

Isolierung von kleinen funktionalen Peptiden durch  
mRNA Display:  
Eine neue Klasse von  
Effektoren des humanen  $\alpha$ -Thrombins.

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn



Vorgelegt von  
Nikolai Raffler  
aus Augsburg

Bonn **2002**

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. Michael Famulok

2. Referent: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion:

1	Einleitung.....	1
1.1	Kombinatorische Chemie .....	1
1.2	In vitro Selektion .....	2
1.3	mRNA Display .....	5
1.3.1	Prinzip.....	5
1.3.2	Anwendung.....	8
1.4	Thrombin .....	10
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung .....	14
3	Ergebnisse und Diskussion.....	15
3.1	Selektion.....	15
3.1.1	Selektionsstrategie.....	15
3.1.2	Design der Bibliothek .....	17
3.1.3	Synthese der Bibliothek.....	24
3.1.4	Optimierung des Selektionszyklus.....	24
3.1.4.1	PCR .....	24
3.1.4.2	Transkription .....	25
3.1.4.3	Ligation .....	25
3.1.4.4	Translation .....	27
3.1.4.5	Affinitätschromatographie.....	29
3.1.4.6	Reverse Transkription .....	30
3.1.5	Vorbereitungen.....	31
3.1.5.1	Stabilität und Reinheit von Thrombin.....	31
3.1.5.2	Vorbereitung der Selektionsmatrix.....	32
3.1.5.3	RNase-Test .....	33
3.1.5.4	Codonanalyse der Startbibliothek.....	33
3.1.6	Durchführung der Selektion.....	35
3.1.6.1	Large Scale PCR.....	35
3.1.6.2	Large Scale Transkription.....	35
3.1.6.3	Large Scale Ligation.....	35
3.1.6.4	Large Scale Translation.....	35
3.1.6.5	Selektionsverlauf .....	36

3.1.6.6	Sequenzierung .....	37
3.1.6.7	Sequenzanalyse .....	39
3.2	Charakterisierung .....	41
3.2.1	Bindungsstudien .....	41
3.2.1.1	Synthese der Konstrukte .....	41
3.2.1.2	Relative Bindung .....	42
3.2.1.3	Kompetitionsstudien .....	43
3.2.2	Oberflächenplasmonresonanz .....	45
3.2.2.1	Bestimmung der Dissoziationskonstanten .....	45
3.2.2.2	Ermittlung des Bindungsepitops .....	48
3.2.3	SPOT-Analysen .....	50
3.2.3.1	Bestimmung des Minimalmotivs .....	50
3.2.3.2	Längenanalyse .....	53
3.2.3.3	Substitutionsanalyse .....	55
3.2.4	Funktionale Charakterisierung .....	57
3.2.4.1	Thrombinaktivität .....	57
3.2.4.2	Gerinnungsstudien .....	58
3.2.4.3	Aktivierung von Protein C .....	60
3.2.5	Strukturelle Untersuchungen .....	61
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	63
5	Material und Methoden .....	65
5.1	Material .....	65
5.1.1	Geräte .....	65
5.1.2	Chemikalien .....	66
5.1.3	Nukleotide und Radiochemikalien .....	68
5.1.4	Standards und Kits .....	68
5.1.5	Enzyme und Proteine .....	68
5.1.6	Säulenmaterial .....	69
5.1.7	Plasmide und Bakterienstämme .....	69
5.1.8	Oligonukleotide .....	70
5.1.9	Verbrauchsmaterial .....	71

5.1.10	Vorratslösungen.....	71
5.2	Methoden.....	74
5.2.1	Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren.....	74
5.2.1.1	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	74
5.2.1.2	Ethanolpräzipitation.....	74
5.2.1.3	Quantitative Nukleinsäure-Bestimmung.....	74
5.2.2	Gelelektrophorese.....	76
5.2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	76
5.2.2.2	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	76
5.2.2.3	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	77
5.2.2.4	Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen.....	78
5.2.2.5	Glycin-SDS-Gelelektrophorese.....	78
5.2.2.6	Tricin-SDS-Gelelektrophorese.....	79
5.2.2.7	Färbung von Proteingelen.....	81
5.2.3	Synthese von Oligonukleotiden.....	82
5.2.4	Peptidsynthese.....	83
5.2.5	Enzymatische Reaktionen.....	83
5.2.5.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	83
5.2.5.2	In vitro Transkription.....	84
5.2.5.3	Reverse Transkription.....	86
5.2.5.4	5'-Dephosphorylierung.....	87
5.2.5.5	5'-Phosphorylierung.....	88
5.2.5.6	3'-Markierung.....	88
5.2.5.7	RNase H Verdau.....	89
5.2.5.8	Alkalische Hydrolyse.....	89
5.2.5.9	RNase-Test.....	89
5.2.5.10	RNA-DNA-Ligation.....	89
5.2.5.11	Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA.....	90
5.2.5.12	Ligation von doppelsträngiger DNA.....	90
5.2.5.13	DNA-Sequenzierung.....	91
5.2.5.14	In vitro Translation.....	91

5.2.6	Chromatographie.....	92
5.2.6.1	Affinitätschromatographie mit Oligo dT Cellulose .....	92
5.2.6.2	Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose.....	93
5.2.6.3	Entsalzung über NAP-Säulen .....	95
5.2.6.4	Reinigung von Nukleinsäuren über Sephadex G-50 .....	96
5.2.7	Bakterienkulturen .....	96
5.2.7.1	Plattenkultur .....	96
5.2.7.2	Flüssigkultur .....	96
5.2.7.3	Glycerinkultur .....	97
5.2.7.4	Plasmidisolierung .....	97
5.2.7.5	Medien und Stocklösungen .....	97
5.2.7.6	Transformation von <i>E. coli</i> .....	98
5.2.8	Aufreinigung der T7-RNA-Polymerase .....	98
5.2.8.1	Herstellung der Übernachtskultur .....	98
5.2.8.2	Induktion der Zellen.....	100
5.2.8.3	Aufreinigung des Proteins.....	100
5.2.8.4	Säulenchromatographie .....	100
5.2.8.5	BioRad-Assay.....	101
5.2.8.6	Dialyse .....	101
5.2.9	Selektion .....	101
5.2.9.1	Herstellung der Selektionsmatrix .....	101
5.2.9.2	Durchführung der Selektion .....	103
5.2.10	Bindungsstudien.....	103
5.2.11	BIAcore-Messungen.....	104
5.2.11.1	$K_d$ -Bestimmung.....	104
5.2.11.2	Bindungsepitop-Bestimmung .....	104
5.2.12	SPOT-Analyse .....	104
5.2.13	Gerinnungsstudien .....	105
5.2.14	Chromogene Assays.....	106
5.2.14.1	Thrombin .....	106
5.2.14.2	Aktiviertes Protein C .....	106

5.2.15	NMR-Analysen.....	106
6	Literaturverzeichnis.....	107
7	Anhang.....	115
7.1	Aminosäuren.....	115
7.1.1	Aminosäuren.....	115
7.1.2	Genetischer Code.....	116
7.1.3	Proteinsequenzen der Klone.....	116
7.1.3.1	Klone aus der Selektion.....	116
7.1.3.2	Klone aus der Startbibliothek.....	118
7.1.4	Sequenzen der Proteine.....	119
7.2	Nukleinsäuren.....	121
7.2.1	Nukleinsäuren.....	121
7.2.2	Nukleotidsequenzen der Klone.....	121
7.2.2.1	Klone aus der Selektion.....	121
7.2.2.2	Klone aus der Startbibliothek.....	126
7.2.3	Vektor pGEM-4Z.....	127
7.2.3.1	Vektorkarte.....	127
7.2.3.2	Multiple cloning site.....	127
7.2.3.3	Sequenz pGEM-4Z.....	128
7.3	NMR-Spektren.....	130
7.4	Abkürzungsverzeichnis.....	133
7.5	Abbildungsverzeichnis.....	135
7.6	Tabellenverzeichnis.....	140
7.7	Danksagungen.....	141

# 1 Einleitung

Im menschlichen Körper repräsentiert die Vielfalt der durch B-Zellen synthetisierbaren Antikörper ein äußerst wirkungsvolles Mittel zur Erkennung und Bekämpfung von Infektionen. Antikörper binden an eingedrungene Krankheitserreger, sogenannte Antigene und markieren diese so für die gerichtete Zerstörung durch Makrophagen. Durch Rekombination und Mutation multipler Gene kann der Mensch mindestens einhundert Milliarden ( $10^{11}$ ) solcher Antikörper mit unterschiedlichsten Spezifitäten bilden. Das Antigen wird im ersten Schritt der Immunantwort mit dieser großen Zahl von vorhandenen Immunglobulin-Molekülen konfrontiert. Aus dem Antikörperrepertoire werden dann diejenigen mit der größten Affinität zum Antigen selektiert und anschließend in großem Maßstab vervielfältigt. Es erfolgt also in vivo ein *Screening* einer Sammlung von Antikörpern (Bibliothek). Antikörper stellen wegen ihrer hohen Spezifität und Affinität ein unentbehrliches Werkzeug in der modernen biologischen Forschung, der Biomedizin und der Diagnostik dar. Die nach Immunisierung eines geeigneten Organismus erhaltenen Antikörper können zum Nachweis oder zur Isolierung nahezu jeder beliebigen biologischen Substanz verwendet werden.

## 1.1 Kombinatorische Chemie

In der biomedizinischen und biotechnologischen Forschung wird nun versucht, die natürliche Bildung von Antikörpern im Labor, d. h. unter in vitro Bedingungen nachzuahmen, indem sogenannte evolutive kombinatorische Methoden bei ihrer Synthese eingesetzt werden. Dabei sollen die komplexen biochemischen Schritte, die zur Generierung von maßgeschneiderten, hochspezifischen und funktionalen Molekülen nötig sind möglichst einfach imitiert werden. Neue Wege in der Synthese von Substanzbibliotheken mit gewünschten Eigenschaften eröffnen hier die kodierte Kombinatorik (Übersichten in Lit.<sup>[1,2]</sup>).

In den achtziger Jahren wurde der Grundstein für die kombinatorische Chemie durch die Entwicklung der Parallelsynthese von Peptiden durch MARIO GEYSEN<sup>[3]</sup> gelegt. Inzwischen hat sich dieses Forschungsgebiet rasant und mannigfaltig weiterentwickelt und stark an Bedeutung gewonnen. Mit der von GEYSEN vorgestellten Methode war es möglich eine damals große Anzahl von 96 Peptiden simultan durch Festphasensynthese herzustellen. Mittlerweile wurden die Techniken soweit weiter entwickelt und verfeinert, dass es heute möglich ist, in kürzester Zeit mehrere Millionen strukturell verwandter Substanzen zu erzeugen. Durch geeignete *Screening*-Verfahren können die wirksamen Substanz-Varianten isoliert werden<sup>[4,5]</sup>. Dennoch ist diese Technik mit noch relativ hohem technischen Aufwand verbunden und die Komplexität der Substanzbibliotheken ist auf wenige Millionen Moleküle beschränkt. Zudem stellt das Wiederfinden der Strukturinformation selektierter Proteine ein Problem dar, da für die Strukturanalyse oft nur geringste Mengen der einzelnen Proteine zur Verfügung stehen und geeignete Amplifikationsmethoden noch nicht entwickelt wurden.

Seit diesen ersten Arbeiten wurde die kombinatorische Chemie auf unterschiedlichste Molekül-Klassen ausgedehnt, die es nun unter anderem erlauben, funktionale Ribonukleinsäuren,



Desoxyribonukleinsäuren, modifizierte Nukleinsäuren, Peptide bzw. Proteine aus komplexen Bibliotheken zu isolieren. Die Entdeckung und Erforschung von replizierenden Enzymen ermöglichte es, den Nachteilen der Parallelsynthese entgegenzuwirken und Biomoleküle bzw. Biopolymere durch enzymatische Reaktionen zu vervielfältigen. Getrieben von dieser Entdeckung, wurden in vitro Selektionsverfahren entwickelt, die es ermöglichen, funktionale Nukleinsäuren zu identifizieren, die aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur ähnlich den Antikörpern ein Zielmolekül erkennen und dieses binden können sollten<sup>[6]</sup>. Molekularbiologische Techniken wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA, in vitro Transkription für die Umschrift von DNA in RNA oder die reverse Transkription zur Erstellung von DNA aus einem RNA-Templat waren hierfür grundlegend. Ebenso war es entscheidend, die in den Nukleinsäuren enthaltene Information einfach durch Sequenzierung zurück gewinnen zu können. Die Entwicklung der Festphasesynthese zur Herstellung großer Mengen an Nukleinsäuren brachte zusätzliche Vorteile. Essentiell für den Erfolg der kombinatorischen Chemie jedoch ist die Möglichkeit, Moleküle durch die Synthese an der Festphase mit Zufallssequenzen zu versehen.

## 1.2 In vitro Selektion

J.W. SZOSTAK<sup>[7]</sup> und L. GOLD<sup>[8]</sup> veröffentlichten Anfang der Neunziger Jahre unabhängig voneinander ein Verfahren, mit dem große Bibliotheken von bis zu  $10^{16}$  verschiedenen Nukleinsäuremolekülen untersucht werden können. Die in vitro Selektion und Evolution von DNA- oder RNA-Molekülen durch SELEX (**S**ystematische **E**volution von **L**iganden durch **E**xponentielle Anreicherung) ermöglicht es, solche umfangreichen Oligonukleotid-Bibliotheken gezielt auf bestimmte Eigenschaften hin anzureichern und zu analysieren. In der Regel wird hierbei das Zielmolekül an einer festen Matrix immobilisiert und nach der Inkubation mit der Bibliothek alle diejenigen Moleküle entfernt, die nicht gebunden haben. Anschließend werden die funktionalen Sequenzen mittels PCR vervielfältigt und erneut einem Selektionsschritt unterworfen, wodurch diese Sequenzen im Laufe der Selektion angereichert werden können. So wurden Moleküle isoliert und charakterisiert, die als sogenannte Aptamere<sup>[9,10]</sup> (lat.: aptus = passend, gr.: meros = Ort, Stelle) bezeichnet werden. Diese sind in der Lage ihre Zielmoleküle, wie z.B. Aminosäuren<sup>[11,12]</sup>, *Small Molecules* (chemische Substanzen, Pharmazeutika)<sup>[13]</sup>, Cofaktoren<sup>[14]</sup>, Peptide<sup>[15]</sup> oder Proteine<sup>[16-18]</sup> spezifisch zu erkennen und hochaffin zu binden. Weitere interessante Beispiele für Nukleinsäuremoleküle, die Proteine erkennen und binden können, sind Aptamere gegen das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>c</sup>)<sup>[19]</sup>, mit denen das PrP<sup>c</sup> in Hirnhomogenaten nachgewiesen werden kann; sowie Aptamere, die das Rev-Protein aus HIV-1<sup>[20]</sup> binden und nach Expression in vivo die biologische Aktivität dieses Proteins blockieren können oder in der Zelle exprimierte Aptamere, sog. Intramere, welche Cytohesin-1<sup>[21]</sup> binden, seine Funktion beeinflussen und somit das Cytoskelett der Zellen verändern. Jedoch konnten nicht nur Aptamere durch SELEX identifiziert werden. In der Natur kommen auch katalytisch aktive Ribonukleinsäuren, sogenannte Ribozyme<sup>[22,23]</sup> vor. Selbst solche Moleküle, die neue katalytische Eigenschaften besitzen konnten selektiert werden<sup>[24]</sup>. Zum

Beispiel Nukleinsäuren mit Ligase-<sup>[25]</sup>, Estertransferase-<sup>[26]</sup> und Peptidyltransferaseaktivität<sup>[27]</sup>, sowie eine Diels-Alderase<sup>[28,29]</sup> und Michaelase<sup>[30]</sup>.

Der Vorteil des Einsatzes von Nukleinsäuren für die kombinatorische Chemie liegt darin, dass die wenigen funktionalen Moleküle in einer Bibliothek zu jeder Zeit ihren Bauplan in Form ihrer Basensequenz selbst mitbringen. Aptamere und Ribozyme sind als Nukleinsäuremoleküle gleichzeitig Träger von Funktionalität und Strukturinformation. Dies birgt gegenüber der Selektion von Proteinen einen entscheidenden Vorteil, der Genotyp (genetische Information) muss nicht mit dem Phänotyp (funktionale Struktur) verknüpft werden. Mittels der PCR können selbst geringste Mengen der Nukleinsäuren vervielfältigt werden, wodurch es möglich wird, sehr komplexe Bibliotheken gleichzeitig zu durchsuchen. Der Nachteil liegt in der relativ begrenzten Diversität funktionaler Gruppen der 4 Nukleinsäurebausteine. Peptide oder Proteine haben aufgrund der 20 verschiedenen Aminosäure-Bausteine mit ihren vielseitigen Funktionalitäten möglicherweise entscheidende Vorteile, zumal die Seitenketten noch in posttranslationalen Prozessen weiter modifiziert werden können. Ein Problem ist jedoch, dass sie nicht wie Nukleinsäuren durch wirksame Amplifikationsmethoden wie der PCR vervielfältigt werden können. Es gibt verschiedene Ansätze, erweiterte Funktionalitäten durch den Einsatz von modifizierten Basen in Nukleinsäuren zu integrieren und damit zu selektieren. Erste Selektionen mit modifizierten Nukleinsäuren waren bereits erfolgreich<sup>[31]</sup>. Mittlerweile konnte auch der Einbau von allen 4 Basen, welche unterschiedliche Modifikationen tragen gezeigt werden<sup>[32]</sup>.

In jüngster Zeit wurden unterschiedliche neue Methoden entwickelt, um die für ein Protein kodierende RNA-Sequenz mit dem Protein zu verknüpfen. Damit soll das SELEX-Prinzip, also die exponentielle Vermehrung geeigneter Vertreter der Bibliothek mittels PCR auf das Durchmusteren von Peptidbibliotheken übertragen werden.

Hierzu gibt es verschiedene Ansätze. Ausgehend vom Gen eines Proteins kann dieses beispielsweise durch *DNA-Shuffling*<sup>[33]</sup> neu arrangiert, in *E. coli*-Zellen kloniert und in vivo auf neue Eigenschaften selektiert und somit dieses Protein letztendlich maßgeschneidert werden.

Eine weitere Technik ist das sogenannten Phagen-Display<sup>[34,35]</sup>. Dabei wird die genetische Information des Proteins bzw. Peptids über den Phagen in Bakterien eingeschleust. Relativ leicht lassen sich somit große kombinatorische Peptidbibliotheken durch gentechnische Methoden erstellen. Dazu wird in das Gen eines Phagen ein DNA-Fragment integriert, das für ein Peptid kodiert. Infiziert man anschließend Bakterien mit dem transformierten Phagen, kann dieser sich dort vermehren und präsentiert das neu eingeführte Peptid an seiner Oberfläche, dessen genetische Information gleichzeitig in seinem Inneren verpackt ist. Durch systematische oder zufällige Variation der DNA-Sequenz können Bibliotheken mit einer Komplexität von  $10^7$  -  $10^9$  Peptiden erzeugt werden. Die Selektion der Phagen, die ein funktionales Peptid auf der Oberfläche tragen kann dann in vitro, beispielsweise durch "*panning*" erfolgen. Dabei wird die Zielstruktur oder das Antigen, gegen das ein spezifischer Binder ge-

sucht wird auf einer Plastikoberfläche immobilisiert und mit der Phagenbibliothek inkubiert. Bindende Phagen können daraufhin isoliert und in ihrem Wirt erneut vermehrt werden. Durch wiederholtes Durchlaufen dieser Schritte können so letztlich hochaffine Proteine oder Peptide angereichert werden. Bei Verwendung des Phagen-Display können die Nachteile des chemisch-kombinatorischen Ansatzes umgangen werden. Phagenbibliotheken mit einer Größe von  $10^6$  bis  $10^9$  Individuen sind relativ leicht handhabbar. Zudem ist die Strukturinformation in Form der Erbinformation, die im Inneren des Phagen lokalisiert ist, fest mit dem exprimierten Protein verbunden und kann nach der Selektion durch gentechnische Methoden leicht vervielfältigt und entschlüsselt werden.

Ähnliche Techniken, die zu den neuen Entwicklungen der evolutiven Verfahren gerechnet werden, und bei denen Phänotyp und Genotyp eines Peptids oder Proteins direkt miteinander verknüpft werden, sind das Ribosomen- oder Polysomen-Display<sup>[36-38]</sup>. Anders als beim Phagen-Display können diese Techniken vollständig in vitro durchgeführt werden. Beide Methoden nutzen die zelluläre Translationsmaschinerie in Form der Ribosomen zur Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp. Polysomen sind Komplexe aus einer mRNA und darauf angelagerten Ribosomen, die im Begriff sind, die kodierte Information zu übersetzen. Durch Veränderung der äußeren Bedingungen kann die Translation der mRNA unterbrochen werden, ohne dass das Polysom zerfällt. Der Komplex aus mRNA, Ribosom und dem noch an das Ribosom gebundenen Peptid oder Protein kann in dieser Form für eine in vitro Selektion/Evolution von Proteinen eingesetzt werden. Das Ribosomen-Display ist als eine Weiterentwicklung des Polysomen-Displays zu betrachten<sup>[39]</sup>. Die Methode basiert grundsätzlich auf der des Polysomen-Displays und wurde durch die Arbeiten von HANES und PLÜCKTHUN zu einem allgemein anwendbaren System für die in vitro Selektion von funktionellen Peptiden und Proteinen verbessert. Jede mRNA der bis zu  $10^9$  verschiedenen Moleküle umfassenden Bibliotheken kodiert für ein spezielles Protein und ist mit diesem über ein einzelnes Ribosom verbunden<sup>[40]</sup>.

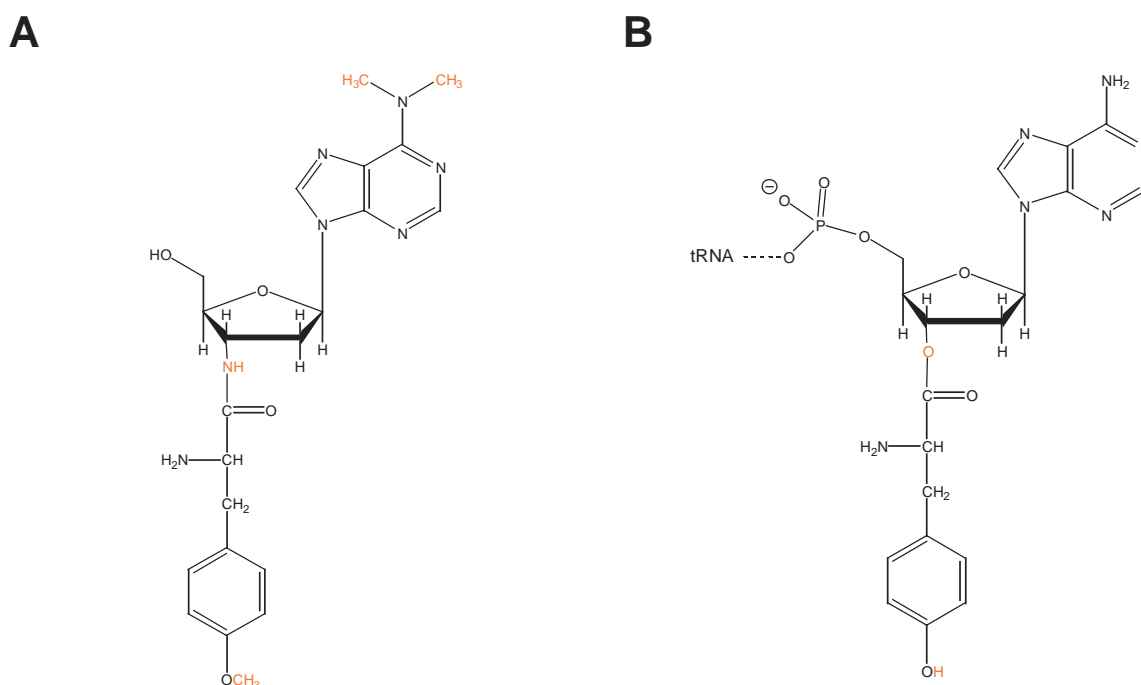
Problematisch und begrenzend an den genannten Techniken ist allerdings die Tatsache, dass die zu screenende Proteinbibliothek unmittelbar an die komplexen Strukturen des Phagen bzw. des Ribosoms angeknüpft ist. Dies bringt nicht nur technische Probleme mit sich, sondern kann auch die Faltung des gebundenen Proteins gegenüber dem freien Protein beeinflussen, was die Reproduzierbarkeit der Selektionszyklen einschränkt.

Diese Nachteile könnten umgangen werden, wenn es gelänge, diese komplexen Strukturen durch ein kleines organisches Molekül zu substituieren, über welches jedes Mitglied einer Peptid- oder Protein-Bibliothek direkt mit seiner kodierenden mRNA verknüpft ist.

## 1.3 mRNA Display

### 1.3.1 Prinzip

Eine solche Möglichkeit bietet das neu entwickelte mRNA Display<sup>[41,42]</sup>. 1997 stellten SZOSTAK<sup>[43]</sup> und YANAGAWA<sup>[44]</sup> nahezu gleichzeitig ein Prinzip vor, das es ermöglicht, Peptide mit der für sie kodierenden mRNA kovalent über ein Brückenmolekül miteinander zu verknüpfen. So können Geno- und Phänotyp des Proteins direkt miteinander verbunden werden wodurch die eindeutige Aussage über die funktionelle Struktur des Proteins erhalten bleibt. Im Zentrum dieser Technologie steht das Antibiotikum Puromycin (**Abbildung 1**). Das Antibiotikum wurde 1959 erstmals aus dem Bodenpilz *Streptomyces alboniger* isoliert und wird in die Gruppe der Aminonukleosidantibiotika eingeordnet.



**Abbildung 1:** (A) Puromycin-Molekül, (B) 3'-Ende einer Tyrosyl-tRNA. Die Unterschiede zwischen den beiden Molekülen sind farblich hervorgehoben. Über die 5'-Hydroxylgruppe des Puromycin erfolgt eine kovalente Bindung an das 3'-Ende des DNA-Linkers, welcher wiederum mit der für das Peptid kodierenden RNA verknüpft ist.

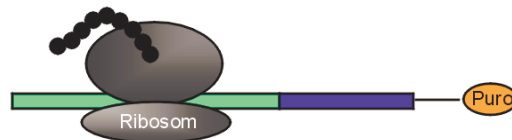
Der Wirkmechanismus von Puromycin wurde 1967 aufgeklärt<sup>[45,46]</sup>. Demnach ahmt das Molekül aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit das 3'-Ende einer aminoacylierten tRNA (siehe **Abbildung 1**) nach und kann so in die Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle (A-Stelle) des Ribosoms eintreten. Durch die Peptidyl-Transferase-Aktivität des Ribosoms wird eine Transpeptidierung mit der naszierenden Peptidkette katalysiert, wobei die wachsende Polypeptidkette

auf das Molekül übertragen wird und Peptidyl-Puromycin entsteht. Da der Aminosäurerest des Puromycin jedoch nicht über eine Esterbindung (**Abbildung 1B**) sondern über eine Amidbindung (**Abbildung 1A**) an die Riboseeinheit gebunden ist, kann der nächste Transpeptidierungsschritt wegen der verminderten Reaktivität der Amidbindung nicht stattfinden. Die Protein- bzw. Peptidsynthese bricht ab und der Translationskomplex zerfällt unter Freisetzung von Peptidyl-Puromycin.

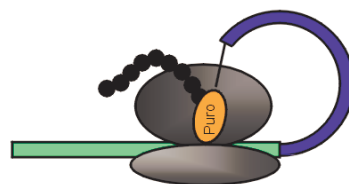
A RNA-DNA-Puromycin-Ligationsmoleküle



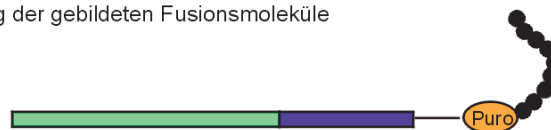
B Translation der RNA



C Puromycin bindet an die A-Stelle des Ribosoms



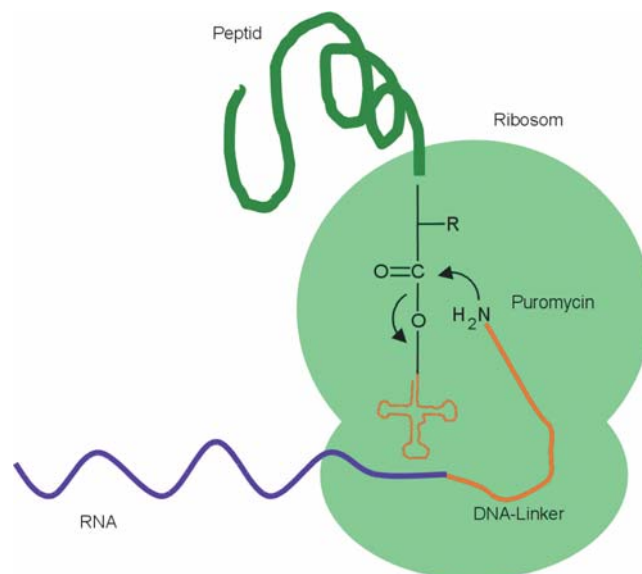
D Freisetzung der gebildeten Fusionsmoleküle



**Abbildung 2:** Mechanismus der Puromycin-vermittelten Fusion von RNA und dem entsprechenden kodierten Peptid. **(A)** Als Ausgangsmaterial wird eine chimäre RNA-DNA-Puromycin-Bibliothek eingesetzt. **(B)** In vitro Translation: das Ribosom bindet die RNA und bewegt sich auf dem Templat in Richtung des 3'-Endes. Die Aminosäuren der wachsenden Peptidkette sind als schwarze Kreise dargestellt. **(C)** Das Ribosom erreicht die Verbindungsstelle RNA-DNA und pausiert, das Puromycin kann in die A-Stelle eintreten, wo es kovalent mit dem Peptid verknüpft wird. **(D)** Freisetzung der gebildeten Fusionsmoleküle.

Durch organische Synthese kann nun ein DNA-Puromycin-Oligomer hergestellt werden, welches am 3'-Ende ein kovalent verknüpftes Puromycin-Molekül trägt. Durch enzymvermittelte Ligation kann eine RNA-Bibliothek mit diesem Linkermolekül verknüpft werden und man erhält ein RNA-DNA-Puromycin-Molekül, welches für die Translation als Ausgangstemplat verwendet werden kann (mRNA Display Templat). Diese Puromycin-gekoppelte RNA-Bibliothek wird nun in eine *in vitro* Translation eingesetzt. Nach erfolgter Peptidsynthese wird die Translation durch das an die mRNA gekoppelte Puromycin gestoppt und es resultieren letztlich Fusionsmoleküle, die aus dem Protein, Puromycin, dem Linker und der mRNA bestehen. In **Abbildung 2** wird schematisch skizziert, wie die kovalente Fusion des RNA-Teils mit dem entstehenden Peptid zustande kommt. Nach dem oben beschriebenen Mechanismus verursacht Puromycin einen vorzeitigen Kettenabbruch und wird kovalent durch eine Peptidbindung an das Carboxylende der wachsenden Peptidkette geknüpft. Wichtigster Schritt bei der Bildung der Fusionsmoleküle ist der Eintritt von Puromycin ins Ribosom und die anschließende Übertragung des im Ribosom entstehenden Peptids auf das Puromycin-Molekül (**Abbildung 2C**).

Während das Ribosom, so der hypothetische Mechanismus, bei Erreichen der Verbindungsstelle zwischen RNA und DNA pausiert, hat das Puromycin Gelegenheit, die A-Stelle zu besetzen. Durch die Peptidyl-Transferase-Aktivität wird daraufhin das Peptid an das Puromycin gebunden (siehe **Abbildung 3**). Somit ist eine stabile kovalente Verbindung zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp entstanden.

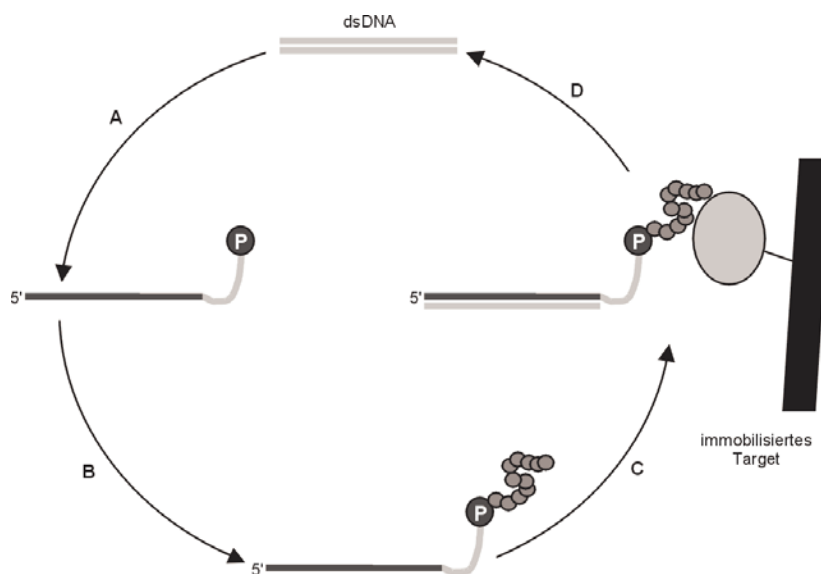


**Abbildung 3:** Das RNA-DNA-Puromycin-Ligationsprodukt wird im Ribosom kovalent an das Peptid geknüpft.

Das gebildete mRNA Display Peptid wird anschließend revers transkribiert, um ein doppelsträngiges RNA-DNA-Hybrid zu gewinnen, um mögliche störende Einflüsse der mRNA, die zur Ausbildung von Sekundärstrukturen befähigt ist zu vermeiden. Somit wird sichergestellt, dass im eigentlichen Selektionsschritt kein RNA-Aptamer isoliert wird. Zudem wird dadurch die Stabilität der Ribonukleinsäure erhöht und Degradation zurückgedrängt. Unter Umständen kann es allerdings gerade interessant sein, sowohl mit der Funktionalität des Peptids und derjenigen der Nukleinsäure gleichzeitig zu selektieren<sup>[47]</sup>. LARRY GOLD beschreibt die Möglichkeit, Proteinaptamere in Konkurrenz mit RNA-Aptameren zu selektieren, deren  $K_d$ -Werte bereits unter 1 nM liegen können. Somit können für ein Zielmolekül sowohl die Eigenschaften von Nukleinsäuren als auch von Proteinen genutzt werden, was die Wahrscheinlichkeit für eine spezifische Bindung möglicherweise erhöht, da unterschiedliche Epitope gleichzeitig adressiert werden können.

### 1.3.2 Anwendung

In **Abbildung 4** ist aufgezeigt, wie eine Selektion mit einer Bibliothek von mRNA Display Peptiden grundsätzlich aufgebaut ist, und welche Schritte in jedem einzelnen Selektionszyklus durchlaufen werden müssen.



**Abbildung 4:** Selektionsschema. **(A)** Ausgehend von der dsDNA der Bibliothek wird die mRNA, die mit dem Puromycin (P) verknüpft ist, erzeugt. **(B)** Durch in vitro Translation werden die mRNA Display Peptide hergestellt (Aminosäuren als graue Kreise dargestellt). **(C)** Nach der reversen Transkription wird die Bibliothek in den Selektionsschritt eingesetzt und auf die Eigenschaften gegenüber einem immobilisierten Targetmolekül untersucht. **(D)** Durch PCR werden die funktionalen Sequenzen angereichert.

Zuerst wird eine DNA-Bibliothek chemisch synthetisiert, welche aufgrund von randomisierten Bereichen eine Diversität von bis zu  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen aufweist. Nach der Umschrift in RNA (in vitro Transkription) und der Verknüpfung mit dem Puromycin-Linker wird eine in vitro Translation mit dem erhaltenen Templat angeschlossen. Während der Translation, die in Gegenwart von radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin durchgeführt wird, werden die entstehenden Peptide markiert. Durch die radioaktive Markierung kann anschließend der Selektionsverlauf verfolgt werden. Nach der reversen Transkription wird mit den so hergestellten Molekülen der eigentliche Selektionsschritt hinsichtlich der gewünschten Eigenschaft ausgeführt. Dabei wird die gewonnene Bibliothek z.B. mit einem an einer Matrix immobilisierten Zielmolekül inkubiert. Nicht gebundene Mitglieder der Bibliothek werden durch sukzessives Waschen entfernt und die gebundenen Spezies spezifisch eluiert. Um bei der Selektion auf Bindung unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, kann vor den eigentlichen Selektionsschritt noch eine Präselektion mit einer underivatisierten Matrix geschaltet werden. Um im Verlauf der Selektion die Spezifität zu erhöhen, wird der Selektionsdruck schrittweise gesteigert. Dies geschieht in der Regel durch Verwendung von niedriger derivatisierten Selektionsmatrices, Erhöhung der Waschvolumina, Erhöhung der Ionenstärke, Zusatz von Kompetitoren oder Ähnlichem. Die DNA der zurückbehaltenen Moleküle wird mittels PCR amplifiziert und dient als Templat für den nächsten Zyklus. Reichern sich nach mehrmaligem Durchlaufen des Selektionszyklus funktionale Repräsentanten der Bibliothek an, so wird die DNA der finalen Bibliothek kloniert, sequenziert und die erhaltenen funktionalen Vertreter analysiert und charakterisiert.

Mit dieser Methode sind mittlerweile einige sehr interessante Proteine selektiert worden. Aus komplett randomisierten Proteinbibliotheken wurde z.B. eine Sequenz isoliert, die spezifisch ATP binden kann<sup>[48]</sup>. Hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit einer funktionalen Sequenz von 1 in  $10^{11}$  und der Entdeckung eines  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen Motivs handelt es sich um ein besonders aussagekräftiges Beispiel. Zum einen wird in dieser Selektion bestätigt, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von funktionalen Proteinen aus randomisierten Bibliotheken ähnlich der von RNA-Selektionen ist. Zweitens zeigt die Evolvierung eines Zinkfingers, dass ein solches Motiv, wie es auch in der Natur häufig verwendet wird, entscheidend für die Funktionalität von Proteinen ist.

Weiterhin wurde ein Streptavidin-bindendes Peptid selektiert, welches mit einer extrem niedrigen Bindungskonstante ( $K_d = 2 \text{ nM}$ ) eine hohe Affinität zum Zielprotein besitzt<sup>[49]</sup>. Der Sequenzraum, d.h. diejenige Zahl an verschiedenen Molekülen, innerhalb der es wahrscheinlich ist, einen funktionalen Vertreter zu finden, wurde ebenfalls anhand der Selektion von Peptiden untersucht, die RNA-Motive binden können<sup>[50]</sup>. Weiterhin wurden durch das *Screening* von cDNA-Bibliotheken Proteine identifiziert, die an das antiapoptotisch wirksame Protein Bcl-X(L)<sup>[51]</sup>, oder phosphoryliertes Tyrosin<sup>[52]</sup> binden können.

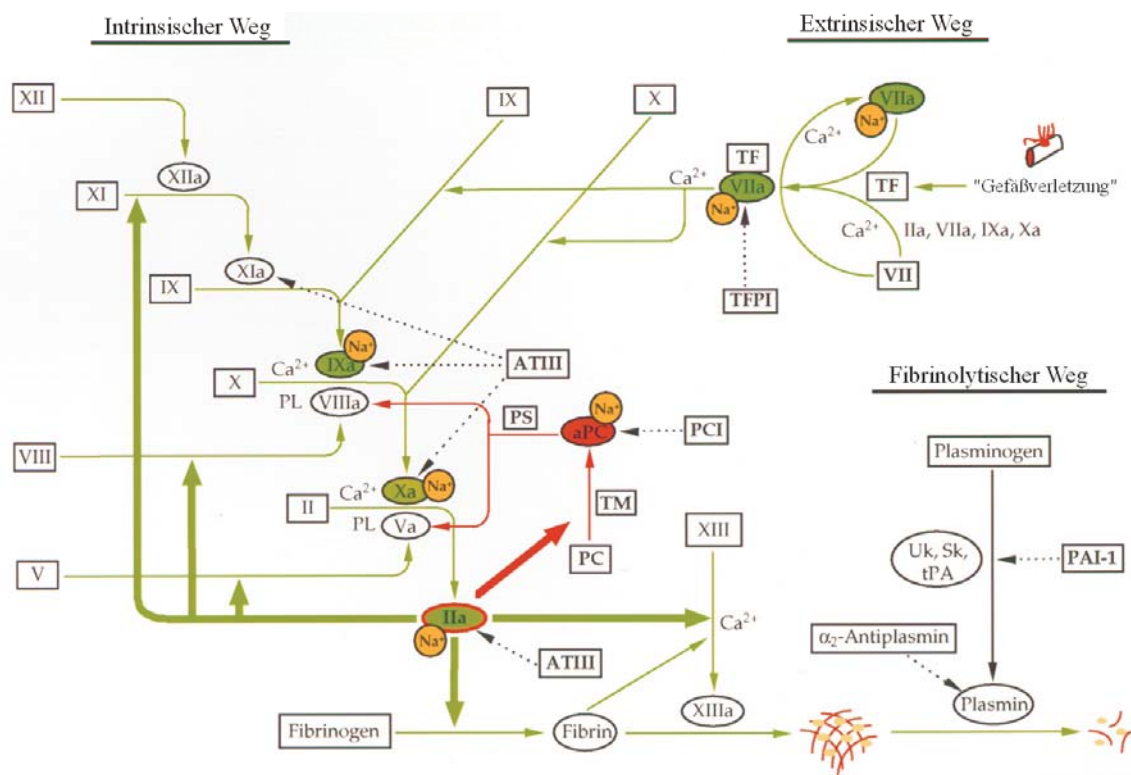
Unter den verschiedenen Techniken, die eine eindeutige Verknüpfung zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp einer Proteinsequenz erlauben, wurde das mRNA Display inzwischen stark weiterentwickelt<sup>[53]</sup>. Hinsichtlich der Einfachheit und Stabilität der Verknüpfung, sowie



der erzielbaren Komplexität der Bibliotheken stellte es sich als besonders leistungsstark heraus<sup>[54-59]</sup>.

