

Ergebnisse

4.1 Etablierung des ‘Ribosome Display’

Unter dem Begriff ‘Ribosome Display’ verbirgt sich eine Aneinanderreihung von Einzelreaktionen, welche die *in vitro* Selektion von Proteinen zum Ziel haben. Jede der bei dieser Methode verwendeten Einzelreaktion ist für sich relativ unproblematisch, doch im Rahmen von *in vitro* Selektionsexperimenten müssen die Reaktionen optimal aufeinander abgestimmt sein und zudem über eine Vielzahl von Selektionszyklen ein gleichbleibend gutes Produkt liefern. Weiterhin müssen aber auch die mRNA und das daraus resultierende Protein für die Methode bestimmte Voraussetzungen erfüllen.

Die Etablierung der Gesamtmethode erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst mußte die Entstehung der PRM-Komplexe sichergestellt werden, bevor im weiteren Verlauf ihre Isolierung aufgrund einer vom synthetisierten Protein vermittelten Bindungseigenschaft erfolgte. Mit Hilfe eines Testsystems sollten schließlich die verschiedenen Reaktionen aufeinander abgestimmt, die Bedingungen optimiert und die Funktionsfähigkeit der Methodik an sich überprüft werden.

4.1.1 Design von Genen für das ‘Ribosome Display’

Alle in dieser Arbeit konstruierten Plasmide basieren auf dem Expressionsplasmid pHMFA von Dr. Merk (Dissertation, 2001) und wurden mit vorangestelltem ‘p’ gekennzeichnet. Der Vektor pHMFA besitzt einen für das fettsäurebindende Protein aus Rinderherz (FABP; 14,78 kDa) kodierenden Bereich (Billich *et al.*, 1988), welchem der untranslatierte Bereich des Gens *10* vom Bakteriophagen T7 vorangestellt und der zugehörige Transkriptionsterminator angefügt sind. Die Transkription befindet sich somit unter der Kontrolle des T7 Promotors. Zwischen dem Promotor und dem Startcodon liegt der sogenannte ‘gene 10 5’ leader’, eine dem translatierten Bereich vorausgehende Sequenz, die eine sehr effiziente Translation ermöglicht (Olins und Rangwala, 1989). Der positive Einfluß auf die Translation ist dadurch zu erklären, daß das entstehende Transkript die vom stark exprimierten T7 Gen *10* Protein stammende Ribosomenbindungsstelle (oder Shine Dalgarno Sequenz) besitzt und zudem eine stabilisierende Sekundärstruktur, einen sogenannten ‘stem-loop’, am 5’-Ende ausbildet (Studier *et al.*, 1990). Weiterhin kodiert das Plasmid die β -Lactamase, die eine Ampicillinresistenz vermittelt und deren Transkription unter der Kontrolle eines *E. coli* Promotors steht. Die konstruierten Plasmide unterscheiden sich vom pHMFA lediglich im kodierenden Bereich und im Abstand zum T7 Terminator. Die für die Transkription und

Translation wesentlichen Elemente sind identisch. Die Abbildung 11 zeigt schematisch den Bereich vom pHMFA, in dem sich die Klonierungen abspielten.

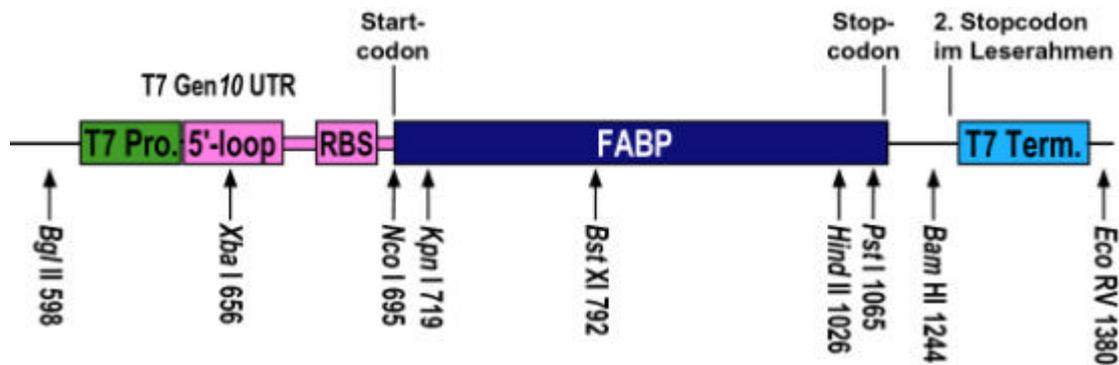


Abb. 11 Bereich von pHMFA, der zur Konstruktion neuer Plasmide verändert wurde

Das von Dr. Gerrits (Freie Universität Berlin) bereitgestellte Plasmid pSEL1 diente ebenfalls als Grundlage für die Konstruktion neuer Plasmide. Es basiert auf dem Plasmid pHMFA und ist bis auf den Bereich zwischen der *Nco* I- und der *Bst* XI-Restriktionsschnittstelle mit diesem identisch. Der Bereich zwischen der *Nco* I- und der *Bst* XI-Schnittstelle kodiert die Aminosäuren 19-83 des Chymotrypsin-Inhibitors 2 (CI2) aus dem Gerstenkorn (McPhalen und James, 1987) und einen $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ -Linker, bevor es ab der *Bst*XI-Schnittstelle mit dem FABP-Gen weitergeht. Das Molekulargewicht von SEL1 beträgt 21,04 kDa. Der ausgewählte Bereich, d.h. die Aminosäuren 19-83 vom CI2, ist in der Lage die biologisch aktive dreidimensionale Struktur auszubilden (Jackson und Fersht, 1994). Die Aminosäuren 54-63 des Inhibitors wurden im pSEL1 durch eine Sequenz ersetzt, die eine *Nsi* I- und *Xho* I-Schnittstelle einführt und insgesamt 17 Aminosäuren kodiert. Das zentrale Motiv dieser 17 Aminosäuren stellt der Strep-tag II mit seinen acht Resten. Die Abb. 12 soll den Aufbau des Plasmids pSEL1 veranschaulichen.

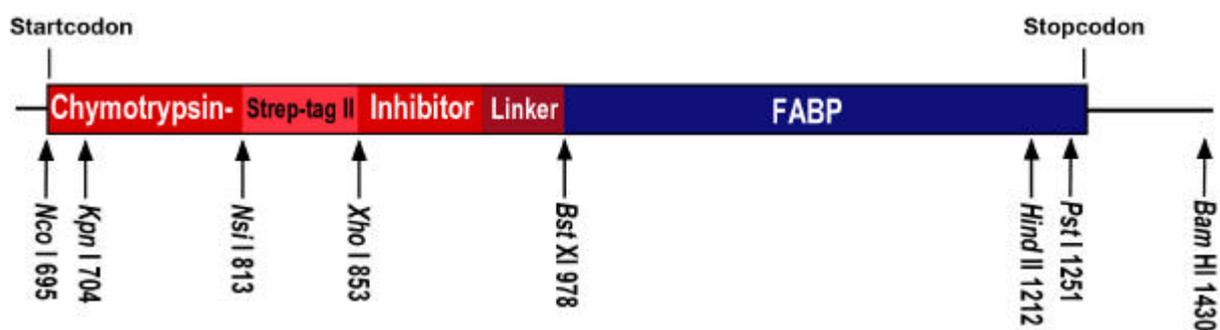


Abb. 12 Bereich von pSEL1 der mit pHMFA nicht übereinstimmt

Für die eigentliche Selektion beim 'Ribosome Display' wurden in dieser Arbeit mRNAs verwendet, die einige Besonderheiten aufweisen. Sie verfügen über kein Stopcodon, sie

kodieren unter anderem für einen sogenannten Abstandhalter ('Spacer') in Anschluß an das eigentliche Gen und sie besitzen ein Sekundärstrukturelement am 3'-Ende, welches nicht nur direkt auf den kodierenden Bereich folgt, sondern ebenfalls translatiert wird.

Bei Verwendung der oben beschriebenen Vektoren, beginnen die daraus resultierenden Transkripte mit einem stabilen Sekundärstrukturelement. Zum Schutz des 3'-Endes wurde der Terminator vom *E. coli* Lipoprotein (lpp) eingeführt. Er bildet ebenfalls eine Sekundärstruktur aus und kodiert für 15 Aminosäuren, die bereits einen Teil des 'Spacers' darstellen. Die Abb. 13 soll den schematischen Aufbau einer für das 'Ribosome Display' geeigneten DNA-Matrize und der entsprechenden mRNA veranschaulichen.

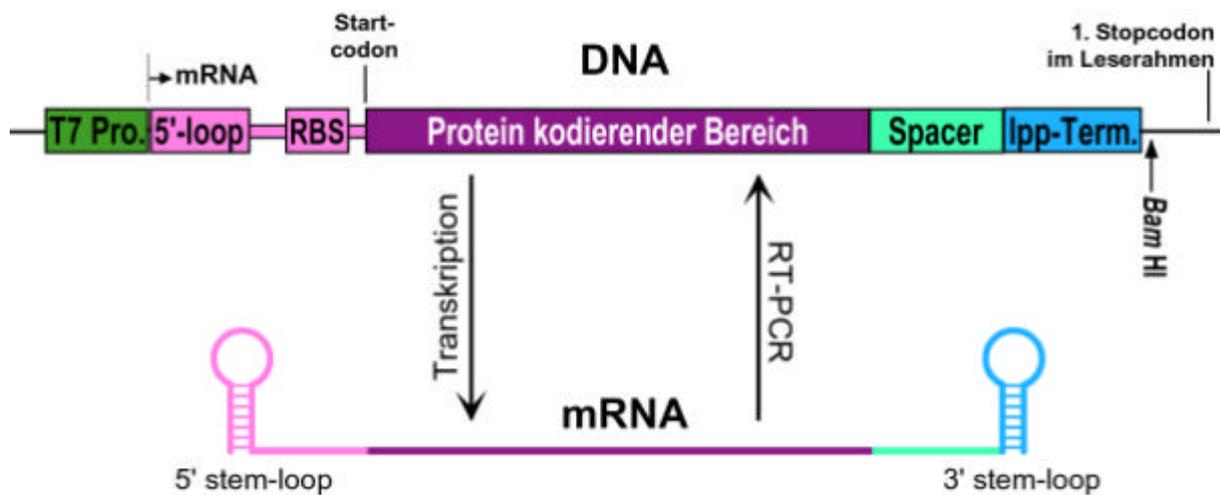


Abb. 13 Design eines Konstruktes für das 'Ribosome Display'

Die mRNA erhält man ausgehend von der DNA mittels *in vitro* Transkription und durch eine RT-PCR läßt sich diese wieder in DNA überführen. Allerdings ist bei der PCR ein Primer zu verwenden, der den für die Transkription notwendigen T7-Promotor einführt.

4.1.1.1 Konstruktion von Plasmiden für das 'Ribosome Display'

Um erste methodische Untersuchungen zum 'Ribosome Display' durchführen zu können, mußten die beiden oben beschriebenen Plasmide pHMFA und pSEL1 mit der Sequenz des Lipoproteininterminators aus *E. coli* versehen werden. Bei diesem Eingriff wurde gleichzeitig das eigentliche Stopcodon entfernt.

Jedes der beiden Plasmide wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Bam* HI geschnitten, dephosphoryliert und über ein Agarosegel gereinigt. Die beiden Oligonukleotide lpp1 und lpp2 (Anhang) wurden erst phosphoryliert, dann miteinander hybridisiert und schließlich in die aufgereinigten Vektoren ligiert. Bei den so erhaltenen Plasmiden, namentlich pFAlpp und pSEL2, wurde das Stopcodon, sowie der für die zehn C-terminalen Aminosäuren von FABP

kodierende Bereich durch einen modifizierten Lipoproteinterminator (Hanes und Plückthun, 1997), der für 15 Aminosäuren kodiert, ersetzt (Abb. 14). Das nächste Stopcodon im Leserahmen folgt mit einem Abstand von 60 Basenpaaren, so daß die Translationsprodukte um weitere 20 Aminosäuren verlängert werden.

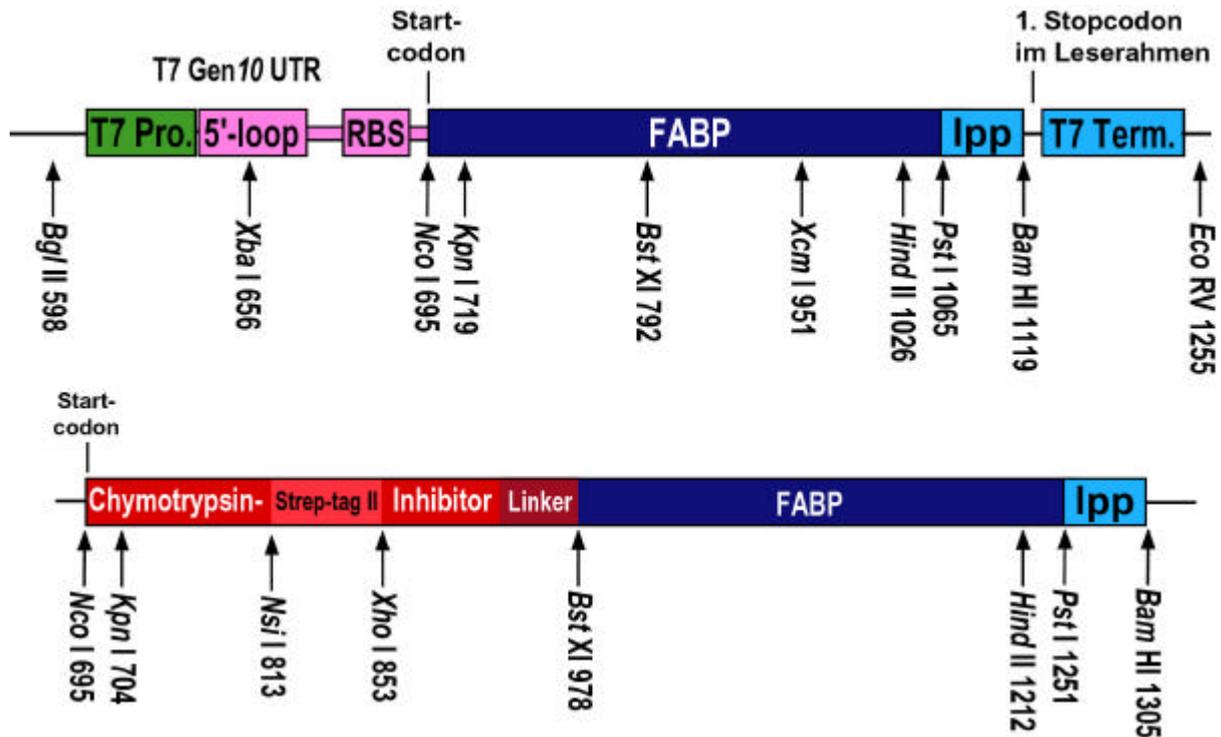


Abb. 14 Schematischer Aufbau von pFAIpp (oben) und pSEL2 (unten)

4.1.2 Untersuchungen zur Entstehung von PRM-Komplexen

Die Entstehung von PRM-Komplexen ist Voraussetzung für die Selektion einer vom Protein vermittelten Eigenschaft. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob sich die Komplexe in der Praxis bilden und ausreichend stabil sind, um nachgewiesen zu werden. In diesem Rahmen wurde zudem der Einfluß der zwei wichtigsten Parameter, nämlich die Translationszeit und die Konzentration des AS-Oligos (Abb. 6, Kapitel 1.3.2.2), auf diesen grundsätzlichen Prozeß bestimmt. Dazu wurde das Plasmid pSEL2 mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI linearisiert und dann transkribiert. Die erhaltene mRNA trägt den Namen des zugrundeliegenden Plasmids, mit dem Unterschied, daß anstelle des vorangestellten 'p' alle in dieser Arbeit verwendeten mRNAs mit einem vorangestellten 'm' gekennzeichnet wurden. Geht die mRNA zudem aus einem linearisierten Plasmid hervor, so wird das verwendete Restriktionsenzym mit Schrägstrich dem Namen angefügt.

Zur Erzeugung der PRM-Komplexe wurde eine *in vitro* Translation mit mSEL2/Bam HI in einer Endkonzentration von 200 nM und in Anwesenheit von 5 μ M AS-Oligo durchgeführt. Um den zeitlichen Verlauf der Komplexbildung zu erfassen, wurden identische Reaktionsansätze 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 bzw. 90 min bei 37°C inkubiert, danach auf Eis gestellt und durch Zugabe von 1 M Magnesiumacetat eine Endkonzentration von 50 mM eingestellt. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 \times g abgetrennt. Vom so behandelten Reaktionsansatz wurde für die spätere Analytik ein Teil abgenommen und ein Teil einer Ultrazentrifugation von 90 min, bei 250.000 \times g und 4°C unterzogen. Nach der Ultrazentrifugation befanden sich die entstandenen PRM-Komplexe im Sediment und ließen sich so vom freigesetzten Protein, welches im Überstand verblieb, abtrennen. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in einem Volumen TLM-Puffer gelöst. Das durch den Einbau von 14 C-Leucin radioaktiv markierte Protein konnte mit TCA gefällt und im Szintillationszähler vermessen werden (Abb. 15). Der Reaktionsansatz, der Überstand und das Sediment der Ultrazentrifugation wurden zudem mittels SDS-PAGE analysiert.

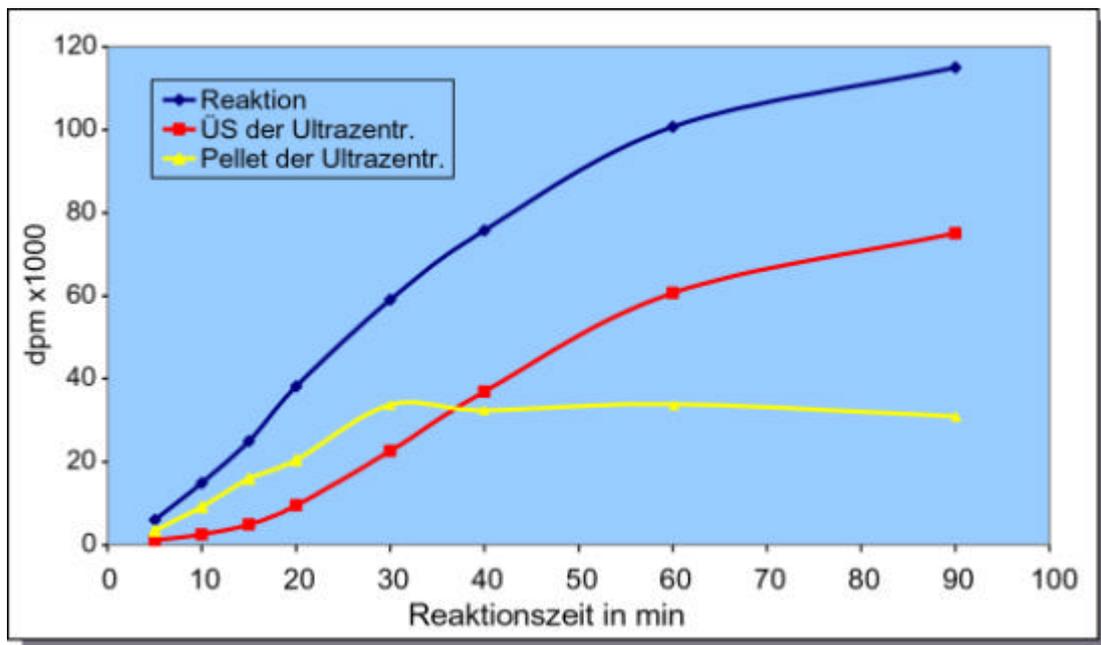


Abb. 15 Zeitlicher Verlauf der Bildung von PRM-Komplexen. Identische Translationsansätze mit mSEL2/Bam HI in Anwesenheit von 14 C-Leucin wurden unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert und der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt. Es folgte eine Ultrazentrifugation, um festzustellen welcher Anteil auf die PRM-Komplexe entfällt und in welchem Maße es sich um freigesetztes Protein handelt, das im Überstand der Ultrazentrifugation verbleibt. ÜS steht für Überstand.

Dieser erste indirekte Nachweis für die Entstehung der PRM-Komplexe zeigte zudem, daß sie über den Zeitraum der Analytik, welcher bis zu vier Stunden betrug, stabil sind. Um den Einfluß des AS-Oligos auf die Entstehung der ternären Komplexe zu überprüfen, wurde der

oben beschriebene Versuch mit folgenden Änderungen wiederholt. Ansonsten identische Translationsansätze mit einer Endkonzentration von 0, 1, 2, 5, 10 und 20 μM AS-Oligo wurden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wie beschrieben aufgearbeitet.

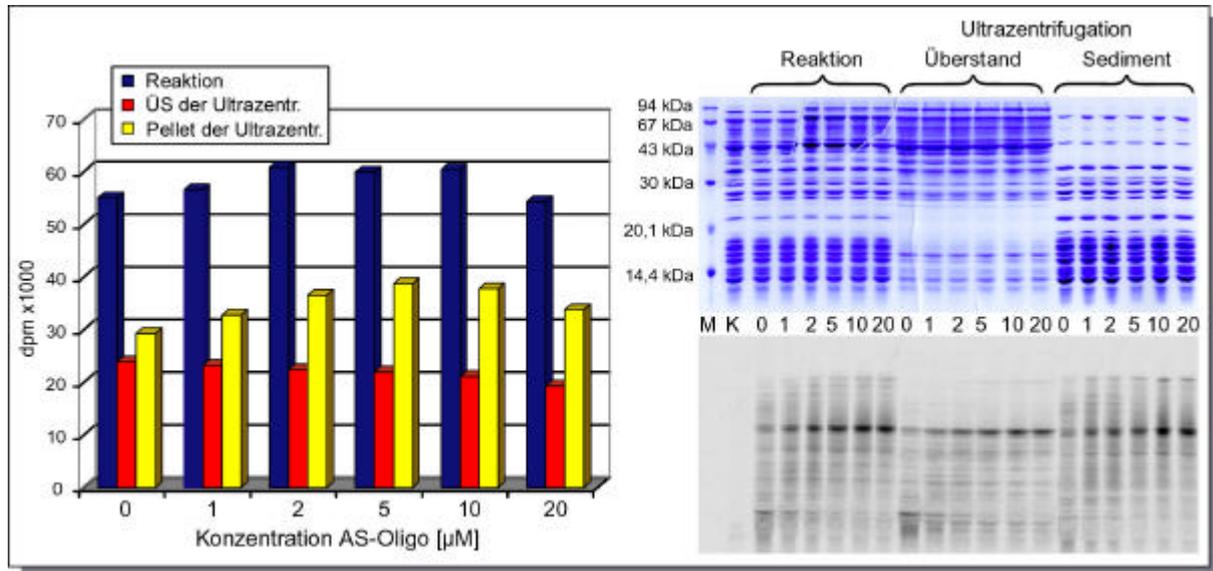


Abb. 16 Einfluß des AS-Oligos auf die Entstehung bzw. Stabilität der PRM-Komplexe. Translationsansätze mit *mSEL2/Bam HI*, ^{14}C -Leucin und verschiedenen Konzentrationen des AS-Oligos wurden 30 min bei 37°C inkubiert und der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt. Es folgte eine Ultrazentrifugation, um festzustellen welcher Anteil der TCA-fällbaren Radioaktivität auf die PRM-Komplexe entfällt und in welchem Maße es sich um freigesetztes Protein handelt, das im Überstand verbleibt. Das Diagramm auf der linken Seite faßt die Ergebnisse zusammen. Auf der rechten Seite sind sowohl das Coomassie gefärbte 15%-ige Gel (oben) nach der SDS-PAGE als auch das zugehörige Autoradiogramm gezeigt, wobei M für Molekulargewichtsmarker und K für einen Kontrollansatz ohne Matrize steht.

Für die sich anschließenden Untersuchungen wurde aufgrund der erzielten Ergebnisse die Translationszeit auf 30 min verkürzt und das AS-Oligo in einer Endkonzentration von 5 μM zugegeben.

4.1.3 Isolierung von PRM-Komplexen mittels Strep-tag II

Nachdem die ersten Ergebnisse für die Entstehung und eine ausreichende Stabilität der PRM-Komplexe sprachen, galt es festzustellen, ob auch ihre Abtrennung aufgrund einer vom Protein vermittelten Bindungseigenschaft möglich ist. Die naheliegendste und zugleich einfachste Möglichkeit dies zu realisieren liegt in der Verwendung eines Affinitätspeptids. Die Wahl fiel auf das Strep-tag II (Kapitel 3.11.1), da es eine sehr spezifische Aufreinigung *in vitro* translaterter Proteine ermöglicht (Lamla und Erdmann, 2002). Bevor jedoch mit der Abtrennung der Komplexe von den übrigen Reaktionskomponenten begonnen werden konnte, mußte sichergestellt werden, daß die Affinitätschromatographie unter den PRM-Komplex stabilisierenden Bedingungen funktioniert.

Es wurden drei gekoppelte Transkriptions-, Translationsreaktionen mit ^{14}C -Leucin durchgeführt. Als Matrize für die ersten beiden Ansätze diente pSEL2/*Eco* RV und für den dritten Ansatz das zirkuläre pFAIpp. Ein Ansatz mit pSEL2 diente als Kontrolle und sollte die Qualität der Aufreinigung unter den herkömmlichen Bedingungen widerspiegeln. Die anderen beiden Ansätze sollten zeigen, welchen Einfluß die für das 'Ribosome Display' benötigten Bedingungen (RD-Bedingungen) auf die Chromatographie haben. Die Translation erfolgte also in Anwesenheit von 5 μM AS-Oligo, anschließend wurden die beiden Ansätze auf Eis gestellt und Magnesiumacetat zugegeben. Alle Ansätze wurden 3 min bei 4°C und 15.000 \times g zentrifugiert, bevor der Überstand auf vorbereitete StrepTactin-Sepharosesäulen aufgetragen wurde. Die Chromatographie unter den RD-Bedingungen fand bei 4°C unter Verwendung des RD-Puffers, welcher zur Elution 2,5 mM Desthiobiotin enthielt, statt. Die verschiedenen Fraktionen wurden gesammelt, der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt und daraus die Menge an synthetisiertem Protein berechnet. Zwischen den herkömmlichen und den RD-Bedingungen war kein Unterschied festzustellen (Abb. 17), d.h. die RD-Bedingungen machen sich bei der Affinitätschromatographie nicht bemerkbar. Der Ansatz mit pFAIpp diente als Negativkontrolle und sollte zeigen, daß die auf das Strep-tag zurückzuführende Bindung an der Matrix spezifisch ist.

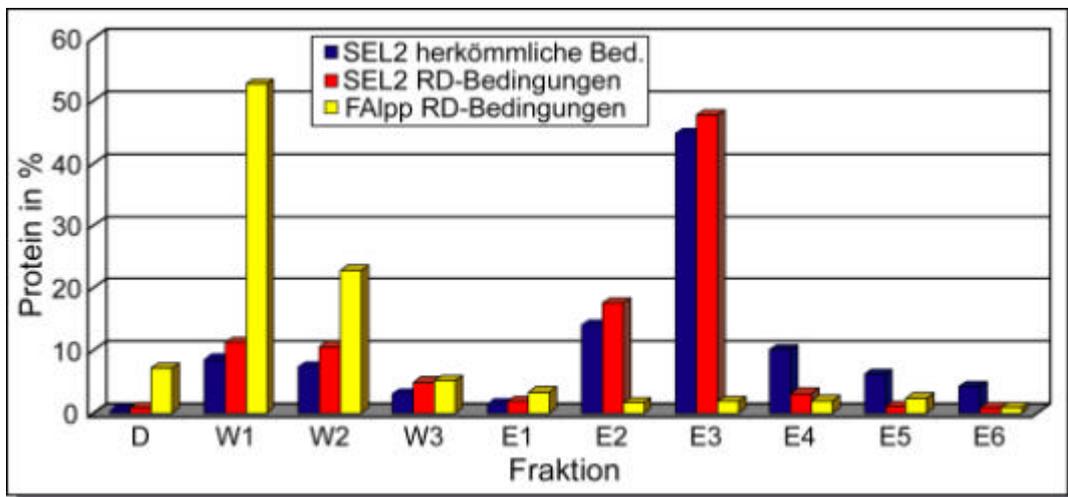


Abb. 17 Strep-tag II Affinitätschromatographien im Vergleich. Das Protein SEL2 wurde in vitro translatiert und anschließend aufgereinigt. Dies geschah zum einen unter Standardbedingungen und zum anderen unter den für die Bildung der PRM-Komplexe optimalen Bedingungen. Der Ansatz mit dem Protein FAIpp, welches keinen Strep-tag II besitzt, sollte die Spezifität der Aufreinigung unter den veränderten Bedingungen dokumentieren. D steht für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion.

Nachdem es möglich war ausreichend stabile PRM-Komplexe zu erzeugen, sollten erste Versuche zur Isolierung der Komplexe durchgeführt werden. Wie bereits beobachtet (Abb. 15) ist ein gewisser Anteil des synthetisierten Proteins nicht mehr mit dem Ribosom assoziiert,

sondern liegt frei in Lösung vor. Damit schließt sich eine Markierung des Proteins aus, da dessen Verteilung auf die verschiedenen Fraktionen der StrepTactin-Chromatographie wenig aussagekräftig wäre. Demzufolge wurde durch den Einbau von α -³⁵S-CTP, während der Transkription von pSEL2/*Bam* HI (ohne Stopcodon), die mRNA (mSEL2/*Bam* HI) radioaktiv markiert. Dies ist sinnvoll, da die mRNA nur im Eluat der Chromatographie auftreten kann, wenn sie gemeinsam mit dem Protein, das die Bindungseigenschaft vermittelt, im Komplex vorliegt. Die Bindung des im Komplex befindlichen Proteins an die Matrix ist Voraussetzung für die Isolierung der mRNA.

Es wurde eine 30 minütige Translation mit 200 nM mSEL2/*Bam* HI in Anwesenheit von 5 μ M AS-Oligo durchgeführt, anschließend auf Eis gekühlt und Magnesiumacetat in einer Endkonzentration von 50 mM zugegeben. Dieser Ansatz wurde auf eine StrepTactin-Sepharosesäule aufgetragen und einer Strep-tag II Affinitätschromatographie unter den RD-Bedingungen unterzogen. Der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität jeder Fraktion wurde bestimmt und damit festgestellt, daß auf diese Weise keine signifikante Menge der markierten mRNA eluiert werden konnte. Daraufhin wurde die Translationsreaktion wiederholt, einer Ultrazentrifugation unterworfen, das Sediment der Zentrifugation in RD-Puffer gelöst und auf die Affinitätssäule gegeben. Doch auch bei der direkten Verwendung von den PRM-Komplexen, ohne das um Bindungsstellen konkurrierende freigesetzte Protein, ließ sich keine mRNA abtrennen.

Eine Erklärung für die scheinbar nicht vorhandene Bindung wäre eine fehlende Zugänglichkeit des Strep-tags. Hervorgerufen durch die Anwesenheit des Komplexes, der entweder zu einer falschen Faltung des Proteins führt oder eine sterische Hinderung bewirkt. Um auch diese mögliche Fehlerquelle auszuräumen, wurde ein weiteres Konstrukt angefertigt, bei dem sich das Strep-tag II am N-Terminus des FABP befindet. Auf diese Weise erhält es den größtmöglichen Abstand zum Komplex und sollte am ehesten zugänglich sein.

Das Plasmid pFAlpp wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Nco* I geschnitten, anschließend dephosphoryliert und über ein Agarosegel gereinigt. Die beiden Oligonukleotide NSt1 und NSt2 (Anhang) wurden erst phosphoryliert, dann miteinander hybridisiert und schließlich in den gereinigten Vektor ligiert. Der so erhaltene Vektor wurde pFAlpp+NStII bezeichnet. Er kodiert für einen N-terminalem Strep-tag II, auf den im Abstand von zwei Aminosäuren das oben beschriebene FABP mit Lipoproteininterminator folgen. Das Molekulargewicht bei terminierter Translation beträgt 18,9 kDa.

In einem ersten Versuch wurde das aus diesem Konstrukt hervorgehende Translationsprodukt durch eine Strep-tag II Affinitätschromatographie unter RD-Bedingungen aufgereinigt. Auch

in diesem Fall ergab sich kein Unterschied im Vergleich zu den Standardbedingungen. Die sich daraufhin anschließende Isolierung von PRM-Komplexen, nach einer *in vitro* Translation von radioaktiv markierter mFAIpp+NStII/Bam HI in einer Endkonzentration von 200 nM unter RD-Bedingungen und dementsprechender Behandlung, blieb abermals erfolglos. Ein letzter Versuch sollte Aufschluß darüber geben, ob die mangelnde Bindung an der Strep-Tactin-Matrix auf den PRM-Komplex zurückzuführen ist oder ob bereits das Protein FAIpp+NStII/Bam HI Schwierigkeiten bei der Bindung aufweist. Eine weitere Translationsreaktion wurde wie zuvor durchgeführt, allerdings diesmal nicht mit markierter mRNA sondern in Gegenwart von ^{14}C -Leucin. Es folgte eine Ultrazentrifugation, gefolgt vom Lösen des aus PRM-Komplexen bestehende Sediments in RD-Puffer. Die eine Hälfte wurde direkt zu einer Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose eingesetzt. Die andere Hälfte wurde zuvor mit Puromycin in einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und 10 min bei 37°C inkubiert. Das Antibiotikum Puromycin bindet an der A-Stelle des Ribosoms und seine α -Aminogruppe bildet eine Peptidbindung mit der Carboxylgruppe der wachsenden Peptidkette (Kapitel 1.3.3.1). Das Peptidyl-Puromycin dissoziiert anschließend vom Ribosom ab (Monro und Marcker, 1967). Es wurde sowohl der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität der verschiedenen Fraktionen der Chromatographie bestimmt, als auch identische Mengen mittels SDS-PAGE auf einem 15%-igen Gel analysiert (Abb. 18).

Wie erwartet nimmt die Menge an Protein im Sediment der Ultrazentrifugation nach Zugabe von Puromycin von 75% auf 13% ab, wohingegen sie im Überstand zunimmt. 22% des markierten Proteins von der mit Puromycin behandelten Probe ließen sich im Verlauf der Affinitätschromatographie eluieren. Von der anderen Probe, wo die PRM-Komplexe stabilisiert wurden, konnten hingegen nur 5% eluiert werden. Dieses Ergebnis zeigte, daß das Potential des Strep-tag II Systems nur für die Bindung und Aufreinigung des freien Proteins ausreicht, aber nicht wenn das Protein Teil des Komplexes ist. Alle bisher erzielten Ergebnisse sind nur ein indirekter Beweis für die Existenz des PRM-Komplexes, aber sein Einfluß auf den Verlust der Bindung an die Affinitätsmatrix scheint offensichtlich zu sein. Mit anderen Worten ist die Bindungsaffinität des Strep-tag II zu StrepTactin nicht ausreichend, um ganze PRM-Komplexe zu isolieren.

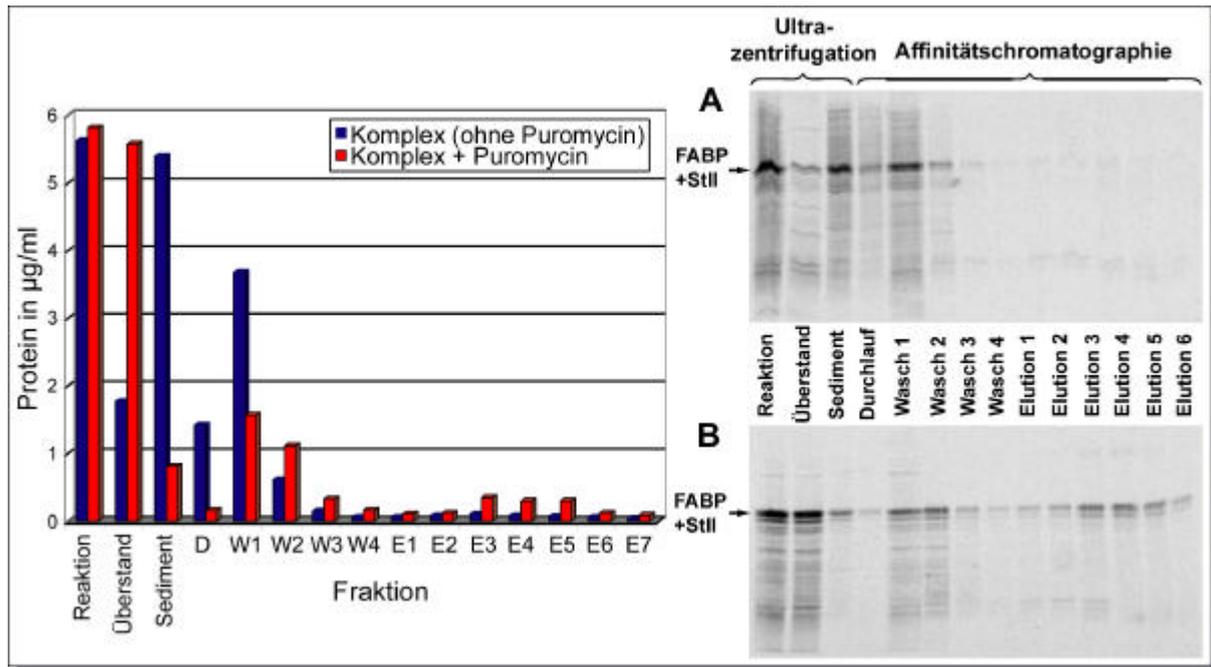


Abb. 18 Einfluß des PRM-Komplex auf die Bindungskapazität des Strep-tag II. Ein *in vitro* Translationssystem wurde verwendet, um FABP mit Strep-tag II zu synthetisieren und den korrespondierenden PRM-Komplex zu bilden. Der Reaktionsansatz wurde geteilt und einer Ultrazentrifugation mit anschließender Affinitätschromatographie unterzogen. Von den Fraktionen der Chromatographie wurde der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt (linkes Diagramm) und zudem die Translationsprodukte mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind die Autoradiogramme (rechts). A: Verhalten der intakten PRM-Komplexe. B: Verhalten des freigesetzten Proteins nach Zugabe von Puromycin. D steht für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion.

4.1.4 Abtrennung von PRM-Komplexen mittels His-tag

Das zur Zeit am häufigsten verwendete Affinitätspeptide mit einer starken Bindungsaffinität ist der His-tag (Kapitel 3.11.2), der im allgemeinen aus vier bis acht Histidinresten besteht. Er bindet Metallionen, welche als Chelatkomplexe an einer Festphase gebunden sind (Hochuli *et al.*, 1988; Arnold, 1991). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Festphase handelt es sich um IDA-Agarose, auf die Ni^{2+} -Ionen aufgebracht wurden.

Ausgehend vom Plasmid pFAlpp und dem Primerpaar FAHisN und lpp (Anhang) wurde eine PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde erst mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Pst* I geschnitten und dann aufgereinigt. Die Vektoren pFA und pFAlpp wurden identisch behandelt. Durch Ligation des DNA-Fragments mit den Vektoren wurden die Konstrukte pFA+NHis und pFAlpp+NHis erhalten, die für ein einzelnes Valin gefolgt von einem Hexahistidin-tag am N-Terminus des FABP kodieren. Die Translationsprodukte sind also sieben Aminosäuren länger als die von pFA bzw. pFAlpp und die PCR-Produkte sind demzufolge um 21 bp verlängert. Bei normaler Termination beträgt das Molekulargewicht von

FA+NHis 15,7 kDa und das von FAIpp+NHis 18,46 kDa. Die Abbildung 19 illustriert diesen Zusammenhang.

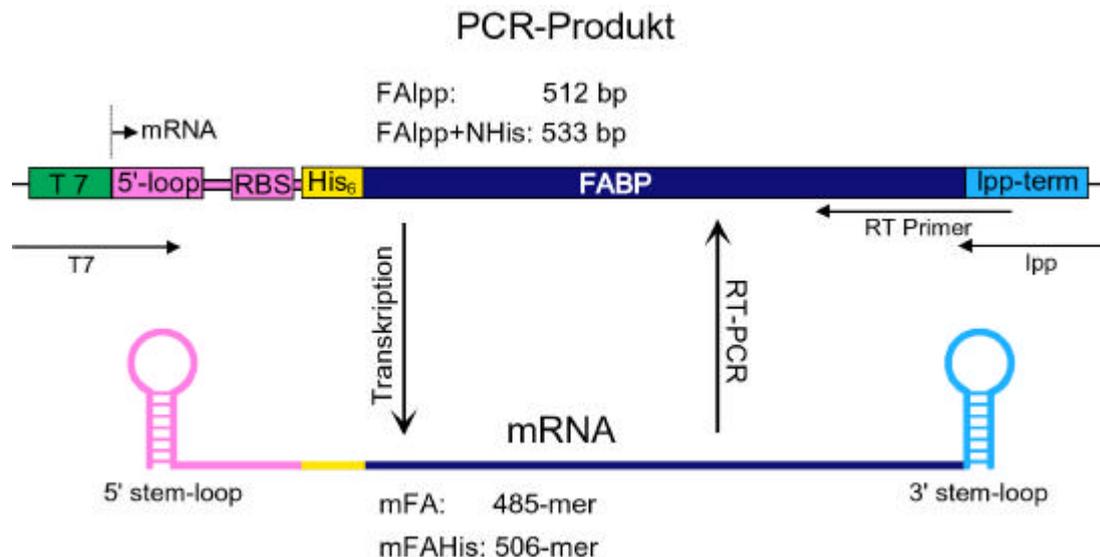


Abb. 19 Schematischer Aufbau des modifizierten FABP-Gens von pFAIpp+NHis. Gezeigt ist das PCR-Produkt bei Verwendung der angegebenen Primer und die korrespondierende mRNA. Die Größe des identischen PCR-Produktes und der mRNA von pFAIpp (ohne His-tag) dienen zum Vergleich.

Bevor versucht wurde die PRM-Komplexe aufgrund des His-tags abzutrennen, mußte wie zuvor beim Strep-tag II sichergestellt werden, daß die Affinitätschromatographie auch unter den RD-Bedingungen funktioniert und spezifisch ist. Um dies zu überprüfen, wurden gekoppelte Transkriptions-, Translationsreaktionen in Anwesenheit von ¹⁴C-Leucin mit pFAIpp und pFAIpp+NHis durchgeführt. Nach 90 minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze auf Eis gelagert, mit 1 M Magnesiumacetat eine Endkonzentration von 50 mM eingestellt, 5 min bei 4°C und 15.000× g zentrifugiert und schließlich die Ansätze auf die vorbereiteten Säulen überführt. Die Chromatographie fand bei 4°C statt und die verwendeten Puffer enthielten zusätzlich 50 mM Magnesiumacetat. Abweichend vom Protokoll (Kapitel 3.11.2) betrug die Imidazolkonzentration des Waschpuffers nur 20 mM. Von den verschiedenen Fraktionen der Chromatographie wurde der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt. Zudem wurden identische Mengen vom Ansatz mit His-tag einer SDS-PAGE unterzogen, um die Qualität der Chromatographie zu überprüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt und zeigen, daß die RD-Bedingungen abermals keinen Einfluß auf die Chromatographie haben.

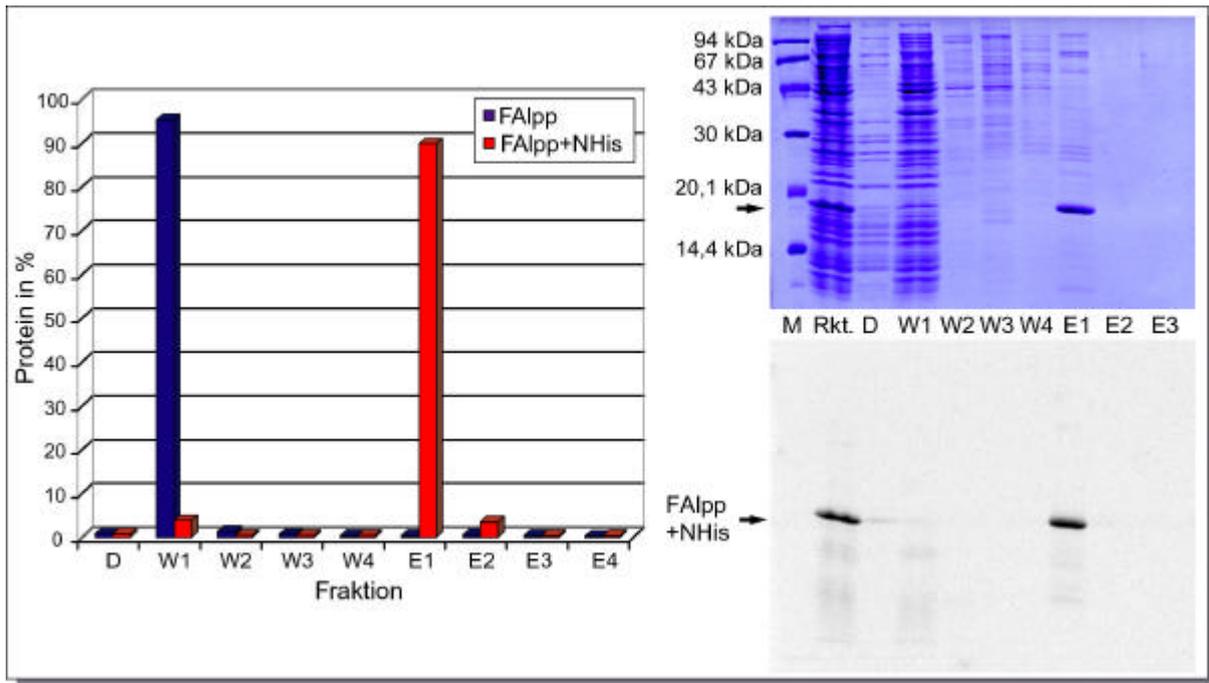


Abb. 20 Ergebnis einer His-tag Affinitätschromatographie unter RD-Bedingungen. Ausgehend von den Vektoren pFAIpp und pFAIpp+NHis wurden mittels zellfreier Proteinbiosynthese in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin die zugehörigen Proteine synthetisiert und einer His-tag Affinitätschromatographie zugeführt. Das linke Diagramm spiegelt den Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität wider. Auf der rechten Seite sind das Coomassie gefärbte Gel (oben) und das zugehörige Autoradiogramm nach Auftrennung der Fraktionen von der FAIpp+NHis-Chromatographie durch SDS-PAGE auf einem 15%-igen Gel gezeigt. M steht für Molekulargewichtsmarker, Rkt. für Reaktionsansatz, D für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion.

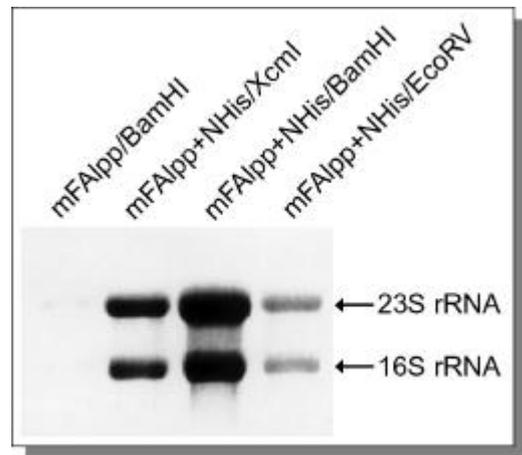
Im Anschluß an die erfolgreiche Affinitätschromatographie unter RD-Bedingungen, sollten die PRM-Komplexe über den His-tag abgetrennt werden. Zuerst wurden die Vektoren pFAIpp und pFAIpp+NHis mit je einer Restriktionsendonuklease linearisiert und danach *in vitro* transkribiert, wobei die mRNAs durch Einbau von α - ^{35}S -CTP radioaktiv markiert wurden. Zur Linearisierung wurden die Enzyme *Xcm* I, *Bam* HI und *Eco* RV verwendet, so daß sich die resultierenden mRNAs folgendermaßen unterschieden:

mFAIpp/ <i>Bam</i> HI	ohne His-tag und Stopcodon	(485-mer)
mFAIpp+NHis/ <i>Xcm</i> I	ohne Ipp-Terminator und Stopcodon	(338-mer)
mFAIpp+NHis/ <i>Bam</i> HI	ohne Stopcodon	(506-mer)
mFAIpp+NHis/ <i>Eco</i> RV	mit Stopcodon	(642-mer)

Ausgehend von diesen mRNAs, wobei mFAIpp/*Bam* HI als Kontrolle diente, fand eine 30 minütige *in vitro* Translation mit 200 nM mRNA in Anwesenheit von 5 μM AS-Oligo statt, gefolgt von einer Inkubation auf Eis und Zugabe von 1 M Magnesiumacetat in einer Endkonzentration von 50 mM. Eine wie oben beschriebene His-tag Affinitätschromatographie schloß sich an, bevor der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 5 mM DTT, welches mit dem Nickel reagierte und ein braunes Präzipitat bildete.

Welchen Einfluß dieses Präzipitat auf die Chromatographie hatte ist unklar. Die Menge eluierter mRNA war bei allen Ansätze mit His-tag höher als beim Kontrollansatz. Das beste Ergebnis in dieser Hinsicht lieferte der Ansatz mit mFAIpp+NH₂/Bam HI, bei dem etwa 3% der eingesetzten mRNA auf das Eluat entfielen, was der vierfachen Menge des Kontrollansatzes entsprach. Da der Verlauf der mRNA während der Chromatographie verfolgt wurde, die Bindung am chelatierten Nickel aber nur vom His-tag bewerkstelligt werden kann, sollten theoretisch PRM-Komplexe abgetrennt worden sein. Um dies sicherzustellen wurden die Eluate jeweils einer Phenolextraktion unterzogen, mit Isopropanol gefällt und in 8 µl H₂O gelöst. Nach Zugabe von 16 µl MOPS-Probenpuffer wurden die Ansätze 6 min bei 65°C inkubiert und danach auf einem 1,5%-igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Die ribosomalen RNAs wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Abb. 21 Abtrennung von PRM-Komplexen mittels His-tag Affinitätschromatographie. Es wurden *in vitro* Translationen mit verschiedenen mRNAs durchgeführt und die entstandenen PRM-Komplexe einer His-tag Affinitätschromatographie zugeführt. Die Komplexe der Eluate wurden zerstört und die ribosomalen RNAs auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Menge der rRNAs spiegelt die Menge abgetrennter PRM-Komplexe wider.



Der Kontrollansatz mit mFAIpp/Bam HI weist fast keine ribosomalen RNAs auf, obwohl er alle nötigen Elemente zur Bildung von PRM-Komplexen besitzt. Dies zeigt, daß die Abtrennung auf das im ternären Komplex befindliche Protein zurückzuführen ist. Der Ansatz mit mFAIpp+NH₂/Eco RV dient als weitere Kontrolle, da das vorhandene Stopcodon die Termination ermöglicht und somit der Entstehung von PRM-Komplexen entgegenwirkt. Erwartungsgemäß fällt die Menge ribosomaler RNAs im Vergleich zu den Ansätzen ohne Stopcodon geringer aus. Zu guter Letzt zeigt der Ansatz mit mFAIpp+NH₂/Xcm I, daß die Länge des Proteins und damit der Abstand zum Ribosom für die Bindung an die Matrix nicht unwesentlich ist.

Um sicherzustellen, daß die ribosomalen RNAs und damit die PRM-Komplexe im Eluat wirklich angereichert vorlagen, wurde der Versuch mit mFAIpp/Bam HI als Kontrolle und mFAIpp+NH₂/Bam HI wiederholt. Im Unterschied zum vorherigen Versuch enthielt der Reaktionsansatz kein DTT, betrug die Translationszeit nur 20 min und die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer war 0,5 M. Die Menge der rRNAs in den Fraktionen der

Chromatographie wurde auf einem Agarosegel verfolgt. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

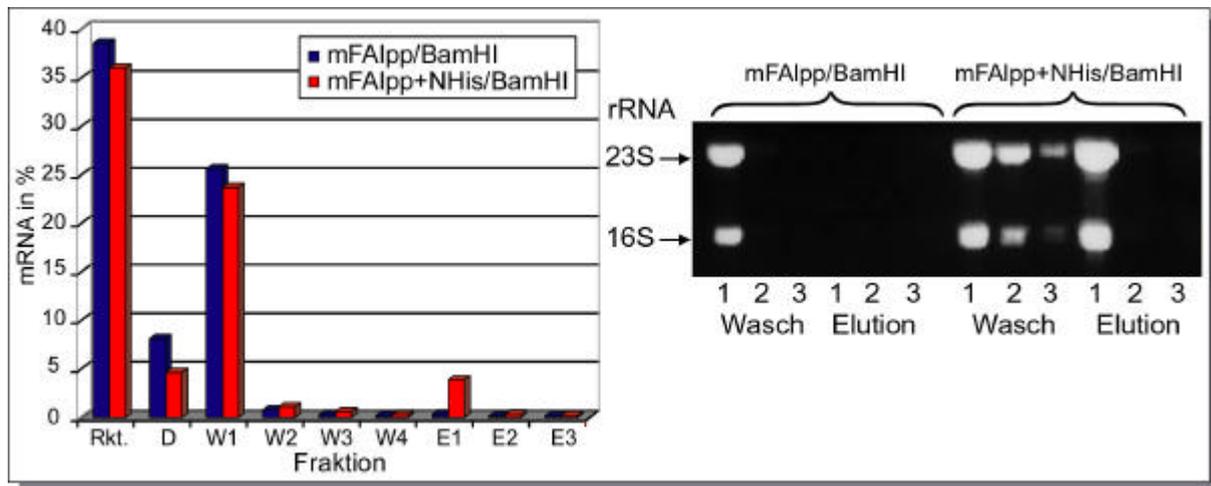


Abb. 22 Abtrennung von PRM-Komplexen mittels His-tag Affinitätschromatographie. Es wurden *in vitro* Translationen mit radioaktiv markierten mRNAs durchgeführt und die entstandenen PRM-Komplexe einer His-tag Affinitätschromatographie unterzogen. Das linke Diagramm spiegelt den Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie wider. Dabei steht Rkt. für Reaktionsansatz nach der Translation, D für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion. Die ribosomalen RNAs der Wasch- und Elutionsfraktionen wurden aus den PRM-Komplexen isoliert und auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt (rechte Seite).

Aufgrund der Variationen zum vorherigen Versuch entfielen etwa 4% der eingesetzten mFAIpp+NHis/Bam HI auf die erste Elutionsfraktion, wohingegen der Kontrollansatz mit mFAIpp/Bam HI nur etwa 0,3% aufwies. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nach der 20 minütigen Inkubation bei 37°C weniger als 40% der eingesetzten mRNA für die Chromatographie zur Verfügung standen. Die Menge an ribosomalen RNAs in den verschiedenen Fraktionen bestätigt die Werte der TCA-Fällung und beweist, daß die mRNA im Komplex mit dem Ribosom vorliegt. Ferner ist die Abtrennung von Ribosom und mRNA auf den His-tag zurückzuführen, der Teil des translatierten Proteins und somit ebenfalls Teil des Komplexes ist.

Als wichtiges Zwischenergebnis gilt es neben der Entstehung und Stabilisierung der PRM-Komplexe, deren Abtrennung mit Hilfe eines Hexahistidin-tags festzuhalten. Das Ribosom kann demzufolge als Bindeglied zwischen Genotyp, in Form der mRNA und Phänotyp, in Form des synthetisierten Proteins, fungieren.

4.1.4.1 Optimierung der Abtrennung von PRM-Komplexen

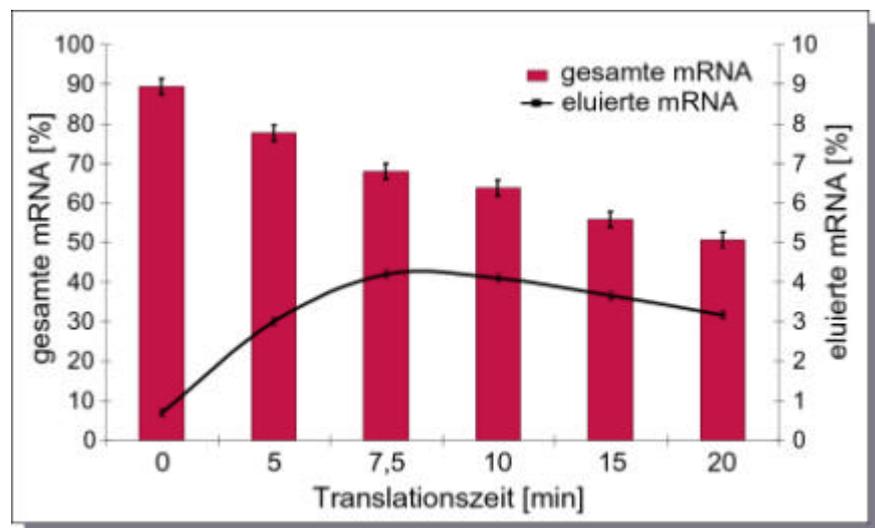
Aufbauend auf den erzielten Ergebnisse sollten nun die wichtigsten Parameter mit dem Ziel optimiert werden, einen möglichst großen Anteil der eingesetzten mRNA in Form von PRM-

Komplexen zu isolieren. Die mRNAs mFAlpp+NHis/*Bam* HI mit der zugehörigen Kontrolle mFAlpp/*Bam* HI, sowie die His-tag Affinitätschromatographie bildeten das Testsystem. Ausgegangen wurde von einem Translationsansatz mit 200 nM radioaktiv markierter mRNA, 5 µM AS-Oligo und einer Translationszeit von 20 min. Es folgte die sofortige Lagerung auf Eis, die Zugabe von 1 M Magnesiumacetat auf eine Endkonzentration von 50 mM, bevor mit 0-4°C kaltem RD-Puffer auf das doppelte Reaktionsvolumen aufgefüllt wurde. Alle für die Affinitätschromatographie verwendeten Puffer beinhalteten 50 mM Magnesiumacetat und waren bei Verwendung 0-4°C kalt. Die Waschschritte umfaßten je zwei Säulenvolumen, wobei die Imidazolkonzentration des ersten Waschschrittes 5 mM und bei den drei folgenden Waschschritten 20 mM betrug. Eluiert wurde mit dem zweifachen Säulenvolumen und einer Imidazolkonzentration von 0,5 M.

Variation der Translationszeit

Identische 100 µl-Ansätze mit radioaktiv markierter mFAlpp+NHis/*Bam* HI wurden 0, 5, 7,5, 10, 15 und 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend wie oben beschrieben behandelt, bevor die entstandenen PRM-Komplexe affinitätschromatographisch abgetrennt und der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen bestimmt wurde.

Abb. 23 Einfluß der Translationszeit auf die Menge eluierter mRNA. Mit „gesamte mRNA“ ist die nach der Translation noch vorhandene mRNA gemeint und mit „eluierter mRNA“ die in den abgetrennten PRM-Komplexen befindliche mRNA in Bezug auf die eingesetzte mRNA.

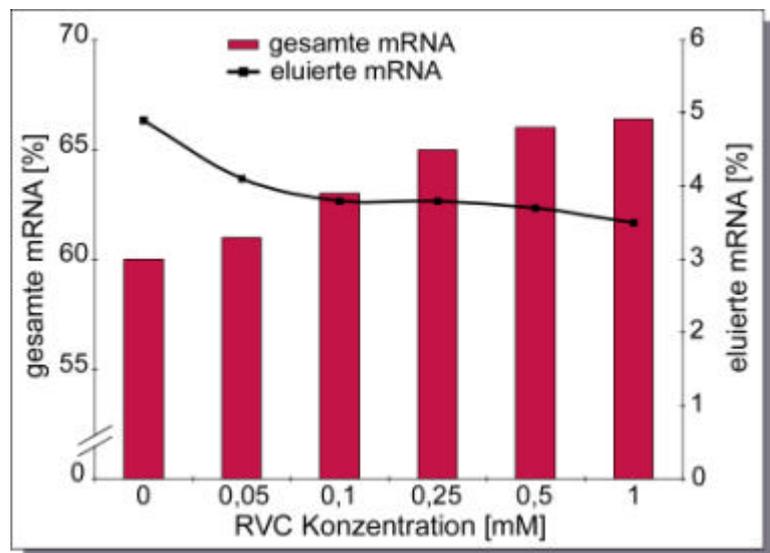


Wie anhand der Abbildung 23 zu sehen ist, nimmt die im System noch vorhandene Menge an mRNA mit zunehmender Translationszeit kontinuierlich ab. Die Menge eluierter mRNA hingegen nimmt bis zu einer Translationszeit von etwa 8 min zu, bevor sie bei andauernder Inkubation leicht abnimmt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Translationszeit der noch folgenden Ansätze auf 8-10 min verkürzt.

Einfluß des Ribonukleosid-Vanadyl-Komplexes (RVC)

Der Ribonukleosid-Vanadyl-Komplex ist in der Lage Ribonukleasen zu inhibieren (Berger, 1987), indem er vermutlich als Analogon des Übergangszustandes agiert. Aus diesem Grund wurde sein Einfluß auf die Menge eluierbarer mRNA untersucht. 100 µl-Ansätze mit radioaktiv markierter mFAlpp+NHis/Bam HI und 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 mM RVC wurden 10 min bei 37°C inkubiert und in Anschluß an die Translation durch Zugabe von 100 mM RVC auf eine Endkonzentration von 2 mM gebracht. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie beschrieben und letztlich wurde der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie bestimmt.

Abb. 24 Einfluß des RVC auf die Menge eluierter mRNA. Mit „gesamte mRNA“ ist die nach der Translation noch vorhandene mRNA gemeint und mit „eluierter mRNA“ die in den abgetrennten PRM-Komplexen befindliche mRNA in Bezug auf die eingesetzte mRNA.

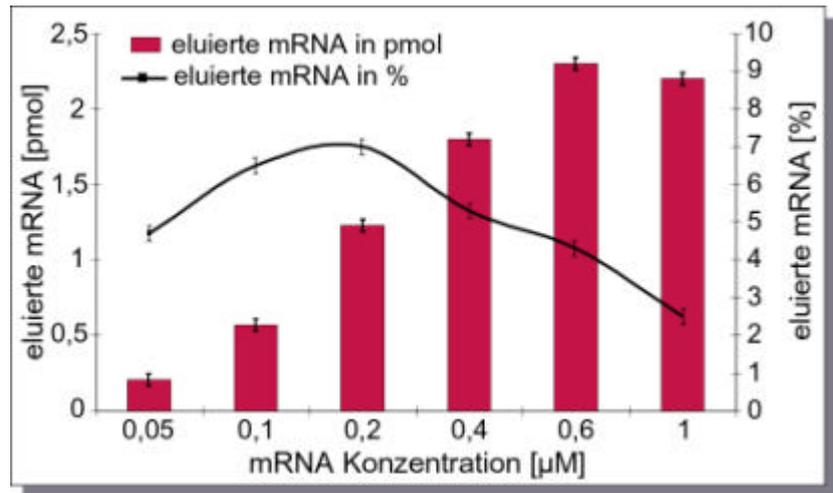


Vorherige Versuche zeigten, daß das System RVC-Konzentrationen von bis zu 0,5 mM ohne Inhibierung der Translation toleriert. Die Verwendung von steigenden RVC-Konzentrationen während der Translation führt, wie in der Abbildung 24 gezeigt, zu einem leichten Anstieg der nach Inkubation bei 37°C vorhandenen mRNA. Die Menge eluierbarer mRNA war allerdings in diesem und allen anderen Versuchen im Vergleich zum Ansatz ohne RVC herabgesetzt, so daß in allen folgenden Ansätzen auf den RVC verzichtet wurde. Auch durch weitere Zugabe des bereits im S-Mix (Kapitel 3.8) vorhandenen Ribonuklease-Inhibitors aus humaner Plazenta konnte die Menge eluierbarer mRNA nicht gesteigert werden.

Variation der mRNA-Konzentration

100 µl-Ansätze mit 50, 100, 200, 400, 600 und 1000 nM radioaktiv markierter mFAlpp+NHis/Bam HI wurden 8 min bei 37°C inkubiert, danach wie beschrieben behandelt und abermals der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt.

Abb. 25 Einfluß der mRNA-Konzentration auf die Menge eluierter mRNA. Mit „eluiertes mRNA in pmol“ ist die absolute Menge mRNA im Eluat gemeint und bei „eluiertes mRNA in %“ bezieht sich der Wert auf die eingesetzte Menge.



Der Versuch zeigt, wie in Abbildung 25 dargestellt, daß das Verhältnis zwischen eluierter und eingesetzter mRNA bei einer Konzentration von 200 nM am günstigsten ist. Die größte Anzahl von mRNA-Molekülen wird jedoch bei einer mRNA-Konzentration von etwa 600 nM wiedergewonnen. Bei Selektionsexperimenten ist es natürlich sinnvoll, einen möglichst großen Teil der Bibliothek in PRM-Komplexe zu überführen und so der Selektion zugänglich zu machen. Da durch *in vitro* Transkription nahezu beliebige Mengen mRNA hergestellt werden können, sollte die mRNA-Konzentration bei Selektionsexperimenten etwa 600 nM betragen.

Bedingungen der Chromatographie

Die Bedingungen der Chromatographie wurden hinsichtlich einer Zunahme eluierter mRNA und einer Verringerung des Hintergrundes optimiert. Mit dem Hintergrund ist die Menge an unspezifisch eluierter mRNA des Kontrollansatzes mit mFAlpp/Bam HI gemeint. Eine Reihe von Versuchen führten zu folgendem Protokoll. Der Ansatz wird nach Zugabe des Magnesiumacetats mit 0-4°C kaltem RD-Puffer auf das 2,5-fache Translationsvolumen gebracht. Um unlösliche Bestandteile abzutrennen, wird 5 min bei 4°C und 15.000× g zentrifugiert, bevor der Ansatz auf die Affinitätssäule überführt wird. Die Waschschriffe umfassen je zwei Säulenvolumen, wobei die Imidazolkonzentration der ersten vier Waschschriffe 5 mM und bei den Waschschriffen fünf und sechs 20 mM beträgt. Eluiert wird mit dem zweifachen Säulenvolumen und einer Imidazolkonzentration von 0,3 M.

Abtrennung von PRM-Komplexen unter den optimierten Bedingungen

Der Einfluß der optimierten Bedingungen, die auf die erlangten Ergebnisse zurückzuführen sind, sollte auf die spezifische Abtrennung einer mRNA über den Umweg der PRM-Komplexe untersucht werden. Da die erzielten Ergebnisse alle auf der Menge eluierter mRNA

basierten, mußte in einem Vorversuch sichergestellt werden, daß die mRNA keine Wechselwirkung mit der Affinitätsmatrix eingehen kann. Zu diesem Zweck wurden zwei Translationsansätze mit je 200 nM radioaktiver mRNA und 5 µM AS-Oligo ohne Inkubation bei 37°C mit Magnesiumacetat und RD-Puffer versetzt und 5 min bei 4°C zentrifugiert, bevor sie auf die Affinitätssäulen überführt wurden. Die Ansätze unterschieden sich lediglich in den verwendeten mRNAs, wobei es sich um mFAIpp/*Bam* HI bzw. mFAIpp+NHis/*Bam* HI handelte. Der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie wurde bestimmt und zudem die aufgearbeiteten mRNAs des Ansatzes, sowie des Eluates auf einem 5%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert (Abbildung 26).

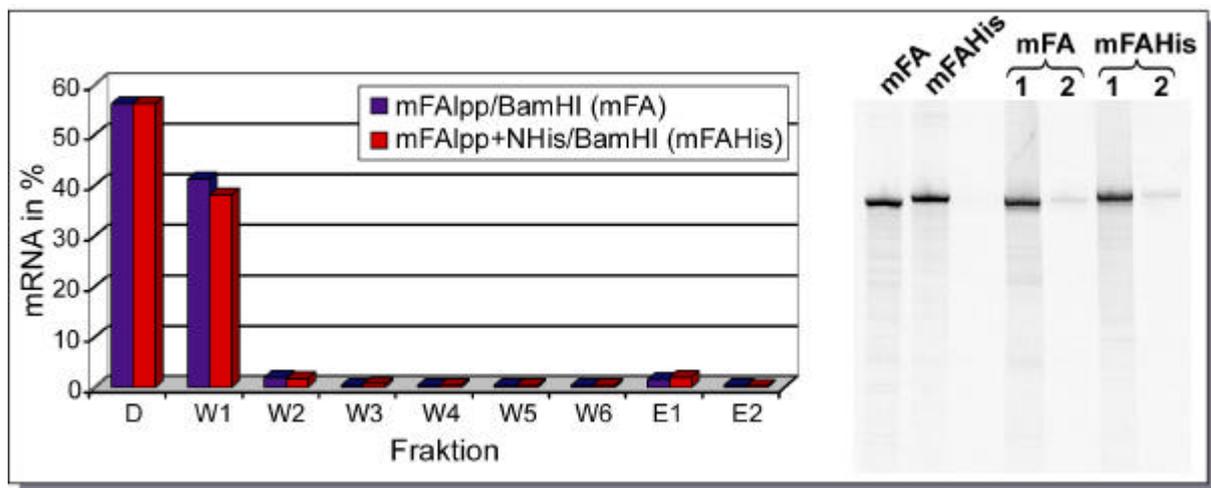


Abb. 26 Unspezifische Bindung der mRNA an Ni²⁺-IDA-Agarose. Das Diagramm auf der linken Seite gibt den Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie an, wobei D für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion steht. Zudem wurde der Zustand der mRNA auf einem 5%-igen denaturierenden PAA-Gel analysiert. Das Autoradiogramm des Gels ist auf der rechten Seite zu sehen. Neben in vitro Transkripten als Vergleich, wurden identische Mengen des Translationsansatzes (1) und des Eluates (2) aufgetrennt.

Aufgrund der fehlenden Translation konnten sich keine PRM-Komplexe bilden und demzufolge sollte auch die spezifische Abtrennung von mFAIpp+NHis/*Bam* HI ausbleiben. Wie anhand der Abbildung 26 zu sehen ist, verhalten sich die beiden mRNAs annähernd identisch auf der Säule, d.h. vergleichbare Mengen entfallen auf die Eluate. Die mRNAs alleine sind zweifelsfrei nicht in der Lage an der Affinitätsmatrix zu binden. Dieses Ergebnis bestätigt erneut, daß für die eluierte mRNA der bisherigen Versuche die abgetrennten PRM-Komplexe verantwortlich sind.

Nach diesem Vorversuch erfolgte die eigentliche Abtrennung von PRM-Komplexen unter den optimierten Bedingungen. Es wurden zwei 250 µl-Translationsansätze mit 5 µM AS-Oligo und 200 nM radioaktiv markierter mFAIpp/*Bam* HI bzw. mFAIpp+NHis/*Bam* HI 8 min bei 37°C inkubiert. In Anschluß wurde wie beschrieben verfahren und abermals der Anteil TCA-

fällbarer Radioaktivität von den Fraktionen der Chromatographie bestimmt. Ferner wurden identische Mengen des Reaktionsansatzes vor und nach der Translation, sowie des Eluates herangezogen, die mRNAs aufgearbeitet und auf einem 5%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert (Abbildung 27).

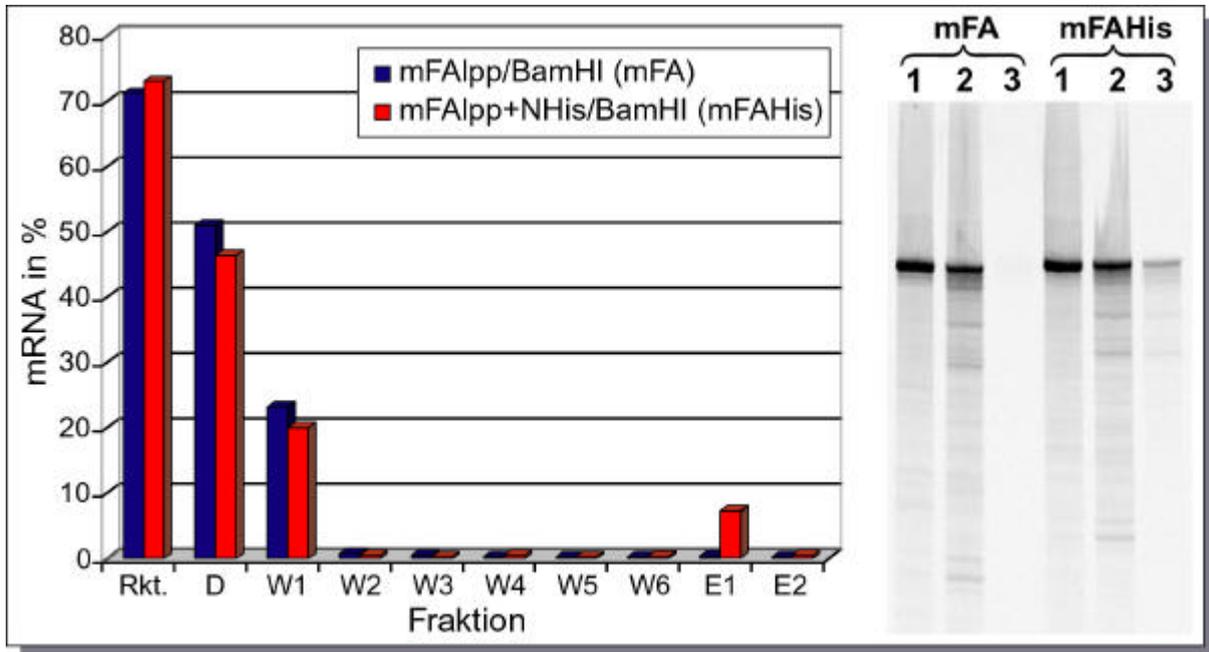


Abb. 27 Abtrennung von PRM-Komplexen unter den optimierten Bedingungen. Das Diagramm auf der linken Seite gibt den Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie an, wobei Rkt. für Reaktionsansatz nach der Translation, D für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion steht. Zudem wurde der Zustand der mRNA auf einem 5%-igen denaturierenden PAA-Gel analysiert. Das Autoradiogramm des Gels ist auf der rechten Seite zu sehen. Es wurden identische Mengen des Reaktionsansatzes vor (1) und nach der Translation (2), sowie des Eluates (3) aufgetrennt.

Aufgrund der optimierten Bedingungen konnte die Menge an mFAIpp+NHis/Bam HI nach affinitätschromatographischer Abtrennung der korrespondierenden PRM-Komplexe laut TCA-Fällung auf fast 8% gesteigert werden. Die Integrität der mRNA wurde durch denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit anschließender Autoradiographie überprüft. Auf die mRNA vollständiger Länge entfielen dabei etwa 5%. Der Hintergrund des Systems wurde mit mFAIpp/Bam HI auf die gleiche Weise ermittelt und betrug etwa 0,3%.

4.1.4.2 Durchführung von Testselektionen

Zur Etablierung der Gesamtmethode und zur Überprüfung, ob die Methode für Selektionsexperimente geeignet ist, sollten Testselektionen dienen. Vor Durchführung der Testselektionen mußte jedoch sichergestellt werden, daß keine der beiden mRNAs bereits während der RT-PCR bevorzugt wird, da sich die Selektion sonst auf dieser Ebene abspielen würde. Identische Mengen der beiden mRNAs wurden gemischt, für eine RT-PCR verwendet,

gefolgt von einer Transkription und einer weiteren RT-PCR. Die PCR-Produkte dieser beiden Proberunden wurden auf einem 3%-igen Agarosegel analysiert.

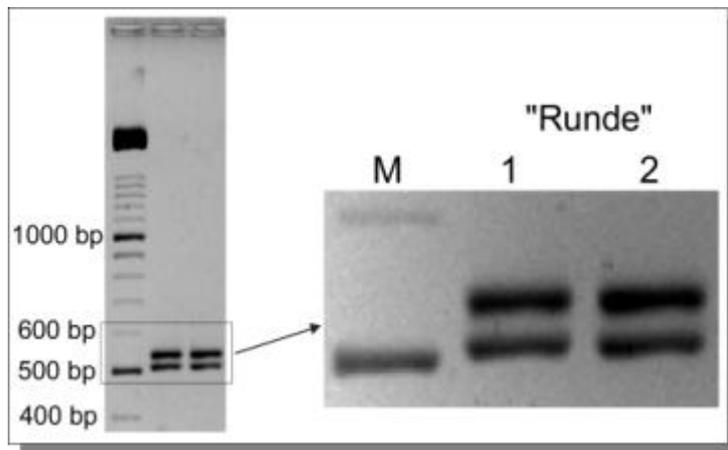


Abb. 28 Einfluß der RT-PCR auf das Verhältnis zwischen den beiden mRNAs. Die RT-PCR-Produkte haben eine Größe von 512 bp und 533 bp für FAIpp bzw. FAIpp+NHIS. M steht für einen 100 bp DNA-Marker

Wie anhand der Abbildung 28 zu sehen ist, bleibt das Verhältnis zwischen den Molekülen pro Runden gleich und demzufolge wird keines der beiden Moleküle auf Ebene der RT-PCR oder Transkription bevorzugt. Die Lage der für die RT-PCR verwendeten Primer ist der Abbildung 19 und deren Sequenz dem Anhang zu entnehmen.

Im Anschluß an diesen Versuch konnte mit den Testselektionen, bei denen es sich um eine zyklische Wiederholung von Selektionsrunden handelt, begonnen werden. Eine Selektionsrunde beginnt mit einer *in vitro* Transkription, gefolgt von einer *in vitro* Translation und einer Affinitätschromatographie. Die so isolierte mRNA wird nach Aufreinigung durch RT-PCR amplifiziert und steht nun für eine weitere Selektionsrunde zur Verfügung. Für die Testselektionen wurde die zu selektierende mRNA in Form von mFAIpp+NHIS/*Bam* HI mit der Kontrolle mFAIpp/*Bam* HI in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und diente als Ausgangspool für das 'Ribosome Display'. Die Translationen und Affinitätschromatographien erfolgten unter den optimierten Bedingungen. Selektionsmerkmal war die Bindung an Ni^{2+} -IDA-Agarose mittels His-tag. Abhängig vom Grad der Verdünnung waren unterschiedlich viele Selektionsrunden nötig, um das für den His-tag kodierende PCR-Produkt anzureichern (Tabelle 18).

Tabelle 18: Anzahl der benötigten Selektionsrunden zur Anreicherung der verdünnten mRNA

Verhältnis von mFAIpp+NHIS : mFAIpp	Anzahl benötigter Selektionsrunden
1:10 ²	3
1:10 ⁴	4
1:10 ⁵	5
1:10 ⁸	9

Selbst bei einem Mischungsverhältnis von $1:10^8$, d.h. ein Molekül mFAIpp+NHis auf 10.000.000 Moleküle mFAIpp, konnte das 'eine Molekül' nach neun Selektionsrunden noch selektiert werden (Abbildung 29).

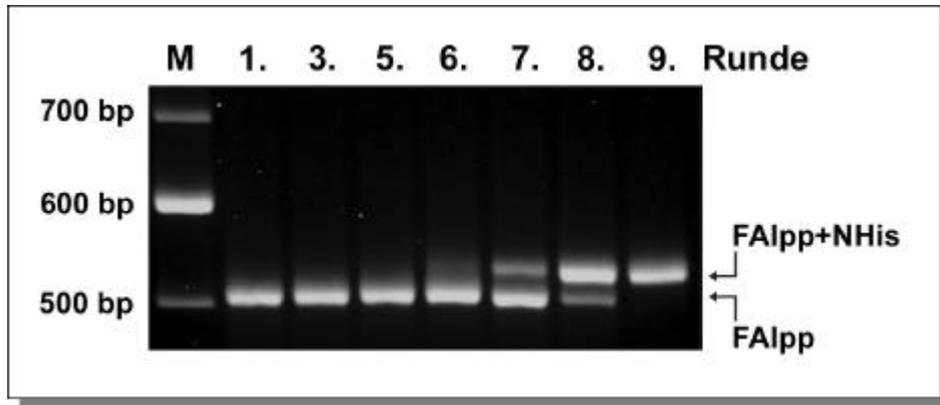


Abb. 29 Anreicherung von mFAIpp+NHis aus einer $1:10^8$ Verdünnung mit mFAIpp mittels 'Ribosome Display'. Nach Affinitätsselektion der His-tag besitzenden PRM-Komplexe wurde die mRNA durch RT-PCR amplifiziert und auf einem 2,5%-igen Agarosegel analysiert. Spur M zeigt einen 100 bp DNA-Marker und die anderen Spuren zeigen die PCR-Produkte nach verschiedenen Selektionsrunden.

Im Verlauf der Testselektionen wurden die bis dato noch nicht optimierten Reaktionen, wie reverse Transkription und PCR, auf die Gesamtmethode zugeschnitten. Zudem erfolgte auch noch die Abstimmung der Einzelreaktionen aufeinander. Die Aufarbeitung der mRNA aus den PRM-Komplexen erwies sich für die Ausbeute der RT-PCR als nicht unbedeutend. Da mit Nickelsäulen gearbeitet wurde, war es nicht möglich die gebundenen PRM-Komplexe durch Zugabe von EDTA zu zerstören und auf diese Weise die mRNA zu eluieren. Aus diesem Grund wurden die Eluate mit 0,5 M EDTA auf eine Endkonzentration von 50 mM gebracht, dann anfänglich noch einer Phenolextraktion unterzogen, bevor die mRNA in Gegenwart von 40 μ g Glycogen mit einem Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) gefällt wurde. Der Ansatz wurde direkt 45 min bei 4°C und $15.000\times$ g zentrifugiert, das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen und in 10 μ l H_2O aufgenommen. Längere Zentrifugationen erwiesen sich als nachteilig, da vermutlich die mitgefällten Salze einen negativen Einfluß auf die RT-PCR haben. Eine Alternative zur Aufreinigung der mRNA bieten kommerzielle Kits, welche sehr gute Ergebnisse liefern, aber bei den Testselektionen noch keine Verwendung fanden. Die Phenolextraktion wurde im weiteren Verlauf der Testselektionen unterlassen, zumal der Primer für die reverse Transkription auch mit der mRNA im PRM-Komplex hätte hybridisieren können.

Für die reverse Transkription wurden die 10 μ l aufgearbeitete mRNA mit 2 μ l (= 4 pmol) RT-Primer versetzt, 10 min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 μ l

5×Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) wurde 52 min bei 52°C inkubiert, wobei nach 2 min 1 µl (= 200 U) Superscript II reverse Transkriptase zugegeben und in Anschluß 10 min bei 70°C inkubiert wurde.

Die PCR erfolgte mit *Taq*-Polymerase wie in Kapitel 3.4.3.1 beschrieben. Verwendet wurden die Primer T7 und lpp (Abb. 19). Als Matrize diente die cDNA der reversen Transkription, von der nicht mehr als 5 µl pro 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt wurden. Die Reaktion umfaßte 30 Zyklen, wobei die Hybridisierung für 1 min bei 70°C stattfand und die Primerextension für 1,5 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel analysiert, aus dem Gel eluiert und als Matrize für die *in vitro* Transkription verwendet. Bei mangelnder Qualität bzw. Ausbeute der PCR, wurde ausgehend vom eluierten PCR-Produkt eine weitere PCR durchgeführt. Die PCR-Produkte nach der neunten Selektionsrunde der 1:10⁸ Verdünnung, welche insgesamt 365 PCR-Zyklen durchliefen, wurden kloniert und anschließend zehn Klone sequenziert. Acht der zehn Klone wiesen die vollständige His-tag Sequenz auf. Die übrigen zwei hatten eine verkürzte His-tag Sequenz, welche für fünf bzw. vier Histidine kodiert. Die Sequenzanalyse zeigte, daß im kodierenden Bereich der Klone auf Nukleotidebene zwischen 5 und 13 Mutationen vorlagen. Der Durchschnitt lag bei 7,7 Mutationen. Auf Proteinebene lag die Anzahl ausgetauschter bzw. deletierter Aminosäuren der selektierten Klone zwischen 0 und 5, wobei der Durchschnitt bei 1,3 lag.

4.2 Konstruktion von DNA-Bibliotheken für das ‘Ribosome Display’

Aufbauend auf den bereits beschriebenen Konstrukten pSEL2 und pFAlpp sollten Bibliotheken erzeugt werden, d.h. ein Teil des kodierenden Bereichs gegen einen randomisierten Bereich ausgetauscht bzw. um ihn ergänzt werden. Der randomisierte Bereich kommt erst auf Proteinebene als Teil der Gesamtstruktur zum Tragen und muß so angeordnet sein, daß die Wechselwirkung mit dem Bindungspartner Streptavidin möglich ist. Der von pSEL2 kodierte modifizierte Chymotrypsin-Inhibitor wurde aufgrund seines ‘Inhibitor-Loops’ von Beginn an als eine gute Basisstruktur für eine Proteinbibliothek eingeschätzt. Hinzu kommt die geringe Größe des Proteins, welches ohne Linker und FABP-Anteil aus nur 71 Aminosäuren besteht. Die Abbildung 30 stellt die räumliche Struktur des Chymotrypsin-Inhibitors dar, welche mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde (McPhalen und James, 1987).

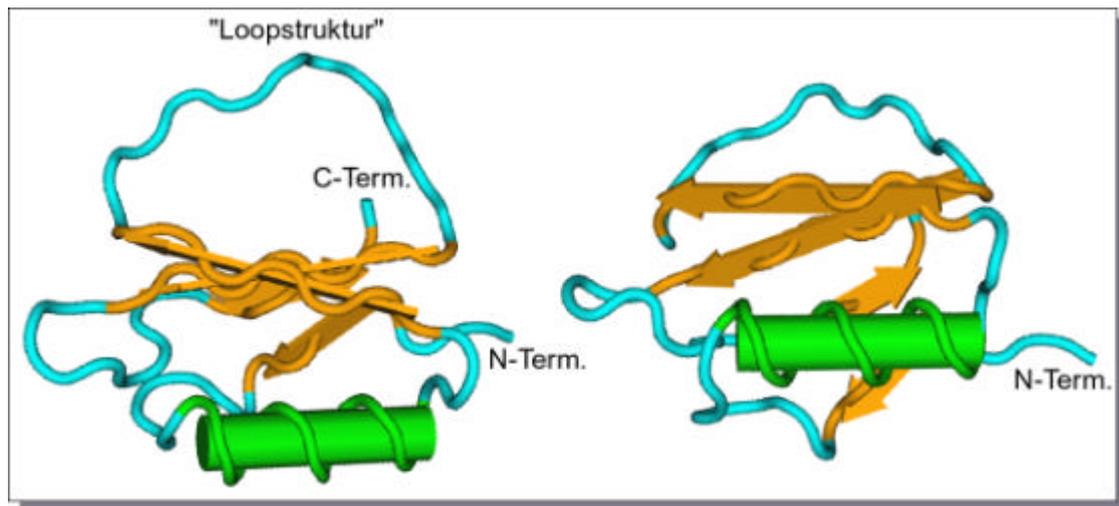


Abb. 30 Dreidimensionale Struktur des Chymotrypsin-Inhibitors (PDB Id:2CI2). Ansicht aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln. Die hellblau markierten Bereiche sind in keine Sekundärstrukturelemente involviert.

Anhand der Abbildung 30 ist die gute Zugänglichkeit der 'Loopstruktur' zu sehen, welche gemäß ihrer biologischen Funktion exponiert vorliegt. Zudem sind die elf Aminosäuren des 'Inhibitor-Loops' an keinem Sekundärstrukturelement beteiligt und aus diesem Grund sollte ihr Austausch bei gleichzeitiger Erhaltung der Gesamtstruktur möglich sein. Die gute funktionierende Aufreinigung des von pSEL2 kodierte modifizierte Chymotrypsin-Inhibitors (Abbildung 17) zeigt, daß die 'Loopstruktur' auch nach Austausch gegen 17 andere Aminosäuren funktional, d.h. zugänglich ist.

Aufgrund seiner relativ hohen Stabilität im zellfreien Translationssystem und einer ebenfalls geringen Größe von nur 133 Aminosäuren bzw. 14,78 kDa sollte das FABP als weitere Basisstruktur dienen.

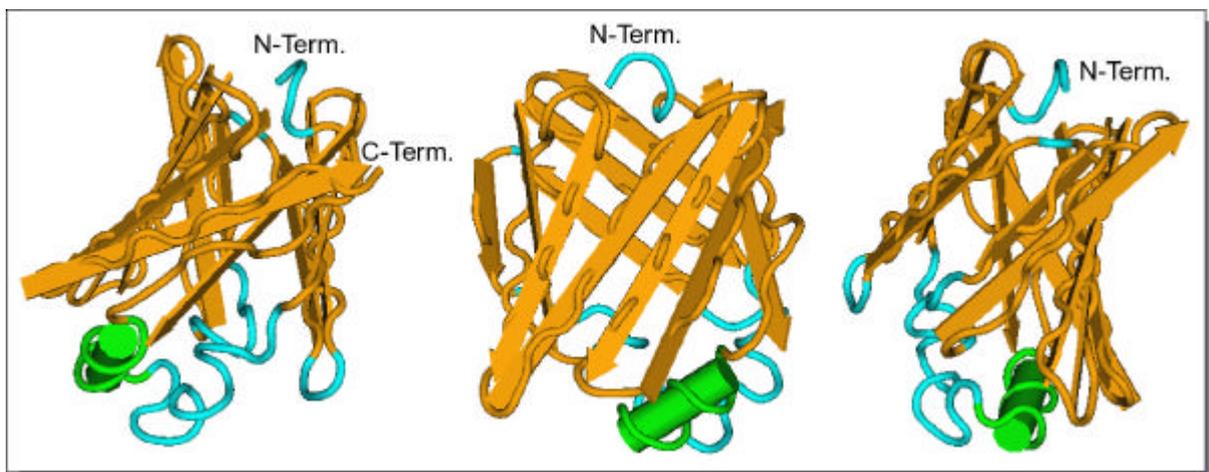


Abb. 31 Dreidimensionale Struktur des FABP (PDB Id:1BWY). Ansicht aus drei verschiedenen Blickwinkeln. Die hellblau markierten Bereiche sind in keine Sekundärstrukturelemente involviert.

Die Abbildung 31 stellt die räumliche Struktur des FABP dar, welche durch NMR bestimmt wurde (Lassen *et al.*, 1995). Beim FABP gibt die Struktur den zu randomisierenden Bereich im Gegensatz zum Chymotrypsin-Inhibitor nicht so offensichtlich vor. Letztlich soll ein Peptid selektiert werden, das später als 'Affinitätstag' fungiert und somit in der Regel an den Enden des aufzureinigenden Proteins plaziert wird. Aus diesem Grund und zumal beim Chymotrypsin-Inhibitor bereits eine 'Loopstruktur' randomisiert werden soll, sollte beim FABP der N-Terminus randomisiert werden. Neben den vier N-terminalen Aminosäuren, die an keiner Sekundärstruktur beteiligt sind, wurden elf weitere eingeführt, so daß der randomisierte Bereich 15 Aminosäuren umfaßte.

Bevor jedoch die randomisierten Bereiche eingeführt werden konnten, mußten die bisherigen Konstrukte auf die zwischenzeitlich erzielten Ergebnisse angepaßt werden.

4.2.1 Design von Genen zur Generierung einer 'Ribosome Display' Bibliothek

Die Charakteristika eines Gens für das 'Ribosome Display' sind bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben worden. Eine unentbehrliche Grundvoraussetzung des Gens ist es, die korrekte Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des synthetisierten Proteins als Teil des PRM-Komplexes zu ermöglichen. Erreicht wird dieses Ziel durch Anfügen eines 'Spacers' an den kodierenden Bereich. Dabei sollte der 'Spacer' nicht länger als nötig sein, um die Größe des Gens möglichst gering zu halten, was sich letztlich auf alle Reaktionen beim 'Ribosome Display' auswirkt. Angefangen bei der Transkription über die Translation hin zur RT-PCR machen kürzere Produkte erfahrungsgemäß weit weniger Probleme.

4.2.1.1 Konstruktion von pSEL4 als Basis für eine Bibliothek

Ausgehend vom Vektor pSEL2 sollte ein Vektor konstruiert werden, der nach Einführung eines randomisierten Bereichs eine geeignete Bibliothek für *in vitro* Selektionen mittels 'Ribosome Display' darstellt. Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand Peptide zu selektieren die Streptavidin binden, mußte natürlich die im kodierenden Bereich von pSEL2 enthaltene Sequenz des Strep-tag II entfernt werden. Dazu wurde im ersten Klonierungsschritt das Strep-tag II durch den etwas größeren C-tag ersetzt. Beim C-tag handelt es sich um ein Epitop des humanen Plasmaproteins C, welches von einem monoklonalen Antikörper (Anti-Protein C) aus der Maus erkannt wird. Anstelle der für den C-tag kodierenden Sequenz hätte auch jede andere vergleichbar lange Sequenz verwendet werden können, da die einzige Aufgabe der Sequenz darin bestand, das Strep-tag II auf DNA-Ebene zu entfernen. Die beiden Oligonukleotide C-tag1 und C-tag2 (Anhang) wurden bei 60°C miteinander hybridisiert und der fehlende Komplementärstrang mit *Pwo*-Polymerase ergänzt. Das DNA-Fragment wurde mit

den Restriktionsendonukleasen *Nsi* I und *Xho* I geschnitten und das für die Klonierung benötigte Fragment mit einer Größe von 56 bp anschließend aufgereinigt. Der Vektor pSEL2 wurde nach dem Verdau mit den gleichen Enzymen noch dephosphoryliert und ebenfalls aufgereinigt. Durch Ligation des DNA-Fragments mit dem Vektor wurde das Konstrukt pSEL3 erhalten.

In einem weiteren Klonierungsschritt sollte das Gen auf die benötigten Elemente verkürzt werden. Aus diesem Grund wurde der zwischen der *Bst* XI- und *Pst* I-Schnittstelle liegende FABP-Anteil mit einer Länge von 273 bp entfernt. Durch Einfügen eines 18 bp-Fragments wurden die Schnittstellen erhalten und zudem eine Ala-Ser kodierende Sequenz eingefügt. Dazu wurde der Vektor pSEL3 mit *Bst* XI und *Pst* I verdaut und anschließend aufgereinigt. Die Oligonukleotide Linker1 und Linker2 (Anhang) wurden erst phosphoryliert, dann miteinander hybridisiert und schließlich in den aufgereinigten Vektor ligiert. Auf diese Weise wurde das Konstrukt pSEL4 (Abbildung 32) erhalten dessen Translationsprodukt bei normaler Termination 14,61 kDa beträgt.

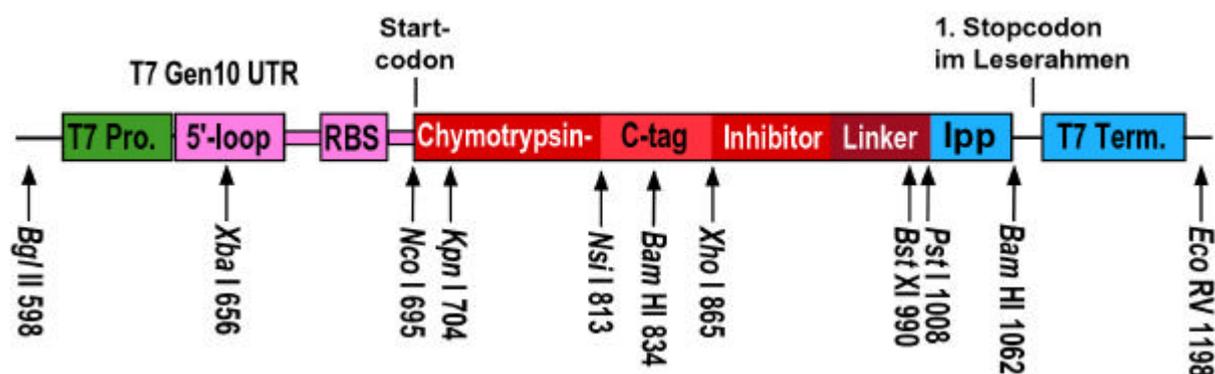


Abb. 32 Schematischer Aufbau von pSEL4

Der Gly-Ser-Linker und der Lipoproteinterminator kodieren für 40 Aminosäuren und stellen den 'Spacer' dar.

4.2.1.2 Konstruktion von pFALlpp als Basis für eine Bibliothek

Bei der Konstruktion von pFAlpp wurde der für die zehn C-terminalen Aminosäuren von FABP kodierende Bereich durch einen modifizierten Lipoproteinterminator ersetzt. Dies war unproblematisch, da das gesamte FABP in den folgenden Testselektionen lediglich als 'Spacer' fungierte. Für die Ausbildung der korrekten dreidimensionalen Struktur des FABP ist der C-Terminus, welcher bis zur letzten Aminosäure an einer Sekundärstruktur beteiligt ist (Abb. 31, linke Struktur), unentbehrlich (Lassen *et al.*, 1995). Da das FABP im Rahmen einer *in vitro* Selektion nicht als 'Spacer', sondern als kleines globuläres Protein in Erscheinung

treten sollte, mußte der C-Terminus wieder ergänzt und zudem ein ‘Spacer’ eingefügt werden. Aus diesem Grund wurden die Oligonukleotide FALink1 und FALink2 (Anhang) miteinander hybridisiert und der fehlende Komplementärstrang mit *Pwo*-Polymerase ergänzt und dann mit *Pst* I und *Bam* HI geschnitten. Der Vektor pFALpp wurde nach dem Verdau mit den gleichen Enzymen noch dephosphoryliert. Durch Ligation des DNA-Fragments mit dem Vektor wurde das Konstrukt pFALinklpp erhalten. Es kodiert für das komplette FABP und anstelle des Stopcodons folgt ein $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ -Linker und der Lipoproteinterminator₄, welche gemeinsam für 37 Aminosäuren kodieren und somit den ‘Spacer’ bilden (Abb. 33). Das terminierte Translationsprodukt hat ein Molekulargewicht von 19,9 kDa.



Abb. 33 Schematischer Aufbau von pFALinklpp

4.2.1.3 Löslichkeit der Proteine SEL4 und FALinklpp

Die Richtige Faltung von Proteinen läßt sich in erster Näherung aufgrund ihrer Löslichkeit bestimmen. Wie bereits erwähnt, ist die Ausbildung der richtigen räumlichen Struktur des Proteins für die anstehenden *in vitro* Selektionen wichtig. Es muß gewährleistet sein, daß die für das ‘Ribosome Display’ benötigten Modifikationen keinen negativen Einfluß auf die Faltung des Proteins haben. Der Einfluß der zusätzlichen Elemente und deren Anordnung auf die Löslichkeit der Proteine wurde untersucht. Es wurden gekoppelte Transkriptions-, Translationsreaktionen mit 2 nM Plasmid in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin durchgeführt, wobei jeder Ansatz in doppelter Ausführung vorlag. Nach der Synthese wurde ein Ansatz mit 75 μl Translationspuffer versetzt und 5 min bei $15.000\times g$ zentrifugiert, während der andere Ansatz mit 75 μl 0,5% SDS versetzt und 20 min bei 50°C inkubiert wurde. In beiden Fällen wurde der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität bestimmt. Anhand des mit SDS behandelten Ansatzes ließ sich die Gesamtsynthese ermitteln, wohingegen der zentrifugierte Ansatz den löslichen Anteil an synthetisiertem Protein ergab (Abb. 34).

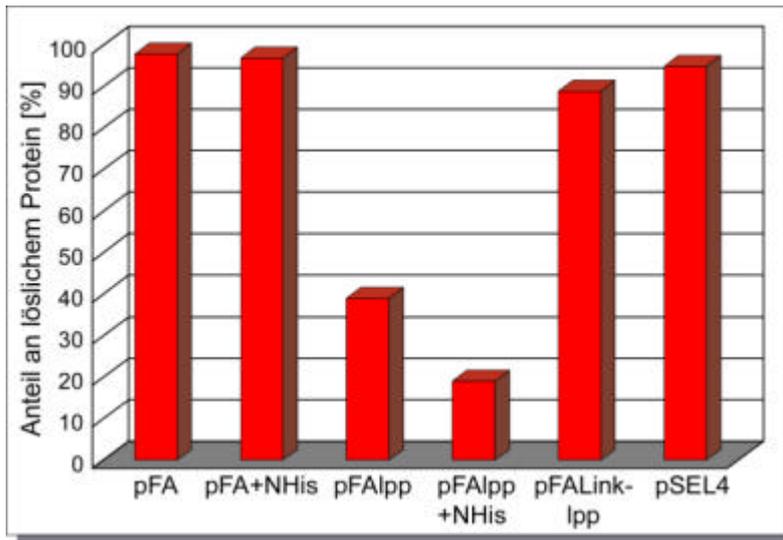


Abb. 34 Löslichkeit von in vitro synthetisierten Proteinen bei Verwendung der konstruierten Plasmide. Der Einfluß von denen für das 'Ribosome Display' benötigten Elementen und besonders ihre Anordnung, auf die Faltung der Proteine wurde überprüft.

Bei Verwendung der konstruierten Plasmide konnte im Gegensatz zur Löslichkeit nur ein geringfügiger Einfluß auf die Gesamtsynthese beobachtet werden. Auffällig ist die geringe Löslichkeit der FAlpp-Varianten, bei denen die zehn C-terminalen Aminosäuren des FABP durch den Lipoproteinterminator ersetzt sind. Alle anderen Proteine sind größtenteils löslich und sollten demzufolge in ihrer nativen dreidimensionalen Struktur vorliegen. Aufgrund des vernachlässigbaren Einflusses des verwendeten 'Spacers', bestehend aus (Gly₄Ser)-Linker und Lipoproteinterminator, auf die Löslichkeit von SEL4 und FALinklpp eignen sie sich zur Erzeugung von Proteinbibliotheken.

4.2.2 Präparation und Vorbereitung der Vektoren

Die Plasmide pSEL4 und pFALinklpp wurden präparativ mit 'Kits' der Firmen Genomed und Qiagen aus *E. coli*-Zellen isoliert. Zur Vorbereitung auf die Einbringung der randomisierten Bereiche wurden die Plasmide erst verdaut, dann mittels Agarosegel-Elektrophorese vom herausgeschnittenen Insert abgetrennt und schließlich mit Phenol aus dem Gel eluiert, bevor sie durch Fällung mit Isopropanol aufgereinigt wurden.

Die SEL4-Plasmide wurden gleichzeitig mit den Restriktionsendonukleasen *Nsi* I und *Xho* I in einem Volumen von 40 ml über einen Zeitraum von zwei Tagen geschnitten. Verwendet wurden 16.000 U *Nsi* I und 9.000 U *Xho* I, sowie der 10× Puffer R⁺ der Firma MBI Fermentas. Die FALinklpp-Plasmide wurden erst mit 27.000 U des Enzyms *Kpn* I und dem zugehörigen 10× Puffer der Firma MBI Fermentas in einem Volumen von 60 ml über einen Zeitraum von zwei Tagen geschnitten. Nach einer Phenolextraktion, gefolgt von einer Isopropanolfällung, wurden die Plasmide nun mit 13.700 U *Nco* I und dem zugehörigen 10× Puffer der Firma NEB in einem Volumen von 40 ml ebenfalls über einen Zeitraum von zwei Tagen geschnitten.

4.2.3 Erzeugung und Vorbereitung der randomisierten DNA-Fragmente

Die randomisierten DNA-Fragmente, die bei der anschließenden Ligation in die vorbereiteten Vektoren eingefügt werden sollten, wurden durch Hybridisierung zweier Oligonukleotide mit nachfolgender Komplementärstrang-Synthese und Restriktionsverdau erzeugt. Die Vorgehensweise ist in der Abbildung 35 schematisch dargestellt.

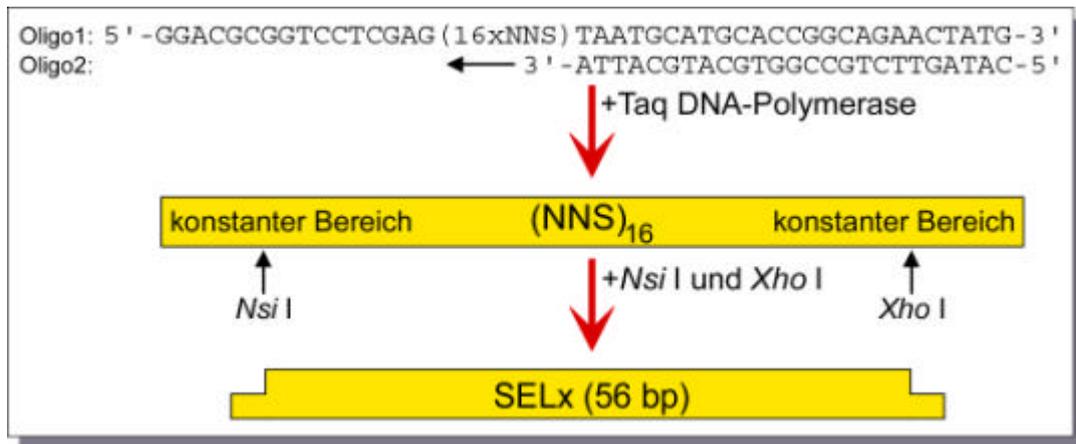


Abb. 35 Erzeugung der randomisierten DNA-Fragmente. Die Vorgehensweise ist exemplarisch für das SELx-Fragment gezeigt. N steht für eine Mischung von G, A, T, und C und S für eine Mischung von G und C.

Die Zusammensetzung der Ansätze für die Hybridisierung und Auffüllreaktion ist der Tabelle 19 zu entnehmen.

Tab. 19: Ansätze zur Erzeugung der randomisierten Inserts

Ansatz	SELx-Fragment	FAx-Fragment
10x Puffer	150 µl	500 µl
MgCl ₂ [50 mM]	45 µl	150 µl
dNTP-Mix [je 10 mM]	60 µl	200 µl
Oligo1 [100 µM]	SELx1 (89-mer) 290 µl	Fax1 (84-mer) 1000 µl
Oligo2 [100 µM]	SELx2 (25-mer) 300 µl	Fax2 (22-mer) 1330 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	15 µl	50 µl
H ₂ O	ad 1,5 ml	ad 5 ml

Zur Hybridisierung wurden die Ansätze im Thermomixer nach 5 min bei 94°C langsam auf 50°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erfolgte die Zugabe der DNA-Polymerase, bevor die Temperatur auf 70°C erhöht und über Nacht beibehalten wurde. Nach einer Phenolextraktion und Ethanol-fällung wurden die DNA-Fragmente wie zuvor die Plasmide verdaut, d.h. SELx mit *Nsi* I und *Xho* I und FAx erst mit *Kpn* I und dann mit *Nco* I. Die Abtrennung der geschnittenen Fragmente erfolgte durch Agarosegel-Elektrophorese. Die Gelkonzentration bei dem SELx/*Nsi* I+*Xho* I-Fragment betrug 5% und beim FAx/*Nco* I+*Kpn* I-Fragment sogar 7%.

Die Aufarbeitung der geschnittenen Fragmente erfolgte analog zu den oben beschriebenen Plasmiden.

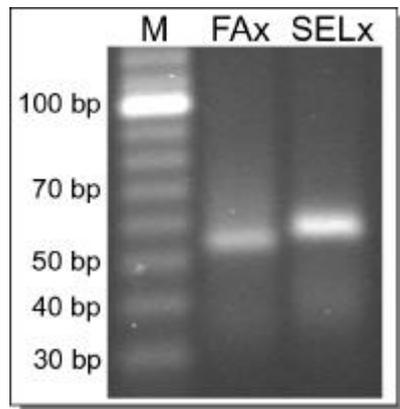


Abb. 36 Auftrennung der randomisierten Inserts auf einem 3,5%-igen Agarosegel. Das Insert FAX besteht aus 53 bp und SELx aus 56 bp. Auf der Spur M ist eine 10 bp-Leiter aufgetragen.

4.2.4 Insertion der randomisierten DNA-Fragmente in die Vektoren

Letzter Schritt auf dem Weg zu einer proteinkodierenden DNA-Bibliothek stellt die Ligation zwischen den randomisierten Fragmenten und den Vektoren dar. Als Resultat erhält man Gene, die in einem definierten Bereich randomisiert sind und demzufolge verfügen auch die aus einer Translation hervorgehenden Proteine über einen solchen randomisierten Bereich.

Da die Ligation eine Vielzahl von Produkten lieferte, fand die Optimierung auf Ebene der PCR-Produkte statt. Zu diesem Zweck erfolgte im Anschluß an die Ligation eine PCR mit genspezifischen Primern, wobei der Ligationsansatz als Matrize diente. Aufgrund der Menge an gebildetem PCR-Produkt ließen sich die Bedingungen für die Ligation indirekt optimieren, worauf die Zusammensetzung (Tabelle 20) der präparativen Ligation basiert.

Tabelle 20: Zusammensetzung der präparativen Ligationsansätze

Ansatz	SELx	FAX
10x Puffer	6,6 ml	13,5 ml
Plasmid	pSEL4/ <i>Nsi</i> I + <i>Xho</i> I [0,88 µg/µl] 7,5 ml, 6,59 mg, 2,7 nmol	pFALinklpp/ <i>Nco</i> I + <i>Kpn</i> I [1,12 µg/µl] 12 ml, 13,48 mg, 5,27 nmol
DNA-Fragment	SELx 102 µg, 2,8 nmol	FAX 186 µg, 5,4 nmol
T4 DNA-Ligase [30 U/µl]	217 µl (6.500 U)	450 µl (13.500 U)
H ₂ O	ad 66 ml	ad 135 ml

Abweichend von den Standardbedingungen mußte die Plasmidkonzentration von 30 µg/ml auf 100 µg/ml erhöht werden, da ansonsten die benötigte Menge an T4 DNA-Ligase zu hoch gewesen wäre. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug etwa 1:1. Die Ligation fand unter Verwendung der T4 DNA-Ligase und des zugehörige 10x Puffers der Firma MBI Fermentas

bei 4°C über einen Zeitraum von 45 h statt. Im Anschluß an die Ligation wurden die Ansätze erst mit Phenol extrahiert, dann mit Isopropanol gefällt und schließlich der SELx-Ansatz in 8 ml und der FAX-Ansatz in 13 ml H₂O aufgenommen. Bevor die Ligationsprodukte als Matrize für die *in vitro* Transkription verwendet werden konnten, mußten sie mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI linearisiert werden.

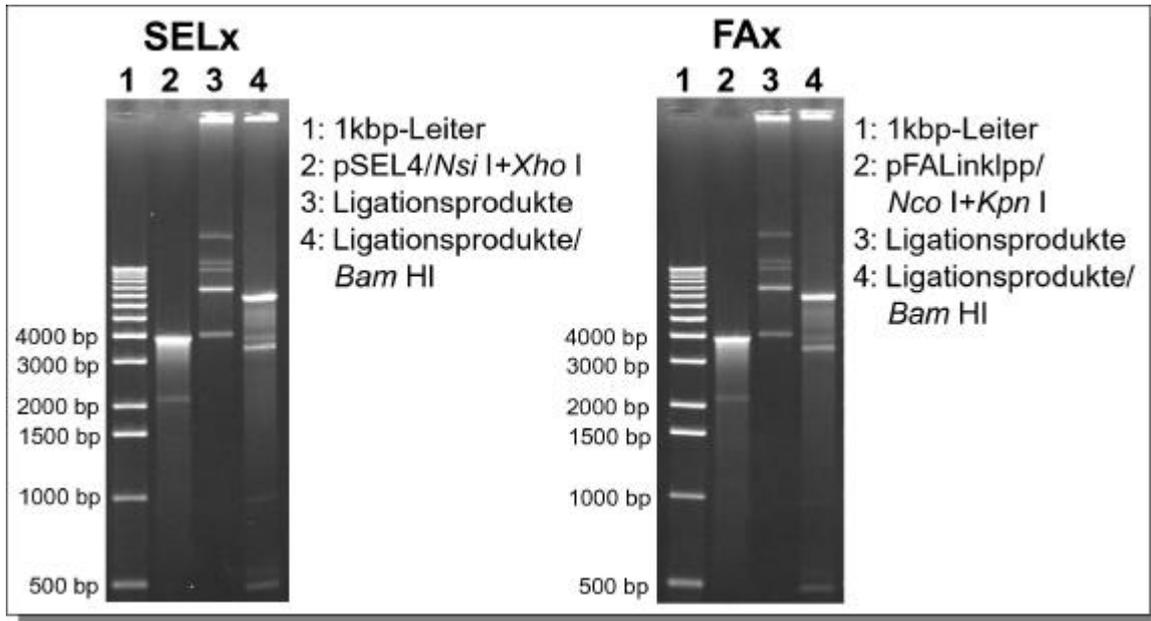


Abb. 37 Ligationsprodukte vor und nach Linearisierung mit *Bam* HI

Die mit *Bam* HI linearisierten Ligationsprodukte lieferten nicht die gewünschten Transkripte (Abbildung 38), worauf die Ansätze zudem mit der Restriktionsendonuklease *Hind* III verdaut wurden.

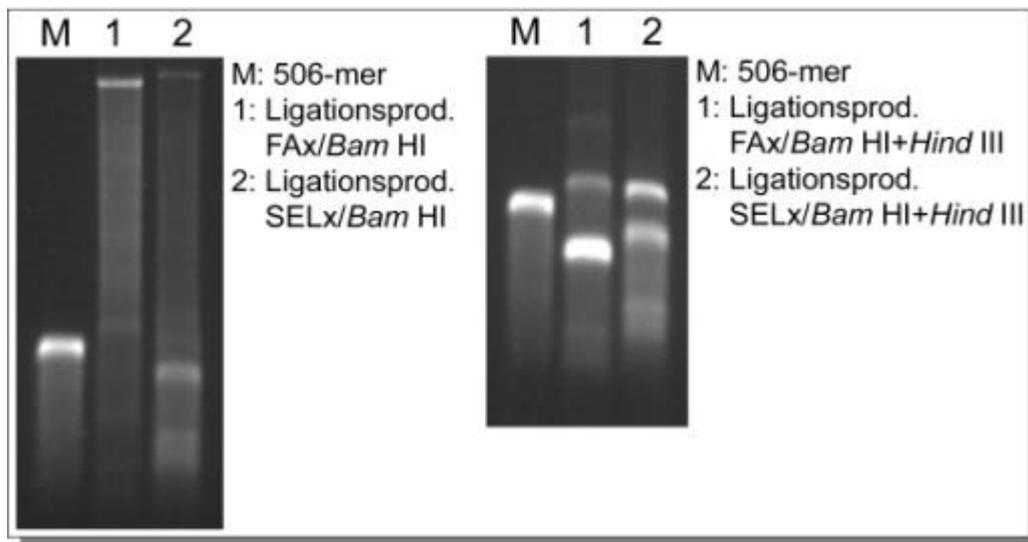


Abb. 38 Aus den Ligationsprodukten hervorgehende Transkripte nach Verdau mit *Bam* HI bzw. *Bam* HI und *Hind* III. Die Auftrennung der Transkripte erfolgte auf einem 1,2%-igen Agarosegel.

Wie anhand der Abbildung 38 zu sehen ist, lieferte der Doppelverdau mit *Bam* HI und *Hind* III im wesentlichen nur noch zwei Transkripte, wobei allerdings die gewünschten Produkte in geringerem Maße entstanden. Aus diesem Grund mußte das dem richtigen Transkript zugrundeliegende Ligationsprodukt isoliert werden. Die möglichen Ligationsprodukte, sowie die nach dem Verdau mit *Bam* HI und *Hind* III resultierenden DNA-Fragmente sind in den Abbildungen 39 und 40 dargestellt.

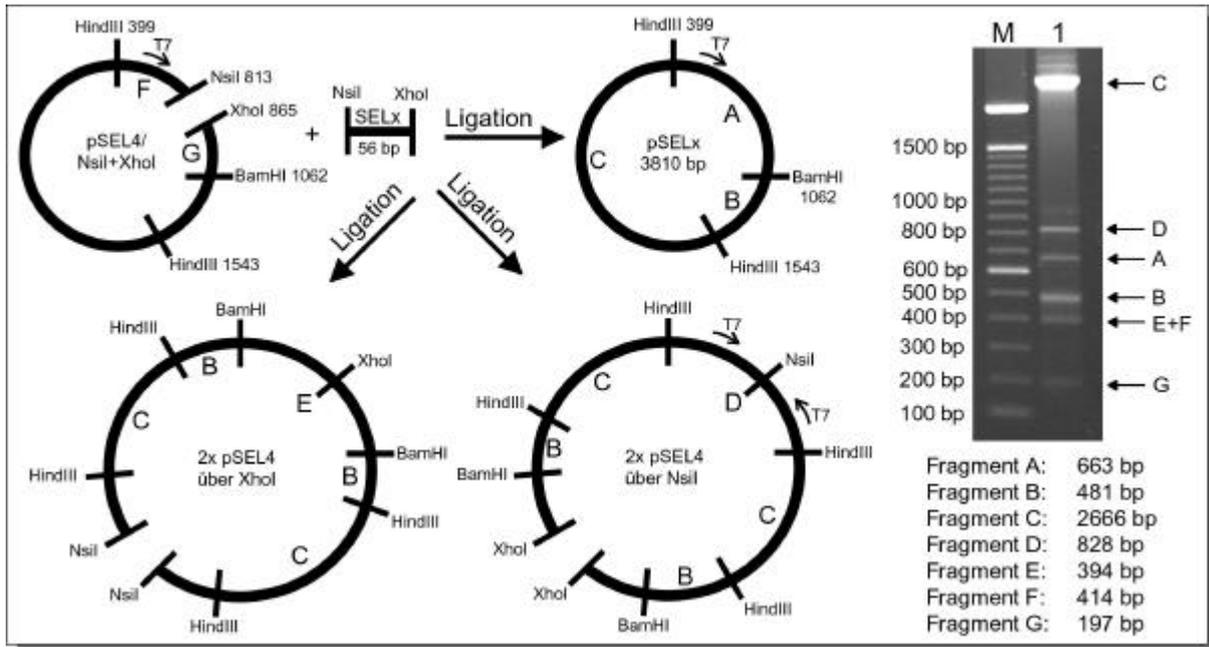


Abb. 39 Ligation von pSEL4/Nsi I + Xho I mit SELx und die dabei entstehenden Ligationsprodukte. Der gesamte Ligationsansatz wurde mit *Bam* HI und *Hind* III verdaut und auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1, rechtes Bild). Auf der Spur M ist eine 100 bp-Leiter aufgetragen.

Das richtige Ligationsprodukt von pSEL4 weist nach dem *Bam* HI-, *Hind* III-Verdau eine Größe von 663 bp auf und bei dem zugehörigen Transkript handelt es sich um ein 428-mer. Die weiteren Fragmente, welche ebenfalls über einen T7-Promotor verfügen, sind die Fragmente D und F. Bei den zugehörigen Transkripten handelt es sich um ein 593-mer bzw. ein 179-mer.

Das richtige Ligationsprodukt von pFALinklpp (Abb. 40) weist nach dem *Bam* HI-, *Hind* III-Verdau eine Größe von 840 bp auf und bei dem zugehörigen Transkript handelt es sich um ein 605-mer. Die weiteren Fragmente, welche ebenfalls über einen T7-Promotor verfügen, sind die Fragmente D und F. Bei den zugehörigen Transkripten handelt es sich um ein 357-mer bzw. ein 61-mer.

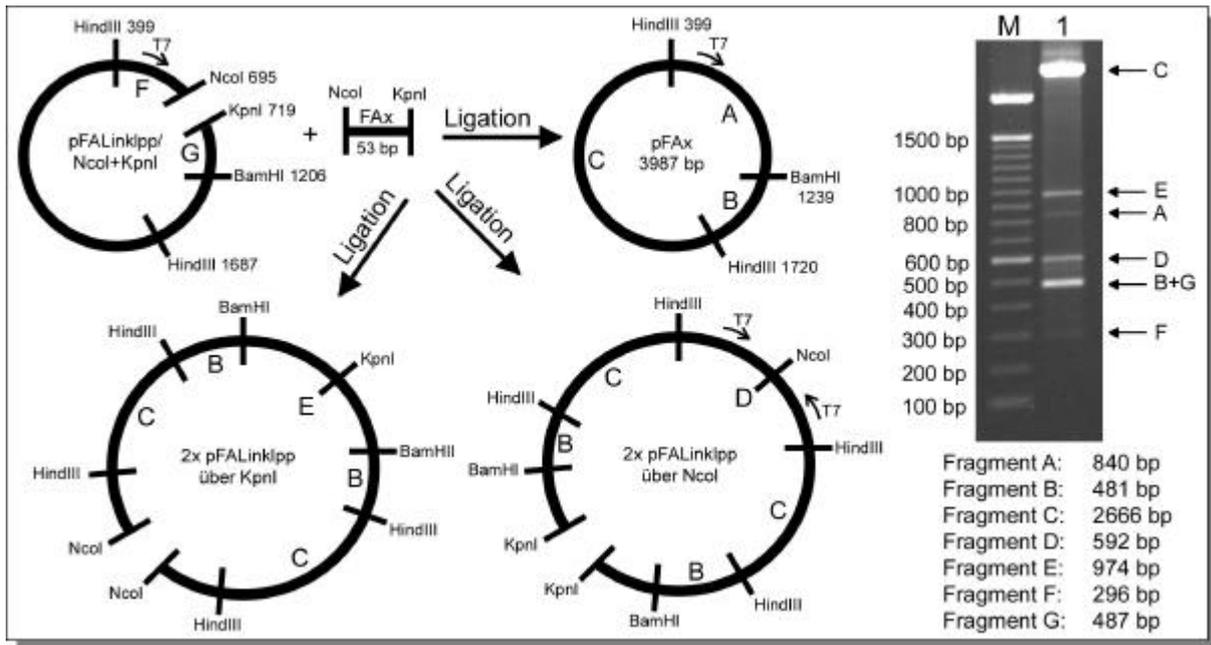


Abb. 40 Ligation von pFALinklpp/Nco I + Kpn I mit FAX und die dabei entstehenden Ligationsprodukte. Der gesamte Ligationsansatz wurde mit *Bam HI* und *Hind III* verdaut und auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1, rechtes Bild). Auf der Spur M ist eine 100 bp-Leiter auf

Aufgrund des Transkriptionsergebnisses mußten die gewünschten Ligationsprodukte (jeweils das Fragment A) isoliert werden. Dazu wurden die mit *Bam HI* und *Hind III* geschnittenen Ligationsprodukte auf 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt und jeweils die das Fragment A enthaltende Bande ausgeschnitten. Die Wiedergewinnung der DNA erfolgte mittels Elektroelution, welche sich praktisch verlustfrei durchführen läßt. Die eluierten DNA-Fragmente wurden mit Isopropanol gefällt und in H₂O aufgenommen. Um sicherzustellen, daß das zudem aufgetretene Transkriptionsprodukt auf das Fragment D zurückzuführen ist, wurde auch dieses Fragment aus dem Gel eluiert. Nachfolgend fanden Transkriptionen statt, wobei neben dem mit *Bam HI* und *Hind III* verdauten Ligationsansätzen auch die isolierten DNA-Fragmente als Matrize dienten. Die erhaltenen Transkripte sind in der Abbildung 41 dargestellt.

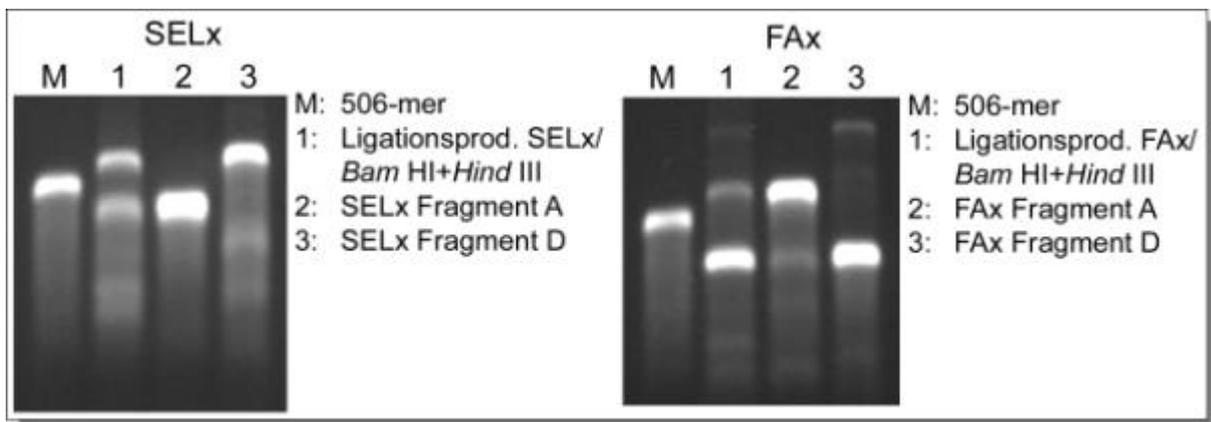


Abb. 41 Transkriptionsprodukte auf einem 1,2%-igen Agarosegel

Wie erhofft liefert das isolierte DNA-Fragment A in beiden Fällen ein Transkript mit der etwa richtigen Größe; bei SELx handelt es sich um ein 428-mer und bei FAX um ein 605-mer. Auch die auf das Fragment D zurückgehenden Transkripte mit einer Länge von 593 und 357 Nucleotiden bei SELx bzw. FAX sind auf dem Gel zu erkennen. Das zusätzliche Transkript beim Fragment A von FAX, läßt auf eine Verunreinigung mit dem Fragment D schließen. Die geringe Transkriptmenge allerdings, obwohl das Fragment über zwei T7-Promotoren verfügt, spiegelt eine vernachlässigbare Verunreinigung wider, die zudem im Rahmen der RT-PCR nicht amplifizierbar ist. Die isolierten DNA-Fragmente repräsentieren die funktionalen DNA-Bibliotheken und konnten nun zum 'Ribosome Display' herangezogen werden.

4.2.5 Qualität der erhaltenen Bibliotheken

Wichtigstes Qualitätsmerkmal bei der Bewertung der erzeugten Bibliotheken ist die Größe, d.h. die Anzahl verschiedener Varianten. Daneben sollte die Anzahl an Deletionen, welche durch die Verwendung der randomisierten Oligonukleotide eingeführt wurden, möglichst gering sein, da sie eine Verschiebung des Leserasters und somit das Auftreten von Stop-codons zur Folge haben. Die Größe der erhaltenen Bibliotheken ist direkt proportional zur Anzahl der richtigen Ligationsprodukte, die letztlich isoliert werden konnten. Damit weisen beide Bibliotheken eine 'Pool-Komplexität' von etwa 10^{14} Molekülen auf. Die im Verlauf der Ligation eingesetzten und nach dem jeweiligen Arbeitsschritt erhaltenen Mengen des entsprechenden Zwischenproduktes sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Die im Verlauf der Ligation pro Arbeitsschritt eingesetzte Anzahl an Molekülen

Ansatz	SELx	FAX
Isolierte Plasmide	24 mg = $5,8 \times 10^{15}$ Moleküle	46,1 mg = $1,1 \times 10^{16}$ Moleküle
Plasmide nach Verdau, geeluliert	7,6 mg = $1,9 \times 10^{15}$ Moleküle	13,9 mg = $3,3 \times 10^{15}$ Moleküle
Randomisierte DNA-Fragmente nach Hybridisierung (theoretischer Wert)	29 nmol = $1,7 \times 10^{16}$ Moleküle	100 nmol = 6×10^{16} Moleküle
Inserts nach Verdau, geeluliert	141 µg = $2,3 \times 10^{15}$ Moleküle	282 µg = $4,9 \times 10^{15}$ Moleküle
Menge an Vektor bei der Ligation	6,6 mg = $1,6 \times 10^{15}$ Moleküle	13,5 mg = $3,2 \times 10^{15}$ Moleküle
Menge an Insert bei der Ligation	102 µg = $1,7 \times 10^{15}$ Moleküle	186 µg = $3,3 \times 10^{15}$ Moleküle
Richtiges Ligationsprodukt, geeluliert	72,3 µg = 1×10^{14} Moleküle	98,7 µg = $1,1 \times 10^{14}$ Moleküle

Eine Überprüfung der Bibliotheken erfolgte durch Sequenzierung von je zwölf zufällig ausgewählten Klonen. Zu diesem Zweck wurde ein gewisser Teil der isolierten Ligationsprodukte mit *Xba* I geschnitten und in den mit *Bam* HI und *Xba* I verdauten Vektor pFAlpp ligiert.

Nach erfolgter Transformation wurden pro Bibliothek zwölf Klone ausgewählt, deren Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Erwartungsgemäß unterschieden sich alle randomisierten Bereiche voneinander. Von den zwölf Sequenzen der SELx-Bibliothek wiesen zwei eine Leserasterverschiebung im Anschluß an den randomisierten Bereich auf. Die Sequenzen der FAX-Bibliothek zeigten zwar keine Leserasterverschiebungen, aber dafür besaßen vier der zwölf sequenzierten Moleküle ein Stopcodon im randomisierten Bereich. Obwohl die Datenmenge äußerst gering ist, läßt das Ergebnis der Sequenzierung darauf schließen, daß nahezu alle isolierten Ligationsprodukte einen randomisierten Bereich enthalten. Weiterhin scheint bis zu einem Drittel der Bibliotheken für das ‘Ribosome Display’, durch das Auftreten von Stopcodons, unbrauchbar zu sein.

4.3 Durchführung der Selektion

Auf der Basis der im vorherigen Kapitel beschriebenen Bibliotheken und der Methode des ‘Ribosome Displays’ sollten Peptide selektiert werden, die in der Lage sind Streptavidin zu binden.

Die *in vitro* Transkription stellt den ersten Schritt des Selektionszyklus dar. Es wurden präparative Transkriptionen im 2 ml-Maßstab mit α -³⁵S-CTP durchgeführt, wobei 30,8 pmol der jeweiligen Bibliothek als Matrize dienten. Auf diese Weise ließen sich 45 nmol mSELx und 28,4 nmol mFAX herstellen, was einer Vervielfältigung um den Faktor 1460 bzw. 930 entspricht. Theoretisch sollten also 1460 bzw. 930 Kopien jeder als Matrize dienenden Nukleinsäuresequenz in Form von mRNA erhalten worden sein. Im weiteren Verlauf der Selektion diente das Produkt der RT-PCR in einer Endkonzentration von 100 nM als Matrize bei der Transkription, deren Reaktionsvolumen 100 µl betrug.

Die *in vitro* Translation fand in Anwesenheit von 600 nM mRNA und 5 µM AS-Oligo mit Ausnahme der ersten Runde, wo die AS-Oligo Konzentration nur 3 µM betrug, statt. Der Translationsansatz wurde auf 0,5 ml Reaktionen aufgeteilt und nach einer Inkubation von 8,5 min bei 37°C in ein Eisbad überführt. Es erfolgte die Zugabe von 26 µl 1 M Magnesiumacetat und 1 ml Waschpuffer (Tabelle 22) pro 0,5 ml Reaktionsansatz, bevor der gesamte Ansatz der Affinitätsmatrix (Streptavidin-Sepharose 4B) zugeführt wurde. Während der ersten beiden Runden fand die Affinitätschromatographie mit Hilfe einer Säule statt. Ab der dritten Runde wurde auf ein ‘Batchverfahren’ umgestellt. Dabei wurden der Reaktionsansatz und die Affinitätsmatrix gemeinsam in ein Kunststoffröhrchen überführt, dieses von einem Eismantel umgeben und zur gleichmäßigen Durchmischung rollend gelagert. Der Überstand nach Sedimentation wurde abgenommen und es schlossen sich zwei Waschschrte mit dem

insgesamt zehnfachen Matrixvolumen Waschpuffer und drei Elutionsschritte mit dem insgesamt vierfachen Matrixvolumen Elutionspuffer (Tabelle 22) nach der gleichen Methode an. Bei Verwendung einer sogenannten Vorsäule wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von nur 0,5 ml Waschpuffer mit 0,5 ml Sepharose 4B versetzt und im 'Batchverfahren' 10 bzw. 30 min inkubiert. Danach folgte die Überführung des gesamten Ansatzes in eine Säule, die nach Sedimentation der Matrix (Sepharose 4B) mit dem zuvor eingesparten Waschpuffer gespült wurde. Der Durchlauf gelangte direkt zur Affinitätsmatrix, so daß die spezifische Bindung von PRM-Komplexen an das Streptavidin stattfinden konnte.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Puffer für die Chromatographie bei der Selektion

Komponente	Waschpuffer	Elutionspuffer
1 M Tris-HOAc (pH 7,5)	50 mM	50 mM
5 M NaCl	150 mM	150 mM
1 M Mg(OAc) ₂	50 mM	-
10% Triton X-100	0,1%	0,1%
14,3 M 2-Mercaptoethanol	5 mM	5 mM
20 mg/ml BSA	50 µg/ml	50 µg/ml
1 µg/µl tRNA	1 µg/ml	1 µg/ml
100 mg/ml Heparin	2 mg/ml	-
0,5 M EDTA	-	20 mM

Das Eluat wurde nach Zugabe von 80 µg Glycogen einer Isopropanolfällung unterzogen, das Sediment in 200 µl H₂O gelöst und die mRNA mit dem 'High Pure RNA Purification Kit' der Firma Roche aufgearbeitet, wobei das Elutionsvolumen 58 µl betrug. Vier parallele reverse Transkriptionen (Kapitel 3.4.2) mit je 14 µl der aufgereinigten mRNA und 5 pmol des Oligonukleotids UniR schlossen sich an. Die so erhaltenen 100 µl cDNA dienten als Matrize für einen 1 ml (10×100 µl) PCR-Ansatz mit den 'Primern' T7 und UniR (Anhang).

Temperaturprogramm der PCR:

94°C	3 min	}	20×
94°C	30 sec		
72°C	135 sec		
72°C	3 min		

Das PCR-Produkt wurde auf einem präparativen 2%-igen Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und mit dem 'High Pure PCR-Product Purification Kit' der Firma Roche aufgereinigt, wobei das Elutionsvolumen 100 µl betrug. Bei ausreichender Menge und Reinheit diente es direkt als Matrize für die Transkription. In den meisten Fällen

mußte ausgehend vom aufgereinigten PCR-Produkt eine weitere 0,5 ml ($5 \times 100 \mu\text{l}$) PCR wie beschrieben durchgeführt werden, wodurch sich nicht nur die Ausbeute steigern ließ, sondern auch die Nebenprodukte deutlich abnahmen. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte wiederum durch Auftrennung auf einem Agarosegel und anschließender Geelution.

4.3.1 Verlauf der Selektion mit SELx

Bei der *in vitro* Translation der ersten Runde handelte es sich um einen 10 ml-Ansatz mit 6 nmol mRNA ($\cong 3,6 \times 10^{15}$ Moleküle). Da bei der vorherigen Transkription etwa 30 pmol ($\cong 1,8 \times 10^{13}$ Moleküle) des isolierten Ligationsproduktes eingesetzt wurden, sollte theoretisch jedes Molekül der Bibliothek in Form von mRNA mit 200 Kopien vertreten sein. Der Aufbau der SELx-Bibliothek ist anhand des in Abbildung 42 gezeigten PCR-Produktes ersichtlich.

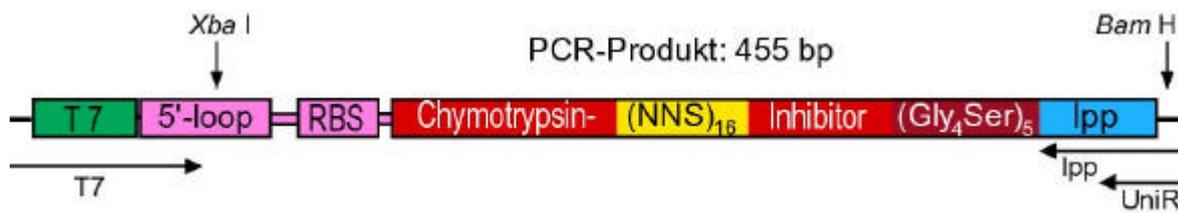


Abb. 42 Aufbau des SELx PCR-Produktes

Die PCR der ersten Runde lieferte neben dem in Abbildung 42 aufgeführten Produkt noch ein weiteres mit einer Größe von etwa 480 bp. Während dieses größere PCR-Produkt nach der ersten Runde ca. ein Drittel des insgesamt entstandenen Produktes ausmachte, lag sein Anteil nach der zweiten Runde bereits bei etwa 80%. Daraufhin wurde bei der PCR der dritten Runde der 'Primer' UniR, welcher bisher für die reverse Transkription Verwendung fand, anstelle von lpp (Anhang) verwendet. Durch Verwendung von UniR konnte das größere PCR-Produkt im weiteren Verlauf der Selektion vermieden und das Produkt mit der richtigen Größe stabil amplifiziert werden.

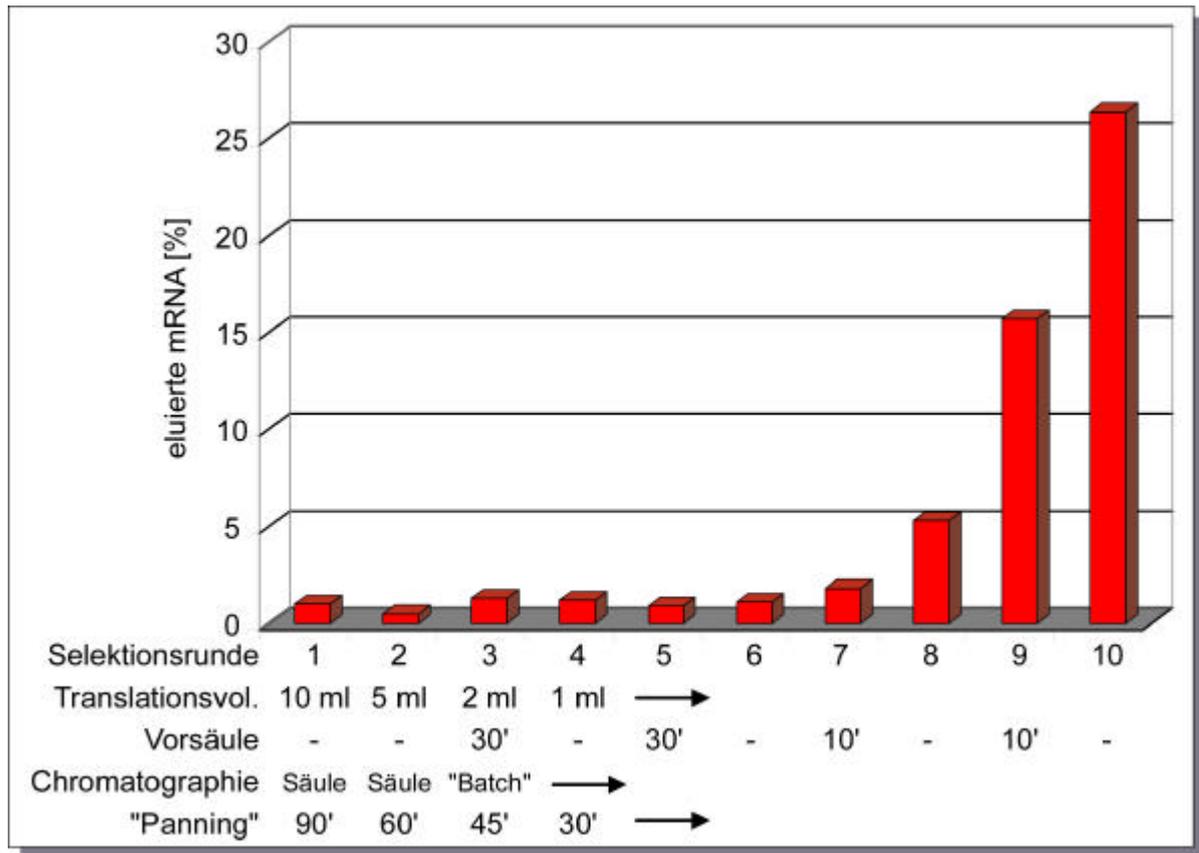


Abb. 43 Verlauf der Selektion mit SELx. Die Menge eluierter mRNA bezieht sich auf die nach der Translation noch vorhandene mRNA, welche der Affinitätschromatographie unterzogen wurde.

Im Anschluß an die zehnte Selektionsrunde ließ sich die Menge eluierbarer mRNA nicht weiter steigern und demzufolge wurde die Selektion abgebrochen. Nun galt es sicherzustellen, daß das Ergebnis der Selektion nicht auf einen Säulenbinder oder sogar auf eine Eigenschaft der mRNA zurückzuführen ist. Zur Überprüfung, ob es sich um Säulenbinder handelt, wurde die zehnte Selektionsrunde mit Sepharose 4B anstelle von Streptavidin-Sepharose 4B wiederholt. Die Menge eluierbarer mRNA betrug in diesem Fall 3,6% anstelle der 26,4% bei Verwendung der Affinitätsmatrix. Auch die Selektion von Aptameren, also RNA-Molekülen mit der Eigenschaft ein Zielmolekül spezifisch zu binden, war denkbar. Aus diesem Grund wurden sowohl die mRNAs der Ausgangsbibliothek als auch die bei der zehnten Runde verwendeten mRNAs in Waschpuffer einer Affinitätschromatographie mit der Streptavidin-Sepharose unterzogen. Bei Verwendung der mRNA des Ausgangspools und der neunten Runde konnten 2,6% bzw. 2% eluiert werden.

Die Kontrollexperimente zeigten, daß das Ergebnis der Selektion weder auf Säulenbinder noch auf Aptamere zurückzuführen ist. Demzufolge muß es sich um Peptide oder Proteine handeln, welche als Bestandteil von PRM-Komplexen Streptavidin binden. Die Zugabe von

EDTA führt zur Zerstörung dieser Komplexe und die so eluierte mRNA läßt sich aufgrund ihrer radioaktiven Markierung nachweisen.

4.3.2 Verlauf der Selektion mit FAX

Analog zur beschriebenen Selektion mit SELx handelte es sich bei der *in vitro* Translation der ersten Runde ebenfalls um einen 10 ml-Ansatz. Demzufolge sollte auch hier theoretisch jedes Molekül der Bibliothek in Form von mRNA mit 200 Kopien vertreten sein. Der Aufbau der FAX-Bibliothek ist anhand des in Abbildung 44 gezeigten PCR-Produktes ersichtlich.



Abb. 44 Aufbau des FAX PCR-Produktes

Auch hier lieferte die PCR der ersten Runde neben dem in Abbildung 44 aufgeführten Produkt noch ein weiteres mit einer Größe von etwas mehr als 600 bp. Während dieses verkürzte PCR-Produkt nach der ersten Runde nur ungefähr 10% des insgesamt entstandenen Produktes ausmachte, lag sein Anteil nach der zweiten Runde bereits bei etwa 70%. Daraufhin wurde es sequenziert und festgestellt, daß die Verkürzung auf eine 30 bp-Deletion zurückzuführen ist. Die Deletion umfaßt die letzten zwei Basenpaare des FABP und die ersten 28 des Linkers (Abbildung 44). Das verkürzte Produkt wurde auf der PCR-Ebene bevorzugt (Abbildung 45) und setzte sich demzufolge im weiteren Verlauf der Selektion durch.

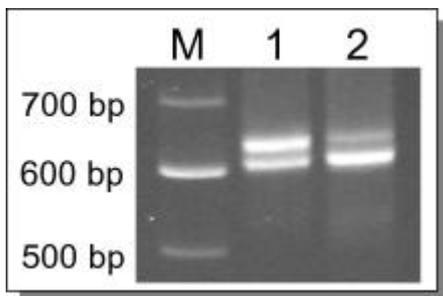


Abb. 45 Bevorzugung des verkürzten FAX PCR-Produktes auf der PCR-Ebene. Das 632 bp-Fragment der 2. Runde wurde geleliert und auf einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt (Spur 1). Die zusätzliche Bande zeigt, daß ein Teil des verkürzten Produktes dabei mitgeführt wurde. Diese Fragmente dienen als Matrize für eine weiteren PCR, deren Produkte in Spur 2 zu sehen sind. Auf der Spur M ist eine 100 bp-Leiter aufgetragen.

Da die Deletion fast ausschließlich den Linker betraf, wurde die Selektion mit dem verkürzten PCR-Produkt fortgesetzt, das sich im weiteren Verlauf als stabil erwies.

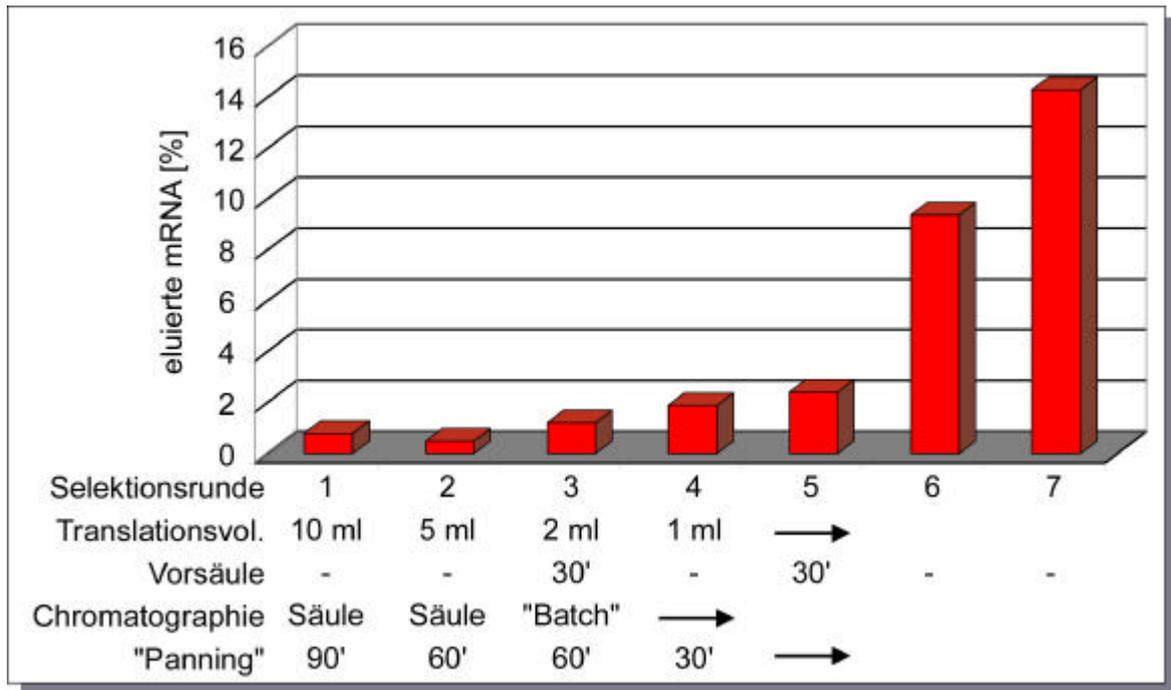


Abb. 46 Verlauf der Selektion mit FAX. Die Menge eluierter mRNA bezieht sich auf die nach der Translation noch vorhandene mRNA, welche der Affinitätschromatographie unterzogen wurde.

Im Anschluß an die siebte Selektionsrunde ließ sich die Menge eluierbarer mRNA nicht weiter steigern und demzufolge wurde die Selektion abgebrochen. Es wurden auch hier die bei der SELx-Selektion beschriebenen Kontrollversuche durchgeführt. Bei der Wiederholung der siebten Runde mit Sepharose 4B wurden 4,9% mRNA eluiert anstelle der 14,3% mit Streptavidin-Sepharose 4B. Ferner erfolgte die Überprüfung des Selektionsergebnisses daraufhin, ob es sich bei den selektierten Molekülen um Aptamere handelt. Die Verwendung der mRNA des Ausgangspools lieferte 1,2% eluierbare mRNA und die der siebten Runde 1,8%.

Die Kontrollexperimente deuten wie zuvor bei der SELx-Selektion weder auf Säulenbinder noch auf Aptamere hin. Zudem legt die Elution der mRNA mittels EDTA nahe, daß die Bindung an Streptavidin auf die Proteinkomponente der PRM-Komplexe zurückzuführen ist. Auch diese Ergebnisse deuten auf die Selektion von Peptiden oder Proteinen hin, welche in der Lage sind Streptavidin zu binden.

4.4 Klonierung und Sequenzanalyse

Die PCR-Produkte der zehnten Runde von SELx, welche 275 PCR-Zyklen durchliefen und die der siebten Runde von FAX, welche 215 PCR-Zyklen durchliefen wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Bam* HI geschnitten, auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und aus diesem eluiert. Das verdauten SELx-Fragment war laut Gelanalyse etwa

10-15 bp kürzer als erwartet. Es folgte die Ligation dieser Fragmente in den Vektor pFAlpp/*Xba* I+*Bam* HI, welcher noch von der Kontrolle der Bibliotheken vorhanden war. Nach erfolgter Transformation wurden pro Ansatz 50 Klone ausgewählt, deren Plasmide isoliert und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des ‘Primers’ UniF, welcher im Bereich des T7-Promotors liegt.

4.4.1 SELx-Sequenzen

Der kodierende Bereich des Chymotrypsin-Inhibitors einschließlich des randomisierten Bereiches umfaßt 240 bp, wobei die 48 bp des randomisierten Bereiches auf die ersten 120 bp folgen. Im Anschluß an die Sequenz des Chymotrypsin-Inhibitors folgt der ‘Spacer’ mit einer Länge von 120 bp. Da es bei der Sequenzierung letztlich auf den randomisierten Bereich ankam, wurden etwa 300 Basen sequenziert. Der dadurch nicht erfaßte Bereich, betrifft die letzten 90-120 Basen, welche den ‘Spacer’ und somit den Teil des Proteins kodieren, der aufgrund seiner Lage im Ribosomentunnel an keiner Sekundärstruktur beteiligt sein kann. Von den 50 Sequenzierungen waren 42 auswertbar und führten zu dem in Abbildung 47 dargestellten Ergebnis.

Die Ausgangssequenz als Vergleich:

SELx MGTLLKTEWPELVGKSVVEEAKKVILQDKPEAQI IVLPVHAL **XXXXXXXXXXXXXX**-
XXXXLEDRVRLFVDKLDNIAQVPRVGTGGGGSGGGGSGGGGS

57% der sequenzierten Klone haben folgende Sequenz:

Peptid 1 MAALLLMVAWNMSEAHKVVDLLRHAPKDDIIVMLLCMSLTVLFDMVIAISVG-
 IVLASLLFMRRIARMTRLAPVVVDVDDVLRVIGPL 25×

18% der sequenzierten Klone haben folgende Sequenz:

Peptid 2 MVGIAVGIQFLATVLTRGYAGRLADQYGAKRSALQGMLACGLAGGALLLAAI-
 LPVSAPFKFALLVVGRLILGFGESQLLTGALTWGLGIVG 8×

11% der sequenzierten Klone haben folgende Sequenz

Peptid 3 MGTANAVLLGAILGGMMCTDMGGPVNKAAYAFGVGLLSTQTYGPMMAAIAAG-
 MVPPLAMGLATMVARRKFDKAQQEGGKAALVLGLCFISEGA 5×

Die restlichen sequenzierten Klone weisen folgende Sequenzen auf:

MGGIMILTAIVISVLLWAYPSNPYVWCVLVVLVGYGVIG**L**VDDYRKVVRKDTKGLIARWKYFW**M**IVIALGVAFALYLAGKDTP
 MGGIMILTAIVISVLLWAYPSNPYVWCVLVVLVGYGVIG**L**VDDYRKVVRKDTKGLIARWKYFW**S**IVIALGVAFALYLAGKDTP
 MDNANKVFPEMAT**V**PIALVILIVCAIGAVIGLINGLI IAYLNVTPFITTLGTMIIVYGINSLYYDFVGASPI SGFDSGFSTFA
 MDNANKVFPEMAT**V**PIALVILIVCAIGAVIGLINGLI IAYLNVTPFITTLGTMIIVYGINSLYYDFVGASPI SGFDSGFSTFA

Abb. 47 Erhaltene Sequenzen der SELx-Selektion nach der zehnten Selektionsrunde. Von den Peptiden 1-3 ist jeweils die Konsensus-Sequenz aufgeführt, wobei etwa jeder dritte Sequenz eine Mutation aufweist und sich demzufolge um eine Aminosäure von der Konsensus-Sequenz unterscheidet.

Die selektierten Sequenzen unterscheiden sich nicht nur im randomisierten Bereich von SELx, sondern sie lassen auf ihrer ganzen Länge keine Übereinstimmung mit der Ausgangssequenz erkennen. Die Suche dieser ‘neuen’ Sequenzen in der SWISS-PROT und TrEMBL Datenbank ergab große Übereinstimmungen mit einer Reihe von Proteinen aus verschiedenen Organismen. Dabei erscheinen Proteine aus *E. coli* am wahrscheinlichsten, da das Lysat für die *in vitro* Translation auf dem *E. coli* Stamm D10 basiert. Das Peptid 1 stimmt über einen Bereich von 68 Aminosäuren mit einem vermeintlichen Membranprotein überein. Das Peptid 2 stimmt über einen Bereich von 32 und 39 Aminosäuren mit einem vermeintlichen Transportprotein überein, wobei es sich vermutlich um einen Transmembrantransporter handelt. Das Peptid 3 stimmt zu 100% mit einem Fructose spezifischen Transportprotein das zum Phosphotransferasesystem (PTS) gehört, der Fructose-Permease IIBC Komponente, überein. Interessanterweise stimmt eines der restlichen Peptide ebenfalls zu 100% mit einer Permease des Galaktosid Transportsystems überein.

4.4.2 Fx-Sequenzen

Da der randomisierte Bereich direkt auf das Startcodon folgt, mußten prinzipiell nicht mehr als 110 Basen sequenziert werden. Es wurde allerdings mehr Basen sequenziert, um auch die Nachbarschaft des randomisierten Bereiches zu erfassen. Von den 50 Sequenzierungen waren nur 37 auswertbar und führten zu dem in Abbildung 48 dargestellten Ergebnis.

Die selektierten Peptide 1-5 ließen sich weder in der SWISS-PROT noch in der TrEMBL Datenbank finden. Weiterhin wurde überprüft, wieviele Mutationen sich während der 215 PCR-Zyklen eingeschlichen haben. Dazu wurden die auf den randomisierten Bereich folgenden 120 Nukleotide herangezogen und mit der Ausgangssequenz verglichen. Auf der DNA-Ebene lagen zwischen 0 und 4 Mutationen bezogen auf die 120 Nukleotide vor, wobei der Durchschnitt 1,6 betrug. Auf der Ebene der Aminosäuren bedeutet dies 0 bis 2 Mutationen bezogen auf die 40 Aminosäuren, wobei der Durchschnitt 0,4 betrug.

46% der sequenzierten Klone besitzen ein HPQ-Motiv:

Peptid 1:	M	DLYDIDRNWVGHPQG	VGT...5×
Peptid 2:	M	DNYDADLAWDTHPQD	VGT...4×
	M	GMHSDLNMMWETHPQ	VGT...1×
	M	AITDWLSHPQGPRSN	VGT...1×
	M	DMYSADDTFRHMHPQ	VGT...1×
	M	DCFNGQEDRINHPQG	VGT...1×
	M	VDVGSWSGNEFIHPQ	VGT...1×
	M	EDLSSPWLVGHPQAT	VGT...1×
	M	DYWNSNDMAMHPQVN	VGT...1×
	M	DSINLMDRFASHPQA	VGT...1×
			Σ 17

32% der sequenzierten Klone besitzen ein DVEAW- oder DVXXW-Motiv:

Peptid 3:	M	DVEAWLDERVPLVET	VGT...3×
	M	DVEAWLADRSQVSPN	VGT...1×
	M	DVCAWLEVESHPVRE	VGT...1×
	M	DVLSWLESNSVRITR	VGT...1×
Peptid 4:	M	DVEAWIADPAVHFTT	VGT...2×
	M	DVEAWISYQSPLPDQ	VGT...1×
	M	DVEAWIMHPCLCSC	VGT...1×
	M	DVESWVEQYSVPIVP	VGT...1×
	M	DVINAWVSNMDCKECR	VGT...1×
			Σ 12

Die restlichen 22% der sequenzierten Klone zeigen keine weitere Motive:

Peptid 5:	M	DLYKVPSHCHPMMP	VGT...2×
	M	DMYIPMFLNHPRMTP	VGT...1×
	M	VEYLSGVQFATWQCP	VGT...1×
	M	DTWTVGCSCMMACVH	VGT...1×
	M	DCLAVLQNEVHPVYD	VGT...1×
	M	VGMTEWWYGLRCVVA	VGT...1×
	M	DSFNGFQNEGHPLDD	VGT...1×
			Σ 8

Abb. 48 Erhaltene Sequenzen der FAX-Selektion nach der siebten Selektionsrunde. Im Anschluß an den randomisierte Bereich setzt sich die FABP-Sequenz mit VGT fort (grau unterlegt).

4.5 Streptavidin-Bindungspeptide

Die Peptide SELx 1-3 und FAX 1-5 wurden für weitere Charakterisierungen herangezogen.

4.5.1 Bestimmung der Bindungskonstanten

Die Dissoziationskonstanten der selektierten Peptide für die Bindung an Streptavidin wurden mit Hilfe der 'Oberflächen Plasmonen Resonanz Spektroskopie' unter Verwendung eines BIAcore-Gerätes und des NTA Sensor-Chips (BIAcore) bestimmt. Zu diesem Zweck mußten

die zu vermessenden Peptide bzw. Proteine mit einem Hexahistidin-tag versehen werden, um sie auf dem Sensor-Chip immobilisieren zu können.

Zur Einführung des His-tags waren mehrere Klonierungsschritte erforderlich. Zuerst wurde ausgehend vom Vektor pHMFA mit den Oligonukleotiden SELHisF und SELHisR (Anhang) eine PCR durchgeführt, das PCR-Produkt mit *Pst* I und *Bam* HI verdaut und in den ebenso verdauten Vektor pHMFA ligiert. Zur Einführung einer *Pst* I-Schnittstelle in die SELx-Peptide erfolgte eine PCR mit den Oligonukleotiden T7 und SELx1, 2 oder 3 (Anhang). Die PCR-Produkte wurden mit *Nco* I und *Pst* I verdaut und in den aus dem ersten Klonierungsschritt hervorgegangenen Vektor kloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft und kodieren die ersten 78 Aminosäuren der SELx-Peptide, gefolgt von drei Aminosäuren, welche von der *Pst* I-Schnittstelle herrühren und dem His-tag. Als Kontrolle diente ein Klon der Ausgangsbibliothek, dessen *Nco* I/*Pst* I-Fragment identisch kloniert wurde.



Abb. 49 Schematischer Aufbau der Proteine zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der selektierten SELx-Peptide. x steht für 1 bis 3.

Für die Klonierung der FAX-Peptide wurde ebenfalls vom Vektor pHMFA ausgegangen und mit den Oligonukleotiden UniF und FAHisR (Anhang) eine PCR durchgeführt, das PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen *Bst* XI und *Bam* HI verdaut und in den ebenso verdauten Vektor pHMFA ligiert. Das resultierende Plasmid (pFA+CHis) kodiert für ein FABP mit C-terminalem His-tag. In diesen Vektor wurden die FAX-Peptide über die *Kpn* I- und *Bgl* II-Schnittstelle hineinkloniert. Weiterhin wurde das *Xba* I/*Kpn* I-Fragment von pFAIpp+NSTII in diesen Vektor hineinkloniert. Die resultierenden Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft. Bei ihnen handelt es sich um das FABP, dessen C-terminus um einen His-tag verlängert wurde und dessen N-terminus eines der selektierten FAX-Peptide bzw. den Strep-tag II trägt. Die Anordnung der FAX-Peptide ist dabei gleichbleibend zur Bibliothek, d.h. das FABP besitzt das Peptid anstelle der vier N-terminalen Aminosäuren.



Abb. 50 Schematischer Aufbau der Proteine zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der selektierten FAX-Peptide. x steht für 1 bis 5 bzw. Strep-tag II.

Nachdem die zu vermessenden Peptide bzw. Proteine mit dem C-terminalen His-tag ausgestattet waren, wurden sie mittels gekoppelter Transkriptions-, Translationsreaktion *in vitro* hergestellt. Dabei fielen die SELx-Peptide mit Ausnahme des Kontrollproteins, d.h. des Chymotrypsin-Inhibitors, durch extrem geringe Syntheseraten auf und waren zudem sehr unlöslich. Im Anschluß an die Synthese erfolgte die Aufreinigung der Proteine durch eine His-tag Affinitätschromatographie. Die für die BIAcore-Messung benötigten Pufferbedingungen wurden bei gleichzeitiger Entfernung des zur Elution benötigten Imidazols eingestellt. Dies geschah mit Hilfe von zentrifugierbaren Filtereinheiten (Microcon YM-3) der Firma Millipore, die ein Ausschlußvolumen von 3 kDa haben.

Die Durchführung der BIAcore-Messungen erfolgte nach Herstellerangaben und wie in Kapitel 3.13.2 beschrieben. Die Aufbringung des Nickels führte zu einer Erhöhung der Basislinie um etwa 68 RU. Die darauffolgende Aufbringung des jeweiligen Proteins führte zu einer Erhöhung der Basislinie um 3.000 bis 5.000 RU, wobei die Messungen durchgeführt wurden, als die Basislinie auf 2.200 bis 4.000 RU abgenommen hatte. Die Basislinie nahm mit zunehmender Zeit kontinuierlich ab, d.h. das immobilisierte Protein wurde mit der Zeit vom Chip gewaschen. Aus diesem Grund konnten die notwendigen Messungen mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen nicht direkt nacheinander durchgeführt werden. Der Sensor-Chip mußte nach jeder Einzelmessung regeneriert werden, bevor dann das jeweilige Protein für die Messung mit der nächsten Analytkonzentration erneut auf den Chip aufgebracht werden konnte. Die Flußrate betrug beim Aufbringen des Nickels, des jeweiligen Proteins, des Streptavidins und bei der Regenerierung 15 µl/min. Die Konzentration der zu immobilisierenden Proteine lag bei 200 bis 500 nM und die Aufbringung auf den Chip erfolgte durch einen 3-minütigen Puls. Die eigentliche Messung mit dem Analyt (= Streptavidin) dauerte 1 min. Die Regenerierung erfolgte erst mit Regenerierungspuffer über einen Zeitraum von 3 min, gefolgt von 0,5% SDS in 'Eluentpuffer' über einen Zeitraum von 1 min. Basierend auf den gemessenen Werten wurden anschließend die Dissoziationskonstanten mit der Software BIAevaluation 3.0 direkt bestimmt.

Die Vermessung der SELx-Peptide lieferte keine Dissoziationskonstanten, da selbst bei der größten Analytkonzentration von 120 µM noch keine Sättigung zu sehen war. Der Verlauf der Sensorgramme sprach zwar für eine Bindung von Streptavidin an den SELx-Peptiden, aber entweder sind die Bindungsaffinitäten sehr gering ($K_d > 100 \mu\text{M}$) oder es handelt sich um eine unspezifische Bindung. Die fünf FAX-Peptide, sowie das FABP mit dem N-terminalen Strep-tag II ließen sich allesamt vermessen und auswerten.

FABP mit N-terminalem Strep-tag II

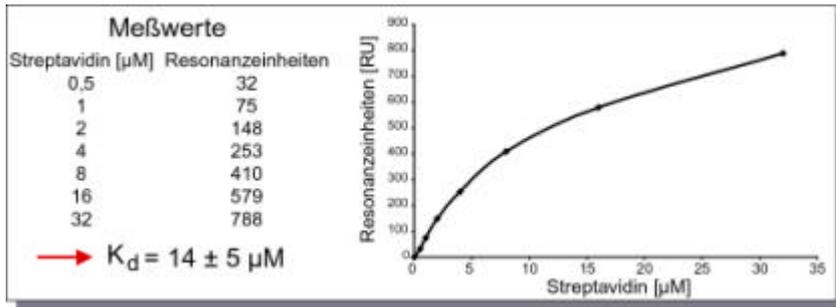


Abb. 51 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung des FABP mit N-terminalem Strep-tag II an Streptavidin mittels BIAcore.

FAx-Peptid 1

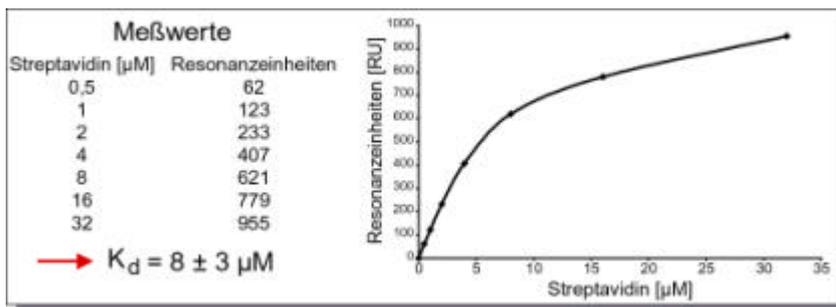


Abb. 51 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung vom FAx-Peptid 1 an Streptavidin mittels BIAcore.

FAx Peptid 2

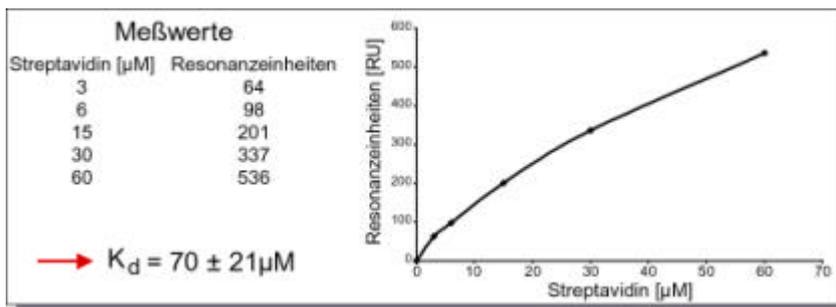


Abb. 52 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung vom FAx-Peptid 2 an Streptavidin mittels BIAcore.

FAx Peptid 3

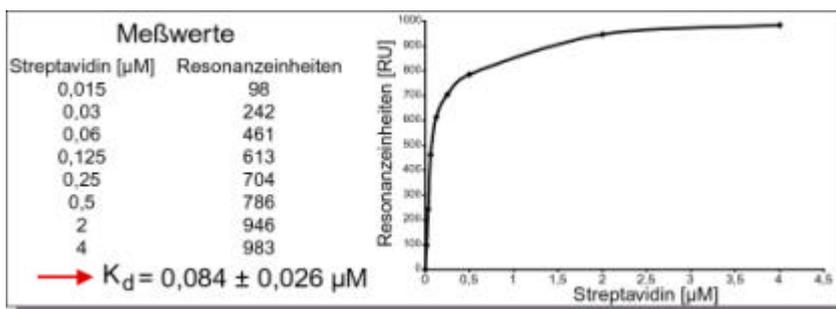


Abb. 53 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung vom FAx-Peptid 3 an Streptavidin mittels BIAcore.

FAx Peptid 4

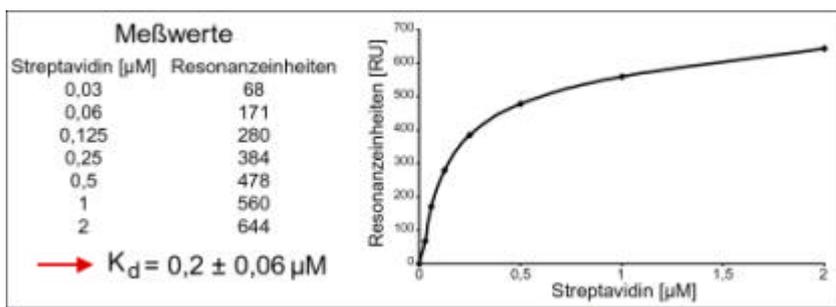


Abb. 54 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung vom FAx-Peptid 4 an Streptavidin mittels BIAcore.

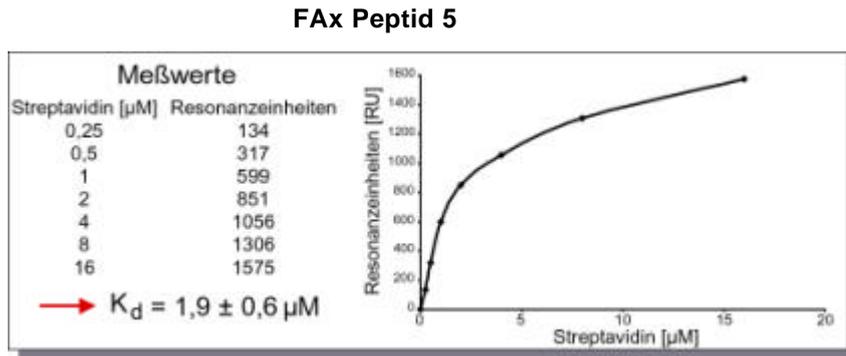


Abb. 55 Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung vom FAX-Peptid 5 an Streptavidin mittels BIAcore.

Tabelle 23: Bestimmung der K_d -Werte mittels BIAcore – Zusammenfassung der Ergebnisse

FAx	Sequenz	K_d [μM]
Peptid 1	DLYDIDRNWVGHPQG	8 ± 3
Peptid 2	DNYDADLAWDTHPQD	70 ± 21
Peptid 3	DVEAWLDERVPLVET	$0,084 \pm 0,026$
Peptid 4	DVEAWIADPAVHF'TT	$0,2 \pm 0,06$
Peptid 5	DLYKVPSHCHPMMP	$1,9 \pm 0,6$

4.5.2 Bindungstest an Streptavidin-Sepharose

Nachdem aufgrund der BIAcore-Messung nicht klar war, inwieweit die SELx-Peptide an Streptavidin binden, sollte ein weiterer Versuch Aufschluß darüber geben. Die in Abbildung 47 dargestellten SELx-Peptide wurden *in vitro* in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin synthetisiert und anschließend unter den Selektionsbedingungen (Puffer und Temperatur) einer Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Streptavidin-Sepharose Säule unterzogen. Der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie ergab, daß in allen drei Fällen das Protein nicht an der Matrix bindet, sondern auf den Durchlauf und die ersten beiden Waschfraktionen entfällt. Diese Ergebnisse in Verbindung mit den BIAcore-Messungen lassen keine Bindung der SELx-Peptide an Streptavidin erkennen.

Auch die FAX-Peptide wurden einer solchen Affinitätschromatographie unterzogen. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Bindung der Peptide an der Biotin-Bindungstasche des Streptavidin erfolgt, worauf die HPQ-Motive der Peptide 1 und 2 hindeuten (Schmidt *et al.*, 1996). Zu diesem Zweck wurden die in Abbildung 48 dargestellten Konstrukte ein weiteres Mal umkloniert. Die bereits bei der vorherigen Klonierung benötigten *Kpn I/Bgl II*-Fragmente der FAX-Peptide wurden in den identisch geschnittenen Vektor pHMFA kloniert. Bei den resultierenden Konstrukten handelt es sich jeweils um das FABP, das anstelle der vier N-terminalen Aminosäuren eines der selektierten FAX-Peptide trägt.



Abb. 56 Aufbau der Proteine für die Streptavidin-Affinitätschromatographie. Das FABP trägt anstelle der vier N-terminalen Aminosäuren jeweils eines der selektierten FAX-Peptide. x steht für 1 bis 5.

Die Proteine wurden *in vitro* in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin synthetisiert und unter den Selektionsbedingungen einer Affinitätschromatographie unterzogen. Die Streptavidin-Sepharose Säulen hatten ein Volumen von 170 μl . Es wurde dreimal mit 200 μl Waschpuffer gewaschen, bevor die Elution durch Zugabe von dreimal 200 μl Elutionspuffer, welcher 2 mM Biotin anstelle der 20 mM EDTA enthielt, erfolgte. Der Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie wurde bestimmt und zudem der Reaktionsansatz und das Eluat 2 mittels SDS-PAGE analysiert.

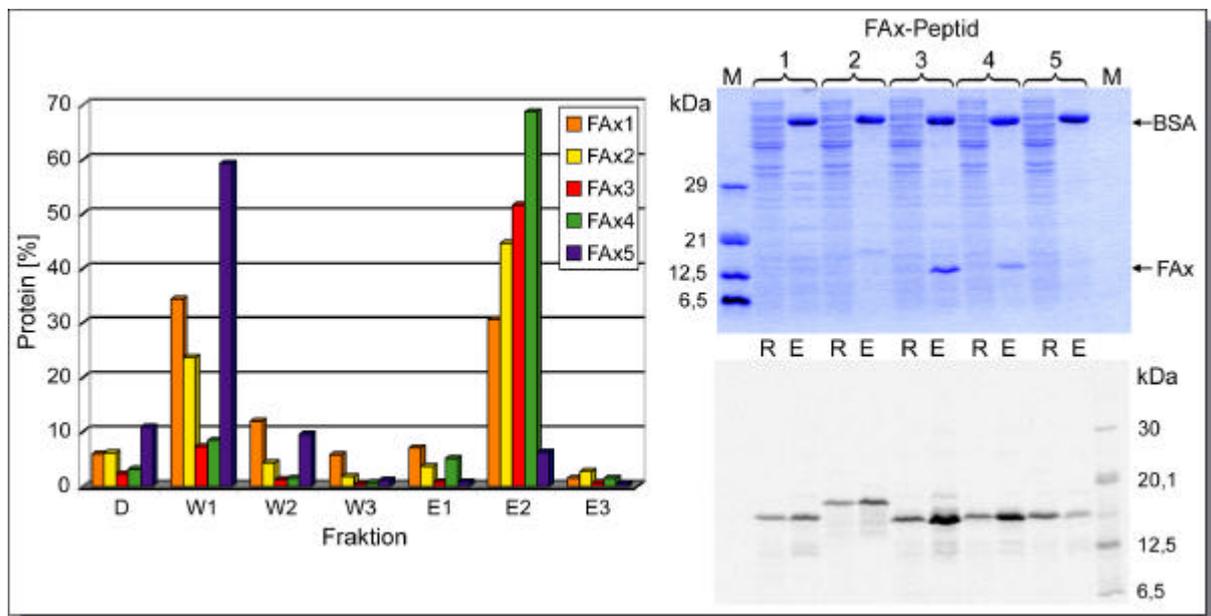


Abb. 57 Streptavidin Affinitätschromatographien der FAX-Peptide am N-terminus des FABP unter den Selektionsbedingungen. Die Proteine wurden mittels zellfreier Proteinbiosynthese in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin synthetisiert und der Affinitätschromatographie zugeführt, wobei die Elution mit Biotin erfolgte. Das linke Diagramm spiegelt den Anteil TCA-fällbarer Radioaktivität wider. Auf der rechten Seite sind das Coomassie gefärbte Gel (oben) und das zugehörige Autoradiogramm nach Auftrennung des Reaktionsansatzes (R) und des Eluates 2 (E) mittels SDS-PAGE auf einem 15%-igen Gel gezeigt. M steht für Molekulargewichtsmarker, R für Reaktionsansatz, D für Durchlauf der Probenauftragung, W für Waschfraktion und E für Elutionsfraktion.

Die in Abbildung 57 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß sich alle FAX-Peptide durch Biotin von der Streptavidin-Sepharose eluieren lassen und demzufolge scheint die Bindung aller Peptide an der Biotin-Bindungstasche des Streptavidin zu erfolgen. Das Peptid 5 zeigt praktisch keine Bindung an Streptavidin, obwohl für diese Peptid ein K_{f} -Wert im unteren mikromolaren Bereich ermittelt wurde. Bei der starken Bande im Coomassie gefärbten Gel handelt es sich um BSA (68 kDa), welches Bestandteil des Elutionspuffers war.

4.5.3 FAX-Peptid 3 als Affinitätspeptid

Das FAX-Peptid 3 zeigt im Vergleich zu den anderen selektierten Peptiden nur einen geringen Einfluß auf die Ausbeute bei der zellfreien Proteinbiosynthese. Weiterhin liegt die Syntheserate nur geringfügig unterhalb der des unmodifizierten FABPs. Darüber hinaus ist das FABP mit dem FAX-Peptid 3 am N-Terminus gut löslich und weist von allen selektierten Proteinen die größte Bindungsaffinität gegenüber Streptavidin auf. Aus diesen Gründen sollte getestet werden, inwieweit sich dieses Peptid als Affinitätspeptid für die Aufreinigung von Proteinen eignet. Das *in vitro* synthetisierte und durch den Einbau von ^{14}C -Leucin radioaktiv markierte Protein wurde einer standardmäßigen Affinitätschromatographie unterzogen. Verwendet wurden dafür eine Streptavidin- und eine StrepTactin-Sepharose Säule, sowie die Puffer des Strep-tag Systems (Kapitel 3.11.1), wobei der Elutionspuffer für die Streptavidinsäule 2 mM Biotin anstelle der 2,5 mM Desthiobiotin enthielt.

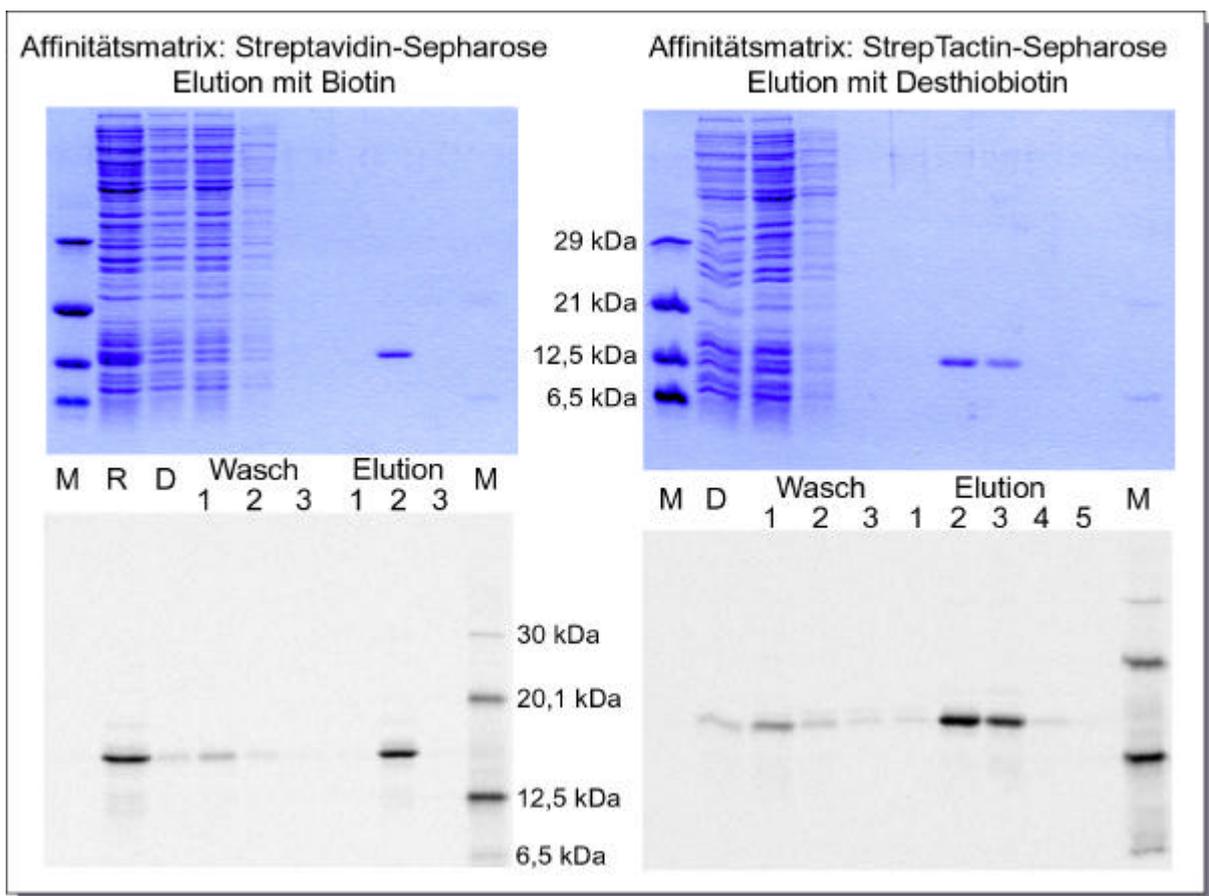


Abb. 58 Affinitätschromatographische Aufreinigung vom FABP mittels N-terminalem FAX-Peptid 3. Das Protein wurde zellfrei in Anwesenheit von ^{14}C -Leucin synthetisiert und über eine Streptavidin- bzw. eine StrepTactinsäule aufgereinigt. Dargestellt sind die Coomassie gefärbten Gele (oben) und die zugehörigen Autoradiogramme nach Auftrennung der Fraktionen der Chromatographie durch SDS-PAGE auf einem 15%-igen Gel. M steht für Molekulargewichtsmarker, R für Reaktionsansatz und D für Durchlauf der Probenauftragung.

Die Bestimmung des Anteils TCA-fällbarer Radioaktivität in den Fraktionen der Chromatographie ergab, daß bei der Verwendung von Streptavidin-Sepharose 90% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden konnten, wobei 78% auf die Eluate entfielen. Bei der Verwendung von StrepTactin-Sepharose konnten 84% des aufgetragenen Proteins von der Säule wiedergewonnen werden, wobei 71% auf die Eluate entfielen. Die Qualität der Aufreinigungen ist in der Abbildung 58 dargestellt.

Diese Ergebnisse spiegeln das Potential des durch *in vitro* Selektion erhaltenen FAX-Peptids 3 als Affinitätspeptid eindrucksvoll wider.