

Zusammenfassung

Das überaus große Interesse an der Identifikation von Protein-Protein Wechselwirkungen gipfelte bereits Mitte der 80er Jahre mit dem 'Phage Display' in einem ersten Selektionssystem. Die Anfang der 90er Jahre aufkommende Methode zur *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren, welche die schnelle Generierung von Aptameren und Ribozymen ermöglicht, verdeutlichte die enormen Vorteile und Möglichkeiten eines *in vitro* Systems, die von den zur Verfügung stehenden Bibliotheken mit bis zu 10^{16} verschiedenen Molekülen herrühren. Da Proteine im Gegensatz zu Nukleinsäuren eine größere Palette an strukturellen und katalytischen Eigenschaften in der Biologie bereitstellen und wesentlich intensiver in der Diagnostik, Therapie und bei industriellen Applikationen verwendet werden, bestand großes Interesse in der Entwicklung von Methoden zur *in vitro* Selektion von Proteinen. Ein Ende der 90er Jahre entwickelter Ansatz ermöglicht die *in vitro* Selektion und Evolution von Proteinen durch Kopplung des Genotyps, in Form der mRNA, mit dem Phänotyp, in Form des Proteins und erhielt den Namen 'Ribosome Display'.

Diese Arbeit beschreibt die Selektion streptavidinbindender Peptide, sowie die Entwicklung der dafür benötigten Technologien. Streptavidin wurde als Zielmolekül ausgewählt, da eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen Streptavidinkonjugaten eine breite Anwendung in den Biowissenschaften finden. Basierend auf einem zellfreien, prokaryontischen Translations-system erfolgte die Etablierung des 'Ribosome Display' anhand eines Modellsystems, dessen Grundlage erstmals kein Antikörper, sondern ein His-tag, also ein einfaches Affinitätspeptid war. Es wurden zwei Nukleinsäure kodierte Peptidbibliotheken generiert, wobei der randomisierte Anteil in einem Fall aus 16 NNS-Codons besteht und die 'Loopstruktur' des Chymotrypsin-Inhibitors 2 aus dem Gerstenkorn kodiert. Die zweite Bibliothek umfaßt 15 NNS-Codons und kodiert den N-Terminus des fettsäurebindenden Proteins (FABP) aus Rinderherz. Aus der kombinatorischen FABP-Bibliothek konnten mit Hilfe des 'Ribosome Display' nach sieben *in vitro* Selektionsrunden streptavidinbindende Peptide isoliert werden. Klonierung und Sequenzierung ergaben eine Reihe unterschiedlicher Peptide, die sich im wesentlichen in zwei Gruppen unterteilen ließen. Bei der größeren Gruppe handelt es sich um Peptide mit einem HPQ-Motiv, das bereits aus anderen Arbeiten bekannt ist. Bei der anderen Gruppe handelt es sich um völlig neuartige Peptide, die am N-terminus ein DVEAW-Motiv aufweisen. Aus dieser Gruppe geht der beste Binder mit der Sequenz DVEAWLDERVPLVET und einem K_d -Wert von etwa 84 nM hervor, der sich zudem hervorragend als Affinitätspeptid zur Aufreinigung rekombinanter Proteine eignet.

Summary

The great interest in the identification of protein-protein interactions culminated in the first selection system which was phage display in the middle of the eighties. Beginning of the nineties a method for the *in vitro* selection of nucleic acids was introduced, which enables the rapid generation of aptamers and ribozymes and highlighted the enormous advantages and possibilities of an *in vitro* system stemming from the large initial libraries with up to 10^{16} different members. Because proteins in contrast to nucleic acids carry out a wider range of structural and catalytic roles in biology and are much more extensively used in diagnostic, therapeutic, and industrial applications, great interest has been generated in the development of methods for the *in vitro* selection of proteins. At the end of the nineties a method for the *in vitro* selection and evolution of proteins was developed and designated ribosome display.

This work describes the selection of streptavidin-binding peptides and the development of the required technologies. Streptavidin was chosen as target molecule, because a large number of commercial available streptavidin-conjugates is widely used in the field of life science. A cell-free, prokaryotic translation system was the basis for establishing the ribosome display technique and took place with help of a model system. For the first time such a model system was based on a simple affinity tag, namely His-tag and not an antibody. Two nucleic acid encoded peptide libraries had been generated. The random portion of the one library consisted of 16 NNS-codons and encodes the loopstructure of the chymotrypsin inhibitor 2 from barley seeds. The other library contained 15 NNS-codons and encodes the N-terminus of the fatty acid binding protein (FABP) from bovine heart. It was possible to isolate streptavidin-binding peptides from the combinatorial FABP-library after seven rounds of *in vitro* selection. Cloning and sequencing revealed a number of different peptides which could be divided in two groups. The larger group involves peptides with a HPQ-motif which is known from other selections. The other group involves totally new peptides with a DVEAW-motif at their N-terminus. Out of this group the best binder evolves with the sequence DVEAWLDERV-PLVET and a K_d value of about 84 nM. This peptide is outstandingly suitable as an affinity peptide for the purification of recombinant proteins.