### 1.4 Thrombin

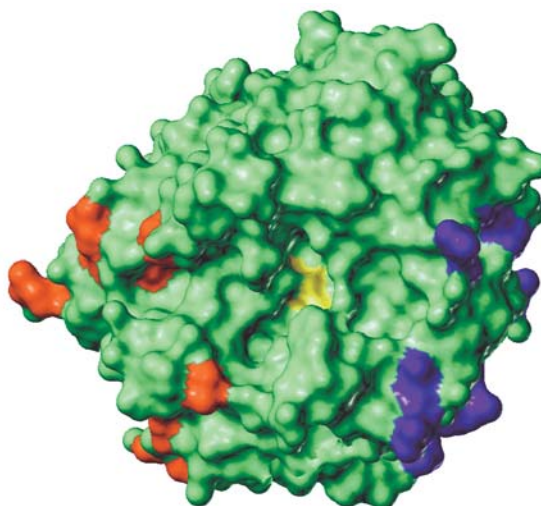
Ein wichtiges, mögliches Zielmolekül für einen kombinatorischen *Screening*-Ansatz mit dem mRNA Display könnte humanes  $\alpha$ -Thrombin darstellen. Es ist eines der Schlüsselenzyme in der Blutgerinnungskaskade<sup>[60]</sup> und reguliert sowohl prokoagulative als auch antikoagulative Prozesse. Aufgrund der Vielseitigkeit dieses Enzyms und der mannigfaltigen Interaktionen im menschlichen Körper würde kleine Peptide als Bindungspartner ein wichtiges Werkzeug für biochemische Untersuchungen darstellen. Thrombin, auch bezeichnet als Faktor IIa, zählt sicher zu einem der am besten charakterisierten Proteine. Zum einen wird durch die Serinprotease Thrombin das Fibrinogenmolekül in Fibrin gespalten, was schließlich zur Ausbildung eines Blutgerinnsels führt. Durch Polymerisation und Quervernetzung der einzelnen Fibrinfasern entsteht ein unlösliches netzartiges Gebilde, welches an der Kontaktregion von verletzten Gefäßen mit der Luft gebildet wird. **Abbildung 5** zeigt schematisch die Gerinnungskaskade mit ihren vielfältigen Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen.



**Abbildung 5:** Blutgerinnungskaskade. Thrombin (IIa) spielt eine zentrale Rolle. Die Pfeile verdeutlichen jeweils die Regulation des angegebenen Schrittes; dick gezeichnete Pfeile sind Reaktionen, die

von Thrombin katalysiert werden. (wichtigste Abkürzungen: aPC = aktiviertes Protein C, ATIII = Antithrombin III, PC = Protein C, PCI = Protein C Inhibitor, PS = Protein S, TM = Thrombomodulin)

Zusätzlich zu diesen grundlegenden Funktionen regelt das Protein seine eigene Produktion durch die enzymatische Aktivierung der Blutgerinnungsfaktoren V, VIII und XI<sup>[61-63]</sup>. In einer Übersicht ist in **Abbildung 6** die Kristallstruktur von humanem  $\alpha$ -Thrombin dargestellt.



**Abbildung 6:** Struktur von humanem  $\alpha$ -Thrombin (nach Lit.<sup>[68]</sup>, pdb: 1HAH). Farblich hervorgehoben sind die wichtigen Seitenketten der Exosite-1 (rot), der Exosite-2 (blau) und dem katalytischen Zentrum (gelb).

Man erkennt, dass es sich um ein weitgehend globuläres Protein handelt, welches unterschiedlichste Domänen für Interaktionen auf seiner Oberfläche besitzt. Die Struktur und die Oberfläche von  $\alpha$ -Thrombin wurde in Mutationsstudien<sup>[64,65]</sup> intensiv erforscht und neben der gleich einem Canyon geformten aktiven Stelle wurden zwei vornehmlich positiv geladene Epitope identifiziert, die sogenannten Anionen-Bindungsstellen, oder *exosites*. Die beiden als Fibrinogen-Erkennungs-Exosite (FRE oder Exosite-1) bzw. Heparin-Bindungs-Exosite (Exosite-2) bezeichneten Epitope liegen auf gegenüberliegenden Seiten des Thrombinmoleküls<sup>[66]</sup>. Viele natürliche Regulatoren und Inhibitoren von Thrombin, wie Heparin, Hirudin, Haemadin oder Antithrombin III, die das aktive Zentrum, bzw. eine oder beide Exostellen auf der Thrombinoberfläche binden, wurden identifiziert, charakterisiert und daraufhin mit synthetischen oder molekularbiologischen Methoden neu gestaltet.<sup>[67]</sup> Viele davon spielen eine wichtige Rolle als Antikoagulantien in einer Vielzahl von klinischen Anwendungen.

Wie bereits erwähnt, bindet Thrombin an Fibrinogen und spaltet dieses spezifisch an einer Stelle, wodurch das Epitop für die Polymerisation freigesetzt wird. Die Bindung des Fibrinogenmoleküls erstreckt sich weitreichend über das gesamte Thrombin-Protein, die Fixierung der  $\alpha$ -Kette des Fibrinopeptids an der Exosite-1 jedoch trägt entscheidend zur Stabilisie-

rung des Thrombin-Substrat-Komplexes und somit zu einer effizienteren Reaktion bei. Interessant ist ebenfalls die inhibitorische Wirkung von Heparin, einem polysulfatierten Glycan. Das negativ geladene Molekül bindet direkt an die Exosite-2 von Thrombin und beeinflusst so die enzymatische Aktivität. Da Heparin die Bindung von Heparin Cofaktor II (aktives Zentrum und Exosite-1) und von Antithrombin III (aktives Zentrum und Exosite-2) um mehrere Größenordnungen steigert<sup>[69-71]</sup>, ist es von hohem klinischen Interesse und medizinischer Bedeutung. Hirudin, einer der effektivsten natürlichen Thrombininhibitoren wurde aus dem medizinischen Blutegel (*Hirudis medicinalis*) isoliert und inaktiviert Thrombin sowohl in Lösung als auch im an Fibrin gebundenen Zustand<sup>[72]</sup>. Ein Teil des 65 Aminosäuren langen Proteins bindet an die Exosite-1, während der andere, der eine schwanzartige Struktur besitzt, sich über das gesamte Thrombin-Molekül erstreckt und somit die aktive Stelle blockiert<sup>[73,74]</sup>. Der 12 Aminosäuren lange C-terminale Teil des Hirudin-Proteins (Aminosäuren 54-65) wird als Hirugen bezeichnet und bindet auch alleine die Exosite-1. Das Fragment ist immer noch als direkter Thrombin-Inhibitor aktiv<sup>[75]</sup>. Durch die Bindung von humanem  $\alpha$ -Thrombin an Thrombomodulin (TM), welches auf Endothelzellen zu finden ist, wird die enzymatische Aktivität von Thrombin geändert. Es erfolgt nun eine Beschleunigung der Aktivierung von Protein C (PC)<sup>[76,77]</sup>. Wird der 1:1 Komplex mit TM gebildet, so spaltet Thrombin schließlich PC unter der Freisetzung von aktiviertem Protein C (aPC). Dadurch wird eine antikoagulatorische Kaskade induziert, die eine verminderte Produktion von Thrombin zur Folge hat (**Abbildung 5**).

Name	Sequenz	Ziel	Lit.
Fibrinogen	52-DWPFCSDEDWN-62	Exosite-1	<sup>[81]</sup>
Hirudin	54-DFEEIPEEYLQ-65	Exosite-1	<sup>[73,74]</sup>
Heparin Cofactor II	54-NDWIPEGEEDDDYLDLEKIFSEDDDYI-75	Exosite-1	<sup>[82]</sup>
Thrombomodulin	415-LDDGFICTDIDECEN-429	Exosite-1	<sup>[83]</sup>
Heparin	Polysulfatiertes Glycan	Exosite-2	<sup>[84]</sup>
Haemadin	46-EFEEFEIDEEEEK-57	Exosite-2	<sup>[79]</sup>
Antithrombin III	391-AGRSLNPNRVTFKA-404	Exosite-2	<sup>[67]</sup>
Platelet Glycoprotein Ib $\alpha$	272-DTDLYDYYPEE-282	Exosite-2	<sup>[85]</sup>

**Tabelle 1:** Verschiedene Proteine, die an humanes  $\alpha$ -Thrombin binden, deren Bindungsmotive und die Stelle der hauptsächlichen Interaktion. Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition im Protein.

Haemadin, ein Protein, das ebenfalls aus einem Blutegel (*Haemadipsa sylvestrus*) isoliert wurde, ist strukturell sehr ähnlich dem Hirudin, bindet aber im Gegensatz dazu an die Exosi-

te-2<sup>[78,79]</sup>. Ein weiteres Protein, das an die Exosite-2 bindet, ist das Platelet Glycoprotein Ib $\alpha$ , jedoch ist dessen biologische Rolle bis jetzt noch nicht vollständig geklärt<sup>[80]</sup>.

In **Tabelle 1** sind zusammenfassend die unterschiedlichen Proteine aufgelistet, die mit humanem  $\alpha$ -Thrombin interagieren. Es wird deutlich, dass Interaktionspartner des Thrombins sehr effektiv mit kurzen Peptidepitopen an beiden Exo-Stellen des Thrombin-Proteins wechselwirken und somit die Funktion von Thrombin beeinflussen. Daher stellt Thrombin ein interessantes Zielmolekül für die Anwendung von Selektionstechniken unter Verwendung geeigneter Peptid-Bibliotheken durch mRNA Display dar. Die Selektion von neuartigen Proteinen, die an Thrombin binden kann zu einer neuen Klasse von Inhibitoren oder Regulatoren führen. Dies ist vor allem wegen der weitreichenden klinischen und medizinischen Bedeutung von Thrombin von besonderem Interesse.

## 2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Identifizierung von Proteinen und Peptiden mit gewünschten Eigenschaften und Funktionalitäten wurde durch den Einsatz von unterschiedlichsten Methoden angestrebt, jedoch haben sich in vitro Selektionstechniken als eine der erfolgsversprechendsten erwiesen. Mittlerweile sind eine Reihe von Methoden entwickelt worden, welche die Verknüpfung der Primärsequenz von Proteinen mit ihrer kodierenden mRNA erlauben. In dieser Arbeit sollten mittels des mRNA Display kleine Peptide selektiert werden, die an ein multifunktionelles Zielmolekül, nämlich humanes  $\alpha$ -Thrombin binden. Dazu war es nötig, eine Bibliothek für die Selektion eines kleinen Peptides, vergleichbar mit der Sequenzlänge der natürlichen Interaktionsmotive gegen  $\alpha$ -Thrombin (**Tabelle 1**) zu konzipieren und zu synthetisieren. Die randomisierten Aminosäuren sollten dabei keinem *Bias* unterliegen, die Verteilung allerdings hinsichtlich der gewünschten Applikation optimiert sein. Die hierfür notwendigen Techniken und Arbeitsschritte, wie Ligation, Translation und die Aufreinigungsschritte mussten etabliert und optimiert werden.

Zudem waren Untersuchungen vorgesehen, ob die selektierten Sequenzen hinsichtlich der Proteinsequenz Ähnlichkeiten mit den natürlichen Thrombin-Bindern aufweisen. Schließlich galt es, die erhaltenen Peptide auf ihre Bindungsaffinität, die Bindungsstelle am Thrombin-Molekül und die Fähigkeit zur Inhibition von Thrombin zu charakterisieren und zu analysieren, sowie gegebenenfalls hinsichtlich ihrer Struktur zu untersuchen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Selektion

Die erste Aufgabe bei der Vorbereitung einer Peptidselektion mit dem mRNA Display war das Design und die Herstellung der Anfangs-DNA-Bibliothek. Um für die Selektion eine große Anzahl unterschiedlicher Moleküle zu erhalten, wurde eine DNA Sequenz gewählt, die über einen längeren Bereich randomisiert war. Für die spätere Übersetzung der genetischen Information in Peptidmoleküle, musste die DNA so gestaltet werden, dass sie für Aminosäuren kodiert, d. h. es mussten bei der DNA-Synthese jeweils Codon-Triplets eingebaut werden.

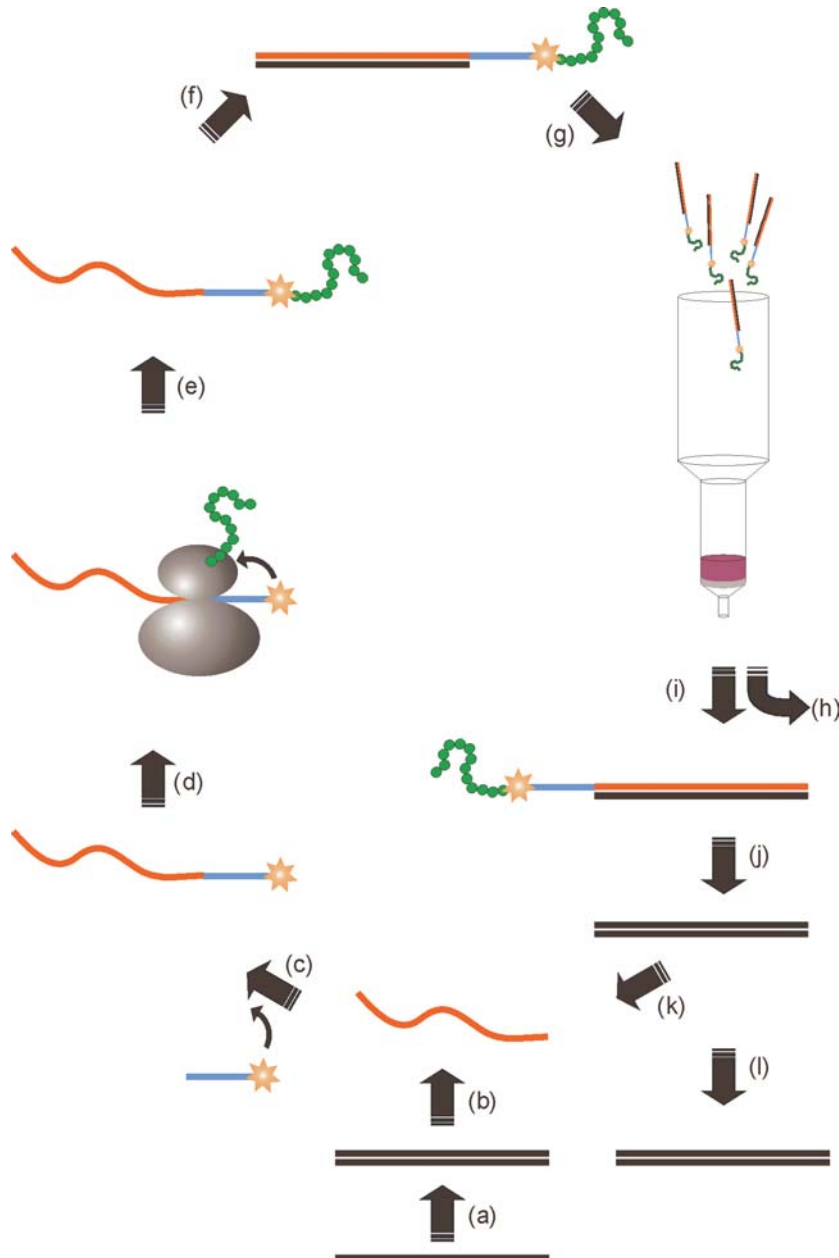
Diese DNA Sequenz wurde auf chemisch-synthetischem Wege erzeugt. Dadurch wurde die Einführung von randomisierten Basenpositionen durch den Einsatz von Mischungen der Nukleosidphosphoramidite während der Synthese erleichtert. Zusätzlich zu der „dem Zufall überlassenen Region“ musste die DNA Bibliothek noch konstante Regionen am 5'- und 3'-Ende besitzen, die eine spätere Amplifikation durch PCR ermöglichen. In den konstanten Bereichen wurden Sequenzen eingebaut, die für Proteinaffinitätsanker kodieren, welche die Reinigung der mRNA Display Peptide über Affinitätschromatographie erlauben. Durch die Einführung von Restriktionsschnittstellen an der Grenze zwischen den randomisierten und konstanten Bereichen wurde gewährleistet, dass diese konstanten Sequenzen ausgetauscht werden können, falls eine Neuorganisation der Bibliothek nötig sein sollte. Zusätzlich erleichterte sich so die spätere Klonierung.

Nach Fertigstellung der DNA-Bibliothek war es wichtig, die einzelnen Schritte der späteren Selektion jeweils separat zu optimieren. Ein entscheidender Teil der Planung war jedoch die Ausarbeitung der Selektionsstrategie.

#### 3.1.1 Selektionsstrategie

Für die Ausarbeitung einer Strategie für die Selektion von Peptiden wurden bekannt Prinzipien der Selektion von Nukleinsäureaptameren zugrunde gelegt. Ausgehend davon wurde dieses entsprechend modifiziert und um zusätzlich nötigen Schritte erweitert. Eine solche Strategie hat sich bereits in verschiedenen Arbeiten bewährt<sup>[43,49,50,57]</sup>. Angelehnt daran wurde das in **Abbildung 7** gezeigte Selektionsschema entwickelt. Startpunkt ist hierbei ein synthetisches Oligonukleotid, welches die randomisierte Region enthält. Mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) im großen Maßstab (**a**) wird das doppelsträngige DNA-Templat gewonnen. Dieses wird transkribiert (**b**) und die erhaltene RNA in einem Ligationsschritt, der durch einen sogenannten *Splint* als molekulares Ligationstemplat vermittelt wird, mit dem DNA-Puromycin-Linker verknüpft (**c**). Das gereinigte mRNA Display Templat wird in die *in vitro* Translation (**d**) in Kaninchenretikulozytenlysat eingesetzt, wobei die entsprechenden Peptide synthetisiert werden. Nach der anschließenden Reaktion mit dem Puromycin-

Molekül (Fusion) werden die mRNA Display Peptide aufgereinigt (e) und anschließend revers transkribiert (f), so dass man den mRNA-Anteil als mRNA-cDNA-Duplex erhält.



**Abbildung 7:** Selektionsschema. (a) Large Scale PCR, (b) Large Scale Transkription, (c) Ligation mit dem DNA-Puromycin-Linker, (d) Translation und Generierung der mRNA Display Peptide, (e) Aufreinigung, (f) RT, (g) Selektionsschritt, (h) Waschen, (i) Elution, (j) PCR, (k) Transkription, (l) Klonierung

Die so generierten Moleküle werden schließlich in den Selektionsschritt eingesetzt (g). Hierbei wird die Bibliothek in der Regel mit einem an einer festen Matrix gebundenen Zielmolekül

inkubiert. Die Inkubation erlaubt es den funktionalen Mitgliedern der Bibliothek an das Zielmolekül zu binden. Um Matrix-Binder aus der Bibliothek abzutrennen wird unter Umständen eine nicht-derivatisierte Säule als Präselektionsmatrix vorangeschaltet.

Nicht an das *Target* gebundene Moleküle werden anschließend von der Säule gewaschen (**h**) und die bindenden daraufhin eluiert (**i**). Danach werden durch PCR aus den cDNA's die gebundenen Sequenzen amplifiziert (**j**) und für die nächste Runde der Selektion transkribiert (**k**). Der Zyklus wird bis zur Anreicherung von funktionalen Sequenzen mehrmals durchlaufen und nach Beendigung der Selektion zur Analyse kloniert (**l**).

Um eine Selektion erfolgreich durchführen zu können, muss jeder einzelne Schritt des Selektionszyklus standardisiert funktionieren.

### 3.1.2 Design der Bibliothek

Im Folgenden werden die einzelnen Anforderungen an eine Peptid-Bibliothek für eine Selektion dargelegt, die notwendig sind, um einen erfolgreichen Selektionsverlauf zu gewährleisten.

#### *T7 RNA Polymerase Promotor Sequenz*

Um die DNA Bibliothek transkribieren und damit in RNA umschreiben zu können wird an deren 5'-Ende eine spezifische Erkennungssequenz (Promotor) für eine RNA Polymerase benötigt. In diesem Fall ist für die T7 RNA Polymerase eine 17 Basen lange Sequenz nötig. Die beiden folgenden Sequenzen TAATACGACTCACTATA und TTCTAATACGACTCACTATA werden hierzu standardisiert eingesetzt, wobei hier die kürzere erste Sequenz verwendet wurde. Die Transkription läuft sehr effizient ab, wenn direkt nach der Promotor Sequenz mindestens zwei Guanosin-Basen folgen. In den ersten Basen des Transkripts sollten zudem Pyrimidine (T oder C) vermieden werden. Für die hier vorliegende RNA wurde die Sequenz GGG für den Start gewählt.

#### *Sequenz für die Translation*

Da die transkribierte RNA keine *Cap*-Struktur trägt, welche die Bindung an das Ribosom ermöglicht, wurde vor dem Translationsstartcodon eine Sequenz für die Ribosomenbindung eingefügt. Eine verkürzte Sequenz aus der 5' untranslatierten Region (UTR) des Tabakmosaikvirus<sup>[86]</sup>, welche die Einschleusung der RNA in das Ribosom fördert (*translation enhancer*) schließt sich deshalb direkt an die Promotor Sequenz an. Die Basenfolge der Tabakmosaikvirus-*translation-enhancer* Region (TMV-TE) ist ACAATTACTATTTACAATTACA und fördert die Assemblierung des Ribosoms mit der mRNA.



### *Start-Methionin*

Das Codon für das initiiierende Start-Methionin (ATG) wurde unmittelbar hinter die TMV-TE Sequenz für die Translation gesetzt. Zusätzlich beginnt das erste Codon direkt nach dem Initiator-Methionin mit einem G, wodurch die Effizienz der Translation gefördert wird<sup>[87]</sup>. Ebenfalls wurde in den konstanten Teil des N-terminalen offenen Leserahmens (ORF) noch ein weiteres Codon für ein Methionin platziert, um eine alternative Translationsinitiation zu ermöglichen und eine Signalverstärkung durch den Einbau von radioaktiv markiertem Methionin zu erzielen.

### *Restriktionsschnittstellen*

Da nach der Selektion die erhaltene DNA in ein passendes Plasmid kloniert werden muss, wurden entsprechende Restriktionsschnittstellen bereits in die Ausgangsbibliothek eingefügt. Zudem können so die konstanten Regionen im Bedarfsfall ausgetauscht werden, ohne dass die Bibliothek neu synthetisiert werden muss. In die Sequenz wurden die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme KpnI (G'GTACC = Gly-Thr) und BamHI (GGATC'C = Gly-Ser) jeweils in die 3'- bzw. in die 5'-Seite außerhalb der randomisierten Region eingebaut. Die Motive wurden so gewählt, dass sie auf Proteinebene für Aminosäuren kodieren, die keine entscheidenden strukturellen Einflüsse auf die Sekundär- und Tertiärstruktur haben (Gly, Ser und Thr). Es wurden zwei unterschiedliche Restriktionsschnittstellen ausgewählt, um sowohl das 5'- als auch das 3'-Ende unabhängig von einander modifizieren zu können, sollte dies für eine Fehlersuche oder bei einer Änderung der Selektionsstrategie nötig sein. Zudem können so Probleme bei der Klonierung vermieden werden.

### *Konstantes Cystein*

Direkt vor die randomisierte Region wurde ein Codon, welches für Cystein kodiert (TGT) integriert, um so einen fixierten Aminosäurerest, der eine SH-Funktion trägt in das Protein einzuführen. Der randomisierte Bereich wurde danach so gestaltet, dass mindestens ein weiteres Cystein enthalten sein soll, damit die Möglichkeit der konformationellen Stabilisierung der Peptide über eine Disulfidbrücke gegeben ist.

### *Affinitätsanker*

Zur Erleichterung der Aufreinigung der Peptide ist es sehr hilfreich, diese mit einer entsprechenden Ankersequenz (*Tag*) für eine Affinitätschromatographie zu versehen. In den C-terminalen Teil der Bibliothek wurde deshalb die Sequenz für einen 6x Histidin-Tag<sup>[88]</sup> (CATCATCATCACCACCAT) eingebettet. Dadurch ist die Reinigung über Metallionenchelatisierung an Ni-NTA Agarose möglich.

### Allgemeines

In der RNA sollten lange Bereiche mit Uracil-Basen möglichst vermieden werden, da es sonst während der Ligation der RNA mit dem Puromycin-Linker unter Umständen zu Fehlhybridisierungen mit dem Poly(dA) Teil des Linkers kommen kann. Außerdem kann das entstehende doppelsträngige RNA-DNA-Hybrid mitgeschleppt werden und wird dann als Substrat von der endogen im Kaninchenretikulozytenlysat vorkommenden RNase H erkannt, was zu einer Zerstörung des mRNA Display Templats führen kann.

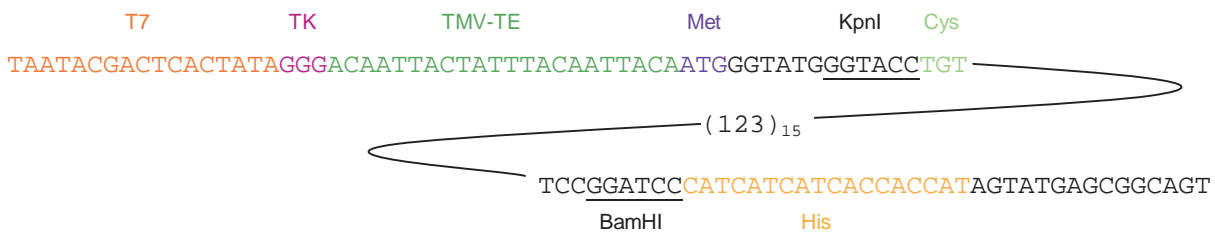
Da das 3'-Ende der RNA für die C-terminale Region des Peptids kodiert ist die Sequenz, sowohl der RNA wie auch des Proteins zum einen für die Ligation mit dem Splint als auch für die Bildung der mRNA Display Proteine von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurde mittels eines Computeralgorithmus<sup>[89,90]</sup>, der im Internet verfügbar ist (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/form1.cgi>) die Faltung des Splints und der RNA überprüft, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, welche die Ligation stören könnten. Es wurde unter anderem darauf geachtet, dass das 5'- und das 3'-Ende der RNA nicht intramolekular hybridisieren, um eine problemlose Bindung in das Ribosom zu gewährleisten. Nach der erfolgten Translation wird das Peptid über seinen C-Terminus mit der mRNA verknüpft. Diese Verknüpfung kann erleichtert werden, indem der C-Terminus Aminosäuren enthält, die keine ausgeprägte Tendenz zur Ausbildung von Strukturen besitzen. In diesem Fall wurde als Spacer die Sequenz Ser-Gly-Ser gewählt. Zudem wurde noch ein weiteres Methionin eingebaut, um zusätzliche Radioaktivität in die Peptide zu inkorporieren und somit das Signal zu verstärken. Das ATG-Codon hierfür wurde jedoch erst nach dem Histidin-Tag eingefügt, um bei Fehlinitiationen eine Aufreinigung über den Affinitätsanker zusammen mit den vollständig translatierten Peptiden unmöglich zu machen. Weiterhin wurde eine Sequenzfolge eingebettet, die dann ein STOP-Codon beinhaltet, wenn es zu einer Verschiebung des Leserahmens um -1 oder +1 kommt (CAT'AGT'ATG'AGC). Bei einer Insertion entsteht auf RNA-Basis UAG, bei einer Deletion UGA. Wenn eine solche Leserasterverschiebung auftritt werden diese translatierten Peptide vor der Bindungsknüpfung mit dem Puromycin aus dem Ribosom entlassen und werden somit nicht mit aufgereinigt.

Unter Berücksichtigung aller oben genannten Betrachtungen ergab sich das in **Abbildung 8** gezeigte Schema für die Sequenz der Bibliothek.



**Abbildung 8:** Schema für die DNA-Sequenz der kompletten Bibliothek (TK = Transkriptionsstart, TMV-TE = Tabakmosaikvirus *translation enhancer*).

In **Abbildung 9** ist zusammenfassend die komplette Sequenz der DNA-Bibliothek auf der Ebene der Nucleobasen gezeigt.



**Abbildung 9:** Sequenz der DNA-Bibliothek, wobei T7 = T7 RNA-Polymerase-Promotorsequenz, TK = Transkriptionsstart, TMV-TE = Tabakmosaikvirus-*translation-enhancer*-Sequenz, Met = Startcodon, Cys = fixiertes Cystein, His = Histidin-Tag, Restriktionsschnittstellen für KpnI und BamHI sind unterstrichen; 123 - Codonpositionen 1, 2 und 3 des Aminosäure-Triplets.

### Randomisierte Region

Der randomisierte Bereich der Bibliothek, wurde auf eine Länge von 15 Aminosäuren festgelegt. Dies entspricht einem kodierenden DNA-Bereich von 45 Basen, wobei jeweils drei Basen zu einem Codon-Triplett zusammengefasst werden, welche schließlich für eine Aminosäure kodieren. Da es für die DNA maximal 4 unterschiedliche Baustein-Variationen gibt ergeben sich hier maximal  $4^{45}$  unterschiedliche Moleküle, was in etwa  $10^{27}$  entspricht. Diese Menge ist allerdings technisch nicht synthetisierbar und stellt deshalb nur eine hypothetische Zahl dar. Es darf allerdings hier nicht die Komplexität der DNA betrachtet werden, sondern die der Aminosäuresequenz, welche bei der gegebenen Länge und dem Vorkommen von 20 verschiedenen natürlichen Aminosäuren gleich  $20^{15}$  ist. Daraus ergeben sich etwa  $33 \cdot 10^{18}$  unterschiedliche Moleküle. Durch die Degeneriertheit des genetischen Codes jedoch, d. h. einzelne Aminosäuren werden durch mehrere Codon-Triplets kodiert, ist diese Zahl noch reduziert. Die hohe Anzahl möglicher, voneinander unterschiedlicher Moleküle übersteigt allerdings bei weitem die Kapazität der Synthese und somit kann davon ausgegangen werden, dass jedes synthetisierte Molekül genau einer Sequenz entspricht.

### Aminosäureverteilung

Da die Herstellung von DNA-Oligonukleotiden an einem Syntheseautomaten durchgeführt wird, ist es möglich, den Einbau der einzelnen Basen in Form der jeweiligen Phosphoramidite an jeder Position des Oligonukleotids genau zu bestimmen und statistisch zu steuern. Wird nun an einer Position nicht eine definierte Base in der Synthese vorgegeben und eingesetzt, sondern ein Gemisch aus allen vier Bausteinen, so resultiert dabei für jede Codonposition eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für ein Auftreten aller 20 Aminosäuren in jeder Triplett-Position der randomisierten Region. Durch geeignete Wahl der Zusammensetzung der Basenmischungen für die Synthese kann die statistische Aminosäureverteilung jedoch

beeinflusst werden. Die Häufigkeit von STOP-Codons, die einen Translationsabbruch verursachen, kann zum Beispiel verringert werden, was sich allerdings auf die Häufigkeit von anderen Aminosäuren auswirkt. Tryptophan und Methionin zum Beispiel werden bei Verringerung der STOP-Codon-Wahrscheinlichkeit ebenfalls stark zurückgedrängt.

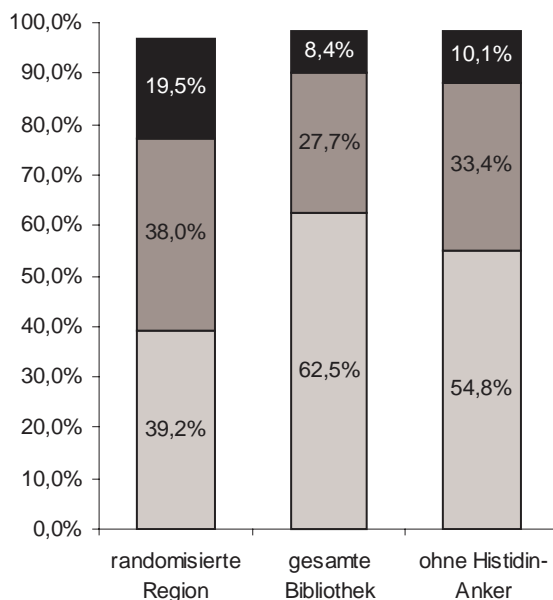
Es ist allerdings nicht zwingend notwendig, die Zahl der STOP-Codons zu minimieren, da später Sequenzen, die STOP-Codons enthalten durch die Selektion entfernt werden. Deshalb wurde hier darauf geachtet, dass alle Aminosäuren ausreichend vorhanden waren, obwohl der Anteil an STOP-Codons leicht erhöht war. Um nach der Translation die Möglichkeit einer Zyklisierung der Peptide über eine Disulfidbindung zu ermöglichen, wurde die Basenverteilung so gewählt, dass mindestens ein weiteres Cystein in der 15 Aminosäure langen randomisierten Sequenz eingefügt wurde. Hierzu musste die Wahrscheinlichkeit für Cystein bei mindestens 7.7% liegen. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass der Anteil der hydrophilen Aminosäuren über dem der hydrophoben liegt, um eine gute Löslichkeit des Peptids zu gewährleisten. Die gewünschte Aminosäureverteilung wurde mit Hilfe eines im Internet zur Verfügung stehenden Computer-Algorithmus<sup>[91]</sup> ermittelt (<http://gaiberg.wi.mit.edu/cgi-bin/CombinatorialCodons>). Die prozentuale Verteilung der Aminosäuren innerhalb des randomisierten Bereich ist in **Tabelle 2** aufgelistet.

<b>Aminosäure</b>	<b>%</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>%</b>
<u>Hydrophile AA</u>		<u>Hydrophobe AA</u>	
Serin	8.9	Cystein	7.7
Tyrosin	7.8	Leucin	6.9
Glycin	7.7	Phenylalanin	4.8
Histidin	5.4	Valin	4.8
Asparagin	4.4	Tryptophan	3.5
Threonin	2.6	Alanin	3.2
Glutamin	2.4	Prolin	3.2
<u>Geladene AA</u>		Isoleucin	2.7
Arginin	9.7	Methionin	1.2
Asparaginsäure	5.4	<u>Stop</u>	
Glutaminsäure	2.4	STOP	3.5
Lysin	2.0		

**Tabelle 2:** Aminosäureverteilung in der randomisierten Region.

Die gezeigte Verteilung ist eine Kompromisslösung über viele Parameter. Schon kleine Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung haben einen großen Einfluss auf die gesamte Verteilung. Auffällig ist der relativ hohe Anteil an Serin, Tyrosin, Glycin und Arginin, der

jeweils über 7% liegt. Unter der Prämisse, alle Aminosäuren gleich wahrscheinlich zu machen und den Cysteinanteil entsprechend auf 7.7% einzustellen ist diese Verteilung jedoch akzeptabel. Zudem wurde versucht, Aminosäuren mit ähnlichen Seitenketten in ein ausgewogenes Verhältnis zu bringen. Ein geringer Anteil an Threonin (2.6%) wurde durch einen erhöhten Anteil an Serin (8.9%) ausgeglichen. Ebenso ein niedriger Gehalt an Alanin (3.2%) und Isoleucin (2.7%) durch höhere Anteile von Glycin (7.7%) bzw. Leucin (6.9%). Unter den gleichen Gesichtspunkten wurden Arginin (9.7%) und Lysin (2.0%) ausgeglichen. Einzig Methionin bleibt mit einem Anteil von 1.2% etwas unterrepräsentiert, was sich allerdings unter dem Vorbehalt, die STOP-Codon-Wahrscheinlichkeit nicht noch weiter zu steigern, vertreten lässt. Die Verteilung der einzelnen Aminosäuregruppen, sowohl in der randomisierten Region als auch über das gesamte Protein hinweg sind in **Abbildung 10** gezeigt.

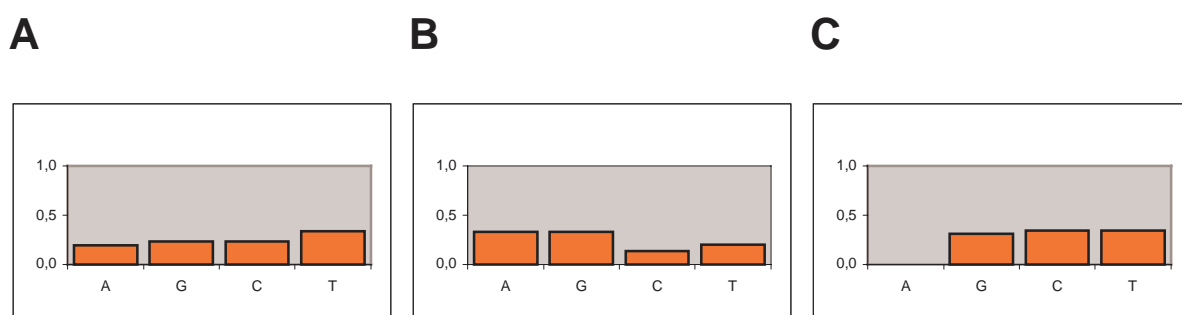


**Abbildung 10:** Aminosäureverteilung (schwarz – geladene AA, dunkelgrau – hydrophobe AA, hellgrau - hydrophile AA) der randomisierten Region, der gesamten Sequenz (konstante Regionen sind mit berücksichtigt) der Bibliothek, sowie der Bibliothek ohne den Histidin-Anker im Vergleich.

Man erkennt, dass sich unter Berücksichtigung der konstanten Bereiche der Bibliothek das Verhältnis hin zu einem Übergewicht an hydrophilen Aminosäuren verschiebt. Dies ist ein durchaus gewünschter Effekt der zur Aufreinigung eingesetzten Sequenz und entsteht durch das Hinzufügen der 6 Histidin-Reste. Nach der Selektion sollen diese aus der Peptidsequenz entfernt werden, wobei statistisch noch die in **Abbildung 10** gezeigte Verteilung bestehen bleibt. Der Anteil an geladenen und hydrophilen Aminosäuren liegt dann bei 64.9%, wodurch

eine leichte Wasserlöslichkeit des durchschnittlich erwarteten Peptids gewährleistet sein sollte.

Unter Zuhilfenahme des oben genannten Programms wurden die Zusammensetzungen der einzelnen Basenmischungen für jede Position des Codon-Triplets optimiert. Diese sind in **Abbildung 11** dargestellt. In der ersten Codonposition findet sich ein ausgeglichenes Verhältnis von G und C (23.4%), der Anteil an A ist erniedrigt (19.2%), der an T erhöht (34%). Für die zweite Position errechnete sich ein in etwa ausgeglichenes Verhältnis von A und G (33.2% bzw. 32.9%). Die Menge an C ist mit 13.5% stark erniedrigt. Der Anteil an T liegt bei 20.4%. Auffällig ist, dass für die dritte Codonposition kein A verwendet wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit für STOP-Codons zurückgedrängt wird (zwei der 3 STOP-Codons besitzen ein A an der dritten Codonposition). Die drei restlichen Basen werden in einem etwa ausgeglichenen Verhältnis eingesetzt (G = 31%; C und T = 34.5%).



**Abbildung 11:** Zusammensetzung der Basengemische der einzelnen Codonpositionen für die Synthese (**A**, **B** und **C** entsprechend den Basenpositionen 1, 2 und 3 des Codon-Triplets).

Phosphoramidit	Molekulargewicht (g/mol)	Massenkorrektur	Korrektur für die Kopplungseffizienz	Gesamtkorrektur
5'-CE-dA	858	0.87	0.67	0.58
5'-CE-dC	834	0.89	0.67	0.60
5'-CE-dG	840	0.89	1.00	0.89
5'-CE-dT	745	1.00	0.83	0.83

**Tabelle 3:** Berechnung der Gesamtkorrekturfaktoren für Phosphoramidite bezüglich ihrer Masse und der Kopplungseffizienz (nach Lit.<sup>[92]</sup>).

Für die Synthese musste zusätzlich noch die unterschiedliche Masse und die Reaktivität (Kopplungseffizienz) der jeweiligen Phosphoramidite berücksichtigt werden<sup>[92]</sup> (siehe **Tabelle 3**).

Um den in **Tabelle 3** aufgelisteten Korrekturen gerecht zu werden, was sich durch eine entsprechend unterschiedlich starke Verdünnung erzielen ließ, wurde jeweils 1 Gramm des ent-

sprechenden Phosphoramidites in einem bestimmten, in **Tabelle 4** gezeigten Volumen Acetonitril gelöst.

Phosphoramidit	Acetonitril (mL)
5'-CE-dA	11.9
5'-CE-dC	12.2
5'-CE-dG	18.1
5'-CE-dT	16.6

**Tabelle 4:** Benötigtes Volumen Acetonitril zum Auflösen der entsprechenden Phosphoramidite.

### 3.1.3 Synthese der Bibliothek

Somit umfasst die Sequenz der DNA-Bibliothek insgesamt 147 Basen (102 konstante und 45 randomisierte Positionen). Deshalb konnte das Oligonukleotid aufgrund der geringen Ausbeuten bei einer solchen Länge in einem einzelnen Syntheseansatz nicht vollständig synthetisiert werden. Darum wurde nur ein Kernstück der DNA-Bibliothek, welches die komplette randomisierte Region enthielt, als einzelsträngige DNA (99-mer) an der Festphase mit dem Oligonukleotidsynthesizer in einem 1  $\mu\text{mol}$  Maßstab synthetisiert. Die fehlenden 5'- und 3'-Enden wurden nach der Aufreinigung in der Amplifikation mittels PCR (siehe 3.1.6.1) über die entsprechenden Primer eingefügt. Für die Herstellung des DNA-Stranges wurden die in **Abbildung 11** genannten Phosphoramiditmischungen für die einzelnen Codonpositionen aus den in **Tabelle 4** aufgeführten, korrigierten Phosphoramiditlösungen vorbereitet und die Synthese am Oligonukleotidsynthesizer durchgeführt.

Etwa 10 Prozent der Synthese wurde in die Entschützung eingesetzt. Anschließend wurde das Material, um die in der Synthese durch unvollständige Abspaltung der Tritylschutzgruppen entstehenden Abbruchfragmente abzutrennen über ein denaturierendes Polyacrylamidgel weiter aufgereinigt. Die Ausbeute an einzelsträngiger DNA lag bei insgesamt 7.5 nmol. Unter der Voraussetzung, dass in der Synthese kein Molekül zweifach hergestellt wurde, kann somit von einer maximalen Diversität von  $4.5 \cdot 10^{15}$  für die Bibliothek ausgegangen werden.

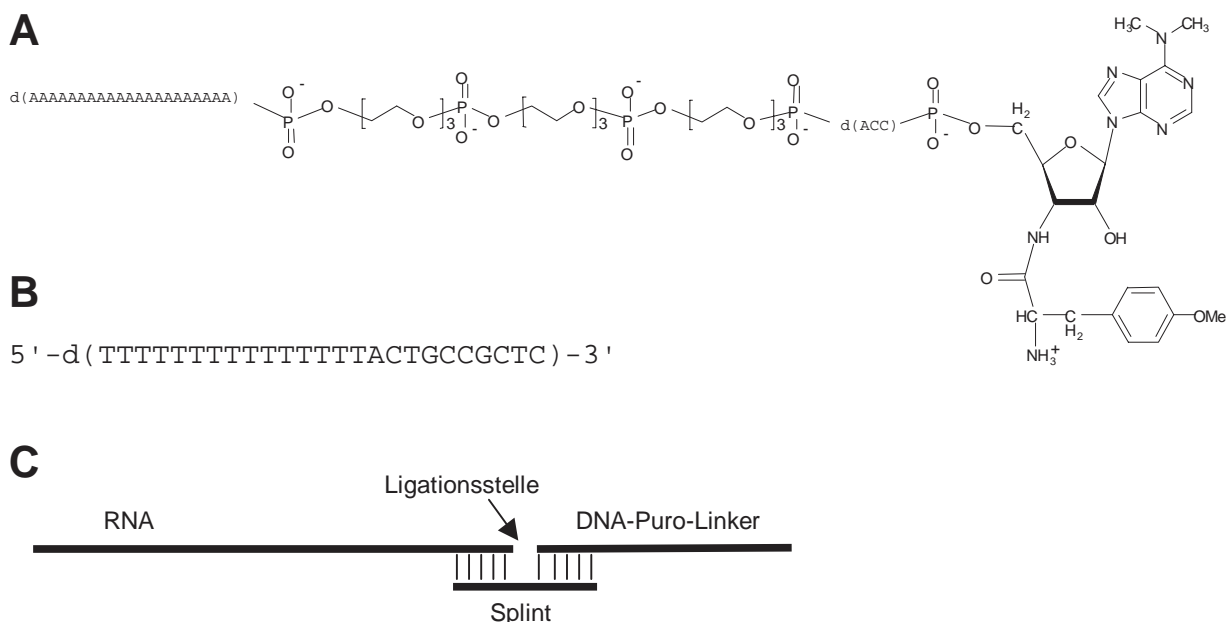
### 3.1.4 Optimierung des Selektionszyklus

Vor Beginn der Selektion wurde jeder einzelne Schritt des Selektionszyklus separat durchgeführt, auf seine Funktion hin überprüft und entsprechend optimiert.

#### 3.1.4.1 PCR

Die Amplifikation von DNA wurde nach dem in 5.2.5.1 angegebenen Protokoll durchgeführt und lieferte unter den gegebenen Standardbedingungen gute Ausbeuten ohne Überamplifikate. Es wurde eine relativ hohe Hybridisierungstemperatur von 55°C gewählt, da die beiden

Primer mit 41 und 55 Nukleotiden relativ lang sind. Im ersten Schritt der PCR liegt der Überlappungsbereich bei nur 20 bzw. 28 Basen, wobei ab dem zweiten Zyklus die Hybridisierung über den gesamten Bereich erfolgt. Somit sollte die Spezifität der Reaktion erhöht und eine reproduzierbare Amplifikation gewährleistet werden.



**Abbildung 12:** (A) Struktur des DNA-Puromycin-Linkers. Links der Poly(dA)-Teil, in der Mitte der flexible Bereich mit jeweils drei Polyethylenglycol-Einheiten und rechts das Puromycin-Molekül. Der eingebettete d(ACC)-Teil soll das 3'-Ende einer tRNA nachahmen. (B) Sequenz des Splint-Oligonukleotids. Über den Poly(dT)-Bereich hybridisiert dieser mit dem Poly(dA)-Teil des DNA-Puromycin-Linkers und mit dem 3'-Ende mit der RNA der Bibliothek. (C) Schematische Darstellung des Ligationsschrittes. Der Splint ist an die mRNA und den DNA-Puro-Linker hybridisiert.

### 3.1.4.2 Transkription

Transkriptionen wurden gemäß den in 5.2.5.2 beschriebenen Angaben durchgeführt. Um die Ausbeute an RNA zu steigern wurde zum Ansatz anorganische Pyrophosphatase gegeben. Diese zerlegt das bei der enzymatischen Synthese aus den Nukleosidtriphosphaten freiwerdende Pyrophosphat und verschiebt somit das Gleichgewicht zugunsten der Produktion von RNA. Unter diesen Bedingungen wurden bei Einsatz von 100 bis 300 pmol dsDNA jeweils 1 bis 3 nmol RNA aus einem 100 µL-Ansatz isoliert, was etwa 10 bis 30 Kopien von jedem RNA-Molekül entspricht.

### 3.1.4.3 Ligation

Der synthetisch hergestellte DNA-Puromycin-Linker (DNA-Puro) trägt am 3'-Ende ein kovalent verknüpftes Puromycin-Molekül. Um nun die Ligation von RNA mit dem DNA-Puro



durchzuführen wurde ein sogenannter Splint verwendet. In **Abbildung 12** sind der Linker und der Splint sowie schematisch die Ligation gezeigt.

Der Splint ist sowohl dem 3'-Ende der RNA als auch dem 5'-Ende des DNA-Puromycin-Linkers komplementär. Dadurch können durch gleichzeitige Hybridisierung die beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle zusammengeführt, zusammengehalten und so mit der T4 DNA Ligase verknüpft werden. Der Splint wirkt quasi als molekulare Schiene, welche die enzymatische Ligation der *blunt ends* erleichtert<sup>[93]</sup>.

In unterschiedlichen Versuchsreihen wurden anhand eines Testtemplates die Reaktionsbedingungen für den Ligationsschritt optimiert. In Vorexperimenten wurde festgestellt, dass in der Ligation ein Überschuss an Linker auf alle Fälle erforderlich ist. In **Tabelle 5** sind die jeweiligen unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und in **Abbildung 13** das dazugehörige Gel der Versuche unter Verwendung von radioaktiv markierter RNA dargestellt.

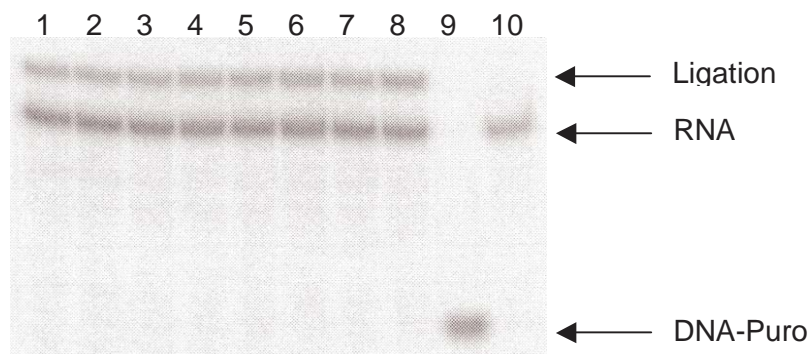
	RNA	DNA-Puro	Splint	Ligase	Ausbeute (%)
1	1	1	1.5	3.2 U/pmol RNA	25.5
2	1	1	3	3.2 U/pmol RNA	23.5
3	1	1	10	3.2 U/pmol RNA	22.4
4	1	1.5	1.5	3.2 U/pmol RNA	27.1
5	1	3	3	3.2 U/pmol RNA	26.6
6	1	8	8	3.2 U/pmol RNA	28.4
7	1	1	1.5	1.6 U/pmol RNA	27.4
8	1	1	1.5	6.4 U/pmol RNA	34.7

**Tabelle 5:** Optimierung der Verhältnisse von RNA zu DNA-Puro und dem Splint. Angaben in  $\mu\text{M}$ .

Auf dem in **Abbildung 13** gezeigten Gel lässt sich erkennen, dass es keinen großen Einfluss auf die Ligationseffizienz hat, wenn das Verhältnis der Reaktionspartner variiert wird. Lediglich eine Erhöhung der Menge der Ligase ergibt eine leichte Steigerung der Ausbeute an ligierter RNA. Die Ligationen lieferten hier durchweg etwa 25 – 35% des gewünschten Produktes. Ein Verhältnis RNA:DNA-Puro:Splint von 1:1:1.5 erwies sich folglich als effektiv und besonders günstig (vgl. 5.2.5.10).

In weiteren Studien, wobei auch Gemische von T4 DNA-Ligase und T4 RNA-Ligase verwendet wurden, konnte die Effektivität weiter gesteigert werden und lag normalerweise im Bereich zwischen 45 und 70%. In der anschließenden Aufreinigung über ein präparatives Polyacrylamidgel und der passiven Elution aus dem Gelmaterial mit nachfolgender Ethanolpräzipitation wurde meist noch Material verloren, so dass die effektive Gesamtausbeute eines Ligationsansatzes bezogen auf das eingesetzte Ausgangsmaterial in der Regel zwischen 25 und 50 Prozent lag. Um die nach der Fällung noch enthaltenen Salze zu entfernen,

was für die spätere Translation von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Ligationsprodukte über eine voräquilibrierte NAP-Säule entsalzt (siehe 5.2.6.3) und das Eluat an einem Gefriertrockner lyophilisiert.



**Abbildung 13:** Optimierung der Ligation. Analytisches Polyacrylamidgel zu den in **Tabelle 5** aufgelisteten Experimenten. Die Nummern der Banden **1 – 8** entsprechen der Numerierung in **Tabelle 5**. Zusätzlich sind in Spur **9** radioaktiv markiertes DNA-Puro und in Spur **10** radioaktiv markierte RNA zum Vergleich aufgetragen.

#### 3.1.4.4 Translation

Die Translation wurde in Kaninchenretikulozytenlysat durchgeführt. Im Retikulozytenlysat sind Ribosomen, tRNA's, tRNA-Synthetasen, sowie EGTA, Kreatinphosphokinase und Hemin enthalten. Die mit HEPES gepufferten Translationsmischung ohne die Aminosäure Methionin enthält noch DTT, Kreatinphosphat und die restlichen 19 Aminosäuren. Das eingesetzte gereinigte mRNA Display Templat wird während der Reaktion an das Ribosom gebunden und das kodierte Peptid synthetisiert, welches schließlich an das Puromycin geknüpft wird. Die finalen Ausbeuten an mRNA Display Peptiden waren jedoch nur sehr gering und lagen in der Regel zwischen 0.1 und 1%. Dies bedeutet, dass nur etwa 1‰ des eingesetzten mRNA Display Templats nach der Translation und der Fusion mit dem Puromycin ein Peptid trägt.

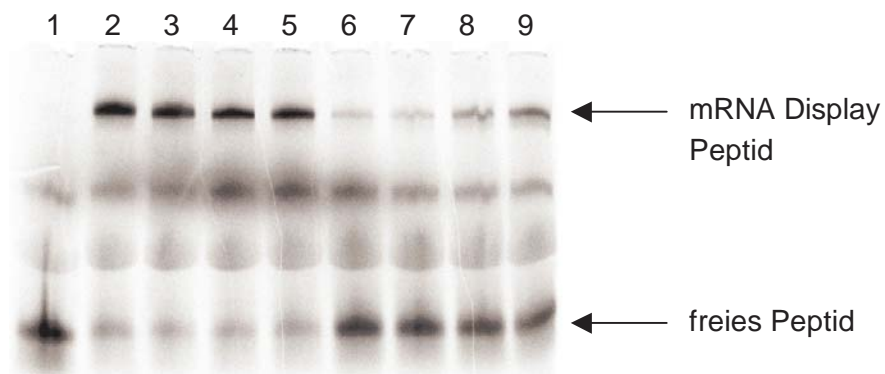
Da die Salzbedingungen in der Translation sehr entscheidend sind, war es unbedingt nötig, das Produkt der Ligation nach der Reinigung noch zusätzlich über eine NAP-Säule zu entsalzen. Zudem konnte so noch eventuell mitgeschleppter Splint abgetrennt werden, der sonst während der Translation wieder an die RNA hybridisieren könnte. Dadurch könnte das mRNA Display Templat durch die im Lysat vorhandene RNase H zerstört werden. Ausgehend von einer Grundkonzentration von 0.5 mM Magnesium und 100 mM Kalium für die Translation wurde die optimale Salzkonzentration sowohl für die Bedingungen während als auch nach der erfolgten Translation ermittelt. Erst durch die Hochsalzbedingungen nach der Translation wurde die Verknüpfung des entstandenen Peptids mit dem Puromycin-Molekül

eingeleitet. Ausgegangen wurde hierbei von einer Endkonzentration von 565 mM Kalium und 50 mM Magnesium.

#### Bestimmung der optimalen Kalium- und Magnesiumkonzentration:

##### *Während der Translation*

In einem ersten Experiment wurde die Konzentration an Magnesium (0.5 mM) konstant belassen und die Konzentration an Kalium im Bereich von 0 bis 250 mM variiert. Dann ließ man die Kaliumkonzentration konstant und die Menge an Magnesium wurde von 0 bis 1 mM variiert. In beiden Fällen wurden nach 1 Stunde Inkubation die Salzbedingungen auf 565 mM Kalium und 50 mM Magnesium erhöht. Hierbei ergaben sich als günstigste Konzentrationen 25 mM für Kalium und 0.25 mM für Magnesium (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 14:** Optimierung von Hochsalzbedingungen. Tricin-SDS Polyacrylamidgel zur Optimierung der Salzkonzentration nach der Translation. In Spur 1 ist das Ergebnis nach der Translation gezeigt. Es ist noch kein Fusionsprodukt zu detektieren, nur das freie Peptid. Die Bahnen 2 – 9 zeigen die Ergebnisse der Zugabe von 300, 400, 500 oder 600 mM Kalium (2 – 5) und von 50, 60, 75 und 100 mM Magnesium (6 – 9). Man erkennt, dass bei der Einstellung von Hochsalzbedingungen die Bande des freien Peptids geringer wird und bei hohem Molekulargewicht, welches etwa dem der RNA entspricht eine neue Bande auftaucht (das Molekulargewicht der RNA von etwa 50 kDa ändert sich nur wenig, wenn diese mit dem Peptid verknüpft ist).

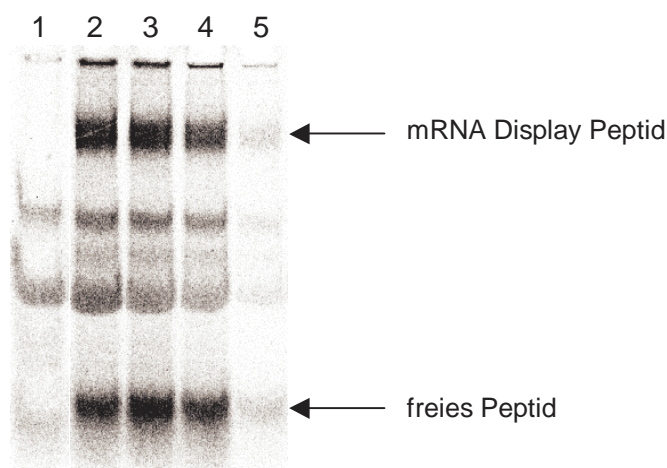
##### *Nach der Translation*

Aufgrund der oben gewonnenen Werte wurden die Salzkonzentrationen für die Inkubation nach der Translation ermittelt. Hierzu wurden Translationen unter diesen Bedingungen durchgeführt und anschließend für die Hochsalzinkubation die Konzentrationen an Kalium von 300 mM bis 600 mM und die Konzentrationen an Magnesium im Bereich von 50 mM bis 100 mM getestet. Die höchsten Ausbeuten an fusionierten Peptiden lieferten hier eine Konzentration von 300 mM Kalium und 100 mM Magnesium (siehe **Abbildung 14**). Diese Konzentrationen wurden somit für alle weiteren Experimente beibehalten. Die prozentuale Verteilung

lung von freiem Peptid und fusioniertem Produkt wurde durch Quantifizierung mit dem Phosphorimager ermittelt.

#### *Lysatanteil*

Vom Hersteller des Lysates wird ein Lysatanteil in der Reaktion von 40% empfohlen. Dennoch wurde eine Untersuchung bezüglich des Lysatanteils durchgeführt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 15** dargestellt.



**Abbildung 15:** Lysatanteil. Gezeigt ist ein Tricin-SDS Polyacrylamidgel für die Verwendung von unterschiedlichen Lysatanteilen während der Translation. Spur 1 zeigt eine Negativkontrolle ohne das mRNA Display Templat, hier entsteht weder das freie Peptid noch das fusionierte Produkt. In den Bahnen 2 – 5 sind Translationsreaktionen mit Lysatanteilen von 40%, 30%, 20% und 10% aufgetragen.

Man kann erkennen, dass bei einem reduzierten Lysatanteil von 30% noch genauso viel mRNA Display Peptide generiert werden, wie unter den empfohlenen Standardbedingungen, weshalb mit diesem niedrigeren Anteil weitergearbeitet wurde. Erst bei weiterer Verringerung der Anteile reduzierte sich die Ausbeute deutlich, was sich bei einem Anteil von nur 10% Lysat als besonders gravierend herausstellte.

#### **3.1.4.5 Affinitätschromatographie**

Nach dem Translations- und dem Fusionsschritt erfolgte die Aufreinigung der Moleküle über Affinitätschromatographien. Dazu wurde zum einen der Poly(dA)-Teil des Linker-Moleküls verwendet (vgl. **Abbildung 12**), sowie der in der Proteinsequenz enthaltene Histidin-Tag (vgl. **Abbildung 8**). Über den Poly(dA)-Teil konnten diejenigen Moleküle durch Hybridisierung an eine Oligo dT Cellulose immobilisiert werden, deren RNA mit dem Linker verknüpft ist. Jedoch wurden gleichzeitig auch alle mRNA Display Templat Moleküle an die Matrix gebunden, die nicht mit dem kodierten Peptid verknüpft waren. Alle Lysatproteine, sowie die

tRNA's und nicht inkorporiertes Methionin konnten so abgetrennt werden. Um nun ausschließlich die mRNA Display Peptide zu gewinnen, wurde eine zweite Affinitätssäule nachgeschaltet, welche über chelatisierte Ni<sup>2+</sup>-Ionen die Imidazolringe des Histidin-Tags bindet. An die Ni-NTA Agarose konnten nur noch Moleküle binden, die den vollständigen Histidin-Anker tragen. Das bedeutet, dass auch alle Peptide, die eine Verschiebung des Leserahmens erfahren haben und deshalb keinen Histidin-Anker mehr besitzen, in diesem Schritt abgetrennt wurden.

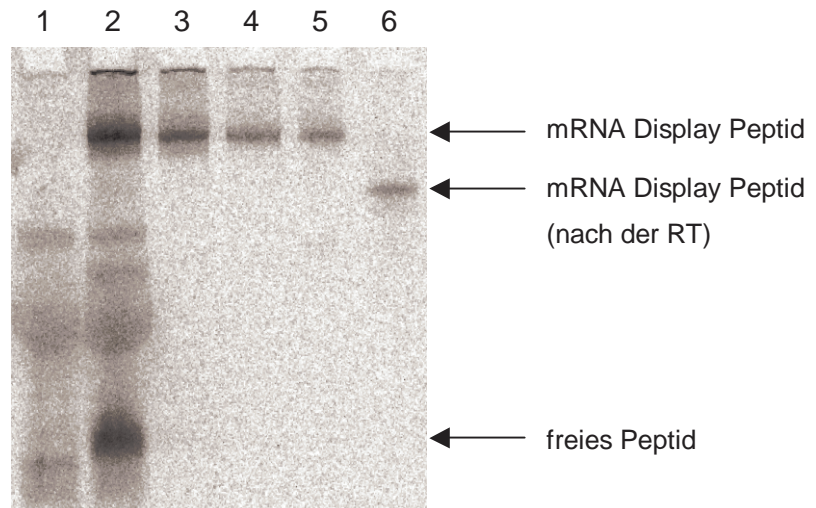
Sowohl die Reinigung über Oligo dT Cellulose, als auch über Ni-NTA Agarose wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, um eine mögliche Degradierung der mRNA Display Peptide zu vermeiden. Von der Oligo dT Matrix wurden die Moleküle durch Zugabe von destilliertem Wasser, was für die Aufschmelzung des RNA/DNA-Hybrids bereits genügend denaturierende Wirkung besitzt wieder eluiert. Bei der Ni-NTA Agarose erfolgte der Elutionsschritt mit einem Puffer, der als kompetitierende Substanz Imidazol enthielt. Die Verluste bei der Affinitätschromatographie mit Oligo dT Cellulose waren in der Regel sehr gering und normalerweise konnten 80 – 95% des Ausgangsmaterials wieder gewonnen werden. Die Ausbeuten bei der Ni-NTA Reinigung lagen niedriger und lieferten Werte zwischen 50 und 70 Prozent. Die Ausbeuten wurden jeweils über die Intensität der Banden auf einem Tricin-SDS Polyacrylamidgel bestimmt. Da es sich bei der vorliegenden Bibliothek um relativ kurze Peptide handelt, die in den Möglichkeiten zur Ausbildung von Tertiärstrukturen beschränkt sind, konnte davon ausgegangen werden, dass der Histidin-Tag bei den gegebenen Verhältnissen für die Immobilisierung an die Säulenmatrix frei zugänglich war. Somit konnte auf denaturierende Bedingungen während der Reinigung mittels Ni-NTA Agarose verzichtet werden. Nach dem zweiten Reinigungsschritt wurde das Eluat zuerst zur Komplexierung eventuell eluierter Ni<sup>2+</sup>-Ionen mit EDTA-Lösung auf 5 mM eingestellt und daraufhin zur Vorbereitung für die reverse Transkription über eine NAP-Säule entsalzt.

#### **3.1.4.6 Reverse Transkription**

Durch die reverse Transkription (RT) wurde die noch als Einzelstrang vorliegende mRNA in einen doppelsträngigen RNA/DNA-Hybridstrang überführt. Durch diesen Schritt sollte verhindert werden, dass die einzelsträngige mRNA Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbildet, was unter Umständen zur Selektion eines Nukleinsäureaptamers statt dem gewünschten Peptidaptamer führen könnte. Der gebildete Doppelstrang liegt als Helix vor, die keine Faltungen und Möglichkeiten zur Ausbildung von dreidimensionalen Bindungsmotiven besitzt. Diese Helix steht quasi als langer Stock vom verknüpften Peptid weg. Ein zusätzlicher Effekt, in der Duplexbildung besteht in der erhöhten Stabilisierung des gesamten Nukleinsäureteils, was für die Selektion von Vorteil ist. Aus beiden genannten Gründen wurde die RT im Gegensatz zur klassischen Aptamerselektion bereits vor dem Selektionsschritt durchgeführt.

Die RT wurde nach den in 5.2.5.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt, wobei als Primer der Splint aus der Ligation verwendet wurde. Die Reaktionskontrolle erfolgte anschließend über ein Tricin-SDS Gel. Obwohl das mRNA Display Molekül durch die Ausbildung des

Doppelstrangs ein höheres Molekulargewicht besitzt, sieht man auf dem Gel eine Verschiebung zu höherer Mobilität (siehe **Abbildung 16**). Zum einen kann dies durch die geordnete Struktur der Helix und zum anderen durch die starke Erhöhung der negativen Ladungen erklärt werden.



**Abbildung 16:** Reinigung und RT. Dargestellt ist ein Tricin-SDS Gel der einzelnen Reinigungsschritte mit anschließender RT. In Spur 1 ist eine Negativkontrolle ohne mRNA Display Templat gezeigt, in Spur 2 das Ergebnis nach der Translation: man erkennt die Bande des freien Peptids und des mRNA Display Peptids. Die Bahnen 3 bis 5 enthalten jeweils eine Probe nach der Oligo dT Reinigung (3), der Ni-NTA Reinigung (4) und nach der Entsalzung über eine NAP-Säule (5). In Spur 6 ist das zu höherer elektrophoretischer Mobilität verschobene Produkt nach der RT gezeigt.

Der denaturierende Effekt in SDS Gelen wirkt sich nur auf den Protein-Anteil der mRNA Display Moleküle aus, der sich durch die RT nicht ändert. Durch die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges wird jedoch über das neu gebildete Phosphatrückgrat pro eingebauter Base eine zusätzliche negative Ladung in das Molekül integriert, was zu dem gezeigten Effekt führen kann.

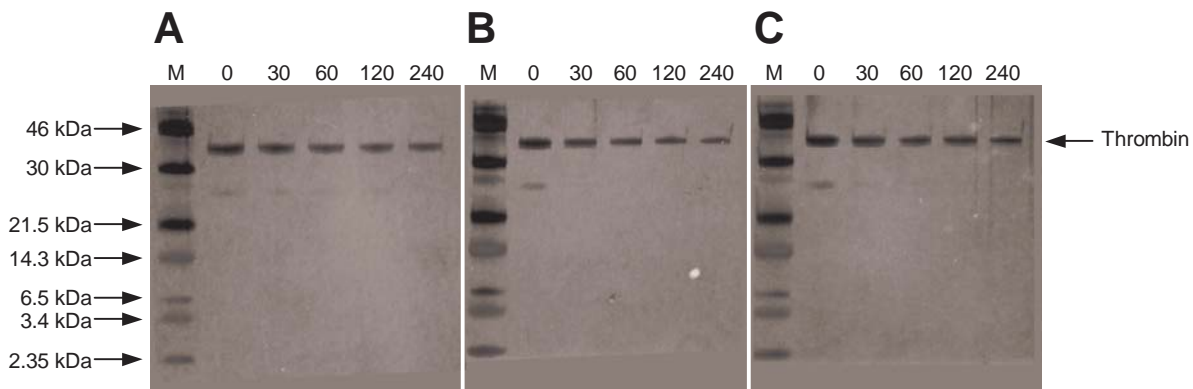
### 3.1.5 Vorbereitungen

Nachdem die einzelnen Schritte, die zur Herstellung der Bibliothek für die Selektion führen optimiert waren, wurde die Stabilität des Zielmoleküls bzw. seine Immobilisierung auf einer geeigneten Trägermatrix untersucht.

#### 3.1.5.1 Stabilität und Reinheit von Thrombin

Um sowohl Reinheit als auch die Stabilität von kommerziell erhältlichem Thrombin (Cell Systems) zu testen wurden Proben bei einer Konzentration von 5 µg/mL in 150 µL Volumen bei

4°C, 25°C und 37°C für 4 Stunden inkubiert. Nach jeweils 30, 60, 120 und 240 Minuten wurden Aliquots entnommen und auf einem Tricin-SDS Gel analysiert (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 17:** Stabilität und Reinheit. Gezeigt sind die Tricin-SDS Gele zur Stabilität von Thrombin bei verschiedenen Temperaturen. Inkubation erfolgte für jeweils 240 Minuten bei 4°C (**A**), 25°C (**B**) und 37°C (**C**). Als Größenstandard wurde ein *Low Range Protein Marker* mit den angegebenen Proteingrößen aufgetragen (jeweils Spur **M**).

Man erkennt, dass das Protein über die Zeit nicht degradiert. Die Abnahme der Intensität der Banden ist durch Bindung des Proteins an die PE-Wand des Reaktionsgefäßes zu erklären. Dies kann grundsätzlich auch mit den Peptiden der Bibliothek passieren. Diese sind jedoch viel kleiner, bieten weniger Kontaktfläche und sind zudem relativ hydrophil, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen zurückgedrängt werden. Das Thrombin-Protein ist demnach bei allen getesteten Temperaturen gleich stabil. Für alle weiteren Experimente wurde bei Raumtemperatur (25°C) gearbeitet. Über den relativ kurzen Zeitraum eines Selektionsinkubationsschritts der Bibliothek mit dem *Target* (ca. 1 Stunde) ist somit die Qualität des Proteins hinreichend gewährleistet.

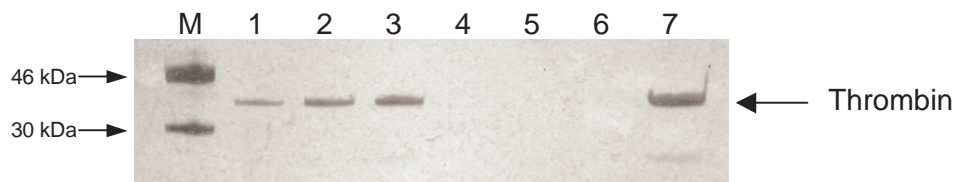
Bei den in **Abbildung 17** gezeigten Gelen wird zudem das Molekulargewicht von Thrombin, nämlich 36.7 kDa bestätigt (vgl. dazu **Anhang**). Die leichte Bande bei etwa 26 kDa entspricht der B-Kette des Thrombins, welche durch die Spaltung der Disulfidbrücke bei der Denaturierung mit SDS freigesetzt wird. Die ebenfalls dabei entstehende weitaus kürzere A-Kette ist aufgrund ihrer geringen Größe nicht zu detektieren.

### 3.1.5.2 Vorbereitung der Selektionsmatrix

Das Sepharose-Säulenmaterial wurde wie unter 5.2.9.1 beschrieben hergestellt indem das Thrombin-Protein an die Matrix gekoppelt wurde. Nachdem die freien reaktiven Gruppen durch das primäre Amin Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan geblockt waren, wurde die Matrix nach Umpufferung in Selektionspuffer bei 4°C gelagert. Für die Kontrolle der Vollständigkeit der Kopplung wurden sowohl davor als auch danach Proben der Proteinlösung entnom-

men und auf ein Tricin-SDS Gel aufgetragen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 18** dargestellt.

Da die Kopplungseffizienz bei fast 100% lag, konnte die Konzentration des immobilisierten Thrombins, ausgehend von einer Anfangskonzentration von 1 mg/mL gequollener Matrix zu 27  $\mu\text{M}$  berechnet werden.



**Abbildung 18:** Kopplung an die Matrix. Dargestellt ist ein Tricin-SDS Gel zur Analyse der Kopplungseffizienz mit der Sepharose-Matrix. Der Längenmarker (**M**) verdeutlicht die Größen der Proteine. In Spur **1**, **2** und **3** sind 50, 100 und 250 ng Thrombin vor der Kopplung und in den Bahnen **4**, **5** und **6** die gleichen Mengen nach der Kopplung aufgetragen. Die Bande in Spur **7** verdeutlicht eine 240-fach höhere Menge an aufgetragenem Protein, wie in Spur **4**. Die Kopplung ist somit nahezu vollständig, der Anteil an nicht auf der Matrix immobilisiertem Thrombin vernachlässigbar.

Zur Herstellung einer nicht-derivatisierten Matrix für eine Präselektion wurde Sepharosematerial unter den identischen Bedingungen behandelt nur ohne den Zusatz des Proteins.

### 3.1.5.3 RNase-Test

Vor der Selektion wurden alle Puffer in ausreichender Menge hergestellt und auf eine eventuelle RNase-Aktivität untersucht (siehe 5.2.5.9). Weil auf den Gelen keine Degradation festgestellt und somit eine Kontamination mit RNasen ausgeschlossen werden konnten, wurde mit der eigentlichen Selektion begonnen.

### 3.1.5.4 Codonanalyse der Startbibliothek

Für die Analyse der Start-Bibliothek wurden 36 Sequenzen ausgewertet (siehe **Anhang**). Zuerst sollte die tatsächliche Aminosäureverteilung mit der aus dem Design verglichen werden. Dazu wurden insgesamt 493 Codonpositionen analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Die erhaltene Aminosäureverteilung weicht in einigen Positionen von der gewünschten ab. Dennoch bleibt die Grundtendenz dabei erhalten. Aminosäuren mit relativ großen Abweichungswerten ( $\geq \pm 1.2$ ), wie z. B. Glycin, Histidin, Leucin und Arginin, besitzen schon einen hohen Prozentanteil im Design, der durch die gefundenen Werte nicht entscheidend beeinflusst wird. Ungewöhnlich ist, dass der Anteil an Cystein relativ stark unterschritten wird. Positiv zu bewerten ist demgegenüber die geringe Zahl der gefundenen STOP-Codons. Der Wert liegt bei weniger als der Hälfte. Die Ungenauigkeiten liegen vermutlich bei der Vorbereitung der Phosphoramiditgemische für die Synthese. Bereits kleine Abweichungen in der Zu-



sammensetzung der Gemische haben einen entscheidenden Einfluss auf die Verteilung der Aminosäuren. Zudem haben die sequenzierten Klone schon einen vollen Präparationszyklus durchlaufen, d. h. es lag schon ein gewisser Selektionsdruck vor, der sich auf das Vorkommen gewisser Aminosäuren auswirken konnte.

Aminosäure	Häufigkeit	Erhalten	Gewünscht	Abweichung	
A	21	4,3%	3,2%	+1,1	
C	28	5,7%	7,7%	-2,0	
D	20	4,1%	5,4%	-1,3	
E	13	2,6%	2,4%	+0,2	
F	24	4,9%	4,8%	+0,1	
G	49	9,9%	7,7%	+2,2	
H	36	7,3%	5,4%	+1,9	
I	17	3,5%	2,7%	+0,8	
K	15	3,0%	2,0%	+1,0	
L	43	8,7%	6,9%	+1,8	
M	7	1,4%	1,2%	+0,2	
N	16	3,3%	4,4%	-1,1	
P	14	2,8%	3,2%	-0,4	
Q	10	2,0%	2,4%	-0,4	
R	42	8,5%	9,7%	-1,2	
S	48	9,7%	8,9%	+0,8	
T	14	2,8%	2,6%	+0,2	
V	18	3,7%	4,8%	-1,1	
W	17	3,5%	3,5%	±0,0	
Y	33	6,7%	7,8%	-1,1	
STOP	8	1,6%	3,5%	-1,9	
<b>TOTAL</b>	<b>493</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>		-2 -1 0 1 2

**Tabelle 6:** Codonanalyse der Start-Bibliothek. Insgesamt wurden 493 Codons sequenziert und die kodierten Aminosäuren ermittelt. Angegeben ist die jeweilige Aminosäure, wie oft diese gefunden wurde und die Abweichung von der gewünschten Verteilung.

## 3.1.6 Durchführung der Selektion

### 3.1.6.1 Large Scale PCR

Wie unter 3.1.4.1 beschrieben wurde die *Large Scale* PCR durchgeführt und das Produkt anschließend zweimal aufeinanderfolgend einer G-50 Gelfiltration (siehe 5.2.6.4) unterworfen. Dadurch wurden die freien Nukleotide und Primer abgetrennt. Die Fraktionen wurden über Nacht lyophilisiert und die DNA anschließend in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  Wasser aufgenommen. Insgesamt wurden aus 4 nmol einzelsträngiger DNA 15.9 nmol der doppelsträngigen DNA-Bibliothek gewonnen. Dies entspricht in etwa einer Vervierfachung des Ausgangsmaterials und eine Pool-Kopie ist somit knapp 4 nmol dsDNA äquivalent.

### 3.1.6.2 Large Scale Transkription

Für die Transkription im großen Maßstab wurden 8 Ansätze zu je 100  $\mu\text{L}$  mit insgesamt 1270 pmol des doppelsträngigen DNA-Templats angesetzt (vgl. 5.2.5.2). Somit wurden als Ausgangsmaterial ungefähr  $1.9 \cdot 10^{14}$  verschiedene Moleküle eingesetzt. Nach der Aufreinigung über denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurden insgesamt 17.4 nmol RNA isoliert. Dies entsprach etwa 13.7 Kopien einer jeden Sequenz aus der DNA-Bibliothek, veränderte aber die Diversität nicht.

### 3.1.6.3 Large Scale Ligation

Das unter 3.1.6.2 hergestellte Material wurde komplett in 7 Ligationsansätzen zu jeweils 2.5 nmol verwendet. Nach der PAGE-Reinigung, Ethanolpräzipitation und Entsalzung über eine NAP-Säule konnten insgesamt 4 nmol mRNA Display Templat gewonnen werden. Die Diversität nahm in diesem Schritt allerdings auf etwa  $4.4 \cdot 10^{13}$  unterschiedliche Moleküle ab.

### 3.1.6.4 Large Scale Translation

Die Translation im großen Maßstab wurde in insgesamt 8 mL Volumen bei einer Konzentration des mRNA Display Templats von 500 nM durchgeführt (siehe 5.2.5.14). Die 4 nmol des unter 3.1.6.3 isolierten Templats wurden hierfür vollständig eingesetzt.

Diese Translation wurde daraufhin, wie in den Protokollen 5.2.6.1 und 5.2.6.2 beschrieben durch Affinitätschromatographien an Oligo dT Cellulose und Ni-NTA Agarose aufgereinigt, revers transkribiert (siehe 5.2.5.3) und anschließend über eine NAP-10 Säule in Selektionspuffer überführt. Über die Auswertung der in die Translation eingesetzten und der nach der Reinigung zurückgehaltenen Radioaktivität konnte die Ausbeute an mRNA Display Peptiden zu 11 pmol berechnet werden, was in diesem Fall noch einer Diversität von  $1.2 \cdot 10^{11}$  verschiedenen Molekülen entsprach.

In **Tabelle 7** sind die unter den Punkten 3.1.6.1 bis 3.1.6.4 dargestellten Ergebnisse noch einmal schematisch zusammengefasst.

Material	Reaktion	Menge	Diversität
ssDNA		4 nmol	$2.4 \cdot 10^{15}$
	⇒ PCR		
dsDNA		15.9 nmol	
	⇒ davon eingesetzt		
dsDNA		1.270 nmol	$1.9 \cdot 10^{14}$
	⇒ Transkription		
mRNA		17.4 nmol	
	⇒ Ligation		
mRNA Display Templat		4 nmol	$4.4 \cdot 10^{13}$
	⇒ Translation		
mRNA Display Peptide		0.011 nmol	$1.2 \cdot 10^{11}$

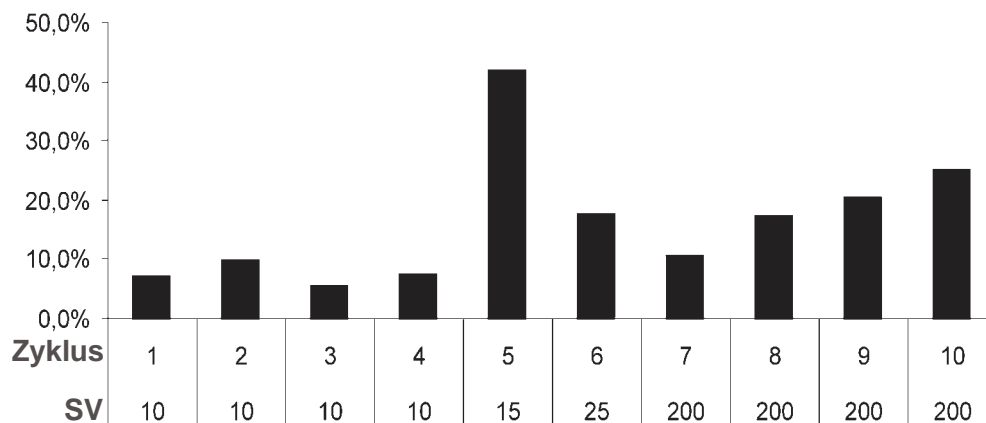
**Tabelle 7:** Zusammenfassung über die Herstellung der mRNA Display Peptid Bibliothek für die Selektion.

### 3.1.6.5 Selektionsverlauf

Im ersten Zyklus der Selektion wurden die in 3.1.6.4 hergestellten und gereinigten mRNA Display Peptide in einem Volumen von 1.5 mL Selektionspuffer mit 150  $\mu$ L der gewaschenen Selektionsmatrix nach dem unter 5.2.9.2 beschriebenen Protokoll bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abfiltriert und die Matrix mit 10 bis 200 Säulenvolumina (SV) Selektionspuffer nachgewaschen. Anschließend wurden die gebundenen mRNA Display Peptide unter denaturierenden Bedingungen mit Elutionspuffer (Harnstoff, SDS) eluiert, die Fraktionen vereinigt, mit Ethanol gefällt und mittels PCR amplifiziert. Die so gewonnene dsDNA wurde dann in einen neuen Selektionszyklus eingesetzt. Dieser Prozess wurde insgesamt 10 mal wiederholt, in den Runden 2 bis 10 wurde jedoch nur noch jeweils ein Volumen von 1 mL für die Translation verwendet und das Säulenvolumen der derivatisierten Matrix auf 100  $\mu$ L verringert. Der gesamte Verlauf der Selektion ist in **Abbildung 19** dargestellt.

In den ersten vier Zyklen wurde nur wenig Radioaktivität respektive der markierten mRNA Display Peptide auf der Selektionsmatrix detektiert (7 – 10%). Im Zyklus 5 wurde das Waschvolumen geringfügig von 10 auf 15 Säulenvolumen (SV) erhöht und trotzdem ergab sich hier bereits eine erste Anreicherung auf knapp 42% aller mRNA Display Peptide, die an die Selektionsmatrix binden konnten. Das Waschvolumen wurde im folgenden Zyklus auf 25 SV gesteigert, was einen Rückgang der Bindung auf etwa 18% zur Folge hatte. Im nächsten Zyklus wurde vor der Elution mit 200 SV Selektionspuffer gewaschen, wodurch erneut eine geringere Bindung detektiert wurde (~10%). Die Bindung stieg in den weiteren drei Zyklen

bei jeweils 200 SV Waschvolumen wiederum auf knapp 25%. Schließlich wurde die DNA aus dem zehnten Zyklus für die Sequenzierung vorbereitet.



**Abbildung 19:** Selektionsverlauf. Dargestellt ist der Verlauf der Selektion bezogen auf die Bindung der Bibliothek an die Selektionsmatrix im jeweiligen Zyklus. Die Balken repräsentieren den an die Säulenmatrix gebundenen Anteil der Gesamtradioaktivität. Angegeben sind die Zyklenzahl und das Waschvolumen in jedem Zyklus in Säulenvolumen (SV).

### 3.1.6.6 Sequenzierung

Den in 5.2.5.11, 5.2.5.12 und 5.2.7 beschriebenen Protokollen folgend wurde die dsDNA aus dem letzten Zyklus mit Restriktionsenzymen geschnitten, kloniert und anschließend zu Monoklonen vereinzelt, wovon insgesamt 72 gepickt wurden. Zuerst wurden die gereinigten Plasmide der Klone getestet, ob sie das Insert tragen. Dazu wurde mittels des T7-Primers und des Universalprimers eine PCR direkt aus dem Plasmid heraus durchgeführt. Untersucht wurde dabei, aus welchen Plasmiden sich ein DNA-Stück mit passender Länge (ca. 200 bp) herausamplifizieren lässt. Teilweise trugen die Plasmide jedoch keine insertierte DNA und bei manchen schien eine Doppelligation des Vektors vorzuliegen, da hier Amplifikate von >2500 bp erhalten wurden (Daten nicht gezeigt). Die positiv getesteten Klone wurden anschließend gemäß 5.2.5.13 sequenziert. Die einzelnen Sequenzen wurden ausgelesen und mit dem im Internet verfügbaren Hilfsprogramm (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) in den Aminosäurecode übersetzt, mittels des Programms Clustalw (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) hinsichtlich von Sequenzhomologien abgeglichen und schließlich unter Zuhilfenahme des Boxshade-Servers ([http://www.ch.emblnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.emblnet.org/software/BOX_form.html)) zur besseren Übersichtlichkeit eingefärbt. In **Abbildung 20** sind die erhaltenen Sequenzen (siehe **Anhang**) bereits in der Umschrift in die Proteinsequenz dargestellt.

Insgesamt wurden aus 57 analysierten Klonen 45 unterschiedliche Sequenzen identifiziert. Die Sequenz des Klons T10-11 wurde dabei 8 mal (14%) gefunden, andere hingegen, wie zum Beispiel T10-23 oder T10-39 nur 2 mal. Wieder andere traten nur einmal auf und zeigten nur noch wenig Sequenzübereinstimmungen. Man könnte sagen, dass die Selektion noch nicht stringent genug durchgeführt wurde, da die Diversität noch relativ hoch zu sein scheint. Dennoch ist bei der Analyse der Sequenzen folgendes besonders bemerkenswert. Bei 32 Klonen konnte das kurze, nur 4 Aminosäuren lange Sequenzmotiv DPGR festgestellt werden. Rechnet man die 4 Sequenzen, die hier nur Punktmutationen aufweisen mit hinzu, so enthalten 63% der analysierten Klone dieses hochkonservierte Motiv. Durch die Selektion hat sich also dieses Motiv durchgesetzt, während die anderen Aminosäurereste noch nicht definiert festzuliegen scheinen.

T10-46 --YFCMGQICFLRFALH--- (2)	T10-49 ---NHNLMNDPGRFFWHD--
T10-05 -FYESCENS DPGRTYA----	T10-33 -YTYSNDFTDGGRHIL----
T10-20 -FHESCENS DPGRTYA----	T10-12 -DYVSDVCRDGGRIML----
T10-17 -YTHSSKSSDPGRKLW----	T10-16 --YFDPGFCVFTSDHLA---
T10-44 --DYSNES SDPGR- LWHC--	T10-63 ---YDAGFCNYDRDHWP--
T10-21 DFDNMF SNLDPGR- HW---- (2)	T10-27 YNSLSGRSLHPDIGF-----
T10-39 FFDRYDSARDPGR- LL---- (2)	T10-32 -DNYKLCE SDVGRLLF----
T10-06 -ERNYND FCDPGRGGL---- (2)	T10-31 -WFVYIDRWAYASFRH----
T10-28 -ERNYND FCDPGRFGL----	T10-66 --YVYLLRHDQHSYYP---
T10-11 -ERNYND FCDPGRVGL---- (8)	T10-60 --YLHVVEIERHRIRFF---
T10-38 -ERNYND FCN PGRVGL----	T10-57 -WEIYWHLEFAGFDRV----
T10-09 -ERNYND LCDPGRVGL----	T10-14 ---YALIYAVKKRMGLAH--
T10-25 -WRHYNPSDDPGRVHL----	T10-35 --WQRCGMAEFIWHFQW---
T10-30 --EYTNDYDDPGR T LSG---	T10-61 ---YGHCFENFGDSFEHN--
T10-54 -RNYTNPYCDPGRQHE----	T10-62 --DYWAFWRVYFQVDGY---
T10-23 -----ERHNDPGRYFVEYET (2)	T10-02 --LYVRRSTAHIFVYAN---
T10-47 -HGPDVNHADPGRYFD----	T10-59 -WLVCRH SKRYNCIFL----
T10-52 -LHLSDHFD PGRTVW----	T10-68 ---LRLVGS D HNFDAVVC--
T10-58 -LVDCISHDDPGRSVG----	T10-37 -YMSFTRRTE SDKLHS----
T10-43 ----DINYCDPGRDCDGH-	T10-26 ---DRSPRMFYNR FNSAL--
T10-24 --DSYCELTDPGRWISA---	T10-13 ---LNWPNNLEGRDPYNR--
T10-29 -EPCCENRDVGR LIH----	T10-41 --DRSILVPRYFELWAN---
T10-22 ----EFNQWEDPGRMRVGC--	

**Abbildung 20:** Sequenzierung. Hier dargestellt sind die aus der Sequenzierung von 72 Klonen erhaltenen unterschiedlichen Sequenzen. Zur Übersichtlichkeit sind nur die 15 Aminosäuren des randomisierten Bereichs wiedergegeben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Häufigkeit der jeweiligen Sequenz. Einzelne Aminosäuren sind gemäß ihrer Konserviertheit farbig unterlegt. Hochkonservierte Positionen sind schwarz hinterlegt und Austausche von Aminosäuren innerhalb der gleichen Gruppe (hydrophil oder hydrophob) grau.

Die Lage des DPGR-Motivs innerhalb der randomisierten Region ist nicht genau festgelegt, es scheint jedoch eine Position in der Nähe des C-terminalen Bereichs bevorzugt zu sein. Zudem ist in 24 der 45 unterschiedlichen Sequenzen mindestens ein zweites Cystein inner-

halb der 15 Random-Aminosäuren zu finden, was für 53% aller Sequenzen zutrifft. Die im Design der Bibliothek gestellte Forderung nach einem weiteren Cystein pro Sequenz wurde also nicht ganz erfüllt, was durch die Selektion beeinflusst sein könnte. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Klone T10-11 (ERNYNDFCDPGRVGL) und T10-39 (FFDRYDSARDPGRLL), sowie T10-35 (WQRCGMAEFIWHFQW) ausgewählt. Die beiden ersten enthalten das identifizierte DPGR-Motiv, der letztgenannte stammt zwar aus der Selektion, besitzt dieses Motiv jedoch nicht und soll deshalb als Kontrollsequenz dienen. Die Sequenzen von T10-11 und T10-35 enthalten zusätzlich noch einen zweiten Cysteinrest, über den eine Zyklisierung und damit eine Strukturstabilisierung möglich sein kann.

Für Kontrollexperimente wurde ein Klon, der als P-11 bezeichnet wurde, aus den Sequenzen der Start-Bibliothek ausgewählt. Dieser besitzt bei der Sequenzfolge VRIAASRISTNNKYF keine übereinstimmenden Aminosäuremotive mit den oben genannten Sequenzen, die selektiert wurden.

### 3.1.6.7 Sequenzanalyse

Die ausgewählten Peptide besitzen keine Sequenzübereinstimmung mit den natürlichen Proteinen, welche mit humanem  $\alpha$ -Thrombin interagieren (**Tabelle 1**). Um nun zu überprüfen, ob andere Proteine aus der GenBank diese Sequenzmotive besitzen, wurde eine Suche mittels BLAST<sup>[94]</sup> durchgeführt. Wegen der kurzen Sequenzen, die in die Suche eingesetzt wurden, musste der „Expect“-Wert von 10 in der Standardeinstellung auf 10.000 bzw. 100.000 erhöht werden, um die statistische Schwelle der Signifikanz zu erweitern. Hier konnte jedoch kein Protein identifiziert werden, welches die komplette Sequenz beinhaltet. Zwar wurden Proteine gefunden, die Übereinstimmungen in der Sequenz zeigen, doch fehlt den Proteinen der Bezug zum humanen Blutgerinnungsfaktor Thrombin. Die Suche mit BLAST liefert einen Wert (*E Value*), der auf der Übereinstimmung in der Sequenz beruht (*Score*) und die Aussagekraft des Ergebnisses widerspiegelt. Ein Wert von 1 ist damit der Wahrscheinlichkeit zuzuordnen, dass in einer Bibliothek der aktuellen Größe (ca. 1.013.000 Sequenzen) eine weitere Sequenz mit demselben *Score* rein zufällig gefunden wird.

Die GenBank wurde also auf die beiden Sequenzen der randomisierten Regionen von T10-11 und T10-39 durchsucht, sowie jeweils nach den unten (siehe 3.2.3.2) beschriebenen Minimalmotiven. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit sind die erhaltenen Ergebnisse in **Tabelle 8** dargestellt, wobei jeweils nur die ersten 4 Sequenzen mit den niedrigsten *E Values* angegeben sind. Für völlige Übereinstimmungen an allen Aminosäurepositionen liegen diese Werte in der Regel bei  $10^{-7}$  und noch kleiner.

	Sequenz	E Value	Protein
<b>T10-11 CERNYNDFCDPGRVGL</b>			
1	5 YNDFCDPGRVGL 16 YN FC PG+ G+ 32 YNHFCSPGQAGV 43	885	KIAA1668 protein [Homo sapiens]
2	1 CERNYNDFCDPGRVGL 16 CE Y + C PGR+G+ 76 CECEYINTCPPGRIGI 91	1472	Collagen alpha chain [Caenorhabditis elegans]
3	2 ERNYNDFC 9 ERNY DFC 382 ERNYKDFC 389	1668	UvrD-helicase, UvrD/REP helicase [Bacillus anthracis A2012]
4	3 RNYNDFCDPG 12 R Y D CDPG 28 RTYQDPCDPG 37	2469	Satellite RNA 48 kDa protein [tomato black ring virus]
<b>T10-11 Minimal CDPGRV</b>			
1	1 CDPGRV 6 CDPGR+ 746 CDPGRM 751	24899	Oar protein [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]
2	1 CDPGRV 6 CDPGR+ 1222 CDPGRI 1227	36245	similar to gamma-E-crystallin - mouse [Mus musculus]
3	1 CDPGRV 6 CDPG+V 143 CDPGQV 148	36855	hypothetical protein XP_119336 [Homo sapiens]
4	1 CDPGRV 6 CDPG++ 99 CDPGKI 104	38106	Alcohol/other dehydrogenases, short chain type [Caenorhabditis elegans]
<b>T10-39 CFFDRYDSARDPGRLL</b>			
1	5 RYDSARDPGRLL 16 RYD A DPGRL+ 675 RYDLALDPGRLLI 686	800	integrin alpha X (Cd11c) [Rattus norvegicus]
2	2 FFDRYDSARDPGRLL 15 + DR D R+PGRL 304 YIDRLDPEREPGRLL 317	1613	2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase [Streptomyces sp.]
3	4 DRYDSARDPGRLL 15 +R DS R+PGRL 256 ERLDSKREPGRLL 267	1654	PhzC [Pseudomonas chlororaphis]
4	2 FFDRYDSARDPGRLL 16 F D +D+ RD GR+L 300 FIDNHDTQRDNGRVL 314	1668	alpha amylase [Zabrotes subfasciatus]

	Sequenz	E Value	Protein
<b>T10-39 Minimal</b>	<b>RDPGRL</b>		
1	1 RDPGRL 6 RDPGRL 746 RDPGRL 751	33623	Na+/H+ antiporter protein [Bos taurus]
2	1 RDPGRL 6 RDPGRL 115 RDPGRL 120	53203	conserved hypothetical protein [Pyrobaculum aerophilum]
3	1 RDPGRL 6 RDPGR+ 183 RDPGRI 188	66646	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]
4	1 RDPGRL 6 RDPGR+ 611 RDPGRI 616	81422	CG5503 gene product [Drosophila melanogaster]

**Tabelle 8:** Dargestellt sind die Ergebnisse der BLAST-Suche auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz der selektierten Peptide mit Proteinen aus der GenBank. Im Fettdruck ist jeweils die Sequenz angegeben, die in die Suche eingespeist wurde. Zu jeder Suche sind 4 Sequenzen mit den *E Values* und der Herkunft angegeben. Jede gefundene Sequenz ist mit der Suche verglichen, wobei ein + einer Übereinstimmung innerhalb derselben Aminosäurekategorie (z.B. hydrophil, hydrophob) entspricht. Die Zahlen geben die Position der Sequenz innerhalb des Proteins wider.

## 3.2 Charakterisierung

### 3.2.1 Bindungsstudien

#### 3.2.1.1 Synthese der Konstrukte

Zunächst wurde die Bindung der freien Peptid-Aptamere an die Selektionsmatrix untersucht. Dazu mussten die entsprechenden Konstrukte der Klone auf der Ebene der DNA vorbereitet werden. Die Sequenzen der einzelnen Klone wurden durch automatisierte Oligonukleotidsynthese hergestellt und anschließend durch den Einsatz von verschiedenen Primern amplifiziert.

```

Klon:   H2N - M G M G T C X15 S G S H H H H H H S M S G S - COOH
His-:  H2N - M G M G T C X15 S G S S M S G S - COOH
end-:  H2N - M G M G T C X15 S G S - COOH

```

**Abbildung 21:** Sequenzen der verkürzten Konstrukte der Peptide.

Der 5'-Primer mit dem T7 Promotor war jeweils identisch und auf der 3'-Seite wurde einmal der 3'-Primer für die Bibliothek, der um den Histidin-Tag verkürzte Primer (His<sup>-</sup>) und der Primer ohne das komplette 3'-Ende (end<sup>-</sup>) eingesetzt. Somit konnten von jedem Klon 3 ver-

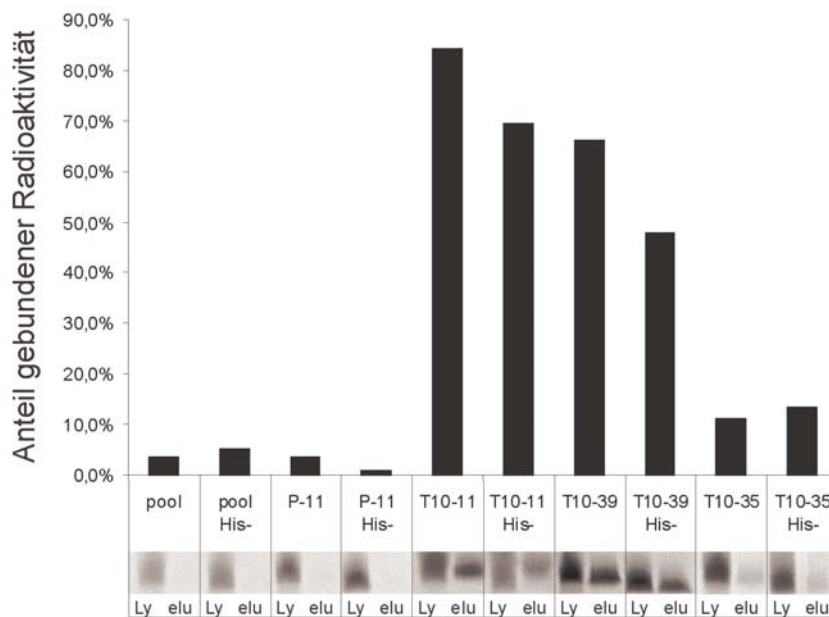


schieden lange Konstrukte gewonnen werden. Die dsDNA der Konstrukte wurde in eine Transkription eingesetzt und die zugehörige RNA isoliert. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Konstrukte sind zur Übersicht in

**Abbildung 21** aufgelistet.

### 3.2.1.2 Relative Bindung

Zur Ermittlung der Bindung der einzelnen Peptide der verschiedenen Klone wurde die unter 3.2.1.1 gewonnene RNA verwendet. Diese wurde direkt, d.h. ohne vorherige Ligation mit dem DNA-Puromycin-Linker in eine Translation eingesetzt. So konnte das freie Peptid der jeweiligen Sequenz generiert werden, welches sich im Retikulozytenlysat des Ansatzes befand. Gemäß dem unter 5.2.10 beschriebenen Protokoll wurden die Peptide auf die Bindung an die Selektionsmatrix hin untersucht. Zudem konnte auf diese Weise gleichzeitig gewährleistet werden, dass der RNA- bzw. der DNA-Teil keinen Einfluss auf die Bindung der Peptide hat. Die Ergebnisse eines exemplarischen Experiments sind in **Abbildung 22** dargestellt.

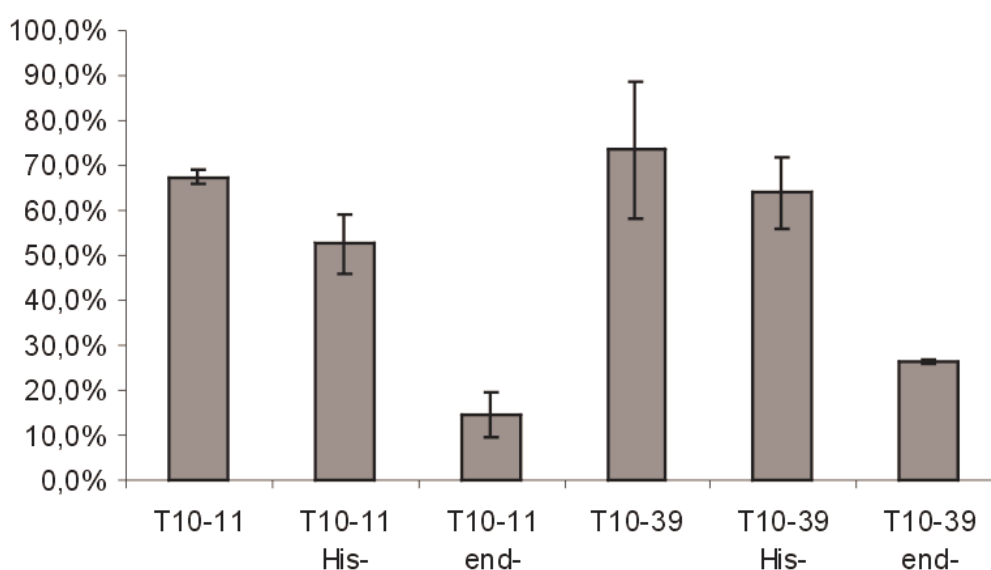


**Abbildung 22:** Bindung an die Säulenmatrix. Im Diagramm verdeutlichen die Balken die Bindung der freien  $^{35}\text{S}$ -markierten Peptide der einzelnen gezeigten Konstrukte an die Thrombin-derivatisierte Sepharose. Unter dem jeweiligen Balken ist die entsprechende Analyse über ein Tricin-SDS Gel gezeigt (Ly = Peptid im gesamten Lysat, elu = eluiertes Peptid).

Die relative Bindung wurde durch Integration am Phosphorimager ermittelt und auf das jeweilige Experiment normalisiert. Man kann erkennen, dass sowohl die unselektierte Bibliothek (*pool*) als auch die monoklonale Sequenz P-11 aus der Startbibliothek nicht oder nur

vernachlässigbar an die Matrix binden. Demgegenüber liegt der Anteil der gebundenen Radioaktivität beim Klon T10-11 bei über 80%. Selbst die Entfernung des Histidin-Tags hat keinen entscheidenden Einfluss auf die Bindung und verringert diese nur um etwa 10 Prozent. Ein ähnliches Verhalten zeigen die Peptide des Klons T10-39. Die Bindung an die Säulenmatrix ist hier jedoch etwas geringer. Der Klon T10-35 stammt zwar aus der angereicherten Bibliothek, trägt jedoch nicht das konservierte DPGR-Motiv und zeigt deswegen nur wenig Bindung an die Matrix. Somit bestätigt sich hier, dass das DPGR-Motiv für die Bindung von entscheidender Bedeutung ist.

Um die gefundenen Erkenntnisse zu bestätigen wurden die Experimente für die Klone T10-11 und T10-39 wiederholt und die Ergebnisse sind in **Abbildung 23** zusammengefasst.



**Abbildung 23:** Bindungsanalyse der freien Peptide der einzelnen dargestellten Konstrukte.

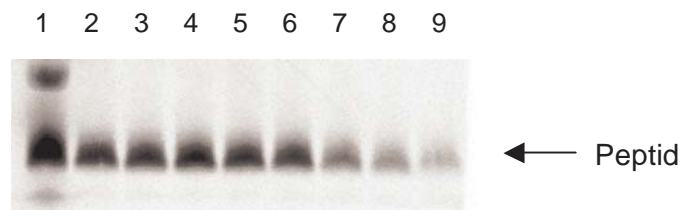
Die oben gewonnenen Daten werden gut bestätigt. Die Bindung ist im allgemeinen etwas geringer, was aber durch eine Verkleinerung des Reaktionsansatzes bedingt sein kann. Die Tendenz, dass die Entfernung des Histidin-Ankers eine geringe Abnahme der Bindung bewirkt ist ebenfalls ersichtlich. Eine komplette Entfernung des C-terminalen Endes hingegen reduziert die Bindung entscheidend. Jedoch muss hier die extrem erniedrigte Translationseffizienz der C-terminal verkürzten Peptide in Betracht gezogen werden.

### 3.2.1.3 Kompetitionsstudien

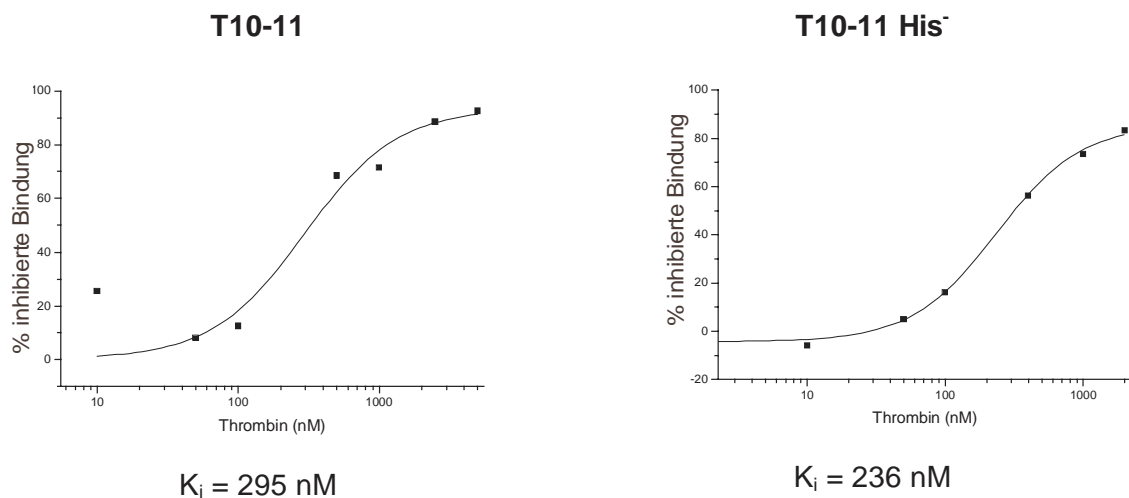
Unter den beschriebenen Bedingungen wurden ebenfalls Kompetitionsstudien durchgeführt. Dazu wurde zu den einzelnen Ansätzen Thrombin in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben (siehe 5.2.10). Durch das zugesetzte freie Thrombin wurde das Peptid schon in

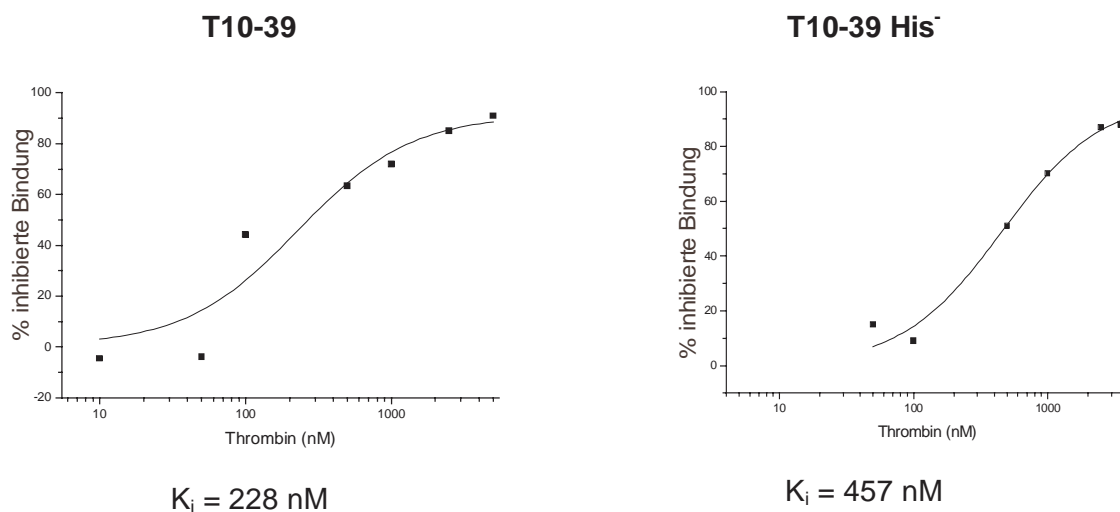
Lösung gebunden und dadurch die Immobilisierung an der Säule verhindert. Mit steigenden Thrombinkonzentrationen wurde so eine immer geringere Bindung detektiert. Aus der Konzentration des Thrombins und dem Anteil des von der Säule eluierten Peptid lies sich so eine entsprechende Inhibitionskonstante von Thrombin für jedes der Peptidkonstrukte errechnen. Exemplarisch ist hierfür ein Gel für den Klon T10-39 His<sup>-</sup> in **Abbildung 24** dargestellt.

Für diesen Klon erkennt man deutlich die Abnahme der Menge des eluierten Peptids bei steigender Konzentration von Thrombin. Die dazugehörigen Graphen der weiteren Versuche sind in **Abbildung 25** vereinigt.



**Abbildung 24:** Kompetitionsstudie für T10-39 His<sup>-</sup> mit Thrombin in Lösung. In Spur 1 ist das Lysat aufgetragen und in den Spuren 2 – 9 die Eluate von der Thrombinmatrix. Dabei wurde in den Bahnen 3 – 9 Thrombin in den folgenden Konzentrationen zugegeben: 1, 10, 50, 100, 400, 1000 und 2000 nM.





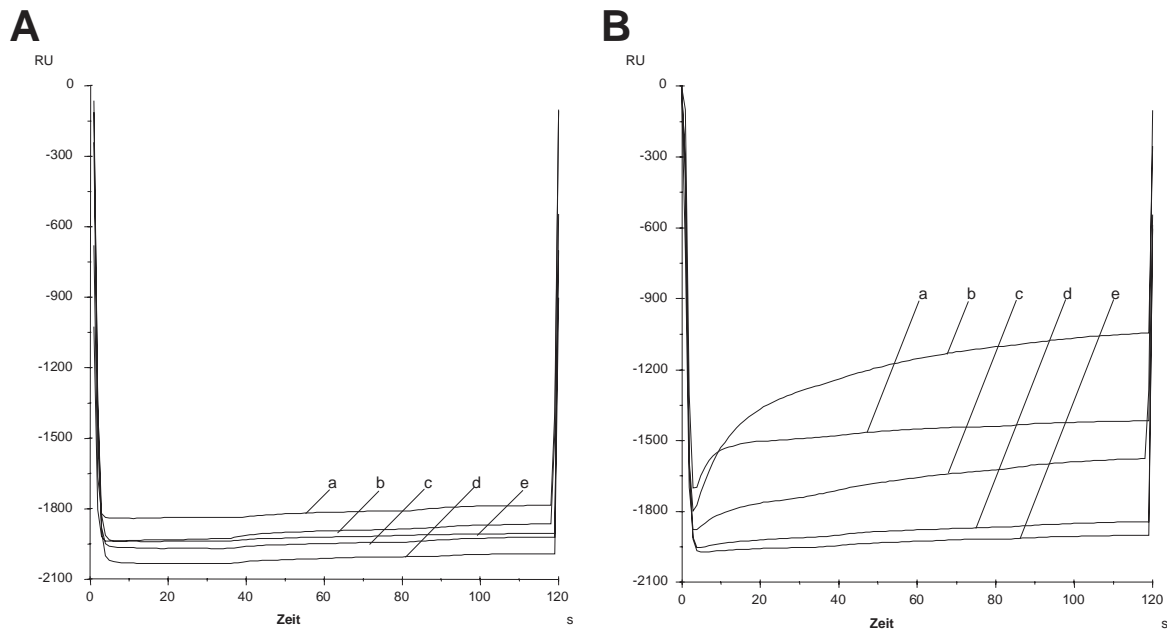
**Abbildung 25:** Wettbewerbsstudien mit freiem Thrombin. Aufgetragen sind jeweils die Konzentration an Thrombin gegen die prozentuale Inhibition. Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) ermittelt sich aus der Konzentration bei halbmaximaler Inhibition.

Die Werte für die ermittelten Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) liegen alle etwa im selben Bereich (ca. 250 nM). Nur bei dem Konstrukt T10-39 His<sup>-</sup> ist diese deutlich erhöht (~450 nM). Man kann deshalb hier von einer stärkeren Bindung des Konstrukts an die Matrix ausgehen, da eine etwa doppelt so hohe Konzentration an Thrombin notwendig ist, um dieses von der Säule zu verdrängen. Zudem lassen die Werte schon einen ersten Eindruck von den zu erwartenden  $K_d$ -Werten gewinnen, welche sich in einem ähnlichen Bereich befinden sollten.

## 3.2.2 Oberflächenplasmonresonanz

### 3.2.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) der Peptide mit  $\alpha$ -Thrombin wurde die Technik der Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt. Hierzu wurde ein BIAcore 3000 Gerät verwendet. Die Peptide der Klone T10-11, T10-39 und P-11 ohne den Histidin-Tag wurden synthetisch hergestellt und nach 5.2.11 auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert. Das Kontrollpeptid P-11 ließ sich leicht bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  unter Standardbedingungen koppeln, wobei etwa 1200 *response units* (RU) auf den Chip gebunden wurden. Für die beiden anderen Peptide konnte bei den gewählten Bedingungen jedoch keine Immobilisierung auf den Chip festgestellt werden. Deshalb wurde eine Optimierung des pH-Wertes für die Kopplung durchgeführt (*pH-Scouting*). Die Immobilisierung wurde deshalb bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in einem pH-Bereich von 3.5 bis 5.5 getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 26** dargestellt.



**Abbildung 26:** *pH-Scouting* für die Immobilisierung von T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**), Konzentration jeweils 50 µg/mL. Dargestellt sind die Kurven für die Anreicherung der Peptide auf der Chip-Oberfläche für unterschiedliche pH-Werte (10 mM Acetat-Puffer mit pH 3.5 (**a**), 4.0 (**b**), 4.5 (**c**), 5.0 (**d**) und 5.5 (**e**))

Für das Peptid T10-11 konnte dadurch noch kein optimaler pH-Wert ermittelt werden. Bei allen pH-Werten konnte keine Anreicherung auf der Oberfläche des Chips detektiert werden. Demgegenüber zeigte sich für T10-39 ein pH-Wert von 4.0 als besonders effizient. Um die schlechte Bindung von T10-11 zu kompensieren wurde eine deutlich höhere Konzentration eingesetzt und die Flussrate verringert, um eine längere Kontaktzeit in der Reaktionszelle zu gewährleisten. Für die Immobilisierungen der Peptide wurde schließlich die in **Tabelle 9** gezeigten Parameter verwendet.

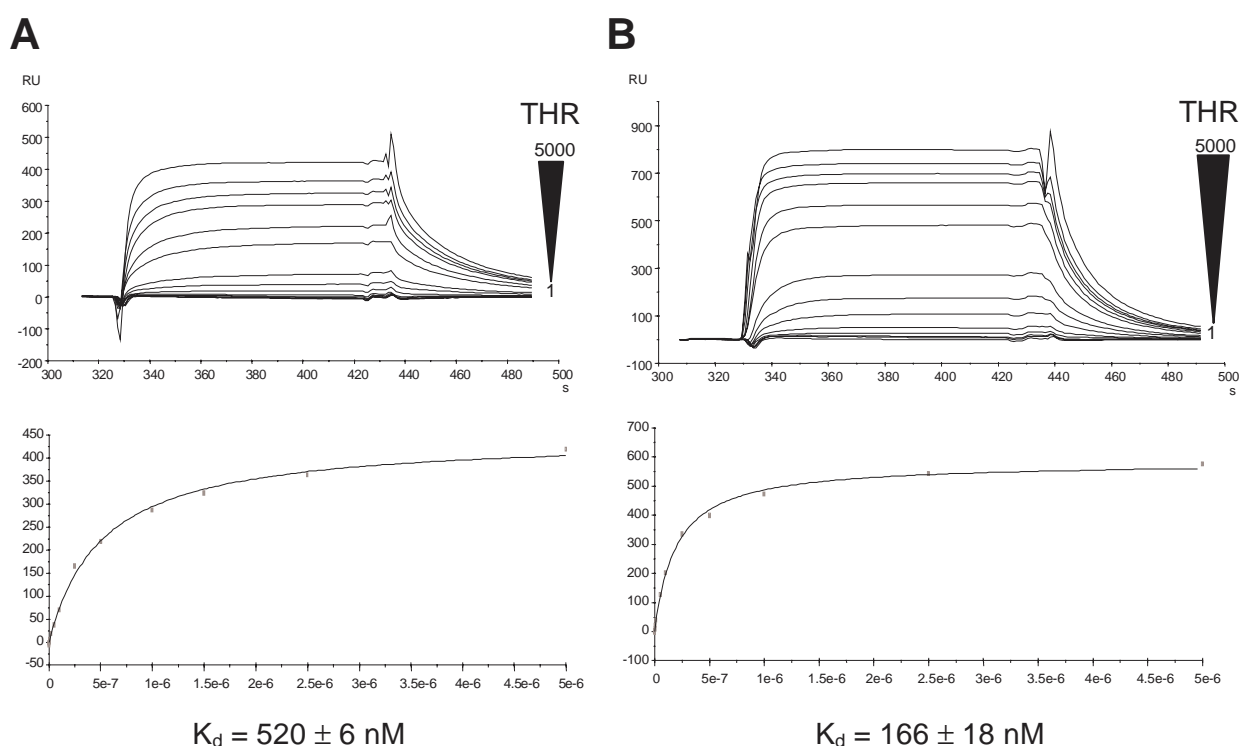
Peptid	pH	Konzentration	Injektionszeit	Flussrate
T10-11	4.0	8 mg/mL	10 min	2 µL/min
T10-39	4.0	100 µg/mL	10 min	5 µL/min
P-11	5.0	50 µg/mL	10 min	5 µL/min

**Tabelle 9:** Immobilisierungsparameter für die Kopplung der jeweiligen Peptide auf den Sensorchip.

Über den so hergestellten Sensorchip ließ man anschließend Thrombinproben in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 1 – 2500 nM fließen. Die entsprechenden Bindungskurven wurden aufgenommen und mittels der BIAevaluation Software über die Verhältnisse

in den Gleichgewichtszuständen ausgewertet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 27** zusammengefasst.

Obwohl der Klon T10-39 nicht am häufigsten in den Sequenzen aus der Selektion vertreten war, zeigt er hier mit einer  $K_d$  von  $166 \pm 18$  nM eine deutlich bessere Bindung an Thrombin als der Klon T10-11 mit einer  $K_d$  von  $520 \pm 6$  nM. Dieses Ergebnis ließ sich schon aus der Auswertung der Bindungsstudien an die Thrombin-derivatisierte Säule erwarten (vgl. 3.2.1.3). Dort war eine höhere Konzentration an Thrombin nötig, um das Peptid von der Bindung zu kompetieren. Zudem stimmen die erhaltenen Werte gut mit den ermittelten Inhibitionskonstanten überein. Im Vergleich mit den durch SELEX evolvierten DNA<sup>[95]</sup>- und RNA-Aptameren<sup>[96]</sup> an Thrombin, die Bindungsaffinitäten von 25 - 200 nM bzw. 9 - 155 nM zeigen, liegen die Werte für die selektierten Peptid-Aptamere im selben Bereich. Weiter lässt sich schlussfolgern, dass die im Klon T10-11 enthaltene Disulfidbrücke nicht zwingend für die Bindung notwendig ist, da der Klon T10-39, welcher zwar das DPGR-Motiv aber nicht die Disulfidbrücke enthält, die besseren Bindungseigenschaften zeigt.

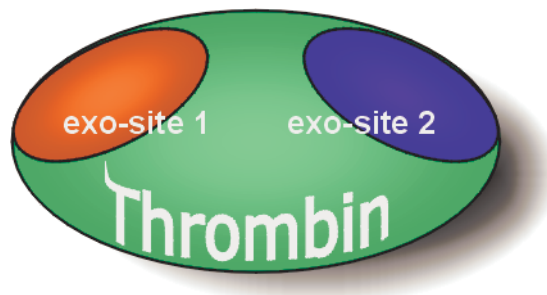


**Abbildung 27:** Oberflächenplasmonresonanz. Gezeigt sind die Bindungskurven von Thrombin (THR, 1 - 5000 nM) an den auf der Chip-Oberfläche immobilisierten Peptiden der Klone T10-11 (**A**) und T10-35 (**B**). Die Keile verdeutlichen jeweils steigende Thrombinkonzentrationen. Im oberen Teil ist die Zeit gegen die Bindungsantwort (*response units* = RU) aufgetragen und im unteren Abschnitt die Konzentration gegen die erhaltenen RU's. Die unten angegebenen  $K_d$ -Werte stellen die Konzentration bei halbmaximaler Sättigung dar.

### 3.2.2.2 Ermittlung des Bindungsepitops

Humanes  $\alpha$ -Thrombin besitzt zwei wichtige anionische Bindungsstellen, welche sich an gegenüberliegenden Seiten des Thrombinmoleküls befinden. Diese Bindungsepitope werden als Exosite-1 und Exosite-2 bezeichnet (siehe **Abbildung 28**).

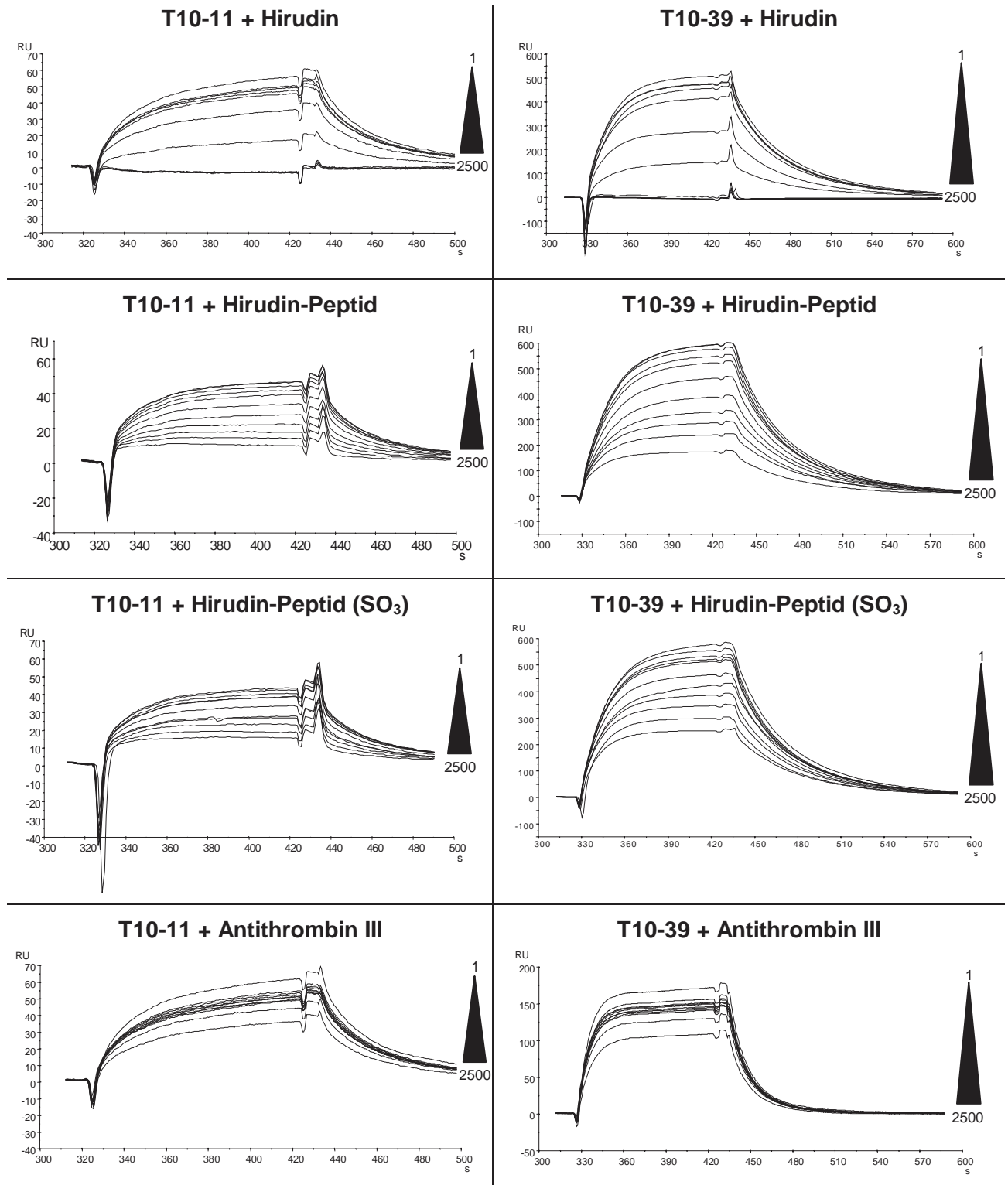
An die Exosite-1 binden zum Beispiel Fibrinogen, Hirudin, Heparin Cofaktor II und Thrombomodulin. An Exosite-2 werden unter anderem Antithrombin III, Haemadin oder Platelet Glycoprotein Iba gebunden (vgl. **Tabelle 1**). Zur Ermittlung des Epitops, welches von den Peptiden am Thrombin erkannt wird, wurden nun Kompetitionsstudien in Lösung durchgeführt. Als repräsentative Beispiele wurden Hirudin und Antithrombin III als Binder für die beiden Exo-Stellen ausgewählt. Für die Analyse wurden wiederum die synthetischen Peptide auf einem Sensorchip immobilisiert und die Bindung von Thrombin bei Zusatz von den anderen Thrombin bindenden Proteinen untersucht.



**Abbildung 28:** Schematische Darstellung der Bindungsepitope von Thrombin.

Bei einer konstanten Thrombin-Konzentration von 50 nM wurden die folgenden Proteine in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: Hirudin, das Hirudin-Peptid, sowohl in der sulfatierten ( $\text{SO}_3$ -54-65) als auch in der nicht-sulfatierten (54-65) Form und Antithrombin III. Im Experiment wurde Thrombin bei Zusatz der entsprechenden Inhibitoren in Konzentrationen von 1 – 2500 nM über den Sensorchip geleitet und die Bindungsdaten aufgenommen. Die Daten sind in **Abbildung 29** zusammengefasst.

Man erkennt, dass ab einer Hirudin-Konzentration von 750 nM die Bindung von Thrombin an den derivatisierten Chip vollständig aufgehoben wird, was mit einer konkurrierenden Wirkung am gleichen Bindungsepitop erklärt werden kann. Sowohl das sulfatierte als auch das nicht-sulfatierte Hirudin-Peptid zeigen ein ähnliches Verhalten. Jedoch wird hier die Bindung nicht vollständig blockiert. Bei Konzentrationen von 2500 nM der Hirudin-Peptide ist die Bindung zwar schon deutlich verringert, der Effekt aber nicht so stark ausgeprägt wie bei Hirudin in Volllänge selbst. Man findet noch etwa 25% der ursprünglichen Bindungsrate. Bei Einsatz von Antithrombin III als Kompetitor wird auch bei Konzentrationen von 2500 nM nur eine Verringerung der Bindung auf etwa 60% des Ausgangsniveaus erreicht.



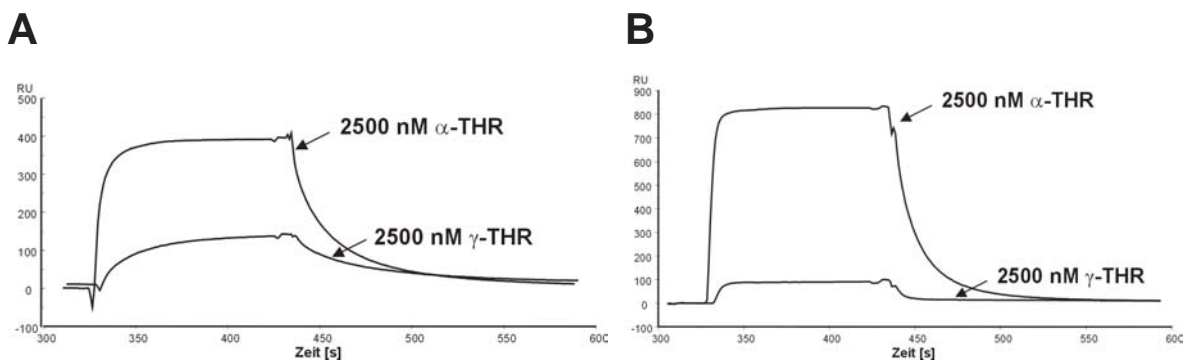
**Abbildung 29:** Konkurrenz in Lösung. Dargestellt sind die Bindungskurven bei einer konstanten Thrombin-Konzentration von 50 nM. Die Peptide T10-11 und T10-39 wurden immobilisiert und Throm-



bin bei Zusatz der entsprechenden Inhibitoren in Konzentrationen von 1 – 2500 nM über die Flusszellen geleitet. Die Keile symbolisieren jeweils steigende Konzentrationen der angegebenen Inhibitoren.

Somit kann geschlossen werden, dass die selektierten Peptide bevorzugt an die Exosite-1 binden. Diese Bindung scheint jedoch auch außerhalb der Exosite-1 zu erfolgen, da durch die Hirudin-Peptide keine vollständige Blockierung mehr möglich ist. Antithrombin III, welches an die Exosite-2 bindet zeigt einen deutlich geringer ausgeprägten Effekt und beeinflusst somit die Bindung nicht entscheidend.

Zusätzlich wird diese Tatsache dadurch bestärkt, dass  $\gamma$ -Thrombin, welchem die Exosite-1 fehlt nur zu einem stark verminderten Maße gebunden wird. Durch proteolytische Spaltung von  $\alpha$ -Thrombin wird  $\gamma$ -Thrombin gebildet. Dieses ist jedoch aufgrund des Fehlens der Fibrinogen-Bindungsstelle nicht mehr in der Blutgerinnung aktiv. Wenn  $\gamma$ -Thrombin in die Bindungsstudien eingesetzt wurde, konnte für die Peptide von T10-11 und T10-39 nur noch eine um den Faktor 3 bzw. 9 geringere Bindung als bei  $\alpha$ -Thrombin festgestellt werden. Somit bestätigt sich erneut, dass die Exosite-1 an der Erkennung der Peptide beteiligt ist, wobei nicht zwingend die gesamte Struktur beteiligt ist. Zu einem geringen Teil wird das Thrombinmolekül noch gebunden. In **Abbildung 30** sind die Ergebnisse dargestellt.



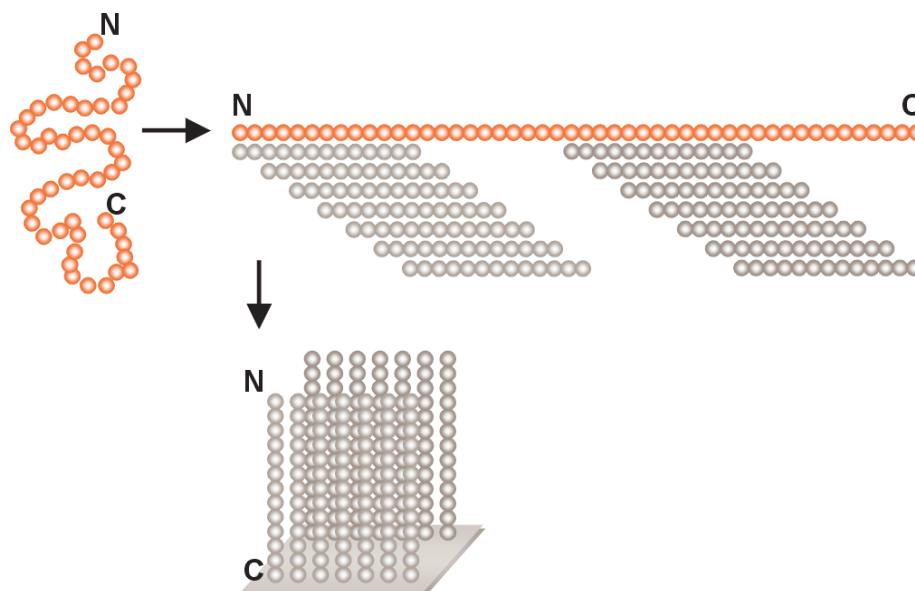
**Abbildung 30:** Bindungskurven für  $\alpha$ -Thrombin und  $\gamma$ -Thrombin an die Peptide von T10-11 (A) und T10-39 (B). Die Bindungsaffinität zu  $\gamma$ -Thrombin ist deutlich reduziert.

### 3.2.3 SPOT-Analysen

#### 3.2.3.1 Bestimmung des Minimalmotivs

Aus der Sequenzanalyse (siehe 3.1.6.6) deutet sich bereits an, dass ein sehr konserviertes Motiv, welches nur 4 Aminosäuren (DPGR) lang ist, für die Bindung von entscheidender Bedeutung sein könnte. Um dies zu bestätigen, wurde eine Minimalmotivbestimmung mittels eines Peptid-Arrays auf Basis der SPOT-Technologie<sup>[97-105]</sup> durchgeführt (siehe 5.2.12). Hierbei wurden stets 13 Aminosäuren lange Fragmente der einzelnen Klone, die jeweils um eine

Aminosäureposition in der Sequenz verrückt sind, auf Cellulosemembranen synthetisiert. Somit wurde die komplette Peptidsequenz überlappend in kleinen Stücken durchgerastert. Eine schematische Darstellung, welche das Durchrastern der gesamten Sequenz verdeutlicht, ist in **Abbildung 31** gezeigt.

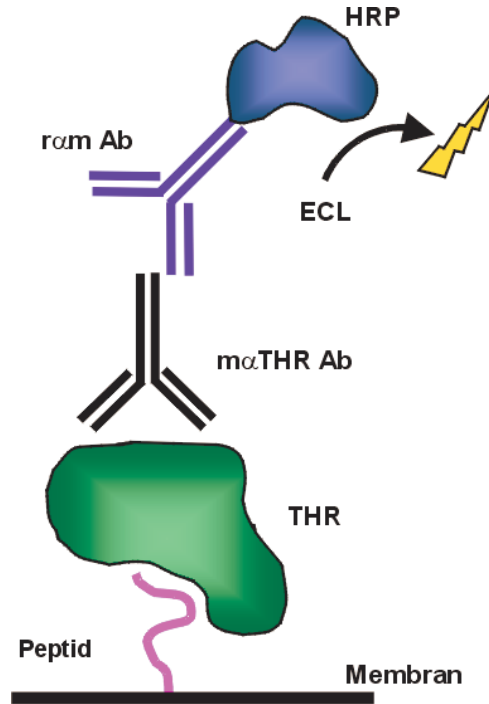


**Abbildung 31:** Skizzierte Darstellung des Prinzips der überlappenden Peptid-Analyse.

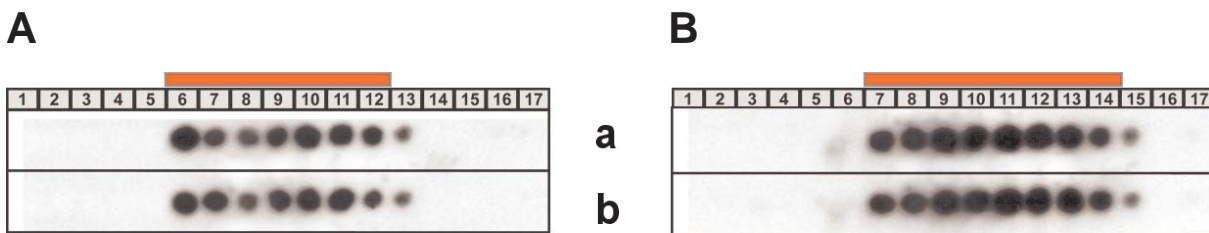
Anschließend konnte mittels eines Bindungstests die minimale Sequenzfolge festgelegt werden, die für die Interaktion zwischen Thrombin und den Peptiden nötig ist. Für den Nachweis der Bindung von Thrombin an die auf der Cellulosemembran immobilisierten Peptide wurde über ein dreistufiges System (siehe **Abbildung 32**), ähnlich einem Sandwich-ELISA angewendet. Die Detektion erfolgte dabei über ein Chemilumineszenzsubstrat (vgl. 5.2.12).

Zusätzlich zur Synthese der überlappenden Peptid-Analyse wurde eine zweite Strategie verfolgt, indem die in den Sequenzen enthaltenen Cysteinreste gegen Serinreste ausgetauscht wurden.

Durch diesen Austausch ist die Bildung einer zyklisierenden Disulfidbrücke nicht mehr möglich und es konnte überprüft werden, ob diese für die Bindung notwendig ist. Die erhaltenen Daten der überlappenden Sequenzanalyse inklusive dem Cystein-Serin-Austausch sind in **Abbildung 33** wiedergegeben.



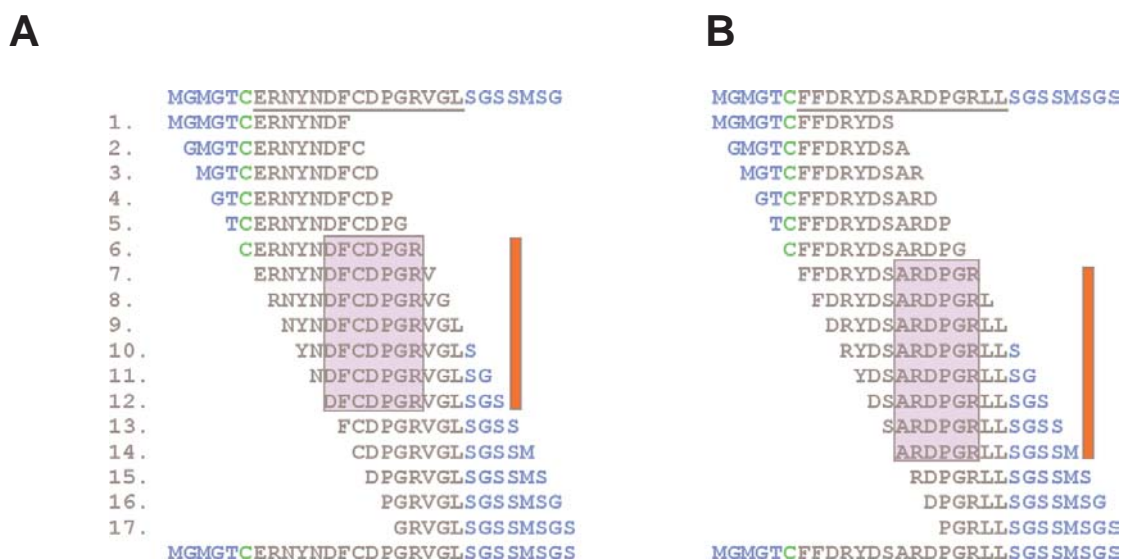
**Abbildung 32:** Schematische Darstellung des SPOT-Assays. Das Peptid (rosa) ist kovalent an die Cellulosemembran gebunden. Thrombin (THR) bindet an das Peptid. Das Thrombin wird daraufhin von einem murinen Anti-Thrombin-Antikörper ( $m\alpha$ .THR Ab) gebunden. Anschließend wird die konstante Region des Mausantikörpers von einem Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper ( $r\alpha m$  Ab), der an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, erkannt. Letztlich wird das Chemilumineszenzsubstrat (ECL = *enhanced chemiluminescence*) durch die HRP gespalten und man detektiert ein Lichtsignal.



**Abbildung 33:** Peptid-Arrays zur Bestimmung des Minimalmotivs von Klon T10-11 (A) und Klon T10-39 (B). Die Zahlen verdeutlichen die jeweiligen Peptide auf der Cellulosemembran. In der oberen Zeile (a) sind die regulären Peptide und in der unteren (b) diejenigen mit Cystein-Serin-Austausch aufgetragen. Die von Thrombin gebundenen Peptide sind jeweils durch den roten Balken markiert.

Man erkennt, dass bei Klon T10-11 die Peptide 6 bis 12, sowie bei Klon T10-39 die Peptide 7 bis 14 am stärksten gebunden werden. Somit lässt sich die Zahl der Aminosäuren, welche für die Erkennung des Thrombin notwendig sind von anfänglich 29 deutlich verringern. Für den Klon T10-11 erhielt man aus den überlappenden Sequenzen das 7 Aminosäuren umfas-

sende Kernmotiv DFCDPGR, beim Klon T10-39 besteht dieses aus den 6 Aminosäuren ARDPGR. Eine Beteiligung der nächsten benachbarten Aminosäuren kann jedoch noch nicht definitiv ausgeschlossen werden. Dennoch scheint Bindung sehr spezifisch zu sein, da an den N- und C-terminalen Peptiden auch keine schwachen Interaktionen zu detektieren sind. Die entsprechenden Sequenzdaten sind in **Abbildung 34** aufgelistet.



**Abbildung 34:** Übersicht über die einzelnen Sequenzen der Peptid-Analyse (**Abbildung 33**). Die roten Balken verdeutlichen wiederum die gebundenen Peptide von Klon T10-11 (**A**) und Klon T10-39 (**B**). Rosa unterlegt sind die überlappenden Sequenzen. Konstante Regionen sind blau, die randomisierte Region grau und der fixierte Cysteinrest grün dargestellt.

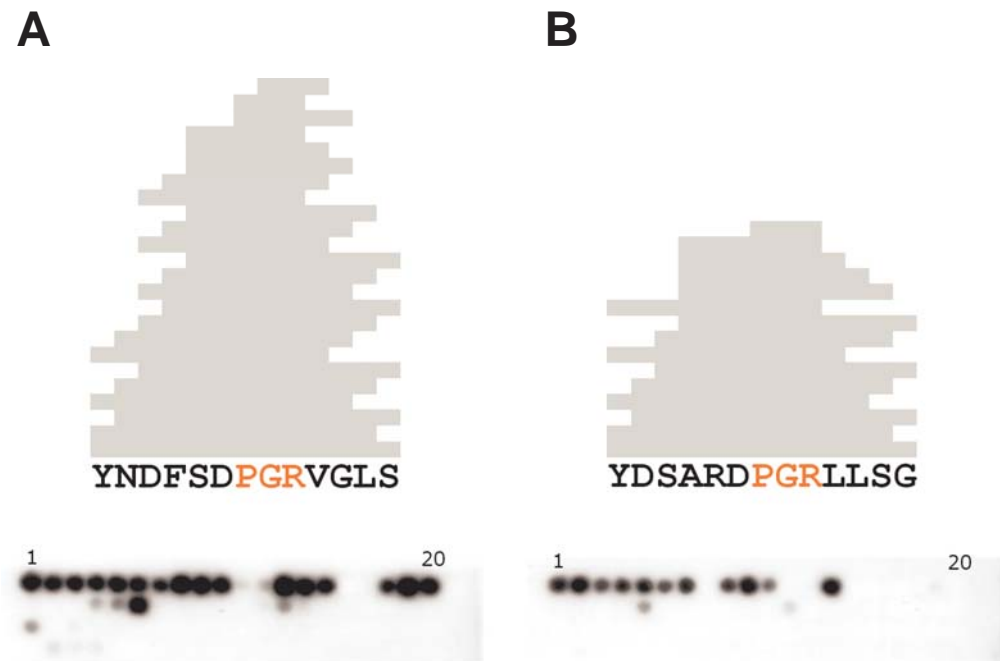
Zudem lässt das Ergebnis des Cystein-Serin-Austauschs den Schluss zu, dass die Disulfidbrücke keine entscheidende Rolle für die Bindung spielt. Der Austausch gegen Serin beeinflusst das Bindungsmuster nicht. Hierbei muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass nur die Peptide 2 – 6 von Klon T10-11 überhaupt zyklisiert werden können. Diese Peptide zeigten allerdings ohnehin keine Bindung mit Thrombin.

Für alle weiteren Experimente wurde aufgrund der Tatsache, dass der Ersatz von Cystein gegen Serin die Bindungseigenschaften nicht verändert, in der Sequenz des Klons T10-11 der Austausch beibehalten und Serin anstelle von Cystein verwendet.

### 3.2.3.2 Längenanalyse

Nachdem das Minimalmotiv durch die Analyse aus den überlappenden Sequenzen eingegrenzt werden konnte, wurde noch eine Längenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die einzelnen Klone daraufhin getestet, ob die Bindung noch erfolgt, wenn die umgebenden Bereiche abgeschnitten werden. Hierzu wurden Peptide der jeweiligen Klone auf Cellulose synthetisiert und die Sequenz sowohl vom N- als auch vom C-terminalen Ende und von beiden

Enden her schrittweise verkürzt. Insgesamt wurden für jeden Klon 66 unterschiedlich lange Sequenzen synthetisiert. Die gewonnenen Daten sind in **Abbildung 35** dargestellt.

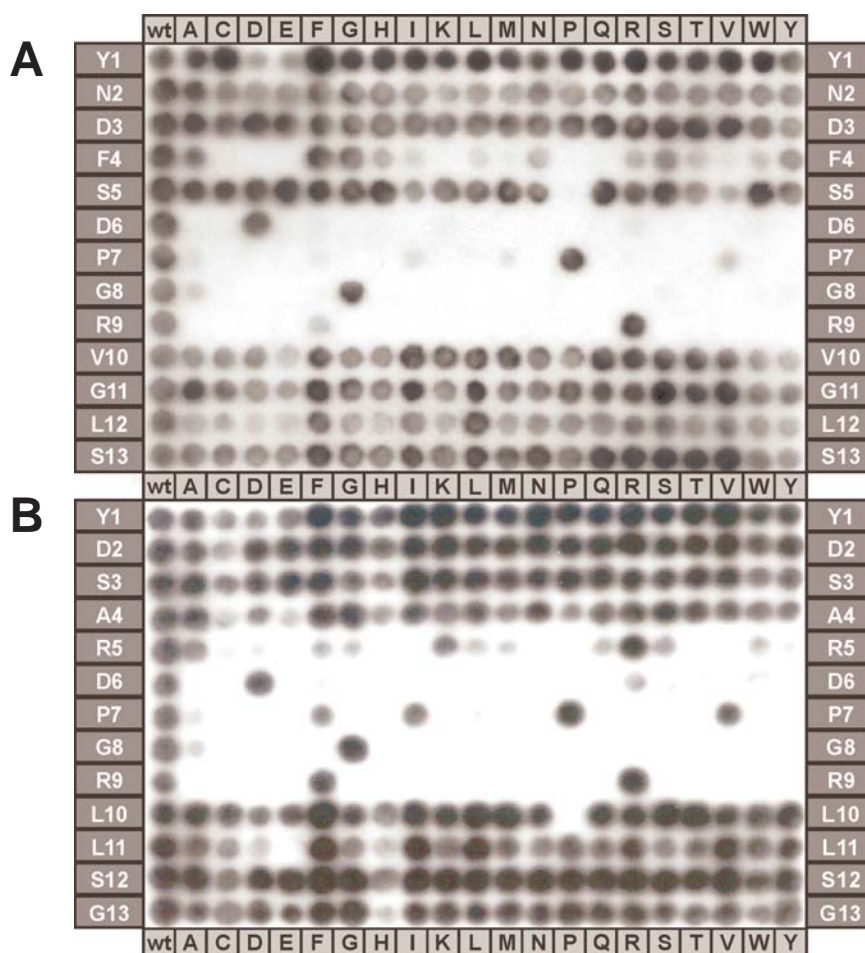


**Abbildung 35:** Längenanalyse. Dargestellt sind die Längenanalysen für T10-11 (A) und T10-39 (B). Jeder SPOT in der unteren Hälfte verdeutlicht ein gebundenes Peptid (insgesamt sind 66 Peptide aufgetragen, jedoch nur die mit erfolgter Bindung detektierbar). In der oberen Hälfte sind die gebundenen Peptide ihrer Sequenzlänge entsprechend als graue Balken dargestellt. Man erkennt die Verkürzung der Motive vom N- und C-terminalen Ende bis hin zum kleinsten gebundenen Motiv.

Die Deletion von Aminosäuren sowohl von N- als auch vom C-terminalen Ende hat keinen entscheidenden Einfluss, solange das DPGR-Motiv bestehen bleibt. Allerdings wird die Bindung verringert oder ganz aufgehoben, je kürzer das Fragment wird und wenn das DPGR-Motiv endständig vorliegt (sowohl N- wie C-terminal). Die 4 Aminosäuren der hochkonservierten Sequenz sind somit essentiell für die Bindung. Betrachtet man die Aminosäuren, die in jeder gebundenen Sequenz vorkommen, so erhält man sogar nur PGR als Konsensusmotiv. Jedoch ist hier teilweise die Bindung schon stark eingeschränkt und gerade noch detektierbar. Einige der flankierenden Aminosäuren scheinen daher zusätzlich einen Beitrag für die Bindung zu leisten.

### 3.2.3.3 Substitutionsanalyse

Um die genaue Sequenzspezifikation der ermittelten Minimalmotive zu überprüfen wurde eine Substitutionsanalyse der Klone T10-11 und T10-39 durchgeführt<sup>[106]</sup>.



**Abbildung 36:** Substitutionsanalyse der ermittelten Minimalmotive von T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**). In der linken und rechten Spalte ist jeweils dunkelgrau unterlegt das entsprechende Minimalmotiv gekennzeichnet (Numerierung erfolgte gemäß der Aminosäureabfolge). Für jede Aminosäureposition findet sich in der entsprechenden Zeile die Wildtyp-Sequenz (wt) und der Austausch gegen die jeweils angegebene Aminosäure, welche durch die hellgrau unterlegte Spalte festgelegt ist.

Dabei wurde das jeweilige Minimalmotiv einschließlich der flankierenden Aminosäuren verwendet. Auf einer Cellulosemembran wurde das entsprechende Minimalmotiv synthetisiert und sequenziell jede Aminosäure gegen alle anderen 19 Aminosäuren ausgetauscht. In **Tabelle 10** ist für Klon T10-11 beispielhaft dargestellt, wie die einzelnen Aminosäurepositionen sequenziell gegen die anderen ausgetauscht werden.

wt	Y	N	D	F	S	D	P	G	R	V	G	L	S
1	A	N	D	F	S	D	P	G	R	V	G	L	S
2	Y	A	D	F	S	D	P	G	R	V	G	L	S
3	Y	N	A	F	S	D	P	G	R	V	G	L	S
4	Y	N	D	A	S	D	P	G	R	V	G	L	S
5	Y	N	D	F	A	D	P	G	R	V	G	L	S
6	Y	N	D	F	S	A	P	G	R	V	G	L	S
7	Y	N	D	F	S	D	A	G	R	V	G	L	S
8	Y	N	D	F	S	D	P	A	R	V	G	L	S
9	Y	N	D	F	S	D	P	G	A	V	G	L	S
10	Y	N	D	F	S	D	P	G	R	A	G	L	S
11	Y	N	D	F	S	D	P	G	R	V	A	L	S
12	Y	N	D	F	S	D	P	G	R	V	G	A	S
13	Y	N	D	F	S	D	P	G	R	V	G	L	A

**Tabelle 10:** Matrix für die Substitutionsanalyse. Am Beispiel der Sequenz von Klon T10-11 ist dargestellt, wie in jeder Spalte in **Abbildung 36** die jeweilige Aminosäure der Wildtyp-Sequenz (wt) gegen hier Alanin ausgetauscht wird. Identisch erfolgen die Austausch für die restlichen Aminosäuren.

Insgesamt ergaben sich so für jede Substitutionsanalyse inklusive der Wildtyp-Sequenzen 273 Peptide, die einzeln synthetisiert wurden. Die Analyse der Bindung erfolgte dabei wie unter 3.2.3.1 beschrieben und die erhaltenen Bindungsmuster sind in **Abbildung 36** dargestellt.

Das Bindungsmuster von T10-11 (**Abbildung 36A**) zeigt, dass die ersten drei N-terminalen Aminosäuren, sowie die vier letzten C-terminalen Aminosäuren gegen jede andere Aminosäure problemlos ausgetauscht werden können. Der Phenylalanin-Rest in Position 4 hingegen kann nur durch wenige andere Aminosäuren, wie Alanin, Glycin, Histidin, Asparagin, Serin oder Tyrosin ersetzt werden, wobei es sich hierbei größtenteils um ungeladene Aminosäuren handelt, welche jedoch Wasserstoffbrücken bilden können. Interessanterweise verliert das Peptid die Bindungsfähigkeit, wenn an Position 5 (Serin) ein Prolin eingebaut wird. Hierbei wird wahrscheinlich durch die Struktur des Prolins (sekundäres Amin) als Helixbrecher die Gesamtstruktur so stark beeinflusst, dass die Bindung unmöglich wird. Klon T10-39 (**Abbildung 36B**) zeigt ein sehr ähnliches Bindungsmuster. Wiederum sind die N- und C-terminalen Aminosäuren relativ unsensitiv gegenüber dem Austausch. Der Argininrest an Position 5 in T10-39 kann vornehmlich nur gegen einen Lysinrest ausgetauscht werden, was aufgrund der Protonierbarkeit der Seitenkette auch erklärbar ist. Das DPGR-Motiv (jeweils Aminosäurepositionen 6 – 9) hingegen ist sehr empfindlich gegenüber substituierten Aminosäuren. Asparaginsäure (Pos. 6) kann durch keine andere Aminosäure ersetzt werden. Die Bindung an Position 7 (Prolin) kann bei T10-39 durch Substitution mit Alanin, Phenylalanin, Isoleucin und Valin, welche alle hydrophobe Aminosäuren darstellen, wieder hergestellt werden. Dasselbe Substitutionsmuster ist bei T10-11 erkennbar, jedoch ist

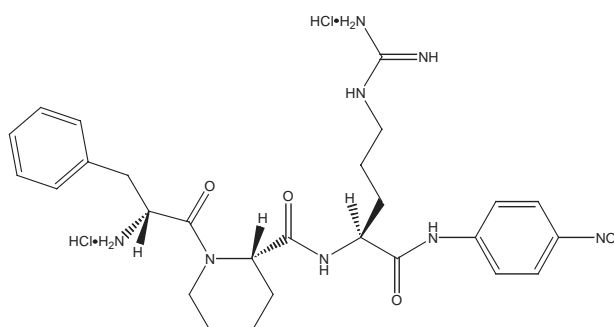
die Regeneration der Bindungseigenschaften durch den Austausch mit ähnlichen Aminosäuren hier schwächer ausgeprägt. Zusätzlich kommt noch Methionin hinzu. Der Austausch am Glycinrest (Pos. 8) führt ebenfalls nur wieder zur Bindung, wenn er durch Glycin oder zu einem geringen Teil durch Alanin ersetzt wird. In beiden Substitutionsanalysen kann Arginin (Pos. 9) nur durch sich selbst oder Phenylalanin substituiert werden. Bei T10-39 erkennt man weiterhin zwei Lücken in den darauffolgenden Leucinresten (Pos. 10 & 11). Der erste Leucinrest zeigt keine Bindung mehr, wenn er gegen Prolin ausgetauscht wird, was wiederum durch die Störfunktion des Prolinrestes erklärt werden kann. Beim Austausch des nächsten Leucin gegen Glutaminsäure verliert das entsprechende Peptid auch seine Bindungseigenschaften. Zusammenfassend erkennt man, dass das schon in vorausgegangenen Studien gefestigte DPGR-Motiv extrem sensitiv gegenüber Substitutionen ist und somit für die Erkennung von Thrombin eine entscheidende Rolle spielt.

### 3.2.4 Funktionale Charakterisierung

Zur Untersuchung des Einflusses der Peptide auf die enzymatische Aktivität von Thrombin wurden drei unterschiedliche Assays durchgeführt. Zum einen wurde getestet, ob die Peptide mit dem aktiven Zentrum von Thrombin interagieren und so die katalysierte Spaltungsreaktion beeinflussen. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Wirkung auf die Spaltung von Fibrinogen in Blutplasma besteht und somit gleichzeitig auf die Blutgerinnung. Schließlich wurden noch Untersuchungen hinsichtlich der Aktivität von Thrombin zur Aktivierung von Protein C bei Anwesenheit von Thrombomodulin durchgeführt.

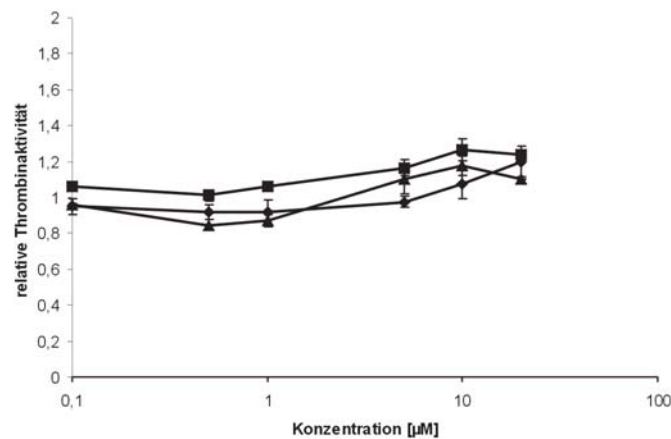
#### 3.2.4.1 Thrombinaktivität

Die enzymatische Thrombinaktivität wurde mittels eines chromogenen Assays untersucht (siehe 5.2.14.1). Das chromogene Substrat S-2238 (**Abbildung 37**) wird hierbei von Thrombin gespalten, wobei das gelb gefärbte p-Nitroanilin freigesetzt wird. Durch Messung der optischen Dichte (OD) der Lösung über die Zeit bei einer Wellenlänge von 405 nm lässt sich somit aus der jeweiligen Anfangssteigung der Kurve die Aktivität bestimmen.



**Abbildung 37:** Chromogenes Substrat für Thrombin: H-D-Phenylalanyl-L-Pipecoyl-L-Arginyl-p-Nitroanilid-2HCl (S-2238).





**Abbildung 38:** Relative Thrombinaktivität normalisiert gegen die Kontrollreaktion ohne zusätzliches Peptid. Die Kurven verdeutlichen die Aktivität von Thrombin bei Zusatz der jeweiligen Peptide: T10-11 (—◆—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

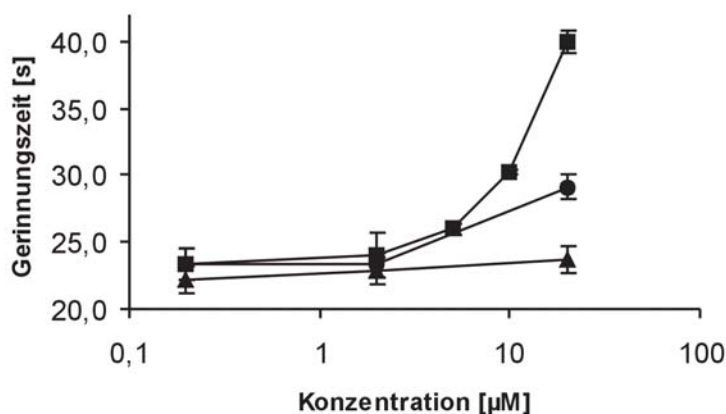
Die selektierten Peptide T10-11 und T10-39, sowie das Kontrollpeptid P-11 wurden in den Assay in Konzentrationen von 0.1 – 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt und jeweils die Thrombinaktivität im Vergleich zur Reaktion ohne Peptid bestimmt. Die gewonnenen Daten sind in **Abbildung 38** veranschaulicht, wobei die Werte bei Anwesenheit der Peptide gegen die Reaktion ohne Inhibitoren normalisiert wurden.

Die Thrombinaktivität ist relativ unbeeinflusst von der Gegenwart der selektierten Peptide. Weder die Peptide mit den Konsensussequenzen, noch das Kontrollpeptid aus der Startbibliothek ändern die enzymatische Aktivität. Über den gemessenen Konzentrationsbereich lässt sich keine signifikante Änderung der Spaltungsrate des chromogenen Substrats feststellen. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass die Peptide zwar, wie bereits gezeigt, an Thrombin binden, jedoch dessen enzymatische Aktivität nicht beeinflussen. Die Exosite-1 des Thrombins konnte in vorausgegangenen Studien schon als das wahrscheinlichste Epitop für die Bindung identifiziert werden. Die Wechselwirkungen ließen sich jedoch nicht ausschließlich auf diese Stelle begrenzen. Aus den obigen Ergebnissen kann man darauf schließen, dass die aktive Stelle von Thrombin nicht in die Interaktion involviert ist. Trotz der Bindung der Peptide an Thrombin besteht also grundsätzlich noch die Möglichkeit für enzymatische Reaktionen. Da das aktive Zentrum von Thrombin durch die Bindung der Peptide somit nicht betroffen ist, wurde eine weitere Untersuchung durchgeführt, um festzustellen, ob trotzdem die Gerinnungseigenschaften verändert werden.

### 3.2.4.2 Gerinnungsstudien

Thrombin wirkt in seiner Hauptfunktion positiv auf die Blutgerinnung. Durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin wird letztlich ein Blutgerinnsel gebildet. Der Einfluss der selektierten

Peptide auf die Blutgerinnung wurde anhand eines Gerinnungsassays gemessen. Thrombin wurde dazu mit humanem Blutplasma (freundlicherweise von Dr. B. Pötzsch zur Verfügung gestellt) versetzt und die Zeit bis zum Auftreten des Blutgerinnsels in einem Kugelcoagulometer gemessen (siehe 5.2.13). Die Peptide wurden hier in Konzentrationen von 0,2 – 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Auswirkungen auf die Zeit bis zum Eintreten Gerinnung sind in **Abbildung 39** zusammengestellt.



**Abbildung 39:** Gerinnungszeit. Die Kurven verdeutlichen den Einfluss der jeweiligen Peptide auf die Zeit bis zum Auftreten der Gerinnung: T10-11 (—●—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Man erkennt, dass nur das Peptid T10-39 einen deutlichen Effekt auf die Gerinnungszeit hat. Die Zeit wird bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  etwa verdoppelt und steigt von 22 Sekunden auf 40 Sekunden an. Klon T10-11 hat hier nur einen geringen Einfluss. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  wird die Zeit bis zum Auftreten des Gerinnsels nur um etwa 6 Sekunden verlängert. Demgegenüber zeigt das Kontrollpeptid P-11 im gesamten getesteten Konzentrationsbereich keinen Effekt.

Vergleicht man die gewonnenen Werte mit anderen in vitro selektierten Molekülen, wie dem RNA- oder dem DNA-Aptamer<sup>[95,96]</sup>, so können die Peptide hier nicht konkurrieren. Die beiden genannten Aptamere erzielen ebenfalls eine Verdopplung der Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung. Ausgehend von einer Gerinnungszeit von 20 bzw. 25 Sekunden erhöht sich diese auf 38 bzw. 43 Sekunden, jeweils für das RNA- bzw. DNA-Aptamer. Dieser Effekt wird allerdings bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  für das RNA-Aptamer bzw. 100 nM für das DNA-Aptamer erreicht. Die selektierten Peptide liegen somit hinsichtlich des Effekts zwar im selben Bereich mit den Nukleinsäureaptameren, es wird jedoch eine 20- bis 200-fach höhere Konzentration dafür benötigt. Zusätzliche Untersuchungen mit den Peptiden der

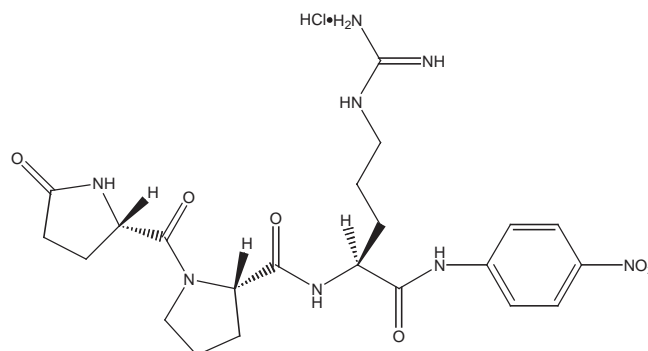
analysierten Minimalmotive oder Studien unter Variation der Salzbedingungen können hier zusätzliche Aufschlüsse liefern.

Hirudin und Haemadin vermögen es sogar die Gerinnung völlig auszusetzen, was in den extrem starken Bindungskonstanten der beiden aus Blutegeln isolierten Proteine begründet liegt. Dies schlägt sich in Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) von 21 bzw. 100 fM nieder<sup>[107]</sup>, während der  $K_i$  von Klon T10-39 etwa im Bereich von 8-9  $\mu$ M liegt.

Da Thrombin neben der prokoagulativen Wirkung noch zusätzlich antikoagulative Prozesse regelt, wurden weiterhin die Auswirkungen der Peptide auf die Aktivierung von Protein C untersucht.

### 3.2.4.3 Aktivierung von Protein C

Wenn Thrombin an Thrombomodulin bindet, findet eine Veränderung der Thrombinaktivität statt. Anstelle der Spaltung von Fibrinogen wird nun von Protein C ein Fragment abgespalten und dieses in aktiviertes Protein C (aPC) konvertiert. Hierdurch wird eine Kaskade induziert, welche im Blutgerinnungsprozess die Nachproduktion von Thrombin hemmt. Die Aktivierung von Protein C konnte wiederum über einen chromogenen Assay bestimmt werden. Dabei wird vom gebildeten aPC das chromogene Substrat S-2366 (**Abbildung 40**) gespalten. Durch Auswertung der Freisetzung des Spaltproduktes konnte die Rate der Protein C Aktivierung bestimmt werden (siehe 5.2.14.2).

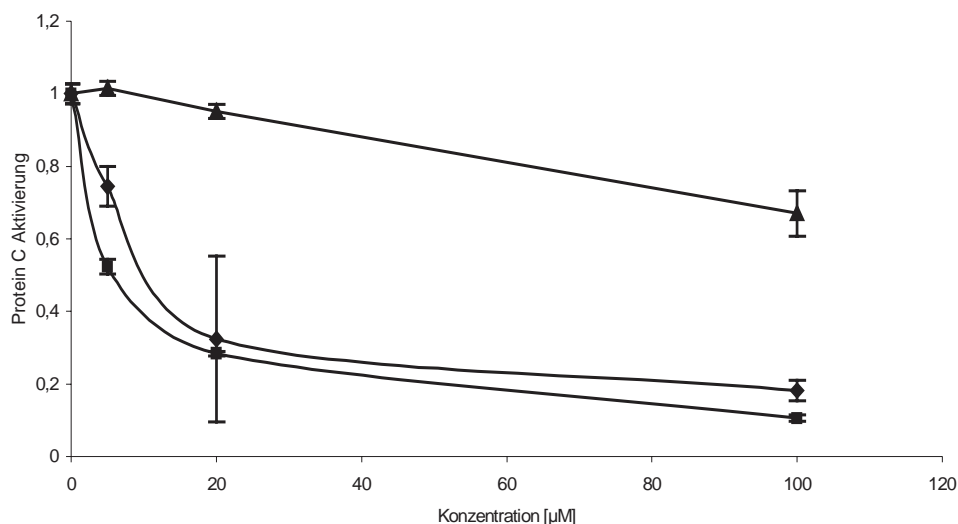


**Abbildung 40:** Chromogenes Substrat für aPC: *pyro*-Glutamyl-Prolyl-Arginyl-*p*-Nitroanilid-HCl (S-2366).

Da Thrombin zu einem geringen Teil das genannte Substrat bereits in Abwesenheit von Thrombomodulin und Protein C spaltet, wurde eine entsprechende Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei wurde nur Thrombin eingesetzt und die gewonnenen Daten für die Hintergrundreaktion bei den entsprechenden Messungen berücksichtigt.

Zur Analyse der Einflüsse wurden zuerst Thrombin und Thrombomodulin vorinkubiert, dann mit den jeweiligen Peptiden versetzt und zum Schluss das Protein C zugegeben. Nach einer

Inkubation von 15 Minuten wurde das chromogene Substrat hinzupipettiert, und die Spaltungsreaktion anhand der gemessenen OD-Werte verfolgt. In **Abbildung 41** sind die erhaltenen Kurven dargestellt.



**Abbildung 41:** Aktivierung von Protein C. Aufgetragen ist die Konzentration der Peptide gegen die relative Aktivierung von Protein C: T10-11 (—●—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Sowohl das Peptid von T10-11 als auch von T10-39 beeinflusst die Rate der Aktivierung von Protein C. Bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  T10-39 ist nur noch 50% Aktivität gegenüber der nicht-inhibierten Reaktion festzustellen. Bei Konzentrationen von jeweils 100  $\mu\text{M}$  sinkt die Rate auf etwa 10 – 20% des Ausgangswertes ab. Somit kristallisiert sich erneut die Wechselwirkung der selektierten Peptide mit der Exosite-1 des Thrombin heraus. Da hier ebenfalls Thrombomodulin gebunden wird, ergibt sich aus der Blockierung der Reaktion, dass hier die Interaktion stattfinden muss. Das Kontrollpeptid P-11 zeigt bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss, bei höheren Konzentrationen jedoch zeichnet sich ein messbarer Effekt ab, der aber unter Umständen auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

### 3.2.5 Strukturelle Untersuchungen

Um eine qualitative Aussage über die Struktur der einzelnen Peptide zu gewinnen, wurden von T10-11, T10-39 NMR-Spektren aufgenommen (siehe **Anhang**). Die erhaltenen NH-gekoppelten Spektren lassen jedoch noch keine genaue Zuordnung der Signale zu. Allerdings kann vor allem aus der guten Auflösung der Signale im Bereich der Aromaten auf das Vorliegen einer definierten räumlichen Konformation schließen. Für ein Peptid mit einer Länge von nur 29 Aminosäuren ist ein solches Ergebnis normalerweise nicht unbedingt zu erwarten. In den NOESY-Spektren erkennt man verschiedene Kreuzsignale. In einer normalen

*coiled*-Struktur ist der Abstand zwischen zwei benachbarten NH-Gruppen größer als 2.6 Å. Für das Auftreten von Kreuzsignalen müssen die beiden NH-Gruppen aber näher als 2.4 Å zusammenliegen. Dies wiederum kann durch die Ausbildung einer geordneten Struktur gewährleistet sein. Das über eine Disulfidbrücke konformationell eingeschränkte Peptid von T10-11 zeigt ein sehr ähnliches Spektrum wie das von T10-11. Somit kann hier wiederum die Aussage bestätigt werden, dass die gefundenen 2 Cysteinreste in T10-11 für die Struktur des Peptids nicht entscheidend sind, da diese anscheinend schon ohne die Verbrückung über eine S-S-Bindung stabilisiert ist. Für die Klärung der absoluten Struktur der Peptide sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Display Technologie erfolgreich zur Selektion von Peptiden angewendet, die an humanes  $\alpha$ -Thrombin binden können. Die dazu notwendigen Arbeitstechniken und Analysenverfahren wurden etabliert, entwickelt und verfeinert.

Aus einer 15 randomisierte Aminosäuren umfassenden Bibliothek wurde nach 10 Selektionszyklen ein nur 4 Aminosäuren langes Konsensusmotiv angereichert. Die Analyse von einzelnen Sequenzen zeigte, dass dieses kurze Motiv aus den Aminosäuren DPGR entscheidend für die Interaktion zwischen Thrombin und dem Peptid ist.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, aus einem Sequenzraum, der etwa der Größe des menschlichen Antikörperrepertoires entspricht ( $10^{11}$ ), funktionale Sequenzen zu isolieren. Das Auftreten eines Tetrapeptids liegt bei einer Wahrscheinlichkeit von 1 in  $10^5$ , was wiederum bedeutet, dass eine Sequenz, die an Thrombin bindet in  $10^9$  verschiedenen Molekülen enthalten sein wird.

Die evolvierten Bindungsmotive zeigen keine Ähnlichkeit mit natürlich vorkommenden Proteindomänen, die an Thrombin binden. In Kompetitionsstudien mit natürlichen Thrombinbindenden Proteinen konnte das Bindungsepitop der Peptide bestimmt werden. Die Exosite-1 des Thrombinmoleküls hat sich hierbei als die wahrscheinlichste Stelle der Interaktion herauskristallisiert. Natürliche Interaktoren von Thrombin binden jedoch sowohl das eine, wie das andere Epitop, teilweise auch beide. Die Kopplung des Proteins an die Säulenmatrix erfolgt rein statistisch, so dass während der Selektion beide Epitope gleichermaßen zugänglich gewesen sein sollten. Somit ist es interessant, dass nur ein Epitop in die Bindung der Peptide involviert ist, was auf eine gerichtete Evolution hinsichtlich des Thrombinproteins schließen lässt.

Zur Analyse der Primärsequenz wurde die SPOT-Technologie eingesetzt. In einem überlappenden Peptid-Scan und einer Längenanalyse konnte das Minimalmotiv auf eine Länge von 6 – 7 Aminosäuren eingegrenzt werden. Entscheidende Aussagen über die in den Minimalmotiven enthaltenen Aminosäuren (DPGR) lieferte allerdings eine Substitutionsanalyse, in der jeder einzelne Aminosäurerest gegen alle anderen 19 natürlichen ausgetauscht wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass das DPGR-Motiv entscheidend an der Bindung beteiligt ist. Die Bindungskonstanten der einzelnen Peptide wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz ermittelt und die erhaltenen  $K_d$ -Werte liegen zwischen 160 und 520 nM.

Obwohl die Bindungskonstanten niedriger als die der natürlichen Binder liegen, konnte dargestellt werden, dass spezifische Interaktionen mit Thrombin stattfinden. Die Auswirkungen der selektierten Peptide auf die Wechselwirkungen von Thrombin mit seinen Substraten wurden anhand von funktionalen Assays untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Peptide einen Einfluss, sowohl auf die Spaltung von Fibrinogen und die folgende Ausbildung eines Gerinnsels, als auch auf die Rate der Steigerung der Aktivierung von Protein C besitzen. Die Gerinnungszeit wird bei Anwesenheit der Peptide verlängert und die Aktivierung von Prote-

in C weitgehend unterbunden. Diese Effekte beruhen sehr wahrscheinlich auf einer Blockierung der Exosite-1 von Thrombin, da bei der Untersuchung der enzymatischen Aktivität kein Einfluss festgestellt werden konnte.

Erste Untersuchungen der Struktur der Peptide wurden mittels NMR durchgeführt. Die Auswertung der Spektren zeigte, dass die Peptide wohl eine definierte räumliche Struktur besitzen, obwohl genauere Aussagen hierzu nicht getroffen werden konnten.

Hier gilt es nun, detailliertere Informationen zu gewinnen und die genaue dreidimensionale Struktur der selektierten Peptide zu ermitteln. Mit diesen Informationen könnte man klare Aussagen über die Bindungsstelle mit dem Thrombin-Protein gewinnen. Unter Umständen ist es auch möglich, mittels *molecular modelling* Vorhersagen über die Wechselwirkungen der Peptide mit Thrombin zu treffen oder diese direkt zu untersuchen.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Verfeinerung der Ergebnisse, wäre eine Reselektion, um damit festere Binder zu evolvieren. Hierzu sollte die DNA aus dem letzten Selektionszyklus oder einer definierten Sequenz aus der Selektion einer mutagenen PCR unterworfen werden, um die Diversität zu erhöhen. Auch könnte bei der *Pool*-Synthese für eine Reselektion als Ausgangspunkt das evolvierte Konsensusmotiv zugrunde gelegt werden. Eine festere Bindung an das Protein erhöht unter Umständen das Potential der Peptide als Inhibitoren oder Regulatoren für Thrombin zu fungieren, was unter therapeutischen Gesichtspunkten von großem Interesse ist.

Um effektive Inhibitoren der Proteaseaktivität von Thrombin zu generieren wäre es auch denkbar, die selektierten Peptide, die an die Exosite-1 binden mit anderen Molekülen, die in das aktive Zentrum binden zu kombinieren. Erfolgreiche Experimente wurden hierzu bereits mit Hirugen als Exosite-Binder und Tripeptiden, die zwar in der aktiven Stelle gebunden, dort allerdings nicht gespalten werden können, durchgeführt (Übersicht siehe Lit.<sup>[67]</sup>).

Die vorliegende Arbeit eröffnet also vielfältige neue Sichtweisen. Zum einen können nach der Strukturaufklärung Informationen über de novo generierte Peptide erhalten werden. Andererseits stellen die vielfältigen Möglichkeiten, welche die mRNA Display Technologie in Aussicht stellt ein äußerst flexibles und erfolgversprechendes System dar, das in den unterschiedlichsten Disziplinen der Grundlagenforschung und der medizinischen Forschung weiterhin Verwendung finden wird.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Geräte

Agarosegelkammern	Fisher Scientific
Elektrophoreseapparaturen	BioRad
Geiger-Müller-Zählrohr	Berthold
Geldokumentationsgerät	Raytest
Geltrockner	BioRad
Heizblock	Fisher Scientific
Kugelcoagulometer	Amelung KC10
Kühlschränke	Liebherr
Magnetrührer	IKA Laborgeräte
Mikropipetten	Eppendorf
Mikrotiterplattenlesegerät	MRX, Dynatech Laboratories
Mikrowellenofen	Bosch
Oligonukleotidsynthesizer	Millipore
Oberflächenplasmonresonanz	BIAcore 3000
PCR-Thermocycler	Biometra
pH-Meter	Knick pH-Meter 766
Phosphorimager	Fuji FLA3000
Reagenzglasschüttler	NeoLab
Reinstwassergerät	Barnstead
Röntgenfilmentwicklermaschine	MS Laborgeräte
Spannungsgeräte	Consort
Spektralphotometer	Biometra
Szintillationszähler	Beckman
Thermoblock	Stuart Scientific
Thermoschüttler	Eppendorf
UV-Transilluminator	Bachofer
Vakuum-Geltrockner	BioRad
Waage	Cyna
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Eppendorf 5417



### 5.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind von „p.a.“ Qualität oder „für die Molekularbiologie“. Wasser wird aus einer UV/UF-Anlage bezogen.

Acrylamid 25% (19:1)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 30% (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 50% ( <i>long ranger gel solution</i> )	FMC
Agarose	GibcoBRL
Ammoniaklösung (32%)	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
Bacto Agar	Sigma, Deisenhofen
Bacto Trypton	Sigma, Deisenhofen
Benzamidin	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Riedel de Haën
Dichlordimethylsilan	Sigma, Deisenhofen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat*2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Riedel de Haën
Ethanol (100%)	Riedel de Haën
Ethidiumbromid (0.1%)	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutathion	Sigma, Deisenhofen

Glutathion-disulfid	Fluka
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Biomol
Glycogen	Roche, Mannheim
Guanidiniumhydrochlorid	ICN
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Roth, Karlsruhe
<i>i</i> -Propanol	Riedel de Haën
IPTG	Biomol
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
<i>Long Ranger Gel Solution</i>	Biozym
<i>Low melting point agarose</i>	Pierce
Magnesiumacetat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat*H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Sigma, Deisenhofen
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Phenol (stabilisiert mit TE, pH 8.0)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Phosphoramidite	GlenResearch
Salzsäure (36%)	Riedel de Haën
Spermidin	Sigma, Deisenhofen
Synthesizer-Chemikalien	GlenResearch
Tricin	ICN
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Fluka

### 5.1.3 Nukleotide und Radiochemikalien

dNTPs	Sigma, Deisenhofen
NTPs	Roche, Mannheim
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-GTP	NEN, Zaventem, Belgien
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-dATP	NEN, Zaventem, Belgien
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	NEN, Zaventem, Belgien
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-pCp	Amersham Biosciences, Freiburg
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	Amersham Biosciences, Freiburg

### 5.1.4 Standards und Kits

1000 bp DNA Leiter	PeqLab
100 bp DNA Leiter	PeqLab
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
ECL Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
Low Molecular Range Rainbow Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
MiniPrep Extraction Kit	Qiagen
Rabbit Reticulocyte Lysate	Novagen
Rainbow Protein Marker	Amersham Biosciences, Freiburg
S-2238 (Chromogenes Substrat)	Chromogenix
S-2366 (Chromogenes Substrat)	Chromogenix
Salmon Sperm DNA	GibcoBRL
Smartladder (100-bp Standard)	Eurogentec
T7-Sequencing Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

### 5.1.5 Enzyme und Proteine

Anorganische Pyrophosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Antithrombin III	Roche, Mannheim
Anti- $\alpha$ -Thrombin Antikörper	Cell Systems, St. Katharinen
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNaseI	Roche, Mannheim

Hirudin	Roche, Mannheim
Hirudin-Peptid 54-65	Sigma, Deisenhofen
Hirudin-Peptid SO <sub>3</sub> -54-65	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen: KpnI, BamHI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Reverse Transcriptase ("Superscript")	GibcoBRL
Ribonucleasen	Amersham Biosciences, Freiburg
Rinderserumalbumin	Calbiochem
RNase H	GibcoBRL
RNasin (Ribonuklease Inhibitor)	Promega
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T7 RNA-Polymerase	Stratagene, eigene Aufreinigung
Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Tdt	Stratagene
α-Thrombin	Cell Systems, St. Katharinen
γ-Thrombin	Cell Systems, St. Katharinen
Rabbit Lung Thrombomodulin	Cell Systems, St. Katharinen

### 5.1.6 Säulenmaterial

CNBr-aktivierte Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
NAP-Säulen	Amersham Biosciences, Freiburg
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Oligo dT Cellulose	Amersham Biosciences, Freiburg
Sephadex G-50	Amersham Biosciences, Freiburg
Sephadex G-50 Säule	Amersham Biosciences, Freiburg
CPG-Säulen	GlenResearch

### 5.1.7 Plasmide und Bakterienstämme

BL21/pAR1219	Genzentrum, München
Vektor pGEM-4Z	Promega
<i>E. coli</i> DH10B	Qiagen



P-11 DNA

5' -CAATGGGTATGGGTACCTGT**GTTAGAATCGCGGCGTCACGTATTAGTACAAATAACAAGTATTTT**  
TCCGGATCCCATCA-3'

**5.1.9 Verbrauchsmaterial**

Glaswolle (silanisiert)	Serva
Petrischalen	Nunc
PolyPrep Säulen	Bio-Rad
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme	Kodak
Spinfilter (0.2 µM, 0.4 µM)	Millipore
Spitzen für Mikropipetten	Peske, Aindling
Spritzen	Merck Eurolab
Sterilfiltrationseinheiten	Nalgene
Ultrafiltrationsröhrchen	Amicon Centricon
Whatmanpapier 3MM	Merck Eurolab

**5.1.10 Vorratslösungen****100 mM DTT**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 10 mL</u>
Dithiothreitol	154.2	100 mM	1.54 g

Lösung steril filtrieren und in 1 mL Aliquots wegfrieren.

**BSA 100x**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 10 mL</u>
BSA	66.000	10 µg/µL	100 mg

**0.5 M EDTA pH 8.0**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 250 mL</u>
Na <sub>2</sub> -EDTA*2 H <sub>2</sub> O	372.2	500 mM	36.5 g

EDTA ("Titriplex")

Mit Wasser bis etwa 200 mL auffüllen, dann unter Rühren circa 20 NaOH Plätzchen zugeben. pH-Wert mit 10 N NaOH auf 8.0 einstellen (Lösung wird erst bei basischen pH klar). Dann mit Wasser auf 250 mL auffüllen und steril filtrieren

**1 M MgCl<sub>2</sub>**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	203.3	1 M	50.8 g

Autoklavieren.

**1 M KCl**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
KCl	74.56	1 M	18.6 g

Autoklavieren.

**5 M NaCl**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
NaCl	58.44	5 M	73.05 g

Autoklavieren.

**1 M Tris**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
Tris	121.14	1 M	30.3 g

Autoklavieren.

**1 M Tris/HCl**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
Tris	121.14	1 M	30.3 g
HCl konz.		12.1 M	21.6 mL

Autoklavieren.

**6 M NH<sub>4</sub>OAc pH 7.0**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 250 mL
NH <sub>4</sub> OAc	77.08	6 M	115.6 g

pH-Wert mit Eisessig auf 7.0 einstellen, mit Wasser auffüllen, steril filtrieren.

**3 M NaOAc pH 5.4**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 250 mL</u>
NaOAc	82.03	6 M	61.5 g

pH-Wert mit Eisessig auf 5.4 einstellen, mit Wasser auffüllen, steril filtrieren.

**10× TBE**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 1000 mL</u>
Tris	121.14	890 mM	108 g
Borsäure	61.84	890 mM	55 g
0.5 M EDTA pH 8.0	372.2	20 mM	40 mL

**8.3 M Harnstoff**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 2000 mL</u>
Harnstoff	60.1	8.3 M	1000 g



## 5.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Vorschriften um biochemische Standardmethoden<sup>[108]</sup>.

### 5.2.1 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren

#### 5.2.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wird die Lösung mit einem Volumen Phenol versetzt, gut durchmischt (Vortexer) und anschließend 3 Minuten bei 20.800 x g zentrifugiert. Von den getrennten Phasen wird die obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, abgenommen und mit zwei Volumen Chloroform versetzt, um eventuell vorhandene Phenolreste abzutrennen. Es wird kurz geschüttelt und nach erneuter kurzer Zentrifugation (ca. 1 Minute) wiederum die obere wässrige Phase abgenommen. Anschließend werden die Nukleinsäuren mit Ethanol gefällt.

#### 5.2.1.2 Ethanolpräzipitation

Die Nukleinsäurelösungen werden durch Zugabe von 3 M Natriumacetatlösung (pH 5.2) auf eine Endkonzentration von 300 mM NaOAc eingestellt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wird mit 2.5 – 3 Volumen Ethanol (100%, gekühlt auf -20°C) versetzt, geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei -80°C inkubiert. (Auch über Nacht bei -20°C möglich.) Danach wird der Nukleinsäureniederschlag durch zentrifugieren bei 20.800 x g für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Präzipitat wird durch Zugabe von 100 µL 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation (20.800 x g, RT) für 5 Minuten gewaschen. Der Überstand wird entfernt und nach kurzem Trocknen des Pellets an der Luft wird dieses in einem geeigneten Volumen Wasser resuspendiert. Zur Präzipitation kleiner Nukleinsäuremengen wird den Lösungen Glycogen vor der Ethanolzugabe zugesetzt.

#### 5.2.1.3 Quantitative Nukleinsäure-Bestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. In der Regel werden dazu untenstehende gemittelten Werte verwendet. Ein OD-Wert von 1 entspricht dabei den in Tabelle 11 gezeigten Werten<sup>[109]</sup>.

Wert	Nukleinsäure
50 µg/mL	doppelsträngige DNA
40 µg/mL	einzelsträngige DNA
33 µg/mL	einzelsträngige RNA

**Tabelle 11:** Konzentrationen von Nukleinsäuren bei einem OD-Wert von 1,000.

Als durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids werden 330 g/mol für DNA und 345 g/mol für RNA angenommen. Die Berechnung erfolgt schließlich nach Gleichung 1:

$$\text{Gleichung 1: } c = \frac{f \times A \times OD_1}{n \times M_r} \quad [\text{mM}]$$

f = Verdünnungsfaktor

A = gemessener Absorptionswert

OD<sub>1</sub> = Konzentration bei theoretischer OD von 1

n = Anzahl der Basen

M<sub>r</sub> = durchschnittliches Molekulargewicht

Für kürzere Oligodesoxyribonukleotide mit bekannter Basensequenz werden die Konzentrationen aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  der einzelnen Basen berechnet. Dazu werden folgende Werte aus Tabelle 12 verwendet:

dNTP	$\epsilon(\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1})$	rNTP	$\epsilon(\text{mM}^{-1}/\text{cm}^{-1})$
dATP	15.4	ATP	15.2
dCTP	9.0	CTP	7.05
dGTP	13.7	GTP	12.1
TTP	10.0	UTP	8.4

**Tabelle 12:** Molare Absorptionskoeffizienten der Nukleotidbasen.

Die Konzentration wird nach Gleichung 2 berechnet:

$$\text{Gleichung 2: } c = \frac{OD \times f}{\sum \epsilon} \quad [\text{mM}]$$

Eine einfache Möglichkeit für die Berechnung der Konzentration bietet ein entsprechendes Programm, das im Internet zur Verfügung gestellt wird (z.B. <http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>).

Relative Konzentrationsmessung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren erfolgt durch Szintillationszählung oder durch Auswertung von Phosphorimagerscreens.

## 5.2.2 Gelelektrophorese

Durch sog. Gelelektrophorese lassen sich die Biomoleküle zum einen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes und zum anderen hinsichtlich ihrer Ladung auftrennen. In der Regel wird für die Elektrophorese 1x TBE Laufpuffer verwendet.

### 5.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen erfolgt in nicht-denaturierenden Agarosegelen<sup>[108]</sup>. In Abhängigkeit von der Fragmentlänge werden Gele mit 0.7 – 3% (w/v) Agarose hergestellt. Dazu wird Agarose eingewogen und in 0.5x TBE vorsichtig im Mikrowellenherd aufgeköcht. Pro 100 mL Lösung werden 10 µL Ethidiumbromidlösung (0.1%) hinzupipettiert und die noch warme Lösung blasenfrei in die vorbereiteten Gelschiffchen gegossen (ca. 0.5 cm dick) und die entsprechenden Kämme für die Geltaschen eingesetzt. Die Nukleinsäureproben werden mit einem Volumen Auftragspuffer versetzt, das Gel geladen und die Moleküle bei einer Spannung von 6 – 8 V/cm aufgetrennt. Als Längenstandard dient eine 100 bp-Leiter (80 bp – 1000 bp) oder eine DNA-Leiter (100 bp – 10.000 bp).

Da der Farbstoff Ethidiumbromid in die Nukleinsäuremoleküle interkaliert können diese als fluoreszierende Banden mit einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und anschließend fotografiert werden.

### Agarose-Ladepuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 10 mL
Glycerin	92.09	50% (v/v)	5 mL
1 M Tris	121.14	50 mM	500 µL
0.5 M EDTA pH 8.0	372.2	50 mM	1 mL
Bromphenolblau	691.94	0.05% (w/v)	5 mg

### 5.2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Nukleinsäuren werden in „*low melting point*“-Agarosegelen (LMP-Agarosen) von 0.7 - 2% bei geringen Spannungen von ca. 70 V aufgetrennt. Die Banden werden unter dem UV-Licht detektiert und mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten. Lange DNA-Fragmente werden anschließend mit dem *Gel Extraction Kit* nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Bei kürzeren DNAs (< 300 bp) werden die ausgeschnittenen Gelstücke bei 60°C unter Schütteln geschmolzen, die Lösung mit Wasser auf 150 µL aufgefüllt und daraufhin aus der noch warmen Lösung die DNA von der Agarose über 2 hintereinander geschaltete G25 *spin column* Filtrationen in der Zentrifuge bei 3000 rpm abgetrennt.

### 5.2.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Reinigung von RNA, einzelsträngiger DNA, sowie den RNA-DNA-Ligationen erfolgt durch präparative, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäuremoleküle werden 5 - 15%-ige Polyacrylamidgele hergestellt. Dazu werden die entsprechenden Anteile der Vorratslösungen zusammen pipettiert. Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren werden Gele mit einer Dicke von 1 - 1.5 mm und einer Trennstrecke von ca. 15 cm verwendet, für Sequenzierungsreaktionen (siehe 5.2.5.13) Gele mit einer Stärke von 0.4 mm, wobei die Trennstrecke 30 - 40 cm betrug. Zum Start der Polymerisation werden 400 µL 10% APS und 40 µL TEMED pro 100 mL Lösung zugegeben. Die Gellösung wird anschließend zwischen zwei gereinigte Glasplatten (ca. 18 x 20 cm) gegossen, die durch entsprechende Abstandhalter (*Spacer*) voneinander getrennt sind. Für die Aussparungen der Geltaschen zum späteren Auftragen der Proben wird ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation (ca. 45 – 60 Minuten) wird das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt, der Laufpuffer 1x TBE hinzugefügt und ein Vorlauf bei 320 - 350 V gestartet (Sequenzgele: 2000 V). Vor dem Auftragen der Proben werden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Nukleinsäureproben werden vor dem Gellauf mit Auftragspuffer versetzt und für 1 Minute bei 95°C denaturiert. Als Längenreferenz dienen die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, deren Laufverhalten in verschiedenen %-igen Gelen einer gewissen Basenpaarlänge zugeordnet werden kann. Die Trennung erfolgt bei einer Spannung von 320 – 350 V bzw. bei Sequenzgelen bei einer konstanten Leistung von 40 Watt. Nach der Elektrophorese werden die Gele entweder getrocknet oder ohne weitere Behandlung auf einen Röntgenfilm oder einen Phosphorimagerscreen exponiert.

Vorratslösung B	10x TBE in 8.3M Harnstoff
Vorratslösung C	25% Acrylamidlösung in 8.3M Harnstoff 2% N,N'-Methylenbisacrylamid
Vorratslösung D	8.3 M Harnstoff

#### Polyacrylamid-Ladepuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 10 mL
Harnstoff	60.1	9 M	5.4 g
0.5 M EDTA pH 8.0	372.2	50 mM	1 mL
Bromphenolblau	691.94	0.05% (w/v)	5 mg
Xylencyanol	538.62	0.05% (w/v)	5 mg

#### 5.2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Um die nach erfolgter Elektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren sichtbar zu machen wird das Gel beidseitig in Klarsichtfolie eingeschlagen, auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und mit UV-Licht von 254 nm beleuchtet (*UV-shadowing*). Die zu isolierende Bande wird markiert, mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und zerkleinert. Radioaktiv markierte Nukleinsäuren werden durch kurze Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert. Nach Entwicklung des Röntgenfilms wird dieser passgenau unter das Gel gelegt (Verwendung eines Autorad-Markers) und ebenfalls die Bande ausgeschnitten und zerkleinert. Zur Elution werden die zerkleinerten Gelstücke in einem Eppendorf-Gefäß mit etwa einem Volumen 0.3 M Natriumacetatlösung versetzt und in einem Thermoschüttler bei 65°C für 90 Minuten geschüttelt. Nachdem der Überstand über mit silanisierter Glaswolle gestopfte Spritzen abfiltriert ist, können die Nukleinsäuren wie unter 5.2.1.2 beschrieben mit Ethanol gefällt werden.

#### 5.2.2.5 Glycin-SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in denaturierenden SDS-Gelen. Diese setzen sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient zur Fokussierung der Proteine, während diese im Trenngel nach ihrem spezifischen Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Zur Herstellung eines Gels (7.5 x 6 cm) wird zuerst das Trenngel aus den entsprechenden Vorratslösungen hergestellt, mit APS und TEMED versetzt und die Lösung zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Für die Polymerisation (ca. 60 Minuten) wird die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Danach wird der Alkohol mit einem Whatmanpapierstreifen entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um eine etwa 1 cm lange Laufstrecke im Sammelgel zu erhalten, werden die Kämme entsprechend eingesetzt. Etwa 5 µL der jeweiligen Proben werden mit Auftragspuffer versetzt und nach Denaturierung für 1 Minute bei 95°C in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei ca. 140 Volt.

Acrylamidlösung            30%, (37,5:1)

#### Glycin-SDS-Ladepuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 10 mL
1 M Tris pH 6.8	121.14	50 mM	500 µL
SDS	288	2% (w/v)	0.2 g
Glycerin	92.09	10% (v/v)	1 mL
β-Mercaptoethanol	78.1	1% (v/v)	100 µL
Bromphenolblau	691.94	0.05% (w/v)	5 mg

**Trenngel (12%): 5 mL**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Wasser	1700 µL		
Tris pH 8.8	1250 µL	1.5 M	0.375 M
SDS	50 µL	10% (w/v)	0.1% (w/v)
Acrylamidlösung	2000 µL	30% (v/v)	12% (v/v)
APS	25 µL	10% (w/v)	
TEMED	2.5 µL		

**Sammelgel (4%): 2 mL**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
Wasser	1220 µL		
Tris, pH 6.8	500 µL	1 M	0.25 M
SDS	10 µL	10% (w/v)	0.1% (w/v)
Acrylamidlösung	270 µL	30% (v/v)	4% (v/v)
APS	10 µL	10% (w/v)	
TEMED	2.5 µL		

**Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer 10x**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	250 mM	30.3 g
Glycin	75	2 M	150 g
SDS	288	1% (w/v)	10 g

pH-Wert auf 8.9 einstellen.

**5.2.2.6 Tricin-SDS-Gelelektrophorese**

Die analytische Auftrennung von *in vitro* Translationsprodukten erfolgt in denaturierenden Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen<sup>[110]</sup>. Die 4 - 15%-igen Gele zeichnen sich gegenüber dem herkömmlichen Glycin-SDS-Polyacrylamidsystem durch eine verbesserte Auflösung aus und sind deshalb dazu geeignet Proteine im Bereich von 1 – 100 kDa aufzutrennen.

Zur Herstellung der Gele werden die fertigen Vorratslösungen in den entsprechenden Anteilen gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Die Lösung wird in die durch *Spacer* (1 mm) voneinander getrennten Glasplatten gegossen und die Polymerisation verläuft in etwa 30 Minuten. Für den Gellauf wird der 1x Kathodenpuffer in das innere Reservoir eingefüllt und der 1x Anodenpuffer in das äußere. Die Proben (bis etwa

15  $\mu\text{L}$  Volumen) werden mit 5  $\mu\text{L}$  Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanter Spannung von 125 Volt.

Nach der Elektrophorese werden die Gele von den Glasplatten gelöst und in der Fixierlösung für 20 Minuten fixiert und daraufhin für 10 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend werden die Gele auf Whatmanpapier übertragen und auf einem Geltdrockner bei 80°C für 30 Minuten getrocknet. Exposition bei radioaktiv markierten Proben erfolgt auf Phosphorimagerscreens.

Acrylamidlösung      30%, (37,5:1)

### Tricin-SDS-Ladepuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 10 mL
1 M Tris pH 6.8	121.14	50 mM	500 $\mu\text{L}$
10% SDS	288	4% (w/v)	4 mL
1 M DTT	154.2	0.1 M	1 mL
Glycerin	92.09	12% (v/v)	1.2 mL
Wasser			3.3 mL

### Gelpuffer 3x

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Tris	121.14	3 M	36.34 g
SDS	288	0.3% (w/v)	300 mg

pH-Wert auf 8.45 einstellen.

### Kathodenpuffer 10x

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	1 M	121.14 g
Tricin	178.2	1 M	178.2 g
SDS	288	1% (w/v)	10 g

pH-Wert auf 8.25 einstellen.

### Anodenpuffer 10x

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	2 M	242.28 g

pH-Wert auf 8.9 einstellen.

**Fixierlösung**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Methanol	32.04	40% (v/v)	400 mL
Eisessig	60.05	10% (v/v)	100 mL
Wasser		50% (v/v)	500 mL

**5.2.2.7 Färbung von Proteingelen***5.2.2.7.1 Coomassie-Färbung*

Zum Einfärben werden die Gele etwa 30 Minuten in Coomassie-Lösung geschwenkt und daraufhin in Entfärber-Lösung für 30 – 120 Minuten wieder soweit entfärbt, dass die Proteinbanden deutlich sichtbar sind.

**Coomassie-Lösung**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Essigsäure	60.05	10% (v/v)	100 mL
Methanol	32.04	45% (v/v)	450 mL
Wasser		45% (v/v)	450 mL
Coomassie Brilliant Blue		0.0125% (w/v)	125 mg

**Entfärber-Lösung**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Essigsäure	60.05	10% (v/v)	100 mL
<i>n</i> -Butanol	74.12	30% (v/v)	300 mL
Wasser		60% (v/v)	600 mL

*5.2.2.7.2 Silberfärbung*

Die Färbung von Gelen mittels Silber wird immer in Glasschalen durchgeführt. Zuerst wird das Gel zum Fixieren für 10 Minuten in LÖS1 geschwenkt. Die Vernetzung erfolgt während 10 Minuten Inkubation in LÖS2. Nach waschen des Gels für 20 Minuten, wird es für 10 Minuten mit LÖS3 gefärbt und anschließend mit LÖS4 für 10 Minuten entwickelt. Die Entwicklung wird durch 5-minütiges Schwenken in 5%-iger Essigsäure gestoppt, das Gel daraufhin mit Wasser für 5 Minuten gewaschen und zuletzt in 10%-igem Glycerin für 5 Minuten imprägniert. Das Gel wird anschließend auf ein feuchtes Whatmanpapier aufgelegt, mit Folie abgedeckt und für 30 Minuten bei 80°C im Geltdrockner getrocknet.



**LÖS1**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 500 mL
Ethanol	46.07	30% (v/v)	150 mL
Essigsäure	60.05	10% (v/v)	50 mL

**LÖS2**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 500 mL
Natriumacetat	82.03	0.4 M	16.4 g
Glutaraldehyd	100.1	0.5% (v/v)	2.5 mL
Natriumthiosulfat	158.18	0.1% (w/v)	500 mg
Ethanol	46.07	30% (v/v)	150 mL

**LÖS3**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 500 mL
Silbernitrat	169.87	0.1% (w/v)	500 mg
Formaldehyd (36%)	30.03	3 $\mu$ M	125 $\mu$ L

**LÖS4**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 500 mL
Natriumcarbonat	105.99	2.5% (w/v)	12.5 g
Formaldehyd (36%)	30.03	4.8 $\mu$ M	200 $\mu$ L

**5.2.3 Synthese von Oligonukleotiden**

Primer-, Splint- und DNA-Puro-Moleküle, sowie die DNA der Bibliothek werden an einem Oligonukleotidsynthesizer mittels konventioneller Festphasen-Synthese auf CPG-Säulen (*controlled pore glass*) hergestellt. Dabei werden Schritt für Schritt vom 3'-Ende her die einzelnen Phosphoramidite der Basen aneinander gekoppelt. Nach Ausführung der Synthese erfolgt die Entschützung und die Aufarbeitung in zwei Schritten. Der Inhalt der Säule wird zur Abspaltung der Schutzgruppen in ein verschraubbares Eppendorf-Gefäß (1.7 mL) überführt, mit 1 mL 32% Ammoniak versetzt und über Nacht bei 55°C stehen gelassen. Für die Reinigung der Nucleinsäuren werden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet.

*Butanolfällung*

Der Überstand wird aliquotiert und die Oligonukleotide durch Zugabe des zehnfachen Volumen an *n*-Butanol gefällt. Nach Zentrifugation (20.800 x g, 10 Minuten) wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in Polyacrylamid-Ladepuffer resuspendiert.

*Ohne Fällung*

Alternativ zur Butanolfällung wird die Ammoniak-Lösung nach der Inkubation zuerst gekühlt und daraufhin an einem Vakuumkonzentrator abgezogen. Das trockene Pellet mit den CPG-Kügelchen wird in Polyacrylamid-Ladepuffer resuspendiert.

Die weitere Aufarbeitung der DNA erfolgt über ein denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese gemäß 5.2.2.3, wobei für jeweils ein Gel für die Hälfte einer Synthese gefahren wird.

**5.2.4 Peptidsynthese**

Alle Peptide wurden nach der standardisierten Fmoc-Strategie von Frau CHRISTIANE LANDGRAF (Charité, Berlin) synthetisiert.

**5.2.5 Enzymatische Reaktionen****5.2.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)***5.2.5.1.1 Standard-PCR*

Die Amplifikation des einzelsträngigen oder doppelsträngigen DNA-Templats erfolgt in Ansätzen zu jeweils 100 µL in einem PCR-Thermocycler.

Standardmäßig wird folgendes Programm verwendet:

Denaturierung	50 s	94°C
Primer- <i>Annealing</i>	60 s	55°C
Polymerase-Reaktion	60 s	72°C
Heizdeckeltemperatur		110°C

Zur Überprüfung der Reaktion wird nach verschiedenen Zyklen ein Aliquot (5 µL) des Ansatzes entnommen, mit Agarose-Ladepuffer (2.5 µL) gemischt und anschließend auf ein Agarosegel, gemäß 5.2.2.1 aufgetragen.

**dNTP-Mix**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
dATP	10 µL	100 mM	25 mM
dCTP	10 µL	100 mM	25 mM
dGTP	10 µL	100 mM	25 mM
TTP	10 µL	100 mM	25 mM

**PCR-Reaktion (100  $\mu$ L)**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
PCR Puffer	10 $\mu$ L	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ L	25 mM	2.5 mM
5' primer	1 $\mu$ L	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M
3' primer	1 $\mu$ L	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M
dNTP Mix (ACTG)	0.8 $\mu$ L	25 mM	0.2 mM
DNA Templat	x $\mu$ L		1-10 nM
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.5 $\mu$ L	5 U/ $\mu$ L	0.025 U/ $\mu$ L
Wasser	y $\mu$ L		

Nach beendeter Reaktion wird die dsDNA nach 5.2.1.1 mit Phenol und Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gemäß 5.2.1.2 gefällt.

**5.2.5.1.2 Large Scale PCR**

Zur Amplifikation der Ausgangsbibliothek in der *Large Scale* PCR wird das Protokoll so modifiziert, dass in einem Ansatz möglichst viel Templat verwendet werden kann, ohne dabei durch Primer-Dimere Überamplifikate zu bilden. So kann hier materialsparend gearbeitet werden. Das Templat (insgesamt 4 nmol) wird demnach in einem Gesamtvolumen von 50 mL in einer Konzentration von 80 nM eingesetzt und nur 5 Zyklen gefahren. Anschließend wird das gesamte Material in 15 mL Reaktionsgefäßen mit Phenol/Chloroform extrahiert und daraufhin mit Ethanol gefällt (siehe 5.2.1.1 und 5.2.1.2). Die erhaltene dsDNA wird in 400  $\mu$ L Wasser aufgenommen und über eine G-50 Säule (siehe 5.2.6.4) gefiltert. Die analysierten Fraktionen, die DNA enthalten werden vereinigt, über Nacht zur Trockene lyophilisiert und zur Konzentrationsbestimmung (vgl. 5.2.1.3) in 100  $\mu$ L Wasser aufgenommen.

**5.2.5.2 In vitro Transkription**

Für die *in vitro* Synthese von RNA wird die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet. Hierfür muss das DNA-Templat doppelsträngig sein und den T7-Promotor tragen. In der Regel setzt man 100 bis 300 pmol DNA in einen 100  $\mu$ L Ansatz ein. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht, wobei die Zeit unter Umständen auch auf 4 Stunden verkürzt werden kann. Für die radioaktive Markierung im Rückgrat der RNA kann dem Ansatz ein [<sup>32</sup>P]-markiertes Nukleosidtriphosphat zugesetzt werden.

Durch Zugabe von 0.5  $\mu$ L DNaseI (1 U/ $\mu$ L) wird nach der Inkubation das DNA-Templat innerhalb von 30 Minuten bei 37°C verdaut und die RNA anschließend nach Zugabe von 50  $\mu$ L 0.5 M EDTA (pH 8.0) mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 5.2.1.1) und danach mit Ethanol (siehe 5.2.1.2) gefällt. Die Reinigung der Transkripte erfolgt daraufhin über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 5.2.2.3).

**Transkription-Puffer 10x**

<u>Reagenz</u>	<u>MW</u>	<u>Konzentration</u>	<u>benötigt für 10 mL</u>
Tris	121.14	400 mM	0.48 g
Spermidin	145.2	68 mM	0.1 g
MgCl <sub>2</sub>	95.3	220 mM	0.21 g
Triton X-100	643.37	0.1% (v/v)	10 µL

pH-Wert auf 7.9 einstellen.

**Transkription-Ansatz für aufgereinigte T7 RNA-Polymerase (100 µL)**

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Vorrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
Transkription-Puffer	10 µL	10x	1x
DTT	10 µL	100 mM	10 mM
NaCl	10 µL	100 mM	10 mM
NTP Mix (ACUG)	10 µL	25 mM	1 mM
IPP	1 µL	2 U/µL	0.02 U/µL
[α- <sup>32</sup> P]-NTP	1 µL	10 µCi/µL	0.1 µCi/µL
RNasin	1.25 µL	40 U/µL	0.5 U/µL
DNA Templat	x µL		1-3 µM
T7 RNA-Polymerase	6 µL	40 U/µL	2.4 U/µL
Wasser	y µL		

**Transkription-Ansatz für kommerzielle T7 RNA-Polymerase (100 µL)**

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Vorrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
Transkription-Puffer	10 µL	10x	1x
NTP Mix (ACUG)	10 µL	25 mM	1 mM
IPP	1 µL	2 U/µL	0.02 U/µL
[α- <sup>32</sup> P]-NTP	1 µL	10 µCi/µL	0.1 µCi/µL
RNasin	1.25 µL	40 U/µL	0.5 U/µL
DNA Templat	x µL		1-3 µM
T7 RNA-Polymerase	5 µL	50 U/µL	2.5 U/µL
Wasser	y µL		

**NTP-Mix**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
ATP	10 $\mu$ L	100 mM	25 mM
CTP	10 $\mu$ L	100 mM	25 mM
GTP	10 $\mu$ L	100 mM	25 mM
UTP	10 $\mu$ L	100 mM	25 mM

**5.2.5.3 Reverse Transkription**

Durch die reverse Transkription (RT) wird ein DNA:RNA-Hybrid aus einem einzelsträngigen RNA Templat und einem RT-Primer (synthetische DNA) erzeugt. Durch den Primer wird eine doppelsträngige Region, die für den Transkriptionsstart nötig ist, generiert.

Folgende RT Reaktion (100  $\mu$ L) wird auf Eis vorbereitet, dabei wird der Mix I. (50  $\mu$ L) zuerst für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Währenddessen wird der Mix II. (50  $\mu$ L) vorbereitet, die RNA für 1 Minute bei 95°C denaturiert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur zum Mix I. gegeben und vorsichtig gemischt. Die Reaktion erfolgt anschließend bei 42°C für 50 Minuten.

**Reverse Transkription (Standard)**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
<b>Mix I.</b>			
RT-Puffer	20 $\mu$ L	5×	1×
DTT	10 $\mu$ L	100 mM	10 mM
dNTP Mix	0.8 $\mu$ L	25 mM	0.2 mM
Superscript II RT	2 $\mu$ L	200 U/ $\mu$ L	4 U/ $\mu$ L
Wasser	17.2 $\mu$ L		

*Inkubation bei 42°C für 10 Minuten*

**Mix II.**

RT-Primer	2 $\mu$ L	100 $\mu$ M	2 $\mu$ M
RNA Templat	10 $\mu$ L	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M
Wasser	38 $\mu$ L		

*Denaturierung für 1 Minute bei 95°C und anschließende Inkubation bei 42°C für 50 Minuten*

Total	100 $\mu$ L		
-------	-------------	--	--

Während der Selektion wird die RT in größeren Volumina durchgeführt, wobei das folgende Protokoll verwendet wird. Zudem wird der Mix II. nicht einer Hitzedenaturierung unterzogen, um die fusionierten Proteine nicht zu zerstören.

**Reverse Transkription**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
---------	-------	--------	------------------

**Mix I.**

RT-Puffer	300 µL	5×	1×
DTT	150 µL	100 mM	10 mM
dNTP Mix	30 µL	25 mM	0.5 mM
Superscript II RT	10 µL	200 U/µL	1.33 U/µL

*Inkubation bei 42°C für 10 Minuten*

**Mix II.**

RT-Primer	30 µL	100 µM	2 µM
mRNA Display Peptide	980 µL		

*Inkubation bei 42°C für 50 Minuten*

Total	1500 µL		
-------	---------	--	--

**5.2.5.4 5'-Dephosphorylierung**

Zur Dephosphorylierung von 5'-Enden inkubiert man RNA oder DNA in einem entsprechenden Puffer mit Alkalischer Phosphatase (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) bei 37°C für 15 Minuten. Nach erneuter Zugabe von Enzym wird nochmals für 15 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend gibt man EDTA-Lösung zum Reaktionsansatz und stellt diesen nach kurzem schütteln für 10 Minuten auf 75°C. Danach wird mit Phenol/Chloroform extrahiert (siehe 5.2.1.1), mit Ethanol gefällt und das Pellet in ca. 20 µL Wasser resuspendiert. Aufreinigung erfolgt über ein denaturierendes Polyacrylamidgel oder ein Aliquot des Ansatzes wird direkt für die 5'-Markierung von Nukleinsäuren eingesetzt (vgl. 5.2.5.5).

**CIAP-Puffer 10x**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 10 mL
NaCl	58.44	500 mM	0.29 g
Tris	121.14	100 mM	0.12 g
MgCl <sub>2</sub>	95.3	100 mM	95 mg
DTT	154.2	10 mM	15 mg
ATP	507.18	10 mM	51 mg

pH-Wert auf 7.9 einstellen.

**CIAP-Ansatz (50 µL)**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
CIAP-Puffer	5 µL	10x	1x
RNA	5 µL	30 µM	3 µM (150 pmol)
BSA	5 µL	10x	1x
CIAP	0.3 µL	57 U/µL	0.17 U/µL
Wasser	34.7 µL		

*Inkubation: 15 Minuten, 37°C*

CIAP	0.15 µL		
------	---------	--	--

*Inkubation: 15 Minuten, 55°C*

EDTA	0.5 µL	0.5 M	5 mM
------	--------	-------	------

*Inkubation: 10 Minuten, 75°C*

**5.2.5.5 5'-Phosphorylierung**

Um DNA oder RNA am 5'-Ende radioaktiv zu markieren, wird mittels T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Dazu werden die Template bei 37°C mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP und T4-PNK für 30 - 60 Minuten inkubiert.

**Kinasierung (20 µL):**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
RNA/DNA-Templat	1 µL	10 µM	0.5 µM (10 pmol)
T4-PNK Puffer	2 µL	10x	1x
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	3 µL	10 µCi/µL	1.5 µCi/µL
RNasin	0.3 µL	40 U/µL	0.6 U/µL
T4-Polynukleotidkinase	2 µL	10 U/µL	1 U/µL
Wasser	9.7 µL		

Durch Zugabe von 1 µL 0.5 M EDTA wird die Reaktion gestoppt und anschließend die Nukleinsäure durch Ethanolfällung reisoliert und über ein Polyacrylamidgel gereinigt.

**5.2.5.6 3'-Markierung**

Um DNA am 3'-Ende radioaktiv zu markieren wird diese mit Terminaler Deoxynucleotidyltransferase (Tdt) in Gegenwart von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-pCp umgesetzt. Für eine Stunde wird der Ansatz bei 37°C inkubiert.

**Tdt-Ansatz (50  $\mu$ L)**

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>	<u>Vorrat</u>	<u>Endkonzentration</u>
Tdt-Puffer	10 $\mu$ L	5x	1x
DNA	1.5 $\mu$ L	10 $\mu$ M	0.3 $\mu$ M (15 pmol)
[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-pCp	1 $\mu$ L	10 $\mu$ Ci/ $\mu$ L	0.2 $\mu$ Ci/ $\mu$ L
Tdt	1.5 $\mu$ L	28 U/ $\mu$ L	0.84 U/ $\mu$ L

**5.2.5.7 RNase H Verdau**

Um die spezifische Abspaltung der RNA vom Fusionsmolekül zu erzielen wird dieses mit dem DNA-Splint (2  $\mu$ M) versetzt. Dieser hybridisiert an der Verknüpfungsstelle zwischen der RNA und dem Linker. So wird ein doppelsträngiges DNA:RNA Hybrid gebildet, welches von RNase H verdaut werden kann. Der 50  $\mu$ L Reaktionsansatz in 1x RT-Puffer wird für etwa 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das RNA-Molekül wird vom Fusions-Molekül abgespalten, wobei ein Molekül zurückbleibt, welches aus dem Peptid und dem daran gekoppelten Linker besteht. Durch einen Gel *shift* zu höherer Mobilität kann dieses Ergebnis sichtbar gemacht werden.

**5.2.5.8 Alkalische Hydrolyse**

Da RNA weniger stabil als DNA ist, kann diese spezifisch durch alkalische Hydrolyse gespalten werden. Dieser Versuch wird als Kontrolle zum unter 5.2.5.7 beschriebenen RNase-Verdau durchgeführt. Das Fusionsmolekül wird dazu mit 1 M KOH in einer Endkonzentration von 100 mM versetzt und der Ansatz anschließend für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die RNA wird dabei gespalten, der DNA-Teil bleibt bestehen. Nach der Reaktion wird die Lösung vor dem Auftragen auf das Gel mit Salzsäure neutralisiert.

**5.2.5.9 RNase-Test**

Um Kontamination von Puffern mit RNasen, die den Selektionsverlauf entscheidend stören können, zu vermeiden, werden alle verwendeten Puffer auf RNase-Aktivität überprüft. Dazu wird radioaktiv markierte RNA (etwa 1000 cpm) in 25  $\mu$ L des entsprechenden Puffers für mindestens 4 Stunden inkubiert. Anschließend wird Polyacrylamid-Ladepuffer zugegeben und ein Gel gefahren. Nach etwa 20 Minuten wird das Gel abgenommen und auf einen Phosphorimagerscreen exponiert. Als Positiv-Kontrolle wurde die RNA mit etwas Speichel versetzt, der sicher die Degradation bewirkte.

**5.2.5.10 RNA-DNA-Ligation**

Für die Ligation von RNA mit dem DNA-Puro-Molekül wird die T4-DNA-Ligase im Gemisch mit der T4-RNA-Ligase verwendet. RNA, DNA-Puro und Splint werden im Verhältnis 1:1:1.6 zusammen pipettiert, die entsprechende Menge Wasser zugegeben und der Ansatz anschließend für 1 Minute bei 95°C inkubiert. Daraufhin werden der Puffer, RNasin, sowie die



Ligasen zugefügt und der Reaktionsansatz für 5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Aufreinigung erfolgt über denaturierende Polyacrylamidgele und Ethanolpräzipitation.

#### Ligations-Ansatz (250 µL)

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
RNA	25 µL	100 µM	10 µM
DNA-Puro	25 µL	100 µM	10 µM
Splint	40 µL	100 µM	16 µM
<i>Denaturierung bei 95°C für 1 Minute</i>			
Wasser	123.7 µL		
T4-DNA-Ligase-Puffer	25 µL	10x	1x
T4-DNA-Ligase	5 µL	2000 U/µL	40 U/µL
T4-RNA-Ligase	6.3 µL	2 U/µL	0.05 U/µL

Die ligierten Moleküle werden nach der Aufreinigung noch zusätzlich über NAP-5 Säulen entsalzt.

#### 5.2.5.11 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Unit-Definitionen und Pufferbedingungen werden den Protokollen des Herstellers entnommen. Zur Klonierung werden 1 µg Plasmid pGEM-4Z (Sequenz und Vektorkarte siehe in 50 µL 1x NEBuffer 1 mit 5 U KpnI unter Zusatz von 1x BSA-Lösung für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Anschließend wird mit Wasser auf 200 µL aufgefüllt und nach Zugabe von 20 µL NaOAc mit Ethanol gefällt. Das Pellet wird in Wasser resuspendiert und in den nächsten Verdau eingesetzt. Hier wird die DNA in 50 µL 1x NEB U Puffer mit 5 U BamHI und Zugabe von 0.5 µL 100x BSA-Lösung wiederum für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Nach Denaturierung der Enzyme für 20 Minuten bei 65°C wird die DNA nochmals gefällt und daraufhin die Vollständigkeit der Spaltung auf einem 0.7%-igen Agarosegel kontrolliert. Das linearisierte Plasmid reinigt man anschließend über ein 0.7%-iges LMP-Agarosegel (siehe 5.2.2.2). Für einen vollständigen Restriktionsverdau der doppelsträngigen linearen DNA aus der Selektion werden 5 µg dsDNA mit 1 U Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert (1 Stunde, 37°C) und wie oben beschrieben weiter behandelt. Zur Reinigung wird die DNA auf einem 2%-igen LMP-Agarosegel bei 70 V aufgetrennt.

#### 5.2.5.12 Ligation von doppelsträngiger DNA

Durch Ligation werden rekombinante Plasmide erzeugt, die anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert werden (siehe 5.2.7.6). Dazu werden ca. 100 ng linearisiertes Plasmid pGEM-4Z (Sequenz siehe **Anhang**) mit dem 4-fachem Überschuss an geschnittenem Oligo-

nukleotid in Gegenwart von 400 U ( $\cong$  6 Weiß-Units) T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Ligation erfolgt in 20  $\mu$ L 1x Ligationspuffer über Nacht bei 16°C. Als Kontrollreaktionen, die ebenfalls in die Transformation eingesetzt werden, dienen Ligationsansätze ohne Insert (Kontrolle auf Religation des Plasmids) und Ligationsansätze in Abwesenheit von Insert und Enzym (Kontrolle auf Kontamination).

#### 5.2.5.13 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen werden nach der Kettenabbruchmethode unter Verwendung der T7 *Sequencing Kit* durchgeführt. Gemäß den Angaben des Herstellers erfolgt die Reaktion nach dem „*quick annealing protocol*“ und der „*read short procedure*“ in Gegenwart von [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-ATP.

Die Sequenzierung von DNA wird nach der von SANGER entwickelten Didesoxymethode<sup>[111]</sup> durchgeführt. Um das DNA-Templat alkalisch zu denaturieren, werden 8  $\mu$ L der unter 5.2.7.4 erhaltenen DNA-Lösung zusammen mit 2  $\mu$ L (10 pmol) Universalprimer und 1.5  $\mu$ L einer 1.000 M NaOH in einem Gesamtvolumen von 11.5  $\mu$ L gemischt, kurz zentrifugiert und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die Probe in ein 37°C Wasserbad überführt und rasch mit 1.5  $\mu$ L einer 1.000 M HCl und 2  $\mu$ L des Hybridisierungspuffers versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wird für weitere 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden die Reaktionsgefäße für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und gleichzeitig mit der Sequenzierungsreaktionen begonnen. Dazu werden auf einer Mikrotiterplatte mit 72 Vertiefungen für jede Sequenzreaktion je 2.5  $\mu$ L Terminationslösungen für A, C, G und T aufgetragen und bei 37°C vorgewärmt. Zu den einzelnen Sequenzierungsreaktionen werden jeweils 3  $\mu$ L des *Labelling Mix*, 1  $\mu$ L radioaktiv markiertes [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-ATP und 2  $\mu$ L der auf die Arbeitskonzentration verdünnten T7 DNA Polymerase pipettiert und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Termination der Reaktionen werden je 4.5  $\mu$ L der Sequenzierungsansätze mit je einer der Terminationslösungen auf der Mikrotiterplatte vermischt, 5 Minuten bei 37°C inkubiert und danach mit jeweils 5  $\mu$ L Stopp-Lösung versetzt. Die in den Sequenzierungsreaktionen entstandenen DNA-Fragmente werden anschließend auf einem analytischen, denaturierenden 8%-igen Polyacrylamidgel (siehe 5.2.2.3) aufgetrennt. Hierzu werden Aliquots von 3  $\mu$ L in neue Mikrotiterplatten überführt, für 1 Minute bei 95°C denaturiert und 1.5  $\mu$ L auf das Gel aufgetragen. Nach dem Trocknen des Gels werden die Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, ausgelesen und analysiert.

#### 5.2.5.14 In vitro Translation

Für die *in vitro* Translation wird Kaninchen-Retikulozyten-Lysat verwendet. Die translatierten Peptide und deren Fusionsprodukte werden über Tricin-SDS-Gele aufgetrennt und durch Markierung mit radioaktivem [<sup>35</sup>S]-Methionin detektiert.

Alle gelieferten Komponenten werden bei -80°C aufbewahrt. Kalium und Magnesium werden in den Reaktionsansatz gesondert zugegeben, der Lysatanteil liegt bei nur 30%. Der Standard-Ansatz kann bis zu einem Reaktionsvolumen von 1 mL beliebig gewählt werden.

**Translation (100 µL)**

Reagenz	Menge	Vorrat	Endkonzentration
mRNA Display Templat	4 µL	10 µM	400 nM
Aminosäure-Mix Met <sup>-</sup>	8 µL	12.5x	1x
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	8 µL	10 µM	800 nM
KCl	1 µL	2.5M	25 mM
Mg(OAc) <sub>2</sub>	1 µL	25 mM	0.25 mM
RNasin	2.5 µL	40 U/µL	1 U/µL
Wasser	45.5 µL		
<i>Rabbit Reticulocyte Lysate</i>	30 µL	100%	30% (v/v)

Die Ansätze werden für 60 Minuten bei 30°C inkubiert.

Nach dem Translationsschritt wird für die Fusion und um die Ausbeute an Peptid-Fusions-Molekülen zu erhöhen die Konzentration an Kalium- und Magnesiumionen durch Zugabe von Kaliumchlorid (4 M KCl) und Magnesiumacetat (1 M Mg(OAc)<sub>2</sub>) auf final 300 mM K<sup>+</sup> und 100 mM Mg<sup>2+</sup> eingestellt und die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die entstandenen fusionierten mRNA-Peptide aus dem Ribosom zu lösen wird der Translationskomplex durch Zugabe von EDTA (final 100 mM) und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten zerstört. Danach erfolgt die Auswertung bzw. Aufarbeitung.

**5.2.6 Chromatographie****5.2.6.1 Affinitätschromatographie mit Oligo dT Cellulose**

Um das nach der Translation erhaltene Fusions-Produkt von den störenden Proteinen des Lysats abzutrennen wird das Lysat über eine Oligo dT Cellulose Säule gegeben. Durch die im DNA-Teil des Linkers enthaltenen Poly-dA-Region ist eine Bindung der Fusionsmoleküle an die Säule möglich. Alle anderen Proteine werden nicht zurückgehalten und ausgewaschen. Die Bindungskapazität der Oligo dT Matrix beträgt etwa 200 nmol/g Cellulose.

Die Translationsproben werden 1:15 oder 1:20 mit Oligo dT Bindungspuffer verdünnt. In eine mit einer Fritte abgeschlossenen Säule (PolyPrep) wird etwa Oligo dT Cellulose (2 mg pro mL verdünnter Translation) eingewogen (maximal 20 mg, sonst verstopft die Säule). Anschließend wird 3 mal mit 1 mL Wasser gewaschen, um eventuell lösliche kleine Partikel aus der Fritte und dem Säulenmaterial zu entfernen. Daraufhin wird zur Äquilibrierung des Säulenmaterials mit 1000 µL Oligo dT Bindungspuffer gewaschen. Die verdünnten Lysate werden bei 4°C für 60 Minuten bei leichtem Schütteln (800 rpm) mit der Oligo dT Cellulose inkubiert. Nach dem Entfernen des Durchflusses, der entweder nochmals über die Säule gegeben oder sogleich verworfen wird, wird 3 - 4 mal mit 1 mL Oligo dT Bindungspuffer und 1 mal

mit 1 mL mit Oligo dT Waschpuffer nachgewaschen. Elution der gebundenen Moleküle erfolgt mit 2 mal 250 µL reinem Wasser, das genügend denaturierende Wirkung hat, um die hybridisierten DNA Stränge aufzuschmelzen. Die Waschfraktionen und die einzelnen Eluate werden in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen und die Radioaktivität der jeweiligen Proben im Vergleich mit dem vollen Lysat am Szintillationszähler gemessen. Die Elutionsfraktionen werden vereinigt und für die weiteren Schritte eingesetzt.

#### **Oligo dT Bindungspuffer**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
KCl	74.6	1 M	7.46 g
Tris	121.14	100 mM	1.21 g
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 µL

#### **Oligo dT Waschpuffer**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
KCl	74.6	100 mM	746 mg
Tris	121.14	10 mM	121 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 µL

#### **5.2.6.2 Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose**

Ni-NTA Affinitätschromatographie wird dazu benutzt, um Proteine, die einen His<sub>6</sub>-tag tragen aufzureinigen. Die Agarosematrix enthält immobilisierte Ni<sup>2+</sup>-Ionen, welche die Histidin-Reste aus dem Protein komplexieren. Diejenigen Proteine, die keinen His<sub>6</sub>-tag tragen, werden nicht an die Matrix binden und können somit von der Säule gewaschen werden. Unter Umständen kann es nötig sein, während der ganzen Aufreinigung denaturierende Bedingungen aufrecht zu halten, indem man jedem Puffer Guanidiniumhydrochlorid zusetzt. Die Elution von der Säule erfolgt spezifisch mittels Imidazol, welches mit den Histidinresten der Proteine um die Komplexierung kompetitiert.

In einer Einwegsäule können etwa 100 – 200 µL der Ni-NTA Agarose verwendet werden. Typischerweise beträgt die Bindungskapazität der Ni-NTA Superflow Agarose circa 300 nmol/mL gequollener Matrix. Für ein Säulenvolumen von 100 µL werden 200 µL der 50/50 Aufschlammung der Agarose verwendet und in eine Säule gefüllt. Anschließend wird 3 mal mit 1000 µL Wasser gewaschen und 1 mal mit 1000 µL 1x Ni-NTA Bindungspuffer. Die Proteinprobe wird mit 2x Ni-NTA Bindungspuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt und mit der Matrix in der verschlossenen Säule für 60 Minuten bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wird der Puffer entfernt und die Agarose nach folgendem Schema gewaschen:

Waschen, 2 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-1.

Waschen, 1 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-1 : Ni-NTA Waschpuffer-2 = 4 : 1

Waschen, 1 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-1 : Ni-NTA Waschpuffer-2 = 3 : 2

Waschen, 1 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-1 : Ni-NTA Waschpuffer-2 = 2 : 3

Waschen, 1 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-1 : Ni-NTA Waschpuffer-2 = 1 : 4

Waschen, 1 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-2

Waschen, 2 x mit 500  $\mu$ L Ni-NTA Waschpuffer-2 : Ni-NTA Elutionspuffer 2 = 19 : 1

Die Elution erfolgt 2 x mit 250  $\mu$ L Ni-NTA Elutionspuffer bei 4°C für jeweils 30 Minuten unter Schütteln. Die Elutionsfraktionen werden vereinigt und optional um Reste des Säulenmaterials zu entfernen durch ein 0.2  $\mu$ m Filtertube zentrifugiert. Um eventuell mitteluierte Nickelionen zu binden wird das Eluat mit 0.5 M EDTA Lösung auf eine finale Konzentration von 5 mM eingestellt.

#### Denaturierender 2x Ni-NTA Bindungspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Guanidinhydrochlorid	95.5	6 M	57.4 g
NaCl	58.4	1 M	5.86 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142	200 mM	2.84 g
Tris	121.14	20 mM	242 mg
Triton X-100	643.37	0.5% (v/v)	500 $\mu$ L
$\beta$ -Mercaptoethanol	78.1	200 mM	1402 $\mu$ L

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

#### Denaturierender 1x Ni-NTA Bindungspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Guanidinhydrochlorid	95.5	3 M	28.7 g
NaCl	58.4	500 mM	2.93 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	142	100 mM	1.42 g
Tris	121.14	10 mM	121 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 $\mu$ L
$\beta$ -Mercaptoethanol	78.1	100 mM	701 $\mu$ L

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

**Denaturierender Ni-NTA Waschpuffer-1**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Harnstoff	60.1	8 M	48.1 g
NaCl	58.4	500 mM	2.93 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	120	100 mM	1.20 g
Tris	121.14	10 mM	121 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 µL
β-Mercaptoethanol	78.1	100 mM	701 µL

pH-Wert auf 6.3 einstellen.

**Ni-NTA Waschpuffer-2**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
NaCl	58.4	500 mM	2.93 g
Tris	121.14	10 mM	121 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 µL
β-Mercaptoethanol	78.1	100 mM	701 µL

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

**Ni-NTA Elutionspuffer**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
NaCl	58.4	500 mM	2.93 g
Tris	121.14	10 mM	121 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	250 µL
Imidazol	68.1	250 mM	1.70 g
β-Mercaptoethanol	78.1	100 mM	701 µL

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

**5.2.6.3 Entsalzung über NAP-Säulen**

Für die Entsalzung oder Umpufferung von Proben werden NAP-Säulen verwendet. Die Probe wird auf eine vorher mit Wasser oder Puffer äquilibrierte Säule gegeben und anschließend mit Wasser oder dem entsprechenden Puffer eluiert. Das dabei zum Einsatz kommende Prinzip der Größenausschlussfiltration beruht darauf, dass kleine Moleküle und Salze länger auf der Säule verbleiben und größere, wie die Oligonukleotide schneller wieder ausgewaschen werden. Bei mRNA Display Proben werden die Säulen zusätzlich vorher mit Lachssperma DNA (*Salmon Sperm* DNA) und BSA geblockt.

Am Beispiel einer NAP-5-Säule wird das Vorgehen erläutert. Zuerst wird über die Säule 10 mL Wasser gegeben und daraufhin 1000 µL einer Lösung von 1 mg/mL Lachssperma DNA und 0.1 mg/mL BSA. Wiederum wird mit 10 mL Wasser nachgewaschen und die Probe in einem Volumen von insgesamt 500 µL in die Säule einlaufen lassen. Anschließend wird dann mit 1000 µL Wasser eluiert.

### **Salmon Sperm DNA und BSA**

Reagenz	Konzentration	benötigt für 1000 µL
Salmon Sperm DNA (10 mg/mL)	1 mg/mL	100 µL
BSA (10 mg/mL)	0.1 mg/mL	10 µL
H <sub>2</sub> O		890 µL

#### **5.2.6.4 Reinigung von Nukleinsäuren über Sephadex G-50**

Die doppelsträngige DNA nach der *Large Scale* PCR kann von Salzen, Nukleotiden und Primern durch Gelfiltration von gereinigt werden. Längere Primer (> 20 Basen) kann jedoch nur durch wiederholte Reinigung abgetrennt werden. Dazu werden mit Glaswolle verschlossene spezielle Glassäulen (0.7 x 20 cm) mit ca. 8 mL gequollenem Sephadex G-50-Material befüllt und mit Wasser äquilibriert. Nach Auftrag der Nukleinsäurelösung in maximal 1 mL Probenvolumen wird mit mehreren Säulenvolumina Wasser eluiert (Elutionsgeschwindigkeit: ca. 100 µL/min). Der Durchlauf wird in Fraktionen von jeweils 400 µL gesammelt und die Nukleinsäure-Konzentration darin photometrisch bestimmt (siehe 5.2.1.3). Die Fraktionen, welche die gereinigte DNA enthalten werden vereinigt und mit Ethanol gefällt (siehe 5.2.1.2).

## **5.2.7 Bakterienkulturen**

### **5.2.7.1 Plattenkultur**

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgt durch Ausstreichen von Flüssigkulturen auf sterile LB-Agar-Platten. Zur Selektion werden dem Medium zusätzlich Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/mL) zugesetzt (LB-Amp-Platten). Für die Detektion werden die LB-Amp-Platten mit 20 µL einer 0.2 M IPTG-Lösung und 20 µL einer 10%-igen X-Gal-Lösung vorbehandelt, welche gleichmäßig auf der Oberfläche der Platte mittels eines Drigalski-Spatels verteilt werden. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgt über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

### **5.2.7.2 Flüssigkultur**

Von der Plattenkultur entnommene Einzelkolonien werden in 5 mL LB-Amp-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm bebrütet. Die Übernachtskulturen verwendete man anschließend zur Präparation von Plasmid-DNA.

### 5.2.7.3 Glycerinkultur

Zum Anlegen von Glycerinkulturen werden 750  $\mu\text{L}$  Flüssigkultur vorsichtig mit 750  $\mu\text{L}$  Glycerin-Medium vermischt, 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 5.2.7.4 Plasmidisolierung

Nach dem Anfertigen der Glycerinkulturen aus den unter 5.2.7.2 hergestellten Flüssigkulturen wird das enthaltene Plasmid mit dem MiniPrep *Extraction Kit* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Elution der DNA von der Säule wird allerdings abweichend Wasser mit einer Temperatur von  $70^\circ\text{C}$  anstelle von Raumtemperatur verwendet.

### 5.2.7.5 Medien und Stocklösungen

#### LB-Agar-Medium

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Bacto Trypton		1.0% (w/v)	10 g
Bacto Agar		1.5% (w/v)	15 g
Hefeextrakt		0.5% (w/v)	5 g
NaCl	58.44	0.5% (w/v)	5 g
1 M NaOH	40	1 mM	1 mL

#### LB-Flüssig-Medium

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Bacto Trypton		1.0% (w/v)	10 g
Hefeextrakt		0.5% (w/v)	5 g
NaCl	58.44	0.5% (w/v)	5 g
1 M NaOH	40	1 mM	1 mL

Nach dem Autoklavieren wird das Medium auf  $50 - 60^\circ\text{C}$  temperiert und daraufhin mit Ampicillin (Endkonzentration  $50 \mu\text{g/mL}$ ) versetzt.

#### Glycerin-Medium

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Glycerin	92.09	65% (v/v)	65 mL
1 M $\text{MgSO}_4$	120.37	0.1 M	10 mL
1 M Tris pH 8.0	121.14	25 mM	2.5 mL



**SOB-Medium**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Bacto Trypton		2% (w/v)	20 g
Hefeextrakt		0.5% (w/v)	5 g
NaCl	58.44	0.2% (w/v)	2 g
1 M MgCl <sub>2</sub>	95.21	10 mM	10 mL
1 M MgSO <sub>4</sub>	120.37	10 mM	10 mL

**SOC-Medium**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
SOB-Medium			100 mL
2 M Glucose	180.16	20 mM	2 mL

Ampicillin-Stocklösung: 100 mg/mL in 50% EtOH

X-Gal-Stocklösung: 10% (w/v) in DMF

IPTG-Stocklösung: 0.2 M in H<sub>2</sub>O

**5.2.7.6 Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von *E. coli* Bakterien mischte man die Hälfte eines 20 µL Ligationsansatzes mit 50 µL frisch aufgetauten, kompetenten Zellen (freundlicherweise von M. KNEIPS zur Verfügung gestellt). Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis werden die Zellen für 40 Sekunden auf 37°C erwärmt und anschließend nochmals für 2 Minuten auf Eis gestellt. Dann wird der Transformationsansatz in 500 µL auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium überführt, vorsichtig mit der Pipette durchmischt und für 45 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 50 – 100 µL dieser Lösung wird auf vorbereitete LB-Amp-Platten (siehe 5.2.7.1) ausgestrichen. Die Platten werden bei RT inkubiert, bis die Bakteriensuspension vollständig eingezogen ist und anschließend über Nacht bei 37°C bebrütet.

**5.2.8 Aufreinigung der T7-RNA-Polymerase****5.2.8.1 Herstellung der Übernachtskultur**

Die T7-RNA-Polymerase wird aus *E. coli* Zellen vom Stamm BL21/pAR1219 gewonnen, die dieses Protein exprimieren können. Dazu wird ein kleiner Teil dieser Glycerin-Kultur mittels einer Pipettenspitze in ein 50 mL-Schraubdeckelfalcon mit etwa 40 mL fertigem TBG-Medium gegeben. Anschließend ließ man die Zellen über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler wachsen.

**TBG-Medium**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Bacto Trypton		1% (w/v)	10 g
NaCl	58.44	0.5% (w/v)	5 g

Autoklavieren.

**Puffer A**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	50 mM	6.06 g
NaCl	58.44	20 mM	1.17 g
EDTA	372.2	2 mM	0.74 g
DTT	154.2	1 mM	0.15 g

pH-Wert auf 8.1 einstellen.

**Puffer B**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	50 mM	6.06 g
NaCl	58.44	20 mM	1.17 g
EDTA	372.2	2 mM	0.74 g
DTT	154.2	1 mM	0.15 g
PMSF	174.19	190 µM	33 mg
Benzamidin	120.15	100 mM	12.02 g
Bacitracin	1307.61	10 µg/mL	10 mg
Leupeptin	427.57	10 µg/mL	10 mg

pH-Wert auf 8.1 einstellen.

**Puffer C**

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	163.94	20 mM	3.28 g
EDTA	372.2	1 mM	0.37 g
DTT	154.2	1 mM	0.15 g
Glycerin	92.09	5%	50 mL

pH-Wert auf 8.1 einstellen.

### 5.2.8.2 Induktion der Zellen

Der Inhalt des Schraubgefäßes wird in 1 Liter des TBG-Mediums gegeben und bei 37°C im Inkubator aerob geschüttelt. Bei einer Wellenlänge von 600 nm wird in zeitlichen Abständen die Optische Dichte (OD) der Kultur gemessen. Bei einer OD von ~0.5 werden die Zellen durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 0.5 mM) induziert und somit die Bildung des Proteins stimuliert.

### 5.2.8.3 Aufreinigung des Proteins

Nach der Induktion werden die *E. coli* Zellen für weitere 4 Stunden bei 37°C wachsen gelassen und anschließend durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4.500 rpm pelletiert. Die abzentrifugierten Zellen werden in Puffer B resuspendiert und anschließend mit 100 µL Lysozym, 10 µL Leupeptin versetzt und die Zelllösung bei 4°C für 20 Minuten im Überkopfschüttler gemischt. Durch das Lysozym wird dabei die Zellmembran zerstört. Zur Vervollständigung der Lyse wird noch 150 mg Natriumdeoxycholat, gelöst in 5 mL Puffer A hinzugegeben und nochmals für 20 Minuten stehen gelassen. Hin und wieder wird kurz geschüttelt. Um die Viskosität der Lösung zu verringern wird auf Eis (um der Wärmeentwicklung entgegenzuwirken) sonifiziert (mit Ultraschall behandelt). 10 mL einer 2 M Ammoniumsulfatlösung werden zugegeben und das Volumen anschließend mit Puffer B auf 100 mL aufgefüllt, was unter Umständen durch die Schaumbildung erschwert ist. Von einer 10%-igen Lösung von Polymyxin P (Polyethylenimin, mit 32% HCl auf pH 8.0 eingestellt) werden 10 mL unter Kühlung auf Eis hinzugefügt. Nach 20 Minuten wird das Präzipitat durch Zentrifugation bei 39.000 x g abgetrennt und der Niederschlag verworfen. Der Überstand wird daraufhin auf Eis langsam mit 0.82 Volumen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (gesättigt bei Raumtemperatur, mit Tris auf pH 7.0 eingestellt, durch 0.45 µm Spritzenaufsatzfilter gereinigt, bei 4°C gekühlt) versetzt, wobei spezifisch nur die T7-RNA-Polymerase ausfällt. 15 Minuten lang wird auf Eis gerührt und anschließend das Präzipitat durch zentrifugieren für 10 Minuten bei 12.000 x g abgetrennt. Dieses wird in 15 mL Puffer C, welcher 100 mM Natriumchlorid enthält, resuspendiert. Über Nacht wird gegen 2 mal 1 Liter Puffer C mit 100 mM NaCl dialysiert. Der Niederschlag wird durch erneutes Zentrifugieren (12.000 x g, 10 Minuten) abgetrennt und verworfen. Der Überstand der Dialyse wird für die Säulenchromatographie vorbereitet. Dazu wird dieser mit 1 Volumen Puffer C (ohne NaCl!) versetzt, um eine Ionenstärke von 50 mM NaCl einzustellen, wobei hierzu etwa 16 mL nötig sind.

### 5.2.8.4 Säulenchromatographie

Eine gereinigte Säule (Durchmesser 1.5 cm, Länge 10 cm) wird mit SP-Sepharose FF gepackt. Über Nacht wird die Säule an eine pneumatische Pumpe angeschlossen und mit Puffer C (mit 50 mM NaCl) bei einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Die T7-Lösung (ca. 35 mL) wird auf die Säule aufgebracht und vollständig in das Säulenmaterial einlaufen lassen. Daraufhin werden mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer (Puffer C mit 50 mM NaCl) alle nicht bindenden Proteine weggespült und die T7-RNA-Polymerase anschließend mit

Elutionspuffer (Puffer C mit 200 mM NaCl) von der Säule eluiert. In einem Fraktionensammler werden die Säuleneluate zu jeweils 1 mL (ca. 35 Tropfen) gesammelt, wobei die Tropfgeschwindigkeit bei etwa 6 Tropfen pro Minute liegt. Um festzustellen, in welchen Fraktionen sich Protein befindet, werden die Proteinkonzentration mittels des sog. BioRad-Assay ermittelt.

#### 5.2.8.5 BioRad-Assay

In einem 96-er *well plate* wird in jede Vertiefung 200  $\mu$ L einer 1:5 Verdünnung der BioRad-Lösung pipettiert. Anschließend gibt man 10  $\mu$ L der jeweiligen Fraktionen zu, wartet kurz und misst dann in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten die OD bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen werden für die weitere Aufarbeitung verwendet. Da eine hohe Proteinkonzentration nicht unbedingt mit einer hohen Konzentration an T7-RNA-Polymerase einhergeht, wird zur Überprüfung ein Glycin-SDS-Gel (siehe 5.2.2.5) mit den in Frage kommenden Fraktionen angefertigt. Diejenigen Fraktionen mit der größten Menge an T7-Polymerase werden vereinigt und der Dialyse unterworfen.

#### 5.2.8.6 Dialyse

Die Dialyse zum spezifischen Ausfällen der T7-Polymerase erfolgt in Dialyseschläuchen mit einer Ausschlussgrenze von 2000 Da. Es wird für 15 Stunden gegen 2 mal 750 mL Puffer C mit 10 mM NaCl dialysiert. Das ausgefallene Enzym wird durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 x g abgetrennt. Das präzipitierte Enzym wird in 10 mL Puffer C mit 100 mM NaCl gelöst und anschließend über Nacht gegen 900 mL Puffer C mit 100 mM NaCl und 50% Glycerin dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauchs (ca. 2.5 – 3 mL) wird entnommen und mittels des BioRad-Assays (siehe 5.2.8.5) wird erneut die Konzentration bestimmt. Die Reinheit des Enzyms wird durch nochmalige Glycin-SDS-Gelelektrophorese (vgl. 5.2.2.5) überprüft. Bei einer ermittelten Konzentration von 0.1 mg/mL und einer spezifischen Aktivität von 400.000 U/mg liegt die Aktivität der aufgereinigten T7-RNA-Polymerase bei 40 U/ $\mu$ L.

### 5.2.9 Selektion

#### 5.2.9.1 Herstellung der Selektionsmatrix

Für die Kopplung des  $\alpha$ -Thrombins an ein geeignetes Säulenmaterial wird Cyanogenbromid-aktivierte (CNBr-aktivierte) Sepharose verwendet und grundsätzlich nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Das Protein wird dabei in einer Konzentration von 1 mg/mL Säulenmaterial eingesetzt. Zusätzlich zur Selektionsmatrix wird noch eine nicht-derivatisierte Säule vorbereitet, die in der Selektion zur Präselektion dienen soll. Man wiegt dazu 2 mal 0.57 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B ab, überführt diese in eine 8 mL Einwegsäule und versetzt mit etwa 4 mL 1 mM HCl. Die Sepharose schwillt auf und es bildet sich das Gelmaterial aus (ca. 2 mL). Anschließend wird über einer Filternutsche mit etwa 110 mL der 1 mM HCl das Säulenmaterial gewaschen. Daraufhin wird gegen den Kopplungspuffer ausgetauscht und die

Säule bei Raumtemperatur für 2.5 Stunden prähydrolysiert, wodurch die Kopplungsaktivität reduziert wird, was später Mehrfachbindungen der Proteine an die Säule verringert. 2 mg  $\alpha$ -Thrombin werden in 2.8 mL Kopplungspuffer gelöst, mit der prähydrolysierten Matrix gemischt und alles für 1 Stunde im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Kopplungspuffer wird abfiltriert und der überschüssige, nicht gebundene Ligand wird mit 5 Säulenvolumen (= 10 mL) Kopplungspuffer gewaschen und im Anschluss werden die noch verbliebenen reaktiven Gruppen durch Zugabe von Blockierungspuffer (2 Stunden Stehen bei Raumtemperatur) abgefangen und geblockt. Das fertige Produkt wird in 3 Zyklen mit Lösungen unterschiedlichen pH-Wertes gewaschen (Waschpuffer 1 gefolgt von Waschpuffer 2). Die Matrix wird zur weiteren Verwendung als eine 50/50-Suspension in Selektionspuffer bei 4°C aufbewahrt. Zur Kontrolle der Kopplung wird jeweils eine Probe der Proteinlösung vor und nach dem Kopplungsschritt genommen und auf einem Tricin-SDS Gel analysiert.

### Kopplungspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
NaHCO <sub>3</sub>	84.01	0.1 M	8.4 g
NaCl	58.44	0.5 M	29.22 g

pH-Wert auf 8.3 einstellen.

### Blockierungspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 500 mL
1 M Tris	121.14	0.1 M	50 mL

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

### Waschpuffer 1

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
3 M NaOAc	82.03	0.1 M	33.3 mL
5 M NaCl	58.44	0.5 M	100 mL

pH-Wert auf 4.0 einstellen.

### Waschpuffer 2

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
1 M Tris	121.14	0.1 M	100 mL
5 M NaCl	58.44	0.5 M	100 mL

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

### 5.2.9.2 Durchführung der Selektion

Die gereinigten (5.2.6.1 & 5.2.6.2) und revers transkribierten (siehe 5.2.5.3) mRNA Display Peptide werden über eine NAP-Säule (vgl. 5.2.6.3) in 1.5 mL Selektionspuffer überführt und anschließend mit der Selektionsmatrix bei 25°C für 1 Stunde unter leichtem Schütteln (800 rpm) in einem Thermomixer inkubiert. Die Sepharose wird vor der Inkubation mit der mRNA Display Bibliothek 2 mal mit 1 mL Selektionspuffer gewaschen. Im ersten Zyklus werden 150 µL Thrombinmatrix und 1.5 mL mRNA Display Peptide eingesetzt und in den folgenden Schritten dieses Volumen auf 100 µL und jeweils 1 mL der Peptidlösung reduziert. Nach entsprechenden Waschungen (10 bis 200 Säulenvolumen) mit Selektionspuffer werden die gebundenen Peptide mit Elutionspuffer (4 mal 250 µL) von der Säule eluiert, wobei zwischen den Elutionschritten jeweils 10 Minuten gewartet wird. Danach wird das Eluat (1 mL) über eine äquilibrierte NAP-10-Säule (vgl. 5.2.6.3) entsalzt und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wird in 100 µL Wasser resuspendiert und anschließend in 5 Aliquots zu je 20 µL mittels PCR (siehe 5.2.5.1) amplifiziert.

#### Selektionspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1600 mL
NaCl	54.88	140 mM	13.09 g
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	203.3	4 mM	1.3 g
KCl	74.6	5 mM	0.4 g
HEPES	238	20 mM	7.62 g
Glutathion	307	2 mM	1.0 g
Glutathion-disulfid	612	1 mM	1.0 g
EDTA	372	0.1 mM	5.79 mg
Triton X-100	643.37	0.25% (v/v)	4 mL

pH-Wert auf 7.4 einstellen.

#### Elutionspuffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 100 mL
Harnstoff	60.1	4 M	24 g
SDS	288.4	0.5% (w/v)	0.5 g

## 5.2.10 Bindungsstudien

Um die relative Bindung der selektierten Peptid-Aptamere oder ihrer verkürzten Konstrukte zu ermitteln, wird die dsDNA der einzelnen Klone oder die Ausgangsbibliothek transkribiert und die gereinigte RNA direkt, d.h. ohne Ligation mit dem Puromycin-Linker, in die *in vitro* Translation eingesetzt, um so das freie Peptid des einzelnen Klons bzw. der Bibliothek zu

generieren. Verkürzte Peptide ohne den Histidin-Tag oder das gesamte C-terminale Ende werden durch PCR (siehe 5.2.5.1) mit den entsprechend kürzeren Primern (vgl. 5.1.8) dargestellt und anschließend in einer *in vitro* Transkription (siehe 5.2.5.2) die RNA gewonnen. Gemäß einem geringfügig modifizierten Protokoll von BARRICK *et al.*<sup>[50]</sup> werden jeweils 20 µL des Lysates, welches das freie Peptid enthält, in 500 µL Selektionspuffer verdünnt und für 1 Stunde bei 25°C mit 10 µL der Selektionsmatrix, welche mit 2 mal 1 mL Selektionspuffer gewaschen wird, unter leichtem Schütteln (800 rpm) inkubiert. Nach der Inkubation wird mit 5 mal 500 µL Selektionspuffer nachgewaschen und die immobilisierten Peptide mit 120 µL Tricin-Ladepuffer (vgl. 5.2.2.6) von der Säule eluiert (25°C, 15 Minuten, 800 rpm). Identische Probenmengen des Lysates und der Elutionsfraktion werden auf ein 12%-iges Tricin-SDS-Gel<sup>[110]</sup> geladen und bei 125 V aufgetrennt. Das Gel wird fixiert, getrocknet und anschließend mit dem Phosphorimager ausgewertet. Schließlich wird aus der Integration die relative Bindung der einzelnen Klone bezüglich des translatierten Peptids ermittelt. Um Kompetitionsstudien mit freiem  $\alpha$ -Thrombin durchzuführen wird dieses in Konzentrationen von 10 bis 5000 nM den Ansätzen zugesetzt und diese, wie oben beschrieben behandelt. Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) werden als Funktion des Anteils an gebundenem Peptid gegen die Konzentration des freien Thrombins ermittelt.

## 5.2.11 BIAcore-Messungen

### 5.2.11.1 $K_d$ -Bestimmung

Die synthetisierten Peptide (ohne den Histidin-Tag) werden auf einem BIAcore CM5 Chip mittels standardisierter EDC/NHS-Kopplung nach den Angaben des Herstellers immobilisiert. Für Thrombin als Analyten werden Bindungskurven bei unterschiedlichen Konzentrationen (1 – 2500 nM) aufgenommen und die entsprechenden Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) durch Analyse der erhaltenen Signale im Gleichgewichtszustand ermittelt.

### 5.2.11.2 Bindungsepitop-Bestimmung

Um das Bindungsepitop der Peptide an Thrombin genauer zu definieren werden Kompetitionsstudien mit Hirudin, dem nicht-sulfatierten und dem sulfatierten Hirudin-Peptid (Aminosäuren 54 - 65), sowie Antithrombin III in Lösung durchgeführt. Hierbei wird Thrombin in einer konstanten Konzentration von 50 nM eingesetzt und die Konzentration der Kompetitoren von 1 – 2500 nM variiert. Anschließend werden die inkubierten Mischungen auf den Chip mit den immobilisierten Peptiden injiziert und die Inhibition der Bindung an die Matrix bei steigenden Kompetitorkonzentrationen bestimmt.

## 5.2.12 SPOT-Analyse

Die Peptid-SPOTs wurden von JERINI AG, Berlin auf Cellulosemembranen synthetisiert. Nach Schwenken in 100% Ethanol für 1 Minute und dreimaligem Waschen mit TBS Puffer für 10 Minuten bei RT werden die Membranen über Nacht mit 10% Blockierungsreagenz

geblockt und daraufhin mit T-TBS Puffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wird die Membran für 75 Minuten mit humanem  $\alpha$ -Thrombin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) bei 25°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit T-TBS für 10 Minuten bei RT folgt eine Inkubation mit einem murinen Anti- $\alpha$ -Thrombin Antikörper (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) für 75 Minuten bei 25°C. Schließlich wird nochmals mit T-TBS für 10 Minuten bei RT gewaschen und die Membran für 75 Minuten bei 25°C mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten Kaninchen Anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 versetzt. Nach 3 Waschungen mit T-TBS für jeweils 10 Minuten bei RT wird die Membran mit dem ECL Substrat für 1.5 Minuten entwickelt und unmittelbar danach für 5 Sekunden auf einen Röntgenfilm exponiert. Für die Zyklisierung der Cystein-Seitenketten wird die Membran gemäß den Angaben des Herstellers über Nacht in 10% DMSO inkubiert und diese Lösung anschließend in vacuo abgezogen.

#### TBS Puffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	50 mM	6.06 g
NaCl	58.44	137 mM	8.01 g
KCl	74.54	2.7 mM	0.20 g

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

#### T-TBS Puffer

Reagenz	MW	Konzentration	benötigt für 1000 mL
Tris	121.14	50 mM	6.06 g
NaCl	58.44	137 mM	8.01 g
KCl	74.54	2.7 mM	0.20 g
Tween-20	1228	0.05% (v/v)	500 $\mu\text{L}$

pH-Wert auf 8.0 einstellen.

### 5.2.13 Gerinnungsstudien

Die Thrombin-Gerinnungszeiten werden mit einem Kugelcoagulometer gemessen. Dazu werden 100  $\mu\text{L}$  eines frisch aufgetauten Plasmas (freundlicherweise von Dr. B. Pötzsch zur Verfügung gestellt) für 2 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Parallel dazu werden 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung, die 0.25 NIH Einheiten  $\alpha$ -Thrombin, die verschiedenen Peptide und  $\text{CaCl}_2$  enthält vorbereitet. Das Plasma wird in die Messeinheit gestellt und die Thrombinlösung hinzupipetiert, wobei gleichzeitig die Zeitmessung gestartet wird. Die Konzentration der Peptide liegt zwischen 0.2 und 20  $\mu\text{M}$  und die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration beträgt final 6.25  $\mu\text{M}$ . Alle Experimente werden mindestens als Dreifachbestimmung durchgeführt und die gestoppten Zeiten gemittelt.



## 5.2.14 Chromogene Assays

### 5.2.14.1 Thrombin

Die Thrombinaktivität wird mittels des chromogenen Substrates S-2238 gemessen. Hierzu werden in einer 96-well Platte jeweils 0.5 NIH Einheiten humanes  $\alpha$ -Thrombin in 150  $\mu$ L Tris Puffer (50 mM, pH 8.3) mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide (0.1 – 20  $\mu$ M) für 5 Minuten bei 37°C vorgewärmt. Daraufhin werden in jede Vertiefung jeweils 50  $\mu$ L einer 2 mM Lösung des chromogenen Substrates S-2238, welche zeitgleich für 5 Minuten bei 37°C inkubiert wird, zugegeben und die Mikrotiterplatte sofort in ein entsprechendes Lesegerät gestellt und die Messung der Absorption bei 405 nm gestartet. Die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten werden gegen die Kontrolle ohne Thrombin korrigiert und gegen die unterschiedlichen Peptidkonzentrationen aufgetragen. Die Reaktionen werden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 5.2.14.2 Aktiviertes Protein C

Der Einfluss der Peptide auf die Thrombomodulin-induzierte Aktivierung von Protein C wird mittels eines chromogenen Assays ermittelt. Durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin wird die enzymatische Aktivität von Thrombin verändert und dadurch Protein C in aktiviertes Protein C (aPC) umgewandelt. Die Bildung von aPC kann über die Spaltung des aPC-spezifischen chromogenen Substrats (S-2366) gemessen werden. Dazu wird in Mikrotiterplatten in 250  $\mu$ L 50 mM Tris (pH 7) 3.7 nM humanes  $\alpha$ -Thrombin, 2 nM *Rabbit Lung Thrombomodulin* für 2 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend werden die selektierten Peptide in Konzentrationen von 5 – 100  $\mu$ M zugegeben und für weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  auf 2.5 mM eingestellt und Protein C in einer finalen Konzentration von 887 nM zugesetzt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 15 Minuten wird schließlich das chromogene Substrat zugegeben und sofort die Messung in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten die Messung bei einer Absorption von 405 nm gestartet. Die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten werden gegen die Kontrolle ohne Thrombomodulin korrigiert, da Thrombin eine geringe Spaltungsaktivität für das Substrat besitzt. Die unterschiedlichen Peptidkonzentrationen werden auf der Abszisse aufgetragen. Die Reaktionen werden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

## 5.2.15 NMR-Analysen

Die Spektren wurden an einem 600 MHz NMR-Spektrometer freundlicherweise von Prof. Dr. HARTMUT OSCHKINAT, FMP Berlin, aufgenommen.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Wilson DS, Szostak JW: In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu Rev Biochem* **1999**, 68:611-647.
- [2] Ketting U, Koltermann A, Eigen M: Evolutionary biotechnology - reflections and perspectives. *Curr Top Microbiol Immunol* **1999**, 243:173-186.
- [3] Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ: Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **1984**, 81:3998-4002.
- [4] Gallop MA, Barrett RW, Dower WJ, Fodor SP, Gordon EM: Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries. *J Med Chem* **1994**, 37:1233-1251.
- [5] Lam KS, Lebl M: Selectide Technology - Bead binding screening. In *METHODS: Companion Methods Enzymol.* Edited by; **1994**:372-380. vol 6.]
- [6] Patel DJ, Suri AK, Jiang F, Jiang L, Fan P, Kumar RA, Nonin S: Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J Mol Biol* **1997**, 272:645-664.
- [7] Ellington AD, Szostak JW: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, 346:818-822.
- [8] Tuerk C, Gold L: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, 249:505-510.
- [9] Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M: Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* **1995**, 64:763-797.
- [10] Osborne SE, Ellington AD: Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry. *Chem Rev* **1997**, 97:349-370.
- [11] Famulok M: Molecular Recognition of Amino-Acids by RNA-Aptamers - an L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116:1698-1706.
- [12] Geiger A, Burgstaller P, von der Eltz H, Roeder A, Famulok M: RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* **1996**, 24:1029-1036.
- [13] Famulok M: Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr Opin Struct Biol* **1999**, 9:324-329.
- [14] Sassanfar M, Szostak JW: An RNA motif that binds ATP. *Nature* **1993**, 364:550-553.

- [15] Xu W, Ellington AD: Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*:7475-7480.
- [16] Giver L, Bartel D, Zapp M, Pawul A, Green M, Ellington AD: Selective optimization of the Rev-binding element of HIV-1. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*:5509-5516.
- [17] Klug SJ, Hüttenhofer A, Kromayer M, Famulok M: In vitro and in vivo characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*:6676-6681.
- [18] Famulok M, Mayer G: Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* **1999**, *243*:123-136.
- [19] Weiss S, Proske D, Neumann M, Groschup MH, Kretzschmar HA, Famulok M, Winnacker EL: RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* **1997**, *71*:8790-8797.
- [20] Good PD, Krikos AJ, Li SX, Bertrand E, Lee NS, Giver L, Ellington A, Zaia JA, Rossi JJ, Engelke DR: Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther* **1997**, *4*:45-54.
- [21] Mayer G, Blind M, Nagel W, Böhm T, Knorr T, Jackson CL, Kolanus W, Famulok M: Controlling small guanine-nucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98*:4961-4965.
- [22] Cech TR: Structure and Mechanism of the Large Catalytic RNAs: Group I and Group II Introns and Ribonuclease P. In *The RNA World*. Edited by Atkins JF: Cold Spring Harbour Laboratory Press; **1993**:239-269.
- [23] Long DM, Uhlenbeck OC: Self-cleaving catalytic RNA. *FASEB J* **1993**, *7*:25-30.
- [24] Famulok M, Jenne A: Catalysis Based on Nucleic Acid Structures. *Top Curr Chem* **1999**, *202*:101-131.
- [25] Bartel DP, Szostak JW: Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* **1993**, *261*:1411-1418.
- [26] Jenne A, Famulok M: A novel ribozyme with ester transferase activity. *Chem Biol* **1998**, *5*:23-34.
- [27] Zhang BL, Cech TR: Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* **1997**, *390*:96-100.
- [28] Tarasow TM, Tarasow SL, Eaton BE: RNA-catalysed carbon-carbon bond formation. *Nature* **1997**, *389*:54-56.
- [29] Seelig B, Jäschke A: A small catalytic RNA motif with Diels-Alderase activity. *Chem Biol* **1999**, *6*:167-176.

- [30] Sengle G, Eisenführ A, Arora PS, Nowick JS, Famulok M: Novel RNA catalysts for the Michael reaction. *Chem Biol* **2001**, *8*:459-473.
- [31] Latham JA, Johnson R, Toole JJ: The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*:2817-2822.
- [32] Thum O, Jäger S, Famulok M: Functionalized DNA: A new replicable biopolymer. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*:3990-3993.
- [33] Stemmer WP: Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **1994**, *370*:389-391.
- [34] Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **1985**, *228*:1315-1317.
- [35] Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chem Rev* **1997**, *97*:391-410.
- [36] Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ: An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, *91*:9022-9026.
- [37] Hanes J, Plückthun A: In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*:4937-4942.
- [38] Jermutus L, Ryabova LA, Plückthun A: Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation. *Curr Opin Biotechnol* **1998**, *9*:534-548.
- [39] Amstutz P, Forrer P, Zahnd C, Pluckthun A: In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr Opin Biotechnol* **2001**, *12*:400-405.
- [40] Hoffmüller U, Schneider-Mergener J: In vitro evolution and selection of proteins: Ribosome display for larger libraries. *Angew Chem Int Ed Engl* **1998**, *37*:3241-3243.
- [41] Roberts RW: Totally in vitro protein selection using mRNA-protein fusions and ribosome display. *Curr Opin Chem Biol* **1999**, *3*:268-273.
- [42] Roberts RW, Ja WW: In vitro selection of nucleic acids and proteins: What are we learning? *Curr Opin Struct Biol* **1999**, *9*:521-529.
- [43] Roberts RW, Szostak JW: RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, *94*:12297-12302.
- [44] Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H: In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett* **1997**, *414*:405-408.

- [45] Monro RE, Vazquez D: Ribosome-catalysed peptidyl transfer: effects of some inhibitors of protein synthesis. *J Mol Biol* **1967**, 28:161-165.
- [46] Monro RE, Marcker KA: Ribosome-catalysed reaction of puromycin with a formylmethionine-containing oligonucleotide. *J Mol Biol* **1967**, 25:347-350.
- [47] Gold L: mRNA display: diversity matters during in vitro selection. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98:4825-4826.
- [48] Keefe AD, Szostak JW: Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* **2001**, 410:715-718.
- [49] Wilson DS, Keefe AD, Szostak JW: The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98:3750-3755.
- [50] Barrick JE, Takahashi TT, Ren J, Xia T, Roberts RW: Large libraries reveal diverse solutions to an RNA recognition problem. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, 98:12374-12378.
- [51] Hammond PW, Alpin J, Rise CE, Wright M, Kreider BL: In vitro selection and characterization of Bcl-X(L)-binding proteins from a mix of tissue-specific mRNA display libraries. *J Biol Chem* **2001**, 276:20898-20906.
- [52] Cujec TP, Medeiros PF, Hammond P, Rise C, Kreider BL: Selection of v-Abl Tyrosine Kinase Substrate Sequences from Randomized Peptide and Cellular Proteomic Libraries Using mRNA Display. *Chem Biol* **2002**, 9:253-264.
- [53] James W: Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr Opin Pharmacol* **2001**, 1:540-546.
- [54] Cho G, Keefe AD, Liu R, Wilson DS, Szostak JW: Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using in vitro selection. *J Mol Biol* **2000**, 297:309-319.
- [55] Liu R, Barrick JE, Szostak JW, Roberts RW: Optimized synthesis of RNA-protein fusions for in vitro protein selection. *Methods Enzymol* **2000**, 318:268-293.
- [56] Kurz M, Gu K, Lohse PA: Psoralen photo-crosslinked mRNA-puromycin conjugates: a novel template for the rapid and facile preparation of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res* **2000**, 28:E83.
- [57] Keefe AD: Protein selection using mRNA display. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by Struhl K: Wiley; **2001**:Unit 24.25.
- [58] Barrick JE, Takahashi TT, Balakin A, Roberts RW: Selection of RNA-binding peptides using mRNA-peptide fusions. *Methods* **2001**, 23:287-293.
- [59] Kurz M, Gu K, Al-Gawari A, Lohse PA: cDNA-Protein Fusions: Covalent Protein-Gene Conjugates for the In Vitro Selection of Peptides and Proteins. *ChemBioChem* **2001**, 2:666-672.

- [60] Stubbs MT, Bode W: The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*:23-28.
- [61] Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S: Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* **1988**, *57*:915-956.
- [62] Kane WH, Davie EW: Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* **1988**, *71*:539-555.
- [63] Gailani D, Broze GJ, Jr.: Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* **1991**, *253*:909-912.
- [64] Tsiang M, Jain AK, Dunn KE, Rojas ME, Leung LL, Gibbs CS: Functional mapping of the surface residues of human thrombin. *J Biol Chem* **1995**, *270*:16854-16863.
- [65] Ayala YM, Cantwell AM, Rose T, Bush LA, Arosio D, Di Cera E: Molecular mapping of thrombin-receptor interactions. *Proteins* **2001**, *45*:107-116.
- [66] Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J: The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* **1989**, *8*:3467-3475.
- [67] Lombardi A, De Simone G, Galdiero S, Staiano N, Natri F, Pavone V: From natural to synthetic multisite thrombin inhibitors. *Biopolymers* **1999**, *51*:19-39.
- [68] Vijayalakshmi J, Padmanabhan KP, Mann KG, Tulinsky A: The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. *Protein Sci* **1994**, *3*:2254-2271.
- [69] Sheehan JP, Wu Q, Tollefsen DM, Sadler JE: Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins heparin cofactor II and antithrombin III. Interaction with the anion-binding exosite determines heparin cofactor II specificity. *J Biol Chem* **1993**, *268*:3639-3645.
- [70] Sheehan JP, Tollefsen DM, Sadler JE: Heparin cofactor II is regulated allosterically and not primarily by template effects. Studies with mutant thrombins and glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **1994**, *269*:32747-32751.
- [71] Le Bonniec BF, Guinto ER, Esmon CT: Interaction of thrombin des-ETW with antithrombin III, the Kunitz inhibitors, thrombomodulin and protein C. Structural link between the autolysis loop and the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion of thrombin. *J Biol Chem* **1992**, *267*:19341-19348.
- [72] Stone SR, Hofsteenge J: Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* **1986**, *25*:4622-4628.

- [73] Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, Fenton JW, 2nd: The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* **1990**, *249*:277-280.
- [74] Grütter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J, Stone SR: Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J* **1990**, *9*:2361-2365.
- [75] Skrzypczak-Jankun E, Carperos VE, Ravichandran KG, Tulinsky A, Westbrook M, Maraganore JM: Structure of the hirugen and hirulog 1 complexes of alpha-thrombin. *J Mol Biol* **1991**, *221*:1379-1393.
- [76] Esmon CT: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* **1989**, *264*:4743-4746.
- [77] Esmon CT: Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* **1995**, *9*:946-955.
- [78] Strube KH, Kroger B, Bialojan S, Otte M, Dodt J: Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. An anticoagulant peptide from the Indian leech. *J Biol Chem* **1993**, *268*:8590-8595.
- [79] Richardson JL, Kroger B, Hoeffken W, Sadler JE, Pereira P, Huber R, Bode W, Fuentes-Prior P: Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J* **2000**, *19*:5650-5660.
- [80] Li CQ, Vindigni A, Sadler JE, Wardell MR: Platelet glycoprotein Ib alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin. *J Biol Chem* **2001**, *276*:6161-6168.
- [81] Rose T, Di Cera E: 3D-modeling of thrombin-fibrinogen interaction. *J Biol Chem* **2002**, *in press*.
- [82] Van Deerlin VM, Tollefsen DM: The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **1991**, *266*:20223-20231.
- [83] Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W: Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature* **2000**, *404*:518-525.
- [84] Sheehan JP, Sadler JE: Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, *91*:5518-5522.
- [85] De Cristofaro R, De Candia E, Rutella S, Weitz JI: The Asp(272)-Glu(282) region of platelet glycoprotein Ibalpha interacts with the heparin-binding site of alpha-thrombin and protects the enzyme from the heparin-catalyzed inhibition by antithrombin III. *J Biol Chem* **2000**, *275*:3887-3895.

- [86] Sleat DE, Gallie DR, Jefferson RA, Bevan MW, Turner PC, Wilson TM: Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene* **1987**, 60:217-225.
- [87] Kozak M: Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* **1983**, 47:1-45.
- [88] Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **1975**, 258:598-599.
- [89] Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH: Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **1999**, 288:911-940.
- [90] Zuker M, Mathews DH, Turner DH: Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*. Edited by Clark BFC: Kluwer Academic Publishers; **1999**:11-43. NATO ASI Series
- [91] Wolf E, Kim PS: Combinatorial codons: a computer program to approximate amino acid probabilities with biased nucleotide usage. *Protein Sci* **1999**, 8:680-688.
- [92] Pollard J, Bell SD, Ellington AD: Design, Synthesis, and Amplification of DNA Pools for In Vitro Selection. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by Struhl K: Wiley; **2000**:Unit 9.2.
- [93] Moore MJ, Sharp PA: Site-specific modification of pre-mRNA: the 2'-hydroxyl groups at the splice sites. *Science* **1992**, 256:992-997.
- [94] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **1997**, 25:3389-3402.
- [95] Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ: Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **1992**, 355:564-566.
- [96] Kubik MF, Stephens AW, Schneider D, Marlar RA, Tasset D: High-affinity RNA ligands to human alpha-thrombin. *Nucleic Acids Res* **1994**, 22:2619-2626.
- [97] Frank R, Overwin H: SPOT synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In *Methods in Molecular Biology*. Edited by Totowa NJ: Humana Press; **1996**:149-169. Epitope Mapping Protocols, vol 66.]
- [98] Schneider-Mergener J, Kramer A, Reineke U: *Peptide libraries bound to continuous cellulose membranes: tools to study molecular recognition*. Edited by Cortese R. Berlin: Walter de Gruyter; **1996**.



- [99] Frank R, Hoffmann S, Kieß M, Lahmann H, Tegge W, Behn C, Gausepohl H: *Combinatorial synthesis on membrane supports by the SPOT technique: imaging peptide sequence and shape space*. Edited by Jung G. Weinheim: VCH; **1996**.
- [100] Pirrung MC: Spatially Addressable Combinatorial Libraries. *Chem Rev* **1997**, *97*:473-488.
- [101] Kramer A, Schneider-Mergener J: Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. In *Methods in Molecular Biology*. Edited by Totowa NJ: Humana Press; **1998**:25-39. *Combinatorial Peptide Library Protocols.*, vol 87.]
- [102] Kramer A, Reineke U, Dong L, Hoffmann B, Hoffmuller U, Winkler D, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J: Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res* **1999**, *54*:319-327.
- [103] Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M, Schulz M, Schneider-Mergener J, Reineke U: Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*:188-206.
- [104] Wenschuh H, Gausepohl H, Germeroth L, Ulbricht M, Matuschewski H, Kramer A, Volkmer-Engert R, Heine N, Ast T, Scharn D, et al.: *Positionally addressable parallel synthesis on continuous membranes*. Edited by Fenniri H. Oxford: Oxford University Press; **2000**.
- [105] Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J: Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol* **2001**, *12*:59-64.
- [106] Toepert F, Pires JR, Landgraf C, Oschkinat H, Schneider-Mergener J: Synthesis of an Array Comprising 837 Variants of the hYAP WW Protein Domain. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*:897-900.
- [107] Salzet M: Leech thrombin inhibitors. *Curr Pharm Des* **2002**, *8*:493-503.
- [108] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* edn 2. Cold Spring Harbor: CSHL Press; **1989**.
- [109] Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; **1998**.
- [110] Schägger H, von Jagow G: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **1987**, *166*:368-379.
- [111] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**, *74*:5463-5467.

## 7 Anhang

### 7.1 Aminosäuren

#### 7.1.1 Aminosäuren

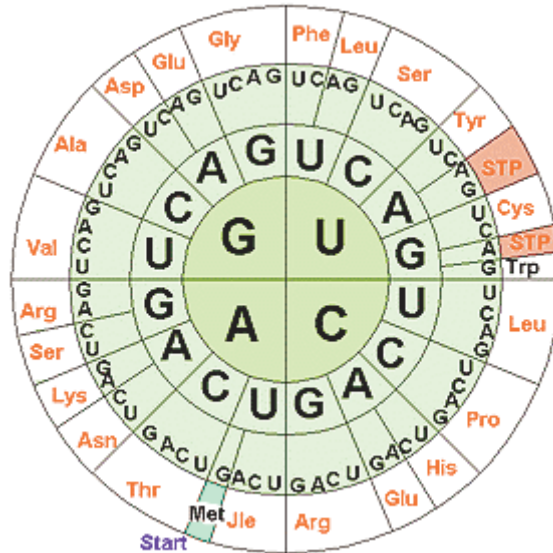
Die 20 natürlichen Aminosäuren werden zum einen durch einen einbuchstabigen oder einen dreibuchstabigen Code dargestellt (siehe **Tabelle 13**).

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure	M <sub>r</sub>	IEP	Seitenkette
A	Ala	Alanin	89	6.01	un
C	Cys	Cystein	121	5.07	pu
D	Asp	Aspartat	133	2.77	ne
E	Glu	Glutamat	147	3.22	ne
F	Phe	Phenylalanin	165	5.48	ar
G	Gly	Glycin	75	5.97	un
H	His	Histidin	155	7.59	po
I	Ile	Isoleucin	131	6.02	un
K	Lys	Lysin	146	9.74	po
L	Leu	Leucin	131	5.98	un
M	Met	Methionin	149	5.74	pu
N	Asn	Asparagin	132	5.41	pu
P	Pro	Prolin	115	6.48	un
Q	Gln	Glutamin	146	5.65	pu
R	Arg	Arginin	174	10.76	po
S	Ser	Serin	105	5.68	pu
T	Thr	Threonin	119	5.87	pu
V	Val	Valin	117	5.97	un
W	Trp	Tryptophan	204	5.89	ar
Y	Tyr	Tyrosin	181	5.66	ar

**Tabelle 13:** Aminosäuren (M<sub>r</sub>: Molekulare Masse, IEP: isoelektrischer Punkt, un: unpolare, aliphatische Seitenketten, ar: aromatische Seitenketten, pu: polare ungeladene Seitenketten, ne: negativ geladene Seitenketten, po: positiv geladene Seitenketten)

## 7.1.2 Genetischer Code

Die „Codonsonne“ in **Abbildung 42** ist von innen nach außen zu lesen, um die entsprechende Aminosäure für das jeweilige Codon zu ermitteln.



**Abbildung 42:** Codonsonne. Von innen nach außen gelesen erhält man aus den Basen der einzelnen Positionen des Codon-Tripletts die entsprechende Aminosäure.

## 7.1.3 Proteinsequenzen der Klone

### 7.1.3.1 Klone aus der Selektion

T10-02 (35) MGMGTC L Y V R R S T A H I F V Y A N SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-05 (35) MGMGTC F Y E S C E N S D P G R T Y A SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-06 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R G G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-07 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-09 (35) MGMGTC E R N Y N D L C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-11 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-12 (35) MGMGTC D Y V S D V C R D G G R I M L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-13 (35) MGMGTC L N W P N N L E G R D P Y N R SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-14 (35) MGMGTC Y A L I Y A V K K R M G I A H SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-15 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-16 (35) MGMGTC Y F D P G F C V F T S D H L A PGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-17 (35) MGMGTC Y T H S S K S S D P G R K L W SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-18 (35) MGMGTC E R H N D P G R Y F V E Y E T SGSHHHHHHSMSGSGS  
 T10-19 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS

T10-20 (35) MGMGTC F H E S C E N S D P G R T Y A SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-21 (35) MGMGTC D F D N M F S N L D P G R H W SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-22 (35) MGMGTC E F N Q W E D P G R M R V G C SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-23 (35) MGMGTC E R H N D P G R Y F V E Y E T SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-24 (35) MGMGTC D S Y C E L T D P G R W I S A SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-25 (35) MGMGTC W R H Y N P S D D P G R V H L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-26 (35) MGMGTC D R S P R M F Y N R F N S A L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-27 (35) MGMGTC Y N S L S G R S L H P D I G F SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-28 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R F G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-29 (35) MGMGTC E P C C C E N R D V G R L I H SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-30 (35) MGMGTC E Y T N D Y D D P G R T L S G TSGSHHHHHHHSMSGSGS  
T10-31 (35) MGMGTC W F V Y I D R W A Y A S F R H SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-32 (35) MGMGTC D N Y K L C E S D V G R L L F SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-33 (35) MGMGTY Y T Y S N D F T D G G R H I L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-34 (35) MGMGTC F F D R Y D S A R D P G R L L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-35 (35) MGMGTC W Q R C G M A E F I W H F Q W SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-36 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-37 (35) MGMGTC Y M S F T R R T E S D K L H S SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-38 (35) MGMGTC E R N Y N D F C N P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-39 (35) MGMGTC F F D R Y D S A R D P G R L L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-41 (35) MGMGTC D R S I L V P R Y F E L W A N SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-42 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R G G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-43 (35) MGMGTC D I N Y C D P G R D C D G H L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-44 (35) MGMGTC D Y S N E S S D P G R L W H C SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-45 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-46 (35) MGMGTC Y F C M G Q I C F L R F A L H SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-47 (35) MGMGTC H G P D V N H A D P G R Y F D SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-49 (35) MGMGTC N H N L M N D P G R F F W H D SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-50 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-52 (35) MGMGTY L H L D S D H F D P G R T V W SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-53 (35) MGMGTC E R N Y N D F C D P G R V G L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-54 (35) MGMGTC R N Y T N P Y C D P G R Q H E SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-56 (35) MGMGTC Y F C M G Q I C F L R F A L H SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-57 (35) MGMGTF W E I Y W H L E F A G F D R V SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-58 (35) MGMGTC L V D C I S H D D P G R S V G SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-59 (35) MGMGTC W L V C R H S K R Y N C I F L SGSHHHHHHSMSGSGS  
T10-60 (35) MGMGTC Y L H V V E I E R H R I R F F SGSHHHHHHSMSGSGS

**T10-61 (35)** MGMGTC Y G H C F E N F G D S F E H N SGSHHHHHHSMSGSGS  
**T10-62 (35)** MGMGTC D Y W A F W R V Y F Q V D G Y SGSHHHHHHSMSGSGS  
**T10-63 (35)** MGMGTC Y D A G F C N Y D R D H I W P SGSHHHHHHSMSGSGS  
**T10-66 (35)** MGMGTC Y V Y L L R H D Q H S Y Y P P SGSHHHHHHSMSGSGS  
**T10-68 (35)** MGMGTC L R L V G S D H N F D A V V C SGSHHHHHHSMSGSGS  
**T10-71 (35)** MGMGTC D F D N M L S N L D P G R H W SGSHHHHHHSMSGSGS

### 7.1.3.2 Klone aus der Startbibliothek

(nur randomisierte Region)

**P-01 (14)** M L R G L G S C R S G L L Y L  
**P-02 (15)** V F G Y K G P R Y E R Y G S S S  
**P-03 (15)** G S C R D R H Y C S H H R W V S  
**P-04 (15)** P V Y Y Q Q N R R G L \* S M A S  
**P-05 (15)** H C W F S W H C N G C N G R M S  
**P-06 (15)** H C W F S W H C N G C N G R M S  
**P-07 (15)** E Q I F V H S L G S S R E H E L  
**P-08 (15)** F L E A A S R D V I T E Y L Y S  
**P-09 (15)** F E K S T G \* D S Q D R D W R S  
**P-11 (15)** V R I A A S R I S T N N K Y F S  
**P-12 (15)** G G C P D R H Y C S H H R W V S  
**P-13 (15)** G M G C K M R Y G C W P H R P S  
**P-14 (14)** L H D H M R L R Y L W V R D S  
**P-15 (15)** G G N A C Y Y V S H W K V Y H S  
**P-17 (14)** G G R H T V L S L G L A A S G  
**P-18 (15)** P I S T R Y Y H H K L S Y H F S  
**P-19 (15)** P I S T R Y Y H H K P E L P L L  
**P-20 (15)** Y P R R L L H A K Y H A Q L G S  
**P-21 (15)** R C W H G D D E S S N S L F H S  
**P-23 (15)** R P S R R A Y S Q G C A Q Y L S  
**P-24 (15)** S I P A T A G T L L G G A I L S  
**P-25 (14)** A G C L L G H G R R C W G D S  
**P-26 (12)** C Q F G L W F F \* R L S S  
**P-27 (15)** G H P L S C V V W Y A L I H Q S  
**P-28 (15)** T F R E S D S \* L H S D N F T S  
**P-29 (15)** Y F A C R D Y P H Y S H K G F S  
**P-30 (14)** C V I F C G T I T G A G I V I  
**P-31 (15)** \* S S Q D A G T C G F A I L E S

**P-32 (15)** C L Y C E L L Y S L D \* T C E S

**P-33 (15)** Y H L I W R S I F V N F R L N S

**P-34 (14)** H W N W G V Y F D C G N S V G

**P-35 (15)** I \* R L K G F S S L H D F L F S

**P-36 (14)** \* D G D R S G S N K K K K K N

## 7.1.4 Sequenzen der Proteine

### Humanes $\alpha$ -Thrombin

TFGSGEADCGLRPLFEKKSLEDKTERELLESYIDGRIVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCGASL  
ISDRWVLTAAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIHPRYNWRENLDLDRDI  
ALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLKETWTANVGKGQPSVLQVVNLP  
IV  
ERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPFNRRWYQMGIVSWGEGCDRDGK  
YGFYTHVFRLLKKWIQKVIDQFGE

### Antithrombin III

HGSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSPEKKATEDEGSEQKIPEATNRRVWELSKANSRFATTFYQHLAD  
SKNDNDNIFLSPLSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVFKFDTISEKTSQIHFFFFAKLNCRLYRKANK  
SSKLVSANRLFQDKSLTFNETYQDISELVYGAKLQPLDFKENAEQSRAAINKWVSNKTEGRITDVIPS  
EAINELTVLVLVNTIYFKGLWKS KFS PENTR K E L F Y K A D G E S C S A S M M Y Q E G K F R Y R R V A E G T Q V L E L  
P F K G D D I T M V L I L P K P E K S L A K V E K E L T P E V L Q E W L D E L E E M M L V V H M P R F R I E D G F S L K E Q L Q D M G L  
V D L F S P E K S K L P G I V A E G R D D L Y V S D A F H K A F L E V N E E G S E A A S T A V V I A G R S L N P N R V T F K A N R P F  
L V F I R E V P L N T I I F M G R V A N P C V K

### Hirudin

VVYTDCTESGQNLCCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPQSHNDGDFEEIPEEYLQ

### Haemadin

IRFGMGKVPCPDGEVGYTDCDCGEKICLYGQSCNDGQCSGDPKPSSEFEFEFEIDEEK

### Thrombomodulin

MLGVLVLGALALAGLGFPAEAPQPGGSQCVEHDCFALYGPATFLNASQICDGLRGHLMTVRSSVAA  
DVISLLLNGDGGVGRRLWIGLQLPFGCGDPKRLGPLRGFQWVTGDNNTSYSRWARLDLNGAPLCGPL  
CVAVSAAEATVPSEPIWEEQQCEVKADGFLCEFHF PATCRPLAVEPGAAAAVSI TYGTPFAARGADF  
QALPVGSSAAVAPLGLQLMCTAPP GAVQGHWAREAPGAWDCSVENGGCEHACNAIPGAPRCQCPAGAA  
LQADGRSCTASATQSCNDLCEHFVCPNPDQPGSYSCMCETGYRLAADQHRCEDVDDCILEPSPCPQRC

VNTQGGFECHCYPNYDLVDGECVEPVDPCFRANCEYQCQPLNQTSYLCVCAEGFAPIPHEPHRCQMFC  
 NQTACPADCDPNTQASCECEGYILDDGFICTDIDECENGGFCSGVCHNLPGETFECICGPDSALARHI  
 GTDCDSGKVDGGDSGSGEPPPSPTPGSTLTPPAVGLVHSGLLIGISIASLCLVVALLLCHLRKKQG  
 AARAKMEYKCAAPSKEVVLQHVRTERTPQRL

### **Platelet Glycoprotein Iba $\alpha$**

MPLLLLLLLLLLPSPLHHPHPICEVSKVASHLEVNC DKRNLTALPPDLPKDTTILHLSENLLYTFSLATLM  
 PYTRLTQLNLDRCCELTKFQVDGTL PVLGTLDSLHNQLQSLPLLQTLPALTVLDVSNRLTSLPLGAL  
 RGLGELQELYLKGNELKTLPPGLLTPPKLEKLSLANNLTELPA GLLNGLENLDTLLLQENSLYTIP  
 KGFFGSHLLPFAFLHGNPWLNCCEILYFRRWLQDNAENVYVWKQGV DVKAMTSNVASVQCDNSDKFPV  
 YKYPGKGCPTLGDGDTLDLYDYYPEEDTEGDKVRATRTVVKFPTKAHTTPWGLFYSWSTASLDSQMPS  
 SLHPTQESTKEQTTFFPRWTPNFTLHMESITFSKTPKSTTEPTSPPTTSEPVPEPAPNMTTLEPTPSP  
 TTPEPTSEPAPSPTTPEPTPIPTIATSPTILVSATSLITPKSTFLTTTKPVSLLESTKKTIPELDQPP  
 KLRGVLQGHLESSRNDPFLHPDFCCLLPLGFYVLGLFWLLFASVVLILLLSWVGHVKPQALDSGQGA  
 LTTATQTTHELEQRGRQVTVPRAWLLFLRGS LPTFRSSLFLWVRPNGRVGPLVAGRRPSALSQGRGQD  
 LLSTVSI RYSGHSL

### **Heparin Cofaktor II**

MKHS LNALLIFLIITS AWGGSKGPLDQLEKGGETAQSADPQWEQLNKNLSMPLLPA DFPKENTVTND  
 WIPEGEEDDDYLDLEKIