

Diskussion

5.1 Die Selektionsmethode

Die Methode des ‘Ribosome Display’ zur *in vitro* Selektion von Proteinen wurde aufbauend auf dem Konzept des ‘Polysome Display’ (Mattheakis *et al.*, 1994) von Hanes und Plückthun erstmals 1997 vorgestellt. Ende des selben Jahres publizierten He und Taussig ebenfalls einen ‘Ribosome Display’ Ansatz, welcher sich durch Verwendung eines eukaryontischen Translationssystems und Durchführung der RT-PCR mit den an Magnetpartikeln gebundenen ribosomalen Komplexen vom vorherigen Ansatz unterschied. Folgearbeiten beider Gruppen zeigten die Funktionalität der Methode zur Selektion einzelsträngiger Antikörper, welche zuvor aus immunisierten Mäusen isoliert wurden (Hanes *et al.*, 1998; He *et al.*, 1999). Die beiden ersten und bisher einzigen publizierten Selektionsexperimente mittels ‘Ribosome Display’ unter Verwendung einer synthetischen Bibliothek erfolgten in der Arbeitsgruppe Plückthun (Hanes *et al.*, 2000; Schaffitzel *et al.*, 2001). Bis zum heutigen Tag wurde die Methode des ‘Ribosome Display’ in leicht abgewandelter Form nur von vier weiteren Laboren der Welt etabliert und publiziert (Bieberich *et al.*, 2000; Irving *et al.*, 2001; Lamla und Erdmann, 2001; Takahashi *et al.*, 2002). Diese Tatsache spiegelt einerseits die Aktualität der Methode wider und zeigt andererseits, daß die Etablierung alles andere als trivial ist. Die Gründe dafür sind im Translationsschritt zu sehen, um welchen die klassische Nukleinsäure SELEX (Tuerk und Gold, 1990; Ellington und Szostak, 1990) erweitert wurde. Da die Translation auf einem biologischen Lysat beruht, ist das Auftreten von RNasen und Proteasen unvermeidbar. Hinzu kommt die eigentliche Translationsreaktion, von deren Effektivität der Selektionserfolg direkt abhängt und im Anschluß daran die Bindung der PRM-Komplexe am Zielmolekül. In diesem Zusammenhang sind die korrekte Faltung des über die Peptidyl-tRNA am Ribosom gebundenen Proteins und die Erhaltung der ribosomalen Komplexe über den Zeitraum der Affinitätschromatographie als unabdingbare Anforderungen an die Methode zu nennen.

Die unter Umständen etwas schwierigere Etablierung der Methode wird durch die Möglichkeiten aufgewogen, welche ein reines *in vitro* System zur Selektion von Proteinen mit sich bringt. Die seit längerem bekannten und bereits in Kapitel 1.1 vorgestellten Systeme zur Selektion von Peptiden und Proteinen, wie das ‘Phage Display’, ‘Plasmid Display’ und ‘Zelloberflächen Display’, beinhalten alle einen obligatorischen *in vivo* Schritt, der die Größe der zu bearbeitenden Bibliothek auf 10^7 bis maximal 10^9 verschiedene Moleküle begrenzt. Im

Vergleich zu diesen Systemen lassen sich mit dem ‘Ribosome Display’ Bibliotheken mit bis zu 10^{14} Mitgliedern bearbeiten. Um einen vergleichbaren Sequenzraum mit den herkömmlichen Systeme abzudecken, müßten anstelle von einer mindestens 100.000 Selektionen durchgeführt werden.

Bei dem parallel zum ‘Ribosome Display’ entwickelten und bereits in Kapitel 1.3.3.1 beschriebenen ‘mRNA Display’ handelt es sich ebenfalls um ein reines *in vitro* Selektionssystem, das auf der zellfreien Translation basiert. Prinzipiell können mit diesem System Bibliotheken mit vergleichbarer Größe zum ‘Ribosome Display’ bearbeitet werden. Dem Namen nach werden beim ‘mRNA Display’ die Mitglieder der Proteinbibliothek von den kodierenden mRNAs präsentiert. Dies wird durch kovalente Verknüpfung von mRNA und Protein mittels Puromycin, welches vor der Translation über einen Linker an das 3‘-Ende der mRNA angefügt wird, erreicht. Die Vorteile dieses Ansatzes gegenüber dem ‘Ribosome Display’ dürften einerseits in der größeren Stabilität von den zur Selektion verwendeten mRNA-Protein-Fusionsmolekülen liegen, was einen größeren Spielraum bei den Selektionsbedingungen mit sich bringt. Andererseits sollte es möglich sein, das Prinzip der linkergekoppelten Reaktanden (Jäschke, 1998), welches zur direkten Selektion von Ribozymen entwickelt wurde, auf diesen Ansatz zu übertragen. Damit wäre es dann in Verbindung mit den variableren Selektionsbedingungen möglich, Enzyme zu verbessern oder sogar neue zu selektieren. Beruht das Selektionsziel jedoch auf einer Bindungseigenschaft, so ist das ‘Ribosome Display’ prädestiniert, da die Durchführung weniger aufwendig und demzufolge wesentlich schneller ist. Die etwaigen Vorteile des ‘mRNA Display’ bei komplexeren Selektionsstrategien kommen hier nicht zum Tragen, weil eine Reihe von zeitintensiven Arbeitsschritten zu Verlusten führen und somit die Bibliothek einschränken. Die kritische Phase der Selektion umfaßt den Zeitraum zwischen dem Beginn der Translation und der Elution der mRNA. Dieser Vorgang kann beim ‘Ribosome Display’ innerhalb von etwa 30 min stattfinden und trägt damit ein Bruchteil vom ‘mRNA Display’, wo alleine die Translation schon 30 min dauert. Zudem ist beim ‘mRNA Display’ im Gegensatz zum ‘Ribosome Display’ die Isolierung der mRNA durch Zugabe von EDTA nicht möglich, sondern sie muß mit einem spezifischen Kompetitor oder freiem Liganden eluiert werden. Dies kann einerseits bei hochaffinen Bindern Probleme bereiten und andererseits erhebliche Kosten verursachen.

