobe Oberflächen können nun zugänglich für Aggregationsvorgänge sein. Außerdem könnten Detergenzmoleküle durch Anhaften an diesen Flächen und besonders an den hydrophoben Seiten des Coil-Ser-Peptids die Molmasse des Proteins scheinbar erhöhen, da die Experimente nicht unter Kompensationsbedingungen gemacht wurden. Der Effekt eventuell anhaftender Detergenzmoleküle als Zuwachs in den Molmassen könnte erst durch Vergleich mit Ultrazentrifugationsläufen in Detergenz unter Kompensationsbedingungen quantifiziert werden.

Da mit diesen Experimenten gezeigt werden konnte, daß der Anteil des trimeren Fv-Fragmentes Fv7E2-CS in 0,05 % DDM mit Sicherheit verringert wurde, wird auch seine Fähigkeit die Oxidase zu trimerisieren verringert. Mit diesen Kontrollexperimenten wäre der niedrigere Konzentrationsanteil an Trimer in den Proben des Komplexes gegenüber denen des Fv7E2-CS erklärbar. Es wurden sogar in Prozenten sehr ähnliche Anteile gefunden. Die bereits erwähnte größere Maximumsbreite des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplexes in der Gelfiltration könnte ebenso auf diesen Detergenzeinfluß zurückzuführen sein.

5.3.4 Stöchiometrie der eingesetzten Proteinmengen

Eine Unstimmigkeit besteht in den zur Bildung des neuen Komplexes eingesetzten relativen Proteinmengen von Fv7E2-CS zu Oxidase. Der Komplex wurde dann für vollständig mit Oxidase abgesättigt erklärt, wenn auf der Gelfiltration ein leichter Überschuß an Oxidase gesehen werden konnte. Theoretisch müßten die drei Bindungsstellen in dem trimeren Fv-Antikörperfragment-Fusionsprotein durch eine dreifache molare Menge an Oxidase abgesättigt sein. Nach den für die beiden separaten Proteinproben ermittelten Proteinkonzentrationen ergab sich aber immer ein deutlich zu kleines Verhältnis von Oxidase zu Fv7E2-CS, was eine nicht vollständige Absättigung der Bindestellen bedeuten würde. Am ehesten ist der

Grund für diese Diskrepanz in den Proteinbestimmungen zu suchen, da selbst bei einem Protein Unterschiede bei verschiedenen Methoden festgestellt wurden. Es müßte eine einzige Proteinbestimmungsmethode für beide Proteine gefunden werden, die vergleichbare Werte liefert.

5.3.5 Weitere Aspekte zu den Ultrazentrifugationsexperimenten

Trotz der komplizierten Fragestellung führte auch die für den Fv7E2-CS/Cytochrom-*c*-Oxidase-Komplex beschriebene Datenanalyse durch die vielen experimentellen und statistischen Kontrollen zu einem mit der Erwartung stimmigen und gut abgesichertem Ergebnis. Die erhöhten Anforderungen durch den vielschichtigen solubilisierten, oligomeren Proteinkomplex sollen im folgenden näher beschrieben werden.

Je mehr Komponenten unterschiedlicher Masse in einer mit Gleichgewichtsläufen untersuchten Probe vorhanden bzw. je mehr Parameter in den an die Daten angepaßten Modellen enthalten sind, um so mehr verringert sich die Qualität der statistischen Absicherung. Im vorliegenden Fall wurden Modelle mit bis zu 6 verschiedenen Massen untersucht, womit die generellen Grenzen der Analysemethode erreicht wurden.

Bei der Durchführung der Ultrazentrifugationsexperimente wurde wie beschrieben eine Dichtekompensation des Detergenz vorgenommen (s. 3.7.2, S. 52). Das verwendete DDM führt zu einem Kompensationspuffer mit einer hohen Lösungsmitteldichte ($\rho_{\text{Komp}} = (1,2065 \pm 0,0060) \text{ gcm}^{-3}$), die sehr ähnlich der Dichte der Cytochrom-*c*-Oxidase in diesem Puffer ist. Dem partialspezifischen Volumen der Oxidase $\bar{v}_{\text{Oxidase}} = (0,7820 \pm 0,0040) \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ steht ein $\rho_{\text{Komp}}^{-1} = (0,8288 \pm 0,0041) \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ gegenüber (bei 4 °C und 95 % D₂O). Beide Werte wurden in Mayer *et al.* (2002) experimentell bestimmt. Bereits für wenige andere Proteine wurden unter gleichen Pufferbedingungen sehr ähnliche Werte für \bar{v} ermittelt (z. B. Tziatzios *et al.*, in Vorbereitung). Im Vergleich dazu errechnet sich \bar{v}_{Oxidase} nach Cohn und Edsall (1943) zu $(0,7520 \pm 0,0040) \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, was auch den durchschnittlichen Werten für andere Proteine entspricht. Die geringe Differenz der Werte von \bar{v}_{Oxidase} und ρ_{Komp}^{-1} führen aber zu einem experimentellen System, das empfindlich gegenüber leichten Änderungen in diesen Parametern ist. Bei der Auswertung der Daten der Oxidase unter Verwendung des experimentell bestimmten Wertes von \bar{v}_{Komp} wurde die erwartete Molmasse mit Konzentrationsanteilen von etwa 96 % in der Probe und einer zusätzlichen, größeren Masse erhalten. Dagegen erhalte man mit einem theoretisch errechneten \bar{v}_{Komp} von $0,8157 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ (Abweichung zum experimentellen Wert 1,6 %) eine Verschiebung der Konzentrationsanteile

zu nur noch etwa 60 % monomerer Oxidase und stattdessen mehr höhere oligomere Zustände. Nach den Erfahrungen aus der Literatur erwartet man aber hauptsächlich monomere Oxidase. Deswegen und wegen der oben erwähnten Ähnlichkeit zu Ergebnissen anderer Proteine wurde der experimentell bestimmte Wert von \bar{v}_{Komp} bei der Auswertung der gezeigten Ergebnisse zum Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex und auch zu seiner zweiten Kontrolle, dem Fv7E2/Oxidase-Komplex, verwendet. Das theoretisch errechnete \bar{v}_{Komp} stellt eine Näherung dar, die für Puffersysteme niedrigerer Dichte ausreichend ist.

Für die Datenanalyse der Probe des Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex wurde mit dem partialspezifischen Volumen des vollständig abgesättigten Komplexes gerechnet. Der Wert unterscheidet sich geringfügig von dem eines nur zweifach abgesättigten ($0,7680 \pm 0,0034$ gegenüber $0,7628$). Wegen der hohen Dichte des Kompensationspuffers konnten keine Geschwindigkeitsläufe unter Kompensationsbedingungen durchgeführt werden. Bei den hohen Rotorgeschwindigkeiten, die für diese Experimente nötig sind, verändert die große Viskosität der Lösung sowie möglicherweise die Bildung eines Zuckergradienten die Sedimentationsgesetzmäßigkeiten. Damit beruhen alle Ergebnisse zum Fv7E2-CS/Oxidase-Komplex einschließlich der Kontrollen nur auf Gleichgewichtsläufen. Geschwindigkeitsläufe würden aber nur ein zusätzliche Kontrolle und zusätzliche Informationen liefern. Generell sind Gleichgewichtsläufe für die Fragestellung die geeignete und etablierte Methode.

Um die aus dem Detergenz DDM resultierenden Schwierigkeiten zu vermeiden, hätte man die Experimente in einem Detergenz geringerer Dichte durchführen können. Zwar ist die Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* bisher nur in maltosidischen Detergenzien als vollständiges „4-Untereinheiten-Enzym“ solubilisiert worden. Man könnte jedoch die Experimente in einem Detergenz geringerer Dichte wiederholen, in dem das Enzym bekannterweise nur in seiner „2-Untereinheiten-Form“ vorliegt. Die Bindestelle für Fv7E2 liegt an Untereinheit II, so daß die Oligomerisierungsexperimente auch mit dem unvollständigen Enzym möglich sind. Im vorliegenden Projekt waren sämtliche vorangegangenen Untersuchungen in der Gelfiltration in DDM mit dem 4-Untereinheiten-Enzym durchgeführt worden. Da sich die Empfindlichkeit des Systems in der analytischen Ultrazentrifugation in ihrer Stärke erst während dieser Experimente herausstellte, wurde zur Vergleichbarkeit mit diesem Detergenz fortgefahren. Es ist aber auch zu bedenken, daß für das Fv7E2-CS alleine beispielsweise in 0,2 % C₁₂E₉ keine trimere Masse nachgewiesen werden konnte. Untersuchungen in weiteren Detergenzien wurden nicht vorgenommen.

5.3.6 Antiparallelität des Coil-Ser-Bündels

Ein für das vorliegende Projekt wichtiger Aspekt war die räumliche Anordnung der Fv-Fragmente innerhalb des Fv7E2-CS-Fusionsproteins (s. 1.7, 23). Die entscheidende Tatsache für die Auswahl des Peptids Coil-Ser war die antiparallele Anordnung der drei Helices in der Röntgenstruktur des Bündels (s. 1.4.1, S. 14). Seine Antiparallelität in Lösung ist jedoch in der Literatur experimentell bisher noch nicht untersucht. Es liegt sogar ein experimenteller Beweis für die Parallelität im trimeren Bündel eines fast identischen Peptides vor (Wendt *et al.*, 1995). Dieses enthält jedoch keinen Tryptophanrest am N-Terminus, der von fast allen Autoren (z. B. Lovejoy *et al.*, 1993, Betz *et al.*, 1995, Dürr *et al.*, 2000) als die Hauptursache der Antiparallelität in Coil-Ser angesehen wird. Das Tryptophan liegt im Coil-Ser-Peptid an der ersten Position a und trägt damit wie die anderen Reste an a und d zum hydrophoben Innenraum bei. In einem parallel trimerisierten Bündel müßten aber drei Tryptophane in einer Ebene zu liegen kommen. Durch die Größe der Tryptophanseitenketten soll das laut Literatur aber nicht möglich sein, ohne die Stabilität des Bündels entscheidend zu verringern. Selbst in der antiparallelen Anordnung in der Röntgenstruktur besitzt einer der beiden gepaarten Tryptophanreste sowie das allein liegende nicht ihre günstigste Konformation. Sie werden vom hydrophoben Innenraum weggeknickt bzw. von den anderen hydrophoben Aminosäureresten aus der Ebene herausgedrängt. Auch die Leucinreste können nur in der antiparallelen Anordnung in allen Positionen ihren günstigsten Winkel einnehmen (Lovejoy *et al.*, 1993). Weiterhin errechneten Lovejoy *et al.* (1993), daß der Energiegewinn durch hydrophobe Wechselwirkung bei der antiparallelen Anordnung größer ist als bei der parallelen (33,7 zu 32,0 kcal/mol).

Eine Überprüfung der Anordnung der Coil-Ser-Peptide innerhalb des Fusionsproteins Fv7E2-CS, wie sie im Schema der Abbildung 4.1 (S. 61) prognostiziert wird, wäre für die weitere Diskussion in der Literatur lohnend (s. Ausblick, 5.4.1, S. 111).

5.3.7 Stellenwert des Fusionsproteins Fv7E2-CS im Vergleich zur aktuellen Literatur

Im vorliegenden Projekt wurde mit dem Fusionsprotein Fv7E2-CS ein neues funktionelles, oligomerisierendes Fv-Antikörperfragment unter Verwendung des trimerisierenden Peptids Coil-Ser als Fusionspartner und Oligomerisierungseinheit hergestellt. Laut Literatur wurden bisher zwei dem Coil-Ser ähnliche Peptide an die lösliche Domäne des Interleukin II-Rezeptors fusioniert und bewirkten ebenfalls eine Trimerisierung dieses Proteins (Thèze *et al.*, 1996 und Wu *et al.*, 1994).

Für Antikörperfragmente ist ein trimerisierendes Peptid als Fusionspartner neu. In der Literatur konnten nur dimere und tetramere α -Helixbündel in dieser Funktion gefunden werden. Pack *et al.* (1995) stellten mittels eines homotetrameren Helixbündel ein homotetra- valentes Fv-Fragment her. Müller *et al.* (1998) gelang durch Fusion mit einem dimerisierenden „helix-loop-helix-Motiv“ die Herstellung eines bispezifischen, tetravalenten Fv-Fragmentes und verwirklicht damit am ehesten das Ziel des vorliegenden Projektes, ein oligomeres Fv-Antikörperfragment mit gegenüberliegenden Bindestellen zu entwickeln.

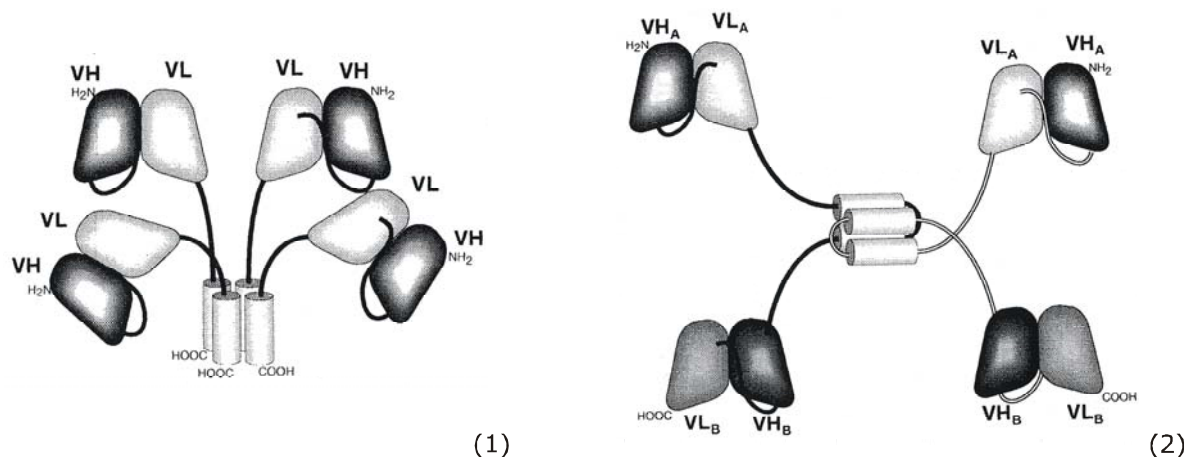


Abb. 5.1: Schematische Darstellung zweier rekombinanter, tetravalenter *scFv*- Fragmente (Abbildung aus Lindner und Plückthun, 2001). (1) das homotetra- valente „scTetrazip“-Fusionsprotein mit vier gleichen Fv-Fragmenten (Pack *et al.*, 1995) und (2) das heterotetra- valente „di-bi-miniantibody“-Fusionsprotein aus zwei unterschiedlichen Fv- Fragmenten (Müller *et al.*, 1998). Die *Linker* sind in Linien dargestellt, die Helices als Zylinder. Die Orientierungen der Fv-Fragmente sind abgeleitet von den Röntgenstrukturen der α -Helixbündel

Allerdings sind bei Müller *et al.* je zwei Fv-Fragmente C-terminal an das Helixbündel fusioniert, was wie in 4.1.2, S. 60 beschrieben bei Einsetzung anderer Fv-Fragmente zu Störungen der Antigen-Bindung führen könnte. Vier paarweise einander gegenüberliegende,

aber identische Bindestellen wurden auch in zwei Fällen durch die Fusion von Fv-Fragmenten an homotetramere globuläre Proteine erreicht (Rheinnecker *et al.*, 1996 und Kipriyanov *et al.*, 1996, s. Abb.1.4 D5, S. 10).

Die prognostizierten räumlichen Strukturen aller oben beschriebenen Fusionsproteine beruhen, wie in der vorliegenden Dissertation für das entwickelte Fv7E2-CS (s. Abb. 4.1, S. 61), auf den Kristallstrukturen der verwendeten Oligomerisierungseinheiten.

Alle tetravalenten Fusionsproteine sowie alle anderen mit Helixbündeln fusionierten Fv-Fragmente aus der Literatur enthalten sogenannte „*single-chain*“-Fv-Fragmente (*scFvs*, s. Abb. 1.4). Unabhängig von der Art der Modifikation wird heute im Antikörper-*Design* generell mit *scFv*- oder auch durch andere Mittel stabilisierten Fv-Fragmenten gearbeitet. Das für das vorliegende Projekt verwendete Fv7E2 gilt auch wegen seiner Fähigkeit zur Kokristallation der Cytochrom-*c*-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans* als sehr stabiles Fv-Antikörperfragment. Auf eine Stabilisierung seiner Struktur wurde verzichtet, da es sich nur um ein Testsystem für die zu untersuchenden Oligomerisierungseinheiten handelte.

5.4 Ausblick

Im Verlauf des vorliegenden Projektes wurde die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Fv-Antikörperfragments Fv7E2-CS über Bindungstests und Molmassenbestimmungen bewiesen, wodurch es Ausgangspunkt für weitere Antikörperfragment-Fusionsproteine sein kann. Für einen Einsatz der Trimerisierungseinheit in einer gezielten Anwendung muß eine weiterführende Charakterisierung stattfinden, die das Fv-Fragment-Fusionsprotein alleine sowie seinen Antigen-Komplex mit einbeziehen sollte. Eventuell könnten diese Untersuchungen bereits mit einem anwendbaren Fv-Fragment/Antigen-System durchgeführt werden, wobei auch die Schwierigkeiten des solubilisierten Membranproteins als Antigen vermieden würden.

5.4.1 Weiterführende Charakterisierung

Antiparallelität

Die aus der Röntgenstruktur für das synthetische Bündel Coil-Ser ermittelte Antiparallelität wurde bisher für das Bündel in Lösung nur prognostiziert (5.3.6). Interessant und für Anwendungen wichtig wäre es, die Anordnung nun innerhalb von Fv7E2-CS zu untersuchen (s. Abb 4.1, S. 61). Am deutlichsten wäre die Anordnung in einer röntgenkristallographisch erhaltenen Struktur zu sehen, jedoch sind die Aussichten auf erfolgreiche Kristallisation des Fv7E2-CS oder seines Antigen-Komplexes gering. Die Kristallisation der Cytochrom-*c*-Oxidase mit dem unmodifizierten Fv7E2 wird zwar standardmäßig durchgeführt, doch wäre zum einen durch die Oligomerisierung eine ganz andere Anordnung der Komplexe im Kristall notwendig, was die Kristallisationsbedingungen verändern würde. Zum andern ist bereits durch die flexible Struktur der *Linker* in Fv7E2-CS eine Kristallisation des Fusionsproteins generell fraglich.

Zur Klärung der Frage nach der Antiparallelität wären spektroskopische Untersuchungen vorstellbar, die nach Einführung einer beispielsweise fluoreszierenden Markierung innerhalb des Fusionsproteins in der Lage sind, den Abstand zwischen den Markierungen zu erfassen.

Avidität

Die Bindungsavidität des trimeren Fv-Fragmentes sollte im Vergleich zum monomeren Fv-Fragment bestimmt werden. Dafür wurden für andere multivalente Antikörperfragment in der Literatur meist *surface plasmon resonance* aber auch ELISA-Tests angewandt. Normalerweise ist durch die Trivalenz eine Erhöhung der Avidität zu erwarten, wie in 1.1.2 (S. 6) beschrieben. Dies alleine könnte das Fusionsprotein für eine Anwendung

interessant machen, besonders falls sich die Anordnung der Peptide als parallel herausstellen würde. Zwar ist aufgrund der niedrigeren Valenz im Vergleich zu den existierenden tetravalenten Fusionsproteinen eine geringere Steigerung zu erwarten, aber je nach Anwendungszweck und Verträglichkeit mit dem fusionierten Antikörperfragment kann in manchen Fällen die Coil-Ser-Oligomerisierungseinheit diesen gegenüber vorzuziehen sein.

Stabilität und Assoziationsgleichgewicht

Um die Eignung eines Proteins für Anwendungszwecke zu prüfen, sollten sich weitere Untersuchungen zu seiner generellen Stabilität anschließen, besonders die zur seiner Stabilität unter den später geforderten Bedingungen. Etwa könnten bereits einfache Tests durch Inkubation des Fusionsproteins in verschiedenen Körperseren wichtige Aufschlüsse über seine Resistenz gegen Abbaumechanismen geben. Weiterhin wäre das Assoziationsgleichgewicht zu untersuchen, um die unteren Konzentrationsgrenzen für die Trimerisierung festzustellen. Dabei wäre die Analyse von Konzentrationsverteilungen des nativen Proteins in der Ultrazentrifuge als direkte Methode gegenüber Denaturierungsexperimenten vorzuziehen, wenn die Absorption des Fusionsproteins im entscheidenden Konzentrationsbereich noch meßbar ist.

Vortest für die Tauglichkeit als Verknüpfungswerkzeug von Zellen

Mit einem geeigneten Antikörperfragment/Antigen-System könnte bereits *in vitro* die Fähigkeit des homotrimeren Fusionsproteins untersucht werden, gleichartige Zellen miteinander zu verknüpfen. Die Überprüfung könnte licht-, elektronenmikroskopisch und mit Durchflußzytometrie geschehen.

5.4.2 Weiter- und Neuentwicklungen

Verwendung von Coil-Ser in Fusion mit anderen Antikörperfragmenten

Es wäre vielversprechend, statt der in diesem Projekt bisher verwendeten drei Fv-Fragmente weitere in genau der entwickelten Fusionsanordnung zu testen. Wie aber unter anderem die Experimente mit den Anti-CD28-Fv-Fragmenten zeigen, sollten dafür unbedingt stabile, am besten bereits rekombinant stabilisierte Fv-Fragmente eingesetzt werden. Auch wäre es unbedingt interessant, Kamel-Schwerketten-Fragmente in Fusion mit Coil-Ser zu testen, was während dieser Arbeiten nicht geschehen ist. Soll die gleiche Affinitäts-Reinigung verwendet werden, müßte allerdings dabei der *Strep-tag* C-terminal an das Coil-Ser fusioniert werden.

Verwendung weiterer Peptide der Coil-Ser-Serie

Das Coil-Ser-Peptid stammt, wie bereits mehrfach erwähnt, aus einer Serie von ähnlichen Peptiden, auf die aufbauend noch viele weitere Peptide entwickelt wurden. Alle zusammen sind Untersuchungsobjekte für generelle Fragestellungen im *Proteindesign* und deswegen besonders im Hinblick auf ihre Stabilität und ihre Assoziationsgleichgewichte sehr gut charakterisiert. So wäre es gut möglich, auch andere dieser Peptide zur Optimierung der hergestellten Fusionsproteine oder für Anwendungen, die andere Anforderungen an das Fusionsprotein stellen, zu verwenden. Durch ihre sehr zu Coil-Ser ähnlichen Aminosäuresequenzen wäre die Wahrscheinlichkeit für erfolgreiche Produktion und Funktion solcher Fusionsproteine groß. In Frage käme etwa das Peptid „Coil-V_aL_d“, dessen Parallelität und größere Stabilität im Vergleich zu Coil-Ser nachgewiesen wurde (Boice *et al.*, 1996 und Ogihara *et al.* 1997). Während des vorliegenden Projektes wurde in der Literatur auch ein auf der Aminosäuresequenz von Coil-Ser basierendes heterotrimeres Bündel gefunden (Lombardi *et al.*, 1996). Dieses Bündel wäre besonders im Hinblick auf die im vorliegenden Projekt angestrebte Heterotrimerisierung, bzw. die für Antikörper-*Design* generell interessante Multispezifität lohnend. Seine Antiparallelität ist bisher aber nur prognostiziert. Auch sind bei zwei seiner drei synthetischen Peptide des Bündels sehr viele negative bzw. positive geladene Aminosäurereste eingesetzt worden, was schon bei der Produktion Schwierigkeiten hervorrufen könnte.

Verwendung anderer α -Helixbündel

In der Literatur wurden zwei weitere α -Helixbündel gefunden, die den Anforderungen der Multispezifität oder auch Antiparallelität eines Antikörperfragment-Fusionsproteins gerecht werden könnten. Nautiyal *et al.* entwickelten 1995 drei synthetische Peptide in ähnlicher Länge wie der des Coil-Ser-Peptides, die miteinander ein sehr thermostabiles α -Helixbündel (T_m von 87 °C) eingehen. In der Röntgenanalyse wurde allerdings eine parallele Anordnung seiner Peptide nachgewiesen (Nautiyal *et al.*, 1999). Antiparallelität sagen dagegen Fairman *et al.* (1996) für ihr entwickeltes heterotetrameres Bündel vorher. Dessen Peptide sind bis zu 10 Aminosäuren kürzer als Coil-Ser, was für gute Produktionsbedingungen in *E. coli* eines Fusionsproteins mit diesen Peptiden sprechen könnte, aber die auch hier (s. o.) starke positive bzw. negative Ladung der Peptide eher für Produktionsschwierigkeiten. Dies könnte ein generelles Problem bei der Verwendung von synthetischen, heteromeren Bündeln sein, da die erwünschte große Stabilität durch stark gegensätzliche Ladungen der Peptide zu erreichen versucht wird.



6 Anhang

6.1 Oligodesoxynukleotide

Die Anzahl der Nukleotide ist in Klammern hinter der Bezeichnung des Oligodesoxynukleotids angegeben (nt). Die Sequenz der Oligodesoxynukleotide ist von 5' nach 3' notiert.

6.1.1 Oligodesoxynukleotide für die Gensynthese

Für die helikalen Bereiche in Fv7E2-Jun:

Nr.	Bezeichnung	Basensequenz
#1	oJunCSI (34 nt)	CGC TGA TCA CTC GAG CCG AAA CCG TCC ACC CCG C
#3	oJunIII (64 nt)	GTG AAC AGG TTG CTC AGC TGA AAC AGA AAG TTA TGA ACC ACT AAT AAT GAA AGC TTA CAG TAC G
#4	oJunIV (52 nt)	CGA TAC GGG AGG AAC CCG GCG GGG TGG ACG GTT TCG GCT CGA GTG ATC AGC G
#5	oJunV (50 nt)	CAG TTC GGA GTT CTG AGC TTT CAG GGT TTT AAC TTT TTC TTC CAG ACG AG
#6	oJunVI (86 nt)	CGT ACT GTA AGC TTT CAT TAT TAG TGG TTC ATA ACT TTC TGT TTC AGC TGA GCA ACC TGT TCA CGC AGC ATG TTA GCG GTG GAA GC
#15	oJunIX (44 nt)	CGG GTT CCT CCC GTA TCG CTC GTC TGG AAG AAA AAG TTA AAA CC
#16	oJunX (46 nt)	CTG AAA GCT CAG AAC TCC GAA CTG GCT TCC ACC GCT AAC ATG CTG C

Für die helikalen Bereiche in Fv7E2-CS:

Nr.	Bezeichnung	Basensequenz
#1	oJunCSI (34 nt)	s. oben
#7	oCoilII (93 nt)	CGG GTT CCT CCG AAT GGG AAG CTC TGG AAA AAA AAC TGG CTG CTC TGG AAT CCA AAC TGC AAG CTC TGG AAA AAA AAC TGG AAG CTC TGG AAC
#8	oCoilIII (28 nt)	ACG GTT AAT AAT GAA AGC TTA CAG TAC G
#9	oCoilIV (55 nt)	CTT CCC ATT CGG AGG AAC CCG GCG GGG TGG ACG GTT TCG GCT CGA GTG ATC AGC G
#10	oCoilV (52 nt)	TTT TCC AGA GCT TGC AGT TTG GAT TCC AGA GCA GCC AGT TTT TTT TCC AGA G
#11	oCoilVI (48 nt)	CGT ACT GTA AGC TTT CAT TAT TAA CCG TGT TCC AGA GCT TCC AGT TTT

Zur Einführung des *Linkers* lnk1 in pASKFv7E2 für die pASK687E2-SNAREs:

Nr.	Bezeichnung	Basensequenz
#32	oB1Link-I	GTC ACC GGC TCC ACC TCC GGT TCT GGC AAA GGT GGC TCT GGT GAA GGT AGC ACT TCC
#33	oB1Link-II	GGT ACC ATC CGT GAA TTC GCT AGC
#34	oB1Link-III	GTT TCC TCT GCT TGG CGT CAC CCG CAG TTC GGT GGC TAA TAA C
#35	oB1Link-IV	CCA CCT TTG CCA GAA CCG GAG GTG GAG CCG
#36	oB1Link-V	CCA AGC AGA GGA AAC GCT AGC GAA TTC ACG GAT GGT ACC GGA AGT GCT ACC TTC ACC AGA G
#37	oB1Link-VI	CAT GGT TAT TAG CCA CCG AAC TGC GGG TGA CG

Zur Deletion von ompA in pAK68SNAREs:

Nr.	Bezeichnung	Basensequenz
#48	oCytoXPf	CTA GAT AAC GAG GGC AAA AAA TGA AAC TGC A
#49	oCytoXPr	GTT TCA TTT TTT GCC CTC GTT AT

6.1.2 Oligodesoxynukleotide zur Vermehrung von DNA mit PCR

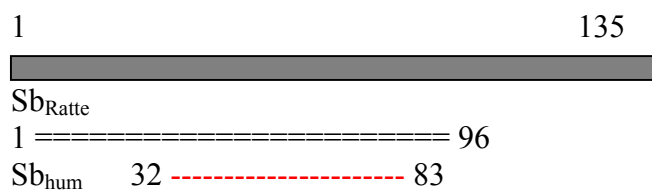
Nr.	Bezeichnung	Basensequenz
#24	oKpnSx	GCG ATC GGT ACC GAG ATC ATC AAG CTG GAG AAC AGC
#25	oSxNhe	GCT AAT GCT AGC GAC GGC CTT CTT GGT GTC AGA CAC
#26	oKpnSb	GTC ATA GGT ACC AGA CTG CAG CAG ACC CAG GCC CAG
#27	oSbNhe	CTA TCT GCT AGC GAG CTT GGC TGC GCT TGT TTC AAA CTG GG
#28	oKpnSn1	GTA CAT GGT ACC AGC ACC CGT CGT ATG CTG CA CTG
#29	oSnlNhe	CGT CAT GCT AGC TCC TAG GTC CGT CAA ATT CTT TTC TGC
#30	oKpnSn2	GCT ATA GGT ACC AAC CTA GAG CAG GTG AGC GGC ATC
#31	oSnl2Nhe	CAT GTT GCT AGC CAG CAT CTT TGT TGC ACG TTG GTT GGC
#38	oB1_2Helixh	GAT CTG ACT GCA GGG TAG CAC TTC CGG TAC C
#39	oB1_2Helixr	CAC TTT ATT TTC TCC ATG GTT ATT AGC CAC CGA ACT G
#50	oEGFPpsf	GCA ATT CTG CAG ATG GTG AGC AAG GGC CAG
#51	oEGFPBsb	CGT ACT GGT GAC CAA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G
#53	oSnlNhXhr	GAT CAT CTC GAG GCT GCT AGC TCC TAG GTC CGT C
#54	oF44Ndf	GCG AAT TCC ATA TGG CCG AGG TGC AGC TGC
#55	oF44Bsr	GCG AAT TCG GTG ACC GAG GTC CCC TTG
#56	oLi18SnaBsf	GCG AAT TCG GTC ACC GGC TCC ACC TCC
#59	oSnlratKpnI-f	CAG AAT TCG GTA CCG CCG AAG ACG CGG ATA TG
#60	oSnlratXhoI-b	GTG AAT TCC TCG AGT TTG CCT AAA TCT TTT

6.2 Verwendete Sequenzbereiche aus den SNARE-Proteinen

Syntaxin-1A:



SynaptobrevinII:



SNAP25:

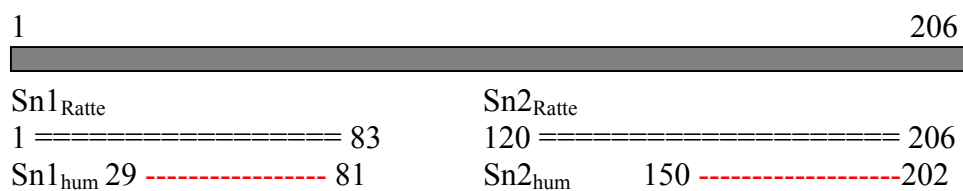


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der in den Fusionsproteinen verwendeten Bereiche aus den SNARE-Proteinen. Die Proteinketten aus den natürlichen SNARE-Proteine aus Ratte sind als Balken dargestellt. Im Vergleich dazu sind die im Projekt rekombinant verwendeten Sequenzbereiche eingetragen. Die Zahlen entsprechen den in den natürlichen Sequenzen nummerierten Aminosäuren. Die Aminosäuresequenzen aus Mensch und Ratte sind in den helikalen Bereichen identisch, die DNA-Sequenzen unterscheiden sich dort in wenigen Basenpaaren. Die Bereiche aus Mensch werden hier mit _{hum} bezeichnet, sind aber sonst in der Dissertation ohne diese Bezeichnung, während die Rattenproteine durchgehend mit _{Ratte} gekennzeichnet sind.

- die natürlichen SNARE-Proteine aus Ratte
- die von Dr. D. Fasshauer (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) verwendeten Bereiche aus den Rattenproteinen enthalten die helikalen Bereiche und benachbarte Abschnitte
- die im Projekt verwendeten helikalen Bereiche aus den humanen Proteinen.

6.3 DNA-Sequenzierungen

6.3.1 DNA-Sequenzierung von pASK68Fv7E2-CS

Gezeigt ist der DNA-Sequenzbereich des Vektors pASK68Fv7E2-CS (s. 4.1.6, S. 62), der die mit Gensynthese in pASK68Fv7E2 eingeführten Bereiche enthält. Die Sequenz ist wie erwartet. Die Aminosäuresequenz des an Fv7E2 fusionierten CoilSer-Peptids ist in rot, der dazwischen eingefügte *Linker* aus der Gelenkregion des IgG3 aus Maus in blau dargestellt. Vor der Restriktionsschnittstelle *XhoI* endet die Sequenz der leichten Kette von Fv7E2.

```

      F S G S G S G T Q F S L K I N S L L P E -
241 AAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTACTCCTCCGCTCACGTTCCGGAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      TTCTAAAACCCTCAATAATGACAGTTGTAGTAATACCATGAGGAGGCGAGTGCAAGCCTC

      D F G S Y Y C Q H H Y G T P P L T F G G -
          X
          h
          o
          I
301 GAGGCACCAAGCTCGAGCCGAAACCGTCCACCCCGCCGGTTCCCTCCGAATGGAAGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      CTCCGTGGTTTCGAGCTCGGCTTTGGCAGGTGGGGCGGCCCAAGGAGGCTTACCCTTCGAG

      G T K L E P K P S T P P G S S E W E A L -
361 TGGAAAAAAACTGGCTGCTCTGGAATCCAAACTGCAAGCTCTGGAAAAAAACTGGAAG
-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      ACCTTTTTTTTTGACCGACGAGACCTTAGGTTTGACGTTTCGAGACCTTTTTTTTTGACCTTC

      E K K L A A L E S K L Q A L E K K L E A -
          H
          i
          n
          d
          I
          I
          I
421 CTCTGGAACACGGTTAATAATGAAAGCT
-----+-----+-----+-----+
      GAGACCTTGTGCCAATTATTACTTTTCGA

      L E H G * * * K L

```

6.3.2 DNA-Sequenzierung der SNARE-Peptide

Die aus der humanen cDNA-Bank (Human Brain, whole Marathon-Ready™ cDNA, Clontech Laboratories, Inc., CA-Palo Alto) mit PCR amplifizierte DNA-Fragmente mit den Sequenzen der SNARE-Peptide wurden mehrfach sequenziert und waren an jeder Basenstelle mindestens einmal mit den Sequenzen aus der Datenbank identisch. Die Teile nachfolgend angegebenen sequenzierten Vektorbereiche enthalten auch den mit Gensynthese hergestellten *Linker* lnk1 (blau). Die Sequenzen der SNARE-Peptide sind rot und die beginnende Sequenz des *Strep-tag* ist grün markiert. Ist wie erwartet. Zusätzlich eingetragen sind die für die Herstellung der Vektoren wichtigen Restriktionsstellen.

Das Sb-Peptid (Synaptobrevin II_{hum}, AS32 – 83):

```

                                     B
                                     S
                                     t
                                     E
                                     I
                                     I
181  TATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGGCTCCACCTCCGGTTCTGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
ATACGATACCTGATGACCCCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCCGAGGTGGAGGCCAAGACCC

Y  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  T  V  T  G  S  T  S  G  S  G  -

                                     K
                                     p
                                     n
                                     I
241  AAAGGTGGCTCTGGTGAAGGTAGCACTTCCGGTACCAGACTGCAGCAGACCCAGGCCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTTCCACCGAGACCACTTCCATCGTGAAGGCCATGGTCTGACGTCGTCTGGGTCCGGGTC

K  G  G  S  G  E  G  S  T  S  G  T  R  L  Q  Q  T  Q  A  Q  -

301  GTGGATGAGGTGGTGGACATCATGAGGGTGAACGTGGACAAGGTCCTGGAGCGAGACCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CACCTACTCCACCACCTGTAGTACTCCCACTTGACACTGTTCCAGGACCTCGCTCTGGTC

V  D  E  V  V  D  I  M  R  V  N  V  D  K  V  L  E  R  D  Q  -

361  AAGCTGTCTGGAGCTGGACGACCGTGCAGATGCACTCCAGGCGGGGGCCTCCCAGTTTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TTTCGACAGCCTCGACCTGCTGGCACGTCTACGTGAGGTCCGCCCCCGGAGGGTCAAACCTT

K  L  S  E  L  D  D  R  A  D  A  L  Q  A  G  A  S  Q  F  E  -

                                     N
                                     h
                                     e
                                     I
421  ACAAGCGCAGCCAAGCTCGCTAGCGTTTCTCTGCTTGCGTCCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGTTTCGCGTCGGTTTCGAGCGATCGCAAAGGAGACGAACGCAGTG

T  S  A  A  K  L  A  S  V  S  S  A  W  .  .  .

```

Das Sx-Peptid (Syntaxin-1A_{hum}, AS202 – 254):

Die Syntaxine existieren in mehreren leicht unterschiedlichen Sequenzformen in *Homo sapiens*. Bei den Sequenzierungen der Bereiche mit dem Sx-Peptid wurden mehrfach Klone mit zwei verschiedenen Sequenzen entdeckt, die sich in 17 Basenpaaren aber nur in zwei Aminosäuren unterscheiden. Die hier angegebene Sequenz ist die in allen SNARE-Fusionsproteinen des Projektes außer den EGFP-Fusionsproteinen verwendete Sequenz. Sie konnte in dieser Form in keiner Datenbank gefunden werden, ist aber mehrfach und sicher sequenziert. Die in den EGFP-SNARE-Fusionsproteinen verwendete Sequenz ist die eigentlich bekannte Sequenz und trägt statt Valin ein Methionin und statt Serin ein Alanin (unterstrichen). Die SNARE-Proteine verschiedener Formen und sogar stark unterschiedlicher SNARE-Komplexe sind aber untereinander komplexierbar (Fasshauer *et al.*, 1999).

```

      B
      s
      t
      E
      I
      I
GACCACGGTCACCGGCTTCCACTCCGGTTCTGGCAAAGGTGGCTCTGGTGAAGGTAGCAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTGGTGCCAGTGGCCGAAGGTGAGGCCAAGACCGTTTCCACCGAGACCACTTCCATCGTG

  T  T  V  T  G  F  H  S  G  S  G  K  G  G  S  G  E  G  S  T  -

      K
      P
      n
      I
TTCCGGTACCGAGATCATCAAGCTGGAGAACAGCATCCGTGAGCTACACGACATGTTTCAT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AAGGCCATGGCTCTAGTAGTTTCGACCTCTTGTCGTAGGCACTCGATGTGCTGTACAAGTA

  S  G  T  E  I  I  K  L  E  N  S  I  R  E  L  H  D  M  F  M  -

GGACATGGCCATGCTCGTGGAGAGCCAGGGAGAGATGATTGACAGGATCGAGTACAATGT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CCTGTACCGGTACGAGCACCTCTCGGTCCCTCTCTACTAACTGTCCCTAGCTCATGTTACA

  D  M  A  V  L  V  E  S  Q  G  E  M  I  D  R  I  E  Y  N  V  -

                                                    N
                                                    h
                                                    e
                                                    I
GGAACACGCGGTAGACTATGTGGAGAGGGCCGTGTCTGACACCAAGAAgGCCGTCGCTAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CCTTGTGCGCCATCTGATACACCTCTCMXGGCACAGACTGTGGTTCTTcCGGCAGCGATC

  E  H  S  V  D  Y  V  E  R  A  V  S  D  T  K  K  A  V  A  S  . . .

```

Das Sn1-Peptid (SNAP25A_{hum}, AS29 – 81):

```

                                                                    K
                                                                    P
                                                                    n
                                                                    I
541  CACCGGCTCCACCTCCGGTTCTGGCAAAGGTGGCTCTGGTGAAGGTAGCACTTCCGGTAC 600
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTGGCCGAGGTGGAGGCCAAGACCGTTTCCACCGAGACCACTTCCATCGTGAAGGCCATG

  T  G  S  T  S  G  S  G  K  G  G  S  G  E  G  S  T  S  G  T  -

601  CAGCACCCGTCGTATGCTGCAACTGGTTGAAGAGAGTAAAGATGCTGGTATCAGGACTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GTCGTGGGCAGCATAACGACGTTGACCAACTTCTCTCATTTCTACGACCATAGTCCCTGAAA

  S  T  R  R  M  L  Q  L  V  E  E  S  K  D  A  G  I  R  T  L  -

661  GGTTATGTTGGATGAACAAGGAGAACAACCTGGAACGCATTGAGGAAGGGATGGACCAAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CCAATACAACCTACTTGTTCCTCTTGTGACCTTGCCTAACTCCTTCCCTACCTGGTTTA

  V  M  L  D  E  Q  G  E  Q  L  E  R  I  E  E  G  M  D  Q  I  -

                                                                    N
                                                                    h
                                                                    e
                                                                    I
721  CAATAAGGACATGAAAGAAGCAGAAAAGAATTTGACGGACCTAGGAGCTAGCGTTTCCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
GTTATTCCTGTACTTTCTTCGTCTTTTCTTAAACTGCCTGGATCCTCGATCGCAAAGGAG

  N  K  D  M  K  E  A  E  K  N  L  T  D  L  G  A  S  V  S  S  -

                                                                    N
                                                                    c
                                                                    o
                                                                    I
781  TGCTTGGCGTCACCCGCAGTTCGGTGGCTAATAACCATGGAGAAAATXXAXXXAAAXAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
ACGAACCGCAGTGGGCGTCAAGCCACCGATTATTGGTACCTCTTTTAXXTXXXTTTXXTTT

  A  W  R  H  P  Q  F  G  G  *  *

```

Das Sn2-Peptid (SNAP25A, AS150 – 203):

```

          B
          S
          t
          E
          I
          I
181 ACTACTGGGGCCAAGGGACCAACGGTCAACCGGCTCCACCTCCGGTTCTGGCAAAGGTGGCT 240
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGATGACCCCGGTTCCCTGGTGCCAGTGGCCGAGGTGGAGGCCAAGACCGTTTCCACCGA

    Y W G Q G T T V T G S T S G S G K G G S -

          K
          P
          n
          I
241 CTGGTGAAGGTAGCACTTCCGGTACCAACCTAGAGCAGGTGAGCGGCATCATCGGGAACC 300
-----+-----+-----+-----+-----+
GACCACTTCCATCGTGAAGGCCATGGTTGGATCTCGTCCACTCGCCGTAGTAGCCCTTGG

    G E G S T S G T N L E Q V S G I I G N L -

301 TCCGTCACATGGCCCTGGATATGGGCAATGAGATCGATACACAGAATCGCCAGATCGACA 360
-----+-----+-----+-----+-----+
AGGCAGTGTACCGGGACCTATAACCGTTACTCTAGCTATGTGTCTTAGCGGTCTAGCTGT

    R H M A L D M G N E I D T Q N R Q I D R -

361 GGATCATGGAGAAGGCTGATTCCAACAAAACCAGAATTGATGAgGCCAACCAACATGCAA 420
-----+-----+-----+-----+-----+
CCTAGTACCTCTTCCGACTAAGGTTGTTTTGGTCTTAACTACTcCGGTTGGTTGTACGTT

    I M E K A D S N K T R I D E A N Q H A T -

          N
          h
          e
          I
421 CAAAGATGCTGGCTAGCGTTTTCTCTGCTTGCGTCA
-----+-----+-----+-----+
GTTTCTACGACCGATCGCAAAGGAGACGAACGCAGT

    K M L A S V S S A . . .

```

6.3.3 Die DNA-Sequenzierung des Jun-Peptids in pASK68Fv7E2-Jun

```

X
h
o
I
GGAGGCACCAAGCTCGAGCCGAAACCGTCCACCCCGCGGGTTCTCCCGTATCGCTCGT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CCTCCGTGGTTCGAGCTCGGCTTTGGCAGGTGGGGCGGCCCAAGGAGGGCATAGCGAGCA

G G T K L E P K P S T P P G S S R I A R -

CTGGAAGAAAAAGTTAAAACCCTGAAAGCTCAGAACTCCGAACTGGCTTCCACCGCTAAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GACCTTCTTTTTCAATTTTGGGACTTTTCGAGTCTTGAGGCTTGACCGAAGGTGGCGATTG

L E E K V K T L K A Q N S E L A S T A N -

H
i
n
d
I
I
I
ATGCTGCGTGAACAGGTTGCTCAGCTGAAACAGAAAGTTATGAACCACTAATAATGRAAG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TACGACGCACTTGTCCAACGAGTCGACTTTGTCTTTCAATACTTGGTGATTATTACYTTC

M L R E Q V A Q L K Q K V M N H * *

```

7 Verwendete Abkürzungen

Zu den Bezeichnungen der Vektoren und Fusionsproteine siehe 2.9.5, S. 35.

ab	<i>antibody</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CD28Fc	rekombinant produzierte lösliche Domäne des humanen T-Zell-Rezeptors CD28 fusioniert mit IgG-Fc (CD: <i>cluster of differentiation</i>)
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
C _{H1} , C _{H2} , C _{H3}	konstante Domänen der schweren Kette eines Antikörpers
C _L	konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
CS	Coil-Ser-Peptid
Da	Dalton
DBT	D-Desthiobiotin
DDM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Variante des GFP
F44	Schwerketten-Antikörper-Fragment, gerichtet gegen FHP
Fab	Antikörperfragment aus V _H , V _L , C _{H1} und C _L
Fc	<i>fragment constant</i> , Antikörperfragment
FHP	Flavohämprotein aus <i>Alcaligenes eutrophus</i>
Fv	<i>fragment variable</i> , Antikörperfragment
Fv11H9	Fv-Antikörper-Fragment, gerichtet gegen CD28Fc
Fv17F8	Fv-Antikörper-Fragment, gerichtet gegen CD28Fc
Fv7E2	Fv-Antikörper-Fragment, gerichtet gegen die Cytochrom-c-Oxidase aus <i>Paracoccus denitrificans</i>
GCN4	Transkriptionsaktivator für Gene der Aminosäurebiosynthese
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Ig	Immunglobulin
IgG, IgM, IgA, IgD, IgE	Immunglobuline G, M, A, D und E

7 Verwendete Abkürzungen

IPTG	Isopropylthio- β -D-Galactosid
Ink1 und Ink2	Protein- <i>Linker</i> 1 und 2
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
OD	optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rpm	<i>rotation per minute</i>
Sb	AS 1 – 96 des SNARE-Proteins Synaptobrevin II
<i>scFv</i>	<i>single-chain Fv</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sn1	AS 1 – 83 des SNARE-Proteins SNAP25A au
Sn2	AS 120 – 206 des SNARE-Proteins SNAP25A
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	<i>Soluble NSF Attachment protein Receptor</i>
Strep	Streptavidin
Sx	AS 180 - 262 des SNARE-Proteins Syntaxin-1A
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
V _H	variabler Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V _L	variabler Domäne der leichten Kette eines Antikörpers

8 Literatur

- Betz S., Fairman R., O'Neil K., Lear J., DeGrado W. (1995)** Design of two-stranded and three-stranded coiled-coil peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 348 (1323):81-8.
- Boice J. A., Dieckmann G. R., DeGrado W. F., Fairman R. (1996)** Thermodynamic analysis of a designed three-stranded coiled coil. *Biochemistry* 35(46):14480-5.
- Branden C., Tooze J. (1999)** *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, Inc. New York and London, 2. Aufl., S. 13–8, 35–45, 191-6, 299-323.
- Burmester G.-R., Pezzutto A. (1998)** *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S. 22–27.
- Cocca B. A., Seal S. N., Radic M. Z. (1999)** Tandem Affinity Tags for the Purification of Bivalent Anti-DNA Single-Chain Fv Expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 17:290–8.
- Cohn E. J., Edsall J. T. (1943)** In: Cohn E. J., Edsall J. T. (Hrsg.) *Proteins, aminoacids and peptides as ions and dipolar ions*. Hafner (Verlag), New York, S. 370 – 381.
- Conrath K. E., Lauwereys M., Galleni M., Matagne A., Frere J. M., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. (2001)** Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 45(10):2807-12.
- Cormack B. P., Valdivia R. H., Falkow S. (1996)** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173:33-8.
- Davies J., Riechmann L. (1995)** Antibody VH Domains as Small Recognition Units. *Bio/Technology* 13:475–9.
- de Kruif J., Logtenberg T. (1996)** Leucine Zipper Dimerized Bivalent and Bispecific scFv Antibodies from a Semi-synthetic Antibody Phage Display Library. *The Journal of Biological Biochemistry* 271(13):7630–4.
- Dorai H., McCartney J.E., Hudziak R. M., Tai M. S., Laminet A. A., Houston L. L., Huston J. S., Oppermann H. (1994)** Mammalian-cell expression of single-chain fv (sfv) antibody proteins and their c-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Bio-Technology* 12:890-897.
- Dübel S., Kontermann R. (2001)** Recombinant Antibodies. In: Kontermann R., Dübel S. (Hrsg.) *Antibody engineering* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 3-18.
- Durchschlag H. (1986)** Specific volumes of biological macromolecules and some other biological molecules of interest. In: Hinz H. J. (Hrsg.) *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 45 – 128.
- Durchschlag H., Zipper P. (1994)** Calculation of the partial volume of organic compounds and polymers. *Progress in Colloid and Polymer Science* 94:20 – 39.

- Durr E., Bosshard HR. (2000)** Folding of a three-stranded coiled coil. *Protein Science* 9(7):1410-5.
- Edelstein J. S., Schachman H. K. (1966)** The Simultaneous Determination of Partial Specific Volumes and Molecular Weights with Microgram Quantities. *The Journal of Biological Chemistry* 242(2):306–11.
- Fairman R., Chao H. G., Lavoie T. B., Villafranca J. J., Matsueda G. R., Novotny J. (1996)** Design of heterotetrameric coiled coils: evidence for increased stabilization by Glu(-)-Lys(+) ion pair interactions. *Biochemistry* 35(9):2824-9.
- Fasshauer D., Antonin W., Margittai M., Pabst S., Jahn R. (1999)** Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *Journal of Biological Chemistry* 274(22):15440-6.
- Fasshauer D., Antonin, W., Subramaniam, V. & Jahn, R. (2002)** SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nature Structural Biology* 9:144-51.
- Fasshauer D., Eliason W. K., Brunger A. T., Jahn R. (1998)** Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37(29):10354-62.
- Ferro-Novick S., Jahn R. (1994)** Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370(6486):191-3.
- Filpula D., McGuire J., Whitlow M. (1996)** Single-chain Fv proteins. In: *Antibody engineering – A practical approach*. McCafferty J., Hoogenboom H. R., Chiswell D. J. (Hrsg.) S. 254–5.
- Fuchs P., Breitling F., Little M., Dübel S. (1997)** Primary structure and functional scFv antibody expression of an antibody against the human protooncogen *c-myc*. *Hybridoma* 16:227-33.
- Gavilondo J. V., Larrick J. W. (2000)** Antibody engineering at the millennium. *Biotechniques*. 29(1):128.
- Glover J. N., Harrison S. C. (1995)** Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373(6511):257-61.
- Gram H., Ridder R. (2001)** Expression of scFv Antibody Fragments in the Yeast *Pichia pastoris*. In: Kontermann R., Dübel S. (Hrsg.) *Antibody engineering* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 321 – 31.
- Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E. C., Flajnik M. F. (1995)** A new antigen receptor family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 374:168-73.
- Guillemette J. G., Matsushimahiya Y., Atkinson T., Smith M. (1991)** Produktion in *Escherichia Coli* of a synthetic gene coding for horse heart myoglobin. *Protein Engineering* 4:585-92.

Hakansson K., Lim N. K., Hoppe H. J., Reid K. B. (1999) Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D. *Structure* 7(3):255-64.

Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E. B., Bendahman N., Hamers R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363(6428):446-8.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166(4):557-80.

Harbury P. B., Zhang T., Kim P. S., Alber T. (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* 262(5138):1401-7.

Hayden M. S., Gilliland L. K., Ledbetter J. A. (1997). Antibody engineering. *Current Opinion in Immunology*. 9 (2):201-212.

Hodges R. S., Sodek J., Smillie L. B., Jurasek L. (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37:299-310.

Hudson P. J., Kortt, A. A. (1999) High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of Immunological Methods*, 231, 177-189.

Huston J. S., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., McCartney J., Warren F., Haber E., Oppermann H. (1991) Protein Engineering of Single-chain fv Analogs and Fusion Proteins. *Methods In Enzymology* 203:46-88.

Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376:660-669.

Jahn R., SUDHOF T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annual Review Of Biochemistry* 68:863-911.

Kannt A., Michel H. (2001) Bacterial cytochrome c oxidase. In: Messerschmidt A., Hubert R., Poulos T., Wieghardt K. (Hrsg.) *Handbook of Metalloproteins*. Verlag: John Wiley and Sons, LTD, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, Band 1: 331-47.

Kipriyanov S. M., Little M., Kropshofer H., Breitling F., Gotter S., Dubel S. (1996) Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Engineering* 9(2):203-11.

Kleinekofort W., Germeroth L., van den Broek J. A., Schubert D., Michel H. (1992) The light-harvesting complex II (B800/850) from *Rhodospirillum rubrum* is an octamer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1140:102-104.

Kleymann G., Ostermeier C., Ludwig B., Skerra A., Michel H. (1995) Engineered Fv Fragment as a Tool for the One-Step Purification of Integral Multisubunit Membrane Protein Complexes. *Bio/Technology* 13:155-160.

- Kohler G., Milstein C. (1975)** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Natur* 256(5517):495-7.
- Kostelny S. A., Michael S. C., Tso J. Y. (1992)** Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *The Journal of Immunology* 148:1547 – 53.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Natur* 227(259):680-5.
- Landschulz W. H., Johnson P. F., McKnight S. L. (1988)** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240(4860):1759-64.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cytochrom-c-Oxidase M. M. (1998)** In: Prinzipien der Biochemie. Tschesche H. (Hrsg.) 2. deut. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford, S. 183–92.
- Lindner P., Plückthun A. (2001)** Miniantibodies. In: Kontermann R., Dübel S. (Hrsg.) *Antibody engineering* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 637-647.
- Lombardi A. Bryson JW. DeGrado WF. (1996)** De novo design of heterotrimeric coiled coils. *Biopolymers* 40(5):495-504.
- Lovejoy B., Choe S., Cascio D., McRorie D. K., Degrado W. F., Eisenberg D. (1993)** Crystal-Structure of a synthetic triple-stranded alpha-helical bundle. *Science* 259(5099): 1288-93.
- Margittai M., Fasshauer D., Pabst S., Jahn R., Langen R. (2002)** Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site- directed spin labeling. *Journal of Biological Chemistry* 276:13169-77.
- Mayer G., Anderka O, Ludwig B., Schubert D. (2002)** The state of the cytochrome bc₁ complex from *Paracoccus denitrificans* in solutions of dodecyl maltoside. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 119:77-83
- Mayer G., Ludwig B., Müller H.-W., van den Broek J. A. Frieen R. H. E., Schubert D. (1999)** Studying membrane proteins in detergent solution by analytical ultracentrifugation: different methods for density matching. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 113:176-81.
- Schubert D. (1999)** Studying membrane proteins in detergent solution by analytical ultracentrifugation: different methods for density matching. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 113: 176-81.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A. (1998)** Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure* 27:329-56.
- Michel, H., Ostermeier, C., Iwata, S., Harrenga, A. (1997)** The structure of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* and possible mechanism of action. *Faseb Journal* 11: 5.
- Moore J., Uppal A., Maley F., Maley G. (1993)** Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr. Purify.* 4(2):160-3.

- Müller K. M., Arndt K. M., Alber T. (2000)** Protein fusions to coiled-coil domains. *Method. Enzymol.* 328:261-282.
- Muller K. M., Arndt K. M., Pluckthun A. (1998)** A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity. *FEBS Letters* 432(1-2):45-9.
- Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J. A., Hamers R. (1994)** Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering* 7(9):1129-35.
- Nautiyal S., Alber T. (1999)** Crystal structure of a designed, thermostable, heterotrimeric coiled coil. *Protein Science* 8(1):84-90.
- Ogihara N. L., Weiss M. S., Degrado W. F., Eisenberg D. (1997)** The crystal structure of the designed trimeric coiled coil coil-V_aL_d: implications for engineering crystals and supramolecular assemblies *Protein Science* 6(1):80-8.
- Ollesch G., Kaunzinger A., Juchelka D., Schubert-Zsilavecz M., Ermler U. (1999)** Phospholipid bound to the flavohemoprotein from *Alcaligenes eutrophus*. *European Journal of Biochemistry* 262(2):396-405.
- O'Neil K., DeGrado W. F. (1990)** A Thermodynamic Scale for the Helix-forming Tendencies of the Commonly Occuring Amino Acids. *Science* 250:646-51.
- O'Shea E. K., Klemm J. D., Kim P. S., Alber T. (1991)** X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254(5031):539-44.
- O'Shea E. K., Rutkowski R., Kim P. S. (1992)** Mechanism of specificity in the Fos-Jun oncoprotein heterodimer. *Cell* 68(4):699-708.
- Ostermeier C. (1995a)** Kristallisation des Membranproteinkomplexes Cytochrom c Oxidase mit Hilfe eines Antikörper-Fv-Fragmentes. *Dissertation* Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.
- Ostermeier C., Essen L. O., Michel H. (1995b)** Crystals of an antibody Fv fragment against an integral membrane protein diffracting to 1.28 Å resolution. *Proteins* 174-7.
- Ostermeier C., Iwata S., Ludwig B., Michel H. (1995c)** Fv fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrom c oxidase. *Nature structural biology* 2(19):842-46.
- Ostermeier C., Iwata S., Michel H. (1996)** Cytochrome c oxidase. *Current Opinion in Structural Biology* 6:460-466.
- Ostermeier C., Harrenga A., Ermler U., Michel, H. (1997)** Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10547-53.
- Pabst S., Hazzard J. W., Antonin W., Sudhof T. C., Jahn R., Rizo J., Fasshauer D. (2000)** Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *Journal of Biological Chemistry* 275(26):19808-18.

Pack P., Muller K., Zahn R., Pluckthun A. (1995) Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biolog.* 246(1):28-34.

Pack P., Pluckthun A. (1992) Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31(6):1579-84.

Pack P., Kujau M., Schroeckh V., Knüpfner U., Wenderoth R., Riesenberger D., Plückthun A. (1993) Improved Bivalent Miniantibodies, with Identical Avidity as whole Antibodies, Produced by High Cell Density Fermentation of *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 11(11):1271-7.

Pack P., Muller K., Zahn R., Pluckthun A. (1995) Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology.* 246(1):28-34.

Pilström L. (2002) The mysterious immunoglobulin light chain. *Developmental and Comparative Immunology* 26:207-15.

Pluckthun A., Pack P. (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3(2):83-105.

Polej S. (2000) Etablierung einer *Camelus bactrianus* V_{HH}-Domänenbibliothek. Isolierung und Charakterisierung von gegen verschiedene Antigene gerichteten Schwereketten-Antikörperfragmenten. *Dissertation*, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.

Probst I., Wolf G., Schlegel H. G. (1979) Oxygen-binding Flavohemoprotein from *alcaligenes eutrophus*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 576:471-78.

Rehm H. (1996) Proteinbiochemie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.

Rheinhecker M., Hardt C., Ilag L. L., Kufer P., Gruber R., Hoess A., Lupas A., Rottenberger C., Pluckthun A., Pack P. (1996) Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *Journal of Immunology* 157(7):2989-97.

Saraste M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Reviews of Biophysics* 23(4):331-66.

Schmidt T. G. M., Skerra A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a c-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv Fragment. *Protein Engineering* 6(1):109-22.

Schmidt T. G. M., Skerra A. (1994) The one-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the 'Strep tag' and immobilized recombinant core streptavidin. *J. of Chromatography A* 676(2):337-45.

Schubert D. (1998) In: Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin:915 – 19.

Schubert D., Schuck P. (1991) Analytical ultracentrifugation as a tool for studying proteins. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 86:12 - 22.

- Schuck P. (1994)** Simultaneous radial and wavelength analysis with the Optima XL-A analytical ultracentrifuge. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 94:1 - 13.
- Schuck P. (2000)** Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modelling. *Biophys. J.* 78:1606 – 19.
- Schuck P., Perugini M. A., Gonzales N. R., Howlett G. J., Schubert D. (2002)** Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: Strategies and application to model system, *Biophys J.* 82:1096 – 111.
- Skerra A., Pluckthun A. (1988)** Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240(4855):1038-41.
- Sollner T., Bennett M. K., Whiteheart S. W., Scheller R. H., Rothman J. E. (1993)** A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75(3):409-18.
- Sudhof T. C. (1995)** The synaptic vesicle cycle - a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375:645-53.
- Sutton R. B., Fasshauer D., Jahn R., Brunger A.T. (1998)** Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 395:347-53.
- Theze J., Alzari P. M., Bertoglio J. (1996)** Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunology Today* 17(10):481-6.
- Thomas R. M., Wendt H., Zampieri A., Bosshard H. R. (1995)** α -helical coiled coils: simple models for self-associating peptide and proteins systems. *Progress in Colloid and Polymer Science* 99:24-30.
- Todorovska A., Roovers R. C., Dolezal O., Kortt A.A., Hoogenboom H. R., Hudson P.J. (2001)** Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *Journal of Immunological Methods* 248:47-66.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4.
- Tziatzios C. (1997)** Untersuchungen zur Komplexgröße und zum Assoziationsverhalten verschiedener Proteinsysteme durch analytische Ultrazentrifugation. *Dissertation* Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.
- Tziatzios C., Schubert D., Schuck P., Gennis R. B., Barquera B.** The state of association of the Na⁺ - translocating NADH: quinone oxidoreductase in detergent solution. An ultracentrifugation study. In Vorbereitung.
- Wendt H., Berger C., Baici A., Thomas R. M., Bosshard H. R. (1995)** Kinetics of folding of leucine zipper domains. *Biochemistry* 34(12):4097-107.

Whitlow M., Bell B. A., Feng S. L., Filpula D., Hardman K. D., Hubert S. L., Rollence M. L., Wood J. F., Schott M. E., Milenic D. E., Yokota T., Schlom J. (1993) An improved linker for single-chain fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Engineering* 6:989-95.

Wisdom R. (1999) AP-1: One Switch for Many Signals. *Experimental Cell Research* 253:180–185.

Witholt B., Boekhout M., Brock M., Kingma J., v. Heerikhuizen H., de Leij L. (1976) An Efficient and Reproducible Procedure for the Formation of Spheroplasts from Variously Grown *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 74:160-70.

Witt H., Ludwig, B. (1997) Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry* 272:5514-7.

Wu Z., Eaton S. F., Laue T. M., Johnson K. W., Sana T. R., Ciardelli T. L. (1994) Coiled-coil molecular recognition: directed solution assembly of receptor ectodomains. *Protein Engineering* 7(9):1137-44.

Zhu B. Y., Zhou N. E., Kay C. M., Hodges R. S. (1993) Packing and hydrophobicity effects on protein folding and stability: effects of beta-branched amino acids, valine and isoleucine, on the formation and stability of two-stranded alpha-helical coiled coils/leucine zippers. *Protein Science* 2(3):383-94.

Danksagung

Die Durchführung dieses Promotionsprojektes war nur möglich mit der finanziellen, wissenschaftlichen, technischen und mentalen Unterstützung zahlreicher Personen. Viele waren in mehreren der aufgeführten Bereiche hilfreich und müßten mehrfach genannt werden, was aber den Rahmen der Danksagungen sprengen würde.

Beginnen möchte ich mit einem sehr herzlichen Dank an **Prof. Dr. Hartmut Michel** für die Übertragung des außergewöhnlichen Projektes zu einem sehr aktuellen Forschungsgebiet, weiterhin für seine sehr entspannte Projektführung und sehr große Geduld, besonders bei der Vollendung des „Werkes“.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für seine Rolle als offiziellem Betreuer meines Projektes an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.

Einen herzlichen Dank richte ich an **Prof. Dr. Dieter Schubert** (Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt), für die Bereitschaft, in Kooperation die analytischen Ultrazentrifugationsexperimente zu übernehmen und seine hilfreiche Betreuung bei wichtigen experimentellen Fragestellungen. Ganz besonders bedanke ich mich bei **Dr. Christos Tziatzios** (AG Prof. Schubert) für die Durchführung und Datenanalyse der Ultrazentrifugationsexperimente, noch viel mehr aber für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die vielen, geduldigen Einführungen, Erläuterungen und Diskussionen über die Theorie der Ultrazentrifugation.

Bei **Dr. Dirk Fasshauer** (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) bedanke ich mich für die Beantwortung vieler Fragen zum SNARE-Komplex, sowie für die Bereitstellung der Vektoren zur Produktion der SNARE-Peptide und die gereinigten SNARE-Proteine.

Vielen herzlichen Dank an **Cornelia Münke** für die Bereitstellung der Vektoren pASK68Fv11H9 und pASK6817F8, an **Hannelore Müller** für gereinigtes Fv7E2 und vieles mehr, an **Stefanie Polej** für den Vektor pCB mit der Sequenz des F44 und an **Annette Roth** für gereinigtes FHP.

Neben vielen anderen Personen möchte ich mich besonders bei **Thomas Ostermann**, **Daniel Ungar** und **Björn Mamat** für viele Hilfestellungen experimenteller und theoretischer Art bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch **Björn Mamat**, **Dr. Christine Ziegler**, **Dr. Lutz Kampmann**, **Thomas Ostermann**, **Jörg Standfuß** und nicht zuletzt **Dr. Christos Tziatzios** für die Durchsicht von Manuskriptteilen zur vorliegenden Dissertation sowie **Dr. Günter Fritsch** für die sehr hilfreiche und großzügige Bereitstellung des Personalcomputers, auf dem sie geschrieben wurde.

Weiterhin bedanke ich mich genauso herzlich:

Bei **Gaby Maul**, **Hannelore Müller**, **Heidi Müller**, **Cornelia Münke** und **Annette Roth** für die Aufrechterhaltung des grundlegenden Laborbetriebes.

Bei **Heidi Müller** für die Synthese der vielen Oligodesoxynukleotide und nicht weniger bei **Elisabeth Uloth** für zahlreiche DNA-Sequenzierungen.

Bei **Dr. Roswitha Harrer**, **Dr. Teresa Ruiz** und besonders **Dr. Winfried Haase** und **Friederike Joos** für ihre elektronenmikroskopischen Bemühungen.

Bei allen jemals aufgetauchten, experimentell oder theoretisch arbeitenden Mitgliedern „meines“ Labors: **Aspasia Spyridaki**, **Annette Roth**, **Andreas Kuglstatler**, **Björn Mamat**, **Uli Zachariae**, **Dr. Guohong Peng**, **Ulrike Demmer**, **Mauro Mileni**, **Gregor Madej** für die lustige Kameradschaft.

Bei allen **Institutsmitgliedern** für die sehr angenehme, familiäre Atmosphäre, großartigen Weihnachtsfeiern und vieles mehr.

Bei allen talentierten und untalentierten **Musikern**, **Fußballern** und **Ruderern** des Instituts.

Einen ganz großen und sehr herzlichen Dank möchte ich an das **Institut** für die gemütliche Zuflucht in den Wohnhäusern des MPIs in der **Tiroler Straße 40/42** mit seinen angenehmen Bewohnern und vielen Grillfesten richten. Ohne dieses grüne Refugium wäre meine Promotionszeit in Frankfurt sicher viel weniger glücklich verlaufen. Besonders den Blick auf den wunderschönen Garten werde ich in Zukunft sehr vermissen und Vergleichbares wohl vergebens suchen.

Vielen Dank an dieser Stelle auch an meine vormals **Ungarische** „Tür-an-Tür“-Nachbarschaft, die erstaunlicherweise durch einen portugiesischen **Bicho-Beetle** wunderbaren Ersatz fand.

Zum guten Schluß bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen **Eltern**, die mir mein Studium und meinen Weg ermöglichten, sowie besonders bei **Jan Schirawski**, **Gaby Holighaus**, **Daniel & Eszter + Emese Ungar**, **I-Peng Chen**, **Wolfgang Grabarse**, **Sylvia Meng**, **Guohong Peng**, **Christine Ziegler** und **Ana Bicho** für Freundschaft, besondere Leistungen im mentalen Bereich und viele schöne gemeinsame Stunden und Unternehmungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anette Klinger
Geburtstag/-ort 26.07.1970, Rüdesheim am Rhein
Anschrift Tiroler Straße 42
60596 Frankfurt am Main

Schulbildung

1977 - 1981 Rabanus Maurus-Schule, Oestrich-Winkel
1981 - 1990 St. Ursula-Schule, Geisenheim
12.06.1990 Abitur

Akademische Bildung

1990 - 1992 Grundstudium der Physik (Diplom) an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
23.09.1992 Vordiplom in Physik
1993 – 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Johannes Gutenberg Universität, Mainz
26.05.1994 Vordiplom in Biologie
04.10.1996 Diplom-Prüfungen in Biologie
1996 – 1997 Diplomarbeit und -abschluß bei Prof. Dr. Gottfried Uden am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Mainz
Titel: „Fnr-ähnliche Regulatorproteine aus Gram-positiven Bakterien“
Inhalt: Suche nach *fnr*-ähnlichen Genen in Gram-positiven Bakterien
seit Februar 1998 Promotion bei Prof. Dr. Hartmut Michel am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main
Titel: „Erzeugung und Optimierung von Proteinoligomerisierungseinheiten“
Inhalt: Produktion und Untersuchung von Antikörperfragmenten in rekombinanter Fusion mit α -Helixbündeln