5.1.1 Etablierung des ‘Ribosome Display’

Die bereits in Kapitel 1.3.2 ausführlich beschriebene Methode des ‘Ribosome Display’ setzt sich aus einer Reihe von Einzelreaktionen zusammen, die gemeinsam einen Zyklus ergeben.

Bei der Etablierung der Einzelreaktionen bereitete die Bildung der PRM-Komplexe und deren Isolierung die größten Schwierigkeiten. Durch die verwendete Methode der Ultrazentrifugation konnte lediglich festgestellt werden, welcher Anteil des synthetisierten Proteins mit dem Ribosom assoziiert ist, da die mRNA in jedem Fall auf das Sediment entfällt. Die Ultrazentrifugation ermöglichte zu Beginn eine grobe Annäherung an das System und erbrachte die erforderlichen Bedingungen. Aufschlußreicher wäre sicherlich, die mRNA während einer Affinitätschromatographie mit PRM-Komplexen zu beobachten, da ihr Auftreten im Eluat, sofern ein Kontrollansatz nicht ein identisches Ergebnis liefert, neben einem vollständigen PRM-Komplex auch ein funktionales Protein erfordert. Bei der zur Abtrennung notwendigen proteinogenen Eigenschaft kann es sich im einfachsten Fall um ein Affinitätspeptid handeln. Da sich das Strep-tag II und die Affinitätsmatrix StrepTactin hervorragend zur Aufreinigung *in vitro* synthetisierter Proteine eignen (Lamla und Erdmann, 2002), wurde dieses System auch zur Abtrennung von PRM-Komplexen herangezogen. Nachdem sichergestellt war, daß die Affinitätschromatographie ohne Qualitätsverlust unter den veränderten Bedingungen (50 mM Mg^{2+} und 0-4°C) funktioniert, sollte die Isolierung der ternären Komplexe erfolgen. Verwendet wurde zuerst das Konstrukt pSEL2, bei dem sich das Strep-tag II in einer internen 'Loopstruktur' befand und anschließend das Konstrukt pFAlpp+NStII, bei dem sich das Affinitätspeptid am N-Terminus des FABP befand und somit das gesamte Protein als 'Spacer' fungierte. In beiden Fällen war es nicht möglich PRM-Komplexe abzutrennen, obwohl eine hinreichende Zugänglichkeit des Strep-tag II gewährleistet war. Die mit Puromycin aus PRM-Komplexen freigesetzten Proteine konnten dagegen an die Affinitätsmatrix binden und von ihr eluiert werden. Das synthetisierte Protein ist also in der Lage an StrepTactin zu binden, aber die Bindungsaffinität scheint nicht auszureichen, um neben dem Protein auch das Ribosom und die mRNA abzutrennen. Der K_d für die Bindung zwischen dem Strep-tag II und StrepTactin beträgt etwa 1 μ M (Voss und Skerra, 1997) und damit handelt es sich im Vergleich zu den üblichen Bindungsaffinitäten zwischen Proteinen (Protease-Inhibitor $K_a = 10^{10}$ - 10^{13} ; Rezeptor-Ligand $K_a = 10^9$ - 10^{12} ; Antikörper-Antigen $K_a = 10^7$ - 10^{11}) um einen vergleichbar schwachen Binder. Diese geringe Bindungsaffinität ist für die Aufreinigung von Proteinen, deren Molekulargewicht typischerweise 40-50 kDa beträgt und nur selten 100 kDa überschreitet, ausreichend. Das Molekulargewicht der PRM-Komplexe beträgt etwa 2.700 kDa, wofür hauptsächlich das Ribosom mit seinen ca. 2.500 kDa verantwortlich ist, aber auch die mRNA (500-mer) mit ihren etwa 170 kDa nicht zu unterschätzen ist. Das für die Selektion so wichtige Protein mit seinen nicht einmal 20 kDa macht weniger als 1% der Masse des PRM-Komplexes aus und

kann bei einer solchen Betrachtung vernachlässigt werden. Die Gestalt eines PRM-Komplexes mit näherungsweise realen Größenverhältnissen ist schematisch in Abbildung 59 dargestellt.

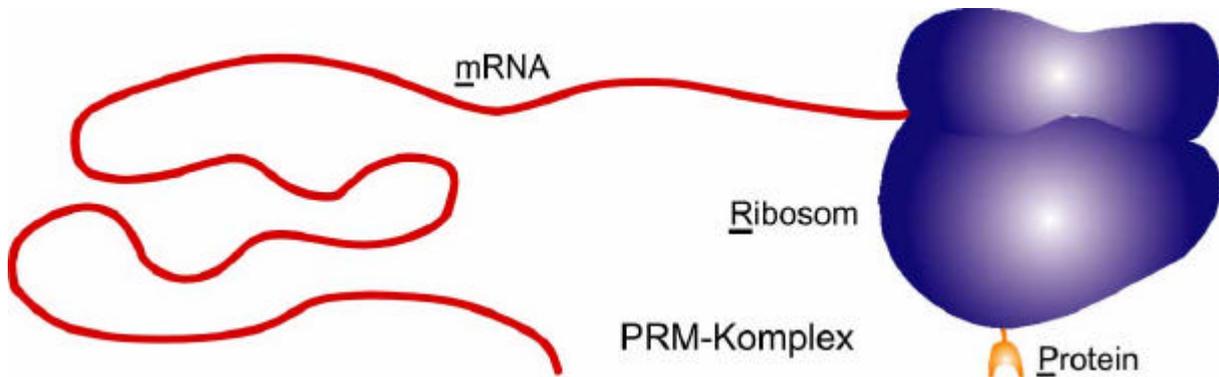


Abb. 59 Etwaige Größenverhältnisse beim PRM-Komplex. Der Komplex hat ein Molekulargewicht von etwa 2.700 kDa, wobei auf das Ribosom 2.500 kDa, auf die mRNA (500-mer) 170 kDa und auf das Protein weniger als 20 kDa entfallen.

Die Abtrennung der PRM-Komplexe wird zusätzlich durch die Verwendung einer Affinitätsäule erschwert, da die Chromatographie in diesem Fall unter Gravitationsfluß durchgeführt werden muß. Es handelt sich also um außergewöhnliche Anforderungen, die an das zur Isolierung der ternären Komplexe herangezogene Affinitätssystem gestellt werden. Dies erklärt, warum bei allen anderen bisher publizierten Selektionen bzw. Modellsystemen die Chromatographie im 'Batch' stattfand und überwiegend Antikörper mit Dissoziationskonstanten $\leq 10^{-9}$ M verwendet wurden (Hanes und Plückthun, 1997; He und Taussig, 1997; Irving *et al.*, 2001)

Da der grundsätzliche Ansatz nicht vollständig verworfen werden sollte, wurde anstelle des Strep-tag II ein Hexahistidin-tag (His-tag) am N-Terminus des FABP eingeführt. Der K_d -Wert für die Bindung eines Hexahistidinpeptids an eine Ni^{2+} -NTA Matrix beträgt etwa 10^{-8} M und von Proteinen mit His-tag etwa 10^{-7} M (Nieba *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis spiegelt den Einfluß eines gewöhnlichen Proteins auf die Bindungsstärke, die um den Faktor zehn abnimmt, wider. In diesem Zusammenhang wird deutlich, welchen Einfluß der PRM-Komplex mit der ungefähr hundertfachen Masse eines mittleren Proteins auf die Bindungseigenschaften eines Affinitätspeptids haben muß und warum der Strep-tag II gescheitert ist. Aufgrund der sehr dichten NTA-Beschichtung der verwendeten Matrices, kann es nach der Dissoziation zur erneuten Bindung kommen. Aus diesem Grund sind in der Literatur K_d -Werte für die Bindung von Proteinen mit His-tag an eine Ni^{2+} -NTA Matrix von bis zu 10^{-13} M zu finden (Komissarov *et al.*, 1996). Nachdem auch für die His-tag Affinitätschromatographie kein Qualitätsverlust unter den veränderten Bedingungen (50 mM Mg^{2+} und 0-4°C)

festgestellt werden konnte, sollte ausgehend vom Konstrukt pFAlpp+NH_{is}, das ein FABP mit N-terminalem His-tag kodiert, die Isolierung der ternären Komplexe erfolgen. Durch Verwendung des His-tag ließ sich nicht nur spezifisch die für den His-tag kodierende mRNA isolieren, sondern auch das Ribosom, was anhand der ribosomalen RNAs verfolgt werden konnte. Damit war neben der Entstehung auch die Isolierung der PRM-Komplexe sichergestellt. Mit diesem System war es nun möglich die Methode hinsichtlich der Menge eluierbarer mRNA bzw. PRM-Komplexe zu optimieren. Eine Selektionsmethode basiert auf dem Zusammenspiel der Einzelreaktionen, so daß das System eine Vielzahl von Selektionszyklen durchlaufen kann. Nur eine nicht richtig funktionierende Reaktion reicht aus, um die Bibliothek stark einzuschränken und die Selektion schon nach wenigen Zyklen in die Sackgasse zu führen. Aus diesem Grund wurden Testselektionen durchgeführt, die zur Abstimmung und Optimierung der Einzelreaktionen dienten und neben der Stabilität auch das Potential des Systems zur Selektion von Proteinen sicherstellen sollten. Bei den Testselektionen ergab sich pro Runde ein Anreicherungsfaktor von etwa 30. Aus anderen Testsystemen sind Anreicherungsfaktoren von 100 beim 'Ribosome Display' (Hanes und Plückthun, 1997) und 200 beim 'mRNA Display' (Roberts und Ja, 1999) bekannt. Der deutlich niedrigere Anreicherungsfaktor ist mit größter Wahrscheinlichkeit auf den Gravitationsfluß während der Affinitätschromatographie zurückzuführen. Ein weiterer Grund könnte in dem verwendeten Affinitätssystem liegen, welches unter Umständen einem Antikörper-Antigen System unterlegen ist.

Die Sequenzanalyse von zehn Klonen der 1:10⁸ Testselektion ergab nach 365 PCR-Zyklen durchschnittlich 7,7 Mutationen. Da pro PCR-Zyklus 482 Nukleotide eingebaut werden mußten entspricht dies einer Mutationsrate von 1/23.000 oder $4,3 \times 10^{-5}$. Die Fehlerrate der *Taq* Polymerase ist die höchste aller bekannter thermostabiler DNA Polymerasen und bewegt sich je nach Reaktionsbedingungen im Bereich von 1×10^{-5} bis 2×10^{-4} pro Nukleotid (Keohavong und Thilly, 1989; Eckert und Kunkel, 1990; Eckert und Kunkel, 1991; Ling *et al.*, 1991). Der sich daraus ergebende Durchschnittswert beträgt 1/22.500 oder $4,4 \times 10^{-5}$, so daß im Verlauf einer PCR mit 20-25 Zyklen die kumulative Fehlerrate bei etwa 10^{-3} pro Nukleotid liegt (Cadwell und Joyce, 1994). Damit liegt die Mutationsrate während der Testselektion im Bereich des erwarteten Durchschnittswertes.

5.2 Konstruktion der DNA-Bibliotheken

Die konstruierten und später für die Selektion verwendeten Bibliotheken basieren auf den kodierenden Bereichen des Chymotrypsin-Inhibitors 2 (CI2) aus dem Gerstenkorn (McPhalen

und James, 1987) und des fettsäurebindenden Proteins (FABP) aus dem Rinderherz (Billich *et al.*, 1988).

Der Chymotrypsin-Inhibitor wurde aufgrund seiner gut zugänglichen ‘Loopstruktur’, welche die Aminosäuren 54-64 umfaßt (Shaw *et al.*, 1995), ausgewählt. Die biologische Aufgabe dieser ‘Loopstruktur’ besteht in der Bindung am aktiven Zentrum des Chymotrypsins, einer Serinprotease im Dünndarm und dient dem Schutz vor ungewollter Proteolyse. Die ‘Loopstruktur’ erfüllt zwei grundsätzliche Kriterien. Sie ist wie bereits in Abbildung 30 gezeigt, durch die exponierte Lage gut zugänglich und an keiner Ausbildung einer Sekundärstruktur beteiligt. Auch die Vergrößerung der ‘Loopstruktur’ auf insgesamt 17 Aminosäuren unter Einbringung eines Strep-tag II wurden von der Proteinstruktur toleriert und ermöglichte die Aufreinigung des Proteins durch eine Strep-tag Affinitätschromatographie (Kapitel 4.1.3). Damit die auf dem CI2 basierende Bibliothek letztlich 16 randomisierte Aminosäuren kodiert, mußte der ‘Loop’ auf insgesamt 21 Aminosäuren vergrößert werden. Das zur Generierung der Bibliothek verwendete Konstrukt wurde ausgehend vom Plasmid pSEL2 (Kapitel 4.1.1.1, Abb. 14) erzeugt. Das Konstrukt muß alle für das ‘Ribosome Display’ benötigten Elemente enthalten (Kapitel 1.3.2.2, Abb. 5) und so klein wie möglich sein. Die Größe ist relevant, da angefangen bei der Transkription, über die Translation, hin zur reversen Transkription und vor allem die PCR kleiner Konstrukte in der Regel weniger problematisch und damit im Rahmen eines zyklischen Prozesses vorteilhaft ist. Zum einen wurde der FABP-Anteil des pSEL2 entfernt und durch einen kleinen Linker ersetzt und zum anderen mußte der Strep-tag II entfernt werden, bevor dieses Konstrukt als Basis für eine Bibliothek dienen konnte. Das besagte Ziel der Selektion bestand in der Auffindung streptavidinbindender Peptide und deshalb durfte keinesfalls bei der Erstellung der Bibliothek ein Streptavidin Bindungspeptid, wie der Strep-tag II, eingeschleust werden. Der für den Strep-tag II kodierende Bereich wurde durch einen für 16 Aminosäuren kodierenden Bereich ersetzt. Dieser Bereich umfaßte den C-tag, der beidseitig von je zwei als Linker fungierenden Aminosäuren eingeschlossen wurde. Diese Sequenz wurde lediglich wegen ihrer Größe ausgewählt, da der im weiteren Verlauf einzuführende randomisierte Bereich ebenfalls aus 16 Aminosäuren besteht. Das erhaltene Plasmid mit der Bezeichnung pSEL4 (Kapitel 4.2.1.1, Abb. 32) diente als Basis zur Erzeugung einer Bibliothek.

Das FABP wurde wegen seiner ebenfalls geringen Größe von nur 133 Aminosäuren und seiner relativ großen Stabilität verbunden mit hohen Syntheseausbeuten im zellfreien Translationssystem, ausgewählt (Lamla und Erdmann, 2002). Das Ziel der Selektion bestand letztlich in der Generierung eines Affinitätspeptids, das später bei der Aufreinigung rekombi-

nanter Proteine Verwendung finden sollte. Die vier N-terminalen Aminosäuren, die ebenfalls an keiner Sekundärstruktur beteiligt sind, bzw. der für sie kodierende Bereich wurde deswegen durch einen randomisierten Bereich ersetzt, der 15 Aminosäuren kodiert. Ausgehend vom Plasmid pFAlpp (Kapitel 4.1.1.1, Abb. 14) mußte der für die zehn C-terminalen Aminosäuren kodierende Bereich bis auf das Stopcodon wiederhergestellt werden, da das FABP im Gegensatz zur Testselektion, wo es nur die Funktion eines ‘Spacers’ hatte, seine native Konformation ausbilden sollte. Gleichzeitig konnte der für das ‘Ribosome Display’ notwendige ‘Spacer’ in Form eines (Gly₄Ser)₄ kodierenden Linkers zwischen den FABP- und Lipoproteinterminator kodierenden Bereich eingefügt werden. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pFALinklpp (Kapitel 4.2.1.2, Abb. 33) diente zur Erzeugung einer weiteren Bibliothek.

Sowohl das Plasmid pSEL4 als auch pFALinklpp lieferten bei Verwendung als Matrize in einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions-, Translationsreaktion etwa 90% lösliches Produkt. Dabei handelt es sich um einen sehr überzeugenden Nachweis dafür, daß die Proteine in ihrer nativen Struktur vorliegen. Trotz des angefügten ‘Spacers’ und Lipoproteinterminators scheinen sich die Proteine richtig zu falten, was einen negativen Einfluß dieser Elemente auf die Faltung ausschließen läßt. Dies ist eine fundamentale Voraussetzung für die Selektion, bei der dieser zusätzliche Bereich des Proteins weitestgehend mit dem Ribosom assoziiert vorliegt.

Die Einführung der randomisierten Bereiche erfolgte auf DNA-Ebene. Dabei handelte es sich im Fall von SELx um 16 randomisierte Codons (NNS)₁₆ und im Fall von FAX um 15 (NNS)₁₅, wobei N eine Mischung von G, A, T, und C und S eine Mischung von G und C ist. NNS kodiert alle 20 Aminosäuren, aber die Beschränkung der dritten Position auf G und C bringt nur ein Stopcodon mit sich. Dadurch verringert sich die Frequenz mit der Stopcodons auftreten (Tabelle 24, LaBean und Kaufmann, 1993).

Tabelle 24: Stopfrequenzen randomisierter Codons

| Codons | Anzahl der Codons | Stopcodons | Stopfrequenz pro Codon | Länge eines Peptids, daß mit 50% Wahrscheinlichkeit ein Stopcodon enthält |
|--------|-------------------|------------|------------------------|---|
| NNN | 64 | 3 | (3/64) = 4,7% | 15 Aminosäuren |
| NNS | 32 | 1 | (1/32) = 3,1% | 22 Aminosäuren |

Die den randomisierten Bereich enthaltenen und über die benötigten Restriktionsschnittstellen verfügenden Oligonukleotide mußten zuerst um den Komplementärstrang ergänzt werden, damit sie nach dem Restriktionsverdau in das gleichermaßen verdaute Plasmid ligiert werden

konnten. Da in Anschluß an die Ligation keine Transformation folgen konnte, andernfalls wäre der Vorteil des *in vitro* Systems verloren gegangen und die letztlich erhaltenen Bibliotheken mehrere Zehnerpotenzen kleiner gewesen, war eine Dephosphorylierung der verdauten Plasmide nicht möglich. Aufgrund dieser Tatsache entstanden bei der Ligation neben dem gewünschten Produkt eine Reihe von Nebenprodukten, was eine anschließende Abtrennung des „richtigen Ligationsproduktes“ unumgänglich machte. In diesem Fall bestand die Möglichkeit der Elektroelution, d.h. das Ligationsprodukt mit der passenden Größe konnte nach Auftrennung durch Agarosegel-Elektrophorese nahezu verlustfrei aus dem Gelstück eluiert werden. Die doch erheblichen Verlust von etwa 70%, die bei der Elution der geschnittenen Plasmide und der Inserts aus Agarosegelen mit Phenol aufgetreten sind, hätten durch die Elektroelution minimiert werden können, bzw. die Isolation und der anschließende Verdau von fast 50 mg Plasmid im Fall von FAX wären nicht nötig gewesen. Die sehr geringen Verluste bei Verwendung der Elektroelution helfen Arbeitszeit und Kosten zu sparen, da im Vergleich zur klassischen Methode mit Phenol nur etwa ein Drittel der herkömmlichen Menge an Plasmid isoliert und verdaut werden muß. Dies prädestiniert diese Methode zur Elution größerer Mengen DNA aus Agarosegelen.

Nach Einführung der Inserts mit den randomisierten Bereichen in die Plasmide pSEL4 und pFALinklpp entstanden die Plasmide pSELx bzw. pFAX, deren Summe die jeweilige Bibliothek darstellt. Wie bereits erwähnt, mußte aufgrund der vielen erhaltenen Ligationsprodukte der gesamte Ansatz nach der Ligation mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Hind* III verdaut und durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt werden. Die den randomisierten Bereich enthaltenen DNA-Fragmente einer Größe wurden aus dem Gel eluiert und ergaben bei einer *in vitro* Transkription die Produkte mit der erwarteten Größe. Diese DNA-Fragmente stellen letztlich die Bibliothek SELx und FAX mit etwa 10^{14} verschiedenen Molekülen dar. Anschließende Sequenzanalysen ergaben, daß aufgrund des randomisierten Bereiches oder einer Verschiebung des Leserahmens etwa ein Drittel aller Mitglieder der Bibliotheken ein Stopcodon aufwiesen und damit für das ‘Ribosome Display’ ungeeignet sind. Die Bibliotheken verkleinerten sich dadurch auf ca. 7×10^{13} funktionale Sequenzen.

5.3 Selektion streptavidinbindender Peptide

Die Selektion streptavidinbindender Peptide wurde mit den in dieser Arbeit hergestellten DNA-Bibliotheken SELx und FAX sowie an Sepharose gekoppeltem Streptavidin durchgeführt. Zur Selektion der Peptide wurden nicht die gesamten Bibliotheken herangezogen, da sonst jedes Mitglied nur in etwa 36 Kopien vertreten gewesen wäre. Diese geringe

Molekülanzahl zu Beginn der Selektion hätte unter Umständen dazu führen können, daß Sequenzen unabhängig vom Selektionsdruck herausgefallen wären. Der Vorteil des größeren Sequenzraumes wäre damit hinfällig gewesen. Ausgehend von $1,8 \times 10^{13}$ DNA-Fragmenten der jeweiligen Bibliothek fand die erste *in vitro* Transkription statt, so daß die Selektion mit etwa $1,2 \times 10^{13}$ funktionale Molekülen, d.h. sie enthielten kein Stopcodon, erfolgte. Die erste *in vitro* Translation fand mit $3,6 \times 10^{15}$ Molekülen mRNA statt. Theoretisch war also jedes zur Transkription eingesetzte DNA-Molekül der Bibliothek in Form von mRNA in 200 Kopien vertreten.

Der Verlauf der Selektion mit SELx und FAX ist in den Abbildungen 43 (Kapitel 4.3.1) bzw. 46 (Kapitel 4.3.2) dargestellt. Ab der dritten Selektionsrunde wurde für die Affinitätschromatographie keine Säule mehr verwendet, sondern auf ein 'Batchverfahren' umgestellt. Die Gründe dafür sind, wie in Kapitel 5.1.1 erläutert, im Gravitationsfluß der Säulenchromatographie zu sehen. Es war nicht klar, ob es in dem zur Verfügung stehenden Sequenzbereich von 15 Aminosäuren überhaupt bessere Streptavidin Bindungspeptide als die beiden bekannten Strep-tags gibt. Falls es jedoch bessere Bindungspeptide geben sollte, war ungewiß, ob sie aus der Selektion hervorgehen würden. Aus diesen Gründen wurde sicherheitshalber auf das 'Batchverfahren' umgestellt, wodurch die Selektion schwächerer Binder ($K_d \geq 1 \mu\text{M}$) ermöglicht und damit der Selektionserfolg gewährleistet werden sollte. Weiterhin fand ab der dritten Runde erstmals eine sogenannte Vorsäule Verwendung. Es handelt sich dabei im klassischen Fall um eine Säule, die nur mit dem Trägermaterial Sepharose 4B gefüllt ist. Die zur Selektion bereitstehenden Moleküle werden vor der eigentlichen Affinitätschromatographie der Vorsäule zugeführt, wobei die an das Trägermaterial bindenden Moleküle abgetrennt werden sollten. Anstelle einer Säulenchromatographie fand diese Prozedur ebenfalls im 'Batch' statt. Die Elution der mRNA erfolgte im Gegensatz zu anderen Selektionen mit Streptavidin ganz bewußt nicht mit Biotin, sondern durch Dissoziation der ribosomalen Komplexe mit EDTA. Dadurch stand die gesamte zugängliche Oberfläche des Streptavidins für eine mögliche Bindung zur Verfügung, wohingegen die Elution mit Biotin die mögliche Bindung von vornherein auf die Biotin-Bindungstasche begrenzt hätte.

Die Selektionen wurden im Fall von SELx nach dem zehnten Zyklus und im Fall von FAX nach dem siebten Zyklus gestoppt, als sich die Menge eluierbarer mRNA nicht weiter steigern ließ. Es folgten Kontrollversuche, die sicherstellen sollten, daß es sich bei den selektierten Molekülen um spezifische Streptavidinbinder handelt. Die Ergebnisse dieser Kontrollen sind in Abbildung 60 dargestellt.

Es wurde überprüft inwieweit es sich bei den selektierten Molekülen um spezifische Streptavidinbinder handelt. Trotz Verwendung einer „Vorsäule“ ist die Selektion von sogenannten Säulenbindern, d.h. Molekülen die am Trägermaterial binden nicht völlig auszuschließen. Die letzte Selektionsrunde wurde dazu wiederholt und anstelle von Streptavidin-Sepharose lediglich die Sepharosematrix verwendet. Wie anhand der Abbildung 60 zu sehen ist, bleibt die Menge eluierbarer mRNA deutlich hinter der bei Verwendung von Streptavidin-Sepharose zurück. Es handelt sich bei den selektierten Molekülen um keine Säulenbinder.

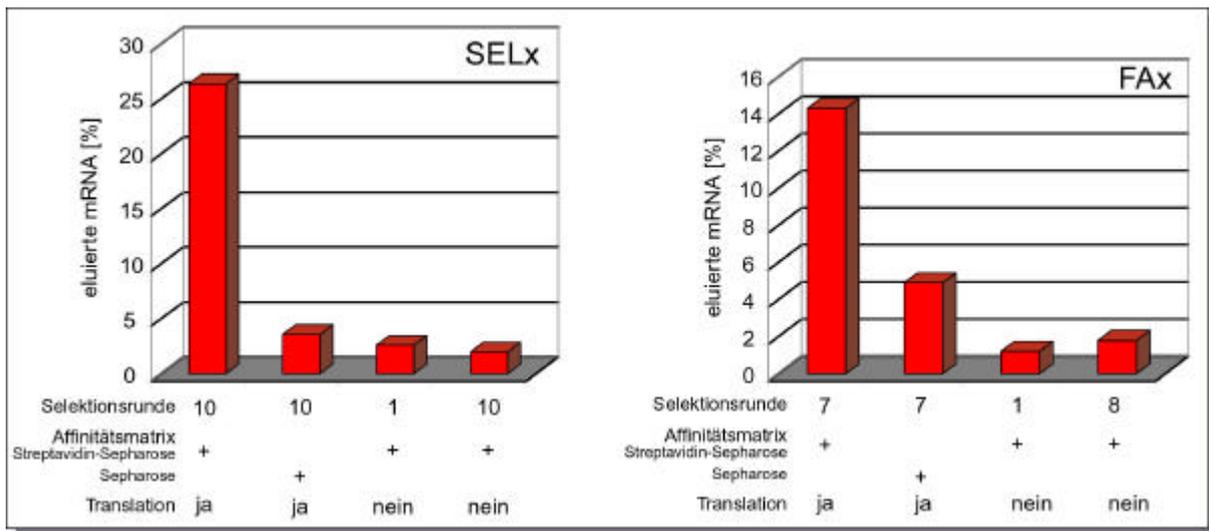


Abb. 60 Kontrollversuche mit den selektierten Molekülen

Weiterhin mußte sichergestellt werden, ob die mRNA alleine in der Lage ist an die Affinitätsmatrix zu binden und es sich somit bei den selektierten Molekülen um Aptamere handelt. Zu diesem Zweck erfolgten Selektionsrunden ohne Translation mit der mRNA der ersten und der letzten Runde. In beiden Fällen und für beide Bibliotheken war keine Bindung der mRNA festzustellen und damit ist auszuschließen, daß es sich bei den selektierten Molekülen um Aptamere handelt.

5.4 Charakterisierung der selektierten Moleküle

Die PCR-Produkte der zehnten Runde im Fall von SELx und der siebten Runde im Fall von FAX wurden kloniert und sequenziert.

Die Sequenzanalyse ergab für SELx nur fünf Peptide, wobei 57% aller Sequenzen auf das Peptid 1 (Kapitel 4.4.1, Abb. 47) entfallen. Zusammen mit dem Peptid 2 und 3 stellen diese drei Peptide etwa 86% aller Sequenzen. Die selektierten Peptide zeigen keine Übereinstimmung mit der Ausgangssequenz (Abb. 47), aber die Suche in der Datenbank (SWISS-PROT und TrEMBL) lieferte Übereinstimmungen von 80 bis 100% mit vermeintlichen Membran-

proteinen, deren Aufgabe vermutlich in der Aufnahme von Zuckern bei *E. coli* besteht. Für die Peptide war weder die Bestimmung von Bindungskonstanten möglich noch konnten sie an Streptavidin-Sepharose gebunden und aufgereinigt werden. Die Anreicherung ist wahrscheinlich auf eine unspezifische Bindung an Streptavidin aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zurückzuführen. Dies würde auch erklären, warum es sich bei den selektierten Peptiden ausschließlich um vermeintliche Membranproteine zu handeln scheint.

Die Sequenzierung ergab im Fall von FAX eine Reihe unterschiedlicher Peptide (Kapitel 4.4.2, Abb. 48), wobei fünf Peptide mehr als einmal vorkamen und somit für weitere Charakterisierungen herangezogen wurden. Nahezu 50% aller Peptide enthalten ein HPQ-Motiv, das als Zentralmotiv aus allen bisher durchgeführten Selektionen mit Streptavidin hervorgegangen ist. Bei diesem Motiv scheint es sich um die naheliegendste Lösung der Aufgabe, die in der Bindung an Streptavidin besteht, zu handeln. Eine weitere Gruppe von Peptiden wies am N-Terminus eine DVEAW-Sequenz auf und ist in mehr als 30% aller sequenzierten Klone vorhanden. Es könnte sich dabei unter Umständen um ein neues Motiv handeln. Die Bindungskonstanten lagen für die Peptide mit einem HPQ-Motiv wie erwartet im unteren mikromolaren Bereich. Die Peptide mit dem N-terminalen DVEAW-Motiv hingegen wiesen K_d -Werte im nanomolaren Bereich auf.

Bis auf das FAX-Peptid 5, das weder ein HPQ- noch ein DVEAW-Motiv enthält, lassen sich die am N-Terminus des FABP befindlichen Peptide 1-4 zur affinitätschromatographischen Aufreinigung heranziehen (Kapitel 4.5.2, Abb. 57). Erwartungsgemäß gelingt die Elution der Peptide mit HPQ-Motiv durch die Zugabe von Biotin. Interessanterweise können aber auch die Peptide mit DVEAW-Motiv durch Biotin vom Streptavidin eluiert werden. Obwohl während der Selektion ganz bewußt auf Biotin zur Elution verzichtet wurde, scheint die Biotin-Bindungstasche für die Bindung von Peptiden prädestiniert zu sein. Ein positiver Nebeneffekt besteht in der Verwertbarkeit der selektierten Peptide. Ihre Nutzung als Affinitätspeptide zur Aufreinigung rekombinanter Proteine wird durch die mögliche Elution mit Biotin erst praktikabel. Das FAX-Peptid 3 wies nicht nur den niedrigsten K_d -Wert aller selektierten Peptide auf, sondern zeigt auch den geringsten Einfluß auf die zellfreie Proteinbiosynthese. Zudem besitzt es kein HPQ-Motiv, d.h. es handelt sich um ein bisher unbekanntes streptavidinbindendes Peptid. Diese Eigenschaften machen das Peptid mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET besonders interessant und es wurde zur Aufreinigung vom FABP, an dessen N-Terminus es sich befand, herangezogen. Verwendet wurden Minisäulen, die mit Streptavidin- bzw. StrepTactin-Sepharose gefüllt waren. Die Affinitätschromatographie erfolgte unter den in Kapitel 3.11.1 beschriebenen Bedingungen, wobei der

Elutionspuffer für die Streptavidinsäule 2 mM Biotin anstelle der 2,5 mM Desthiobiotin enthielt. Beide Aufreinigungen führten zu einem sehr reinen Protein (Kapitel 4.5.3, Abb. 58), so daß sich dieses Peptid bereits in diesem Stadium auch ohne weitere Optimierung als Affinitätspeptid eignet.

Anhand der durchgeführten Sequenzierung wurde auch überprüft, wieviele Mutationen sich während der 215 PCR-Zyklen eingeschlichen haben. Als Basis dienten die auf den randomisierten Bereich folgenden 120 Nukleotide. Die Sequenzanalyse ergab durchschnittlich 1,6 Mutationen, was einer Mutationsrate von $1/16.000$ oder $6,2 \times 10^{-5}$ entspricht. Dieser Wert liegt zwar oberhalb des in Kapitel 5.1.1 aufgeführten Durchschnittswertes von $1/22.500$ oder $4,4 \times 10^{-5}$, aber noch deutlich in dem für *Taq* Polymerase üblichen Bereich von 1×10^{-5} bis 2×10^{-4} Fehlern pro Nukleotid.

5.5 Einfluß der verwendeten Bibliothek

Alle bisher durchgeführten Selektionsexperimente mit Streptavidin ergaben Peptide mit einem HPQ-Motiv (Kap. 1.4.1). Die Selektion eines streptavidinbindenden Peptids, das nicht auf einem HPQ-Motiv basiert, gelang erstmals im Rahmen dieser Arbeit. Die naheliegendste Erklärung liegt in der verwendeten Bibliothek, die aus einem randomisierten 15-mer Peptid bestand und $1,2 \times 10^{13}$ funktionale Peptide enthielt. Es sind 3×10^{19} unterschiedliche 15-mer Peptide möglich, so daß auch die verwendete Bibliothek nur einen winzigen Bruchteil des möglichen Sequenzraumes abdecken konnte. Im Vergleich zu dem von Devlin *et al.* (1990) durchgeführten 'Phage Display' Ansatz mit 2×10^7 15-mer Peptiden, ist der bearbeitete Sequenzraum jedoch sechs Zehnerpotenzen größer und damit wiederum sehr beachtlich. Mit anderen Worten müßte der 'Phage Display' Ansatz 1.000.000 mal durchgeführt werden, um einen vergleichbaren Sequenzraum abzudecken. Die bei den *in vitro* Ansätzen hinzukommende Diversifikation durch die PCR ist bei dieser Betrachtung noch nicht berücksichtigt worden. Bei einem weiteren 'Phage Display' Ansatz mit 10^8 38-mer Peptiden (Kay *et al.*, 1993) war zwar die Bibliothek etwas größer, aber der abgedeckte Sequenzraum aufgrund des längeren Peptids viel geringer. Auch der erste *in vitro* Ansatz, der von Wilson *et al.* (2001) mit 7×10^{12} 88-mer Peptiden basierend auf dem 'mRNA Display' durchgeführt wurde, lieferte im wesentlichen Peptide mit HPQ-Motiv. Dieser Ansatz führte erstmals zu einem streptavidinbindenden Peptid, dessen Bindungskonstante nicht im mikro-, sondern im unteren nanomolaren Bereich lag. Allerdings ist dieses Peptid mit einer Länge von 38 Aminosäuren (Keefe *et al.*, 2001) als Affinitätspeptid eher ungeeignet.

Der Vergleich mit den anderen Selektionsexperimenten zeigt, daß die Größe der verwendeten Bibliothek in Verbindung mit der Länge des randomisierten Peptids zu sehen ist. Erst der sich daraus ergebende Bruchteil des erfaßbaren Sequenzraumes lassen eine qualitative Bewertung der Bibliothek zu. Die in dieser Arbeit verwendete Bibliothek mit $1,2 \times 10^{13}$ funktionalen 15-mer Peptiden stellt die größte Bibliothek dar, die bisher zur Selektion von streptavidinbindenden Peptiden verwendet wurde. Hinzu kommt die Länge des randomisierten Peptids, das mit 15 Aminosäuren in der Lage ist, eine Bindungseigenschaft auszubilden und darüber hinaus den möglichen Sequenzraum wenigstens im Ansatz greifbar macht. Diese Kombination, in Verbindung mit den weiteren Vorteilen eines *in vitro* Selektionssystems, ist möglicherweise für die Auffindung der bisher im Sequenzraum verborgenen Streptavidin Bindungspeptide, die ohne HPQ-Motiv auskommen, verantwortlich.

5.6 Ausblick

In erster Linie gilt es das aus der Selektion hervorgegangene, neuartige Streptavidin Bindungspeptid mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET (FAx-Peptid 3), welches kein HPQ-Motiv besitzt und einen K_d -Wert im nanomolaren Bereich aufweist, zu optimieren. Primäres Ziel der Optimierung ist die Identifizierung des sogenannten Minimalmotivs, also des kürzesten möglichen Peptids mit den nahezu gleichen Eigenschaften. Das sekundäre Ziel der Optimierung besteht in dem Versuch, die Bindungseigenschaften des Peptids durch Substitution von Aminosäuren zu verbessern. Letztlich soll ein universelles Affinitätspeptid erhalten werden, dessen breite Anwendung bei der Aufreinigung und dem Nachweis von Proteinen möglich ist.

Eine Substitutionsanalyse soll Aufschluß über das etwaige Minimalmotiv sowie die essentiellen Aminosäuren hinsichtlich der Bindung an Streptavidin geben. Bei einer solchen Substitutionsanalyse werden 15-mer Peptide durch 'Spot-Synthese' an einer Membran kovalent verknüpft und jeweils eine Position durch die übrigen 19 L-Aminosäuren ersetzt. Diese Membran kann anschließend mit einem Streptavidinkonjugat inkubiert und das dem Markermolekül zugrundeliegende Signal analysiert werden. Bleibt das erhaltene Signal im Vergleich zum Wildtyp unverändert, so ist die Position für die Bindung bedeutungslos. Die Substitution einer essentiellen Position hingegen wird durch ein fehlendes Signal angezeigt. In Anschluß daran sollen aufgrund der erhaltenen Informationen unterschiedlich substituierte Peptide getestet, d.h. ihre Bindungskonstanten bestimmt werden. Wenn möglich, soll durch Kombination verschiedener Substitutionen das optimale Peptid erhalten und im weiteren Verlauf zur Aufreinigung rekombinanter Proteine verwendet werden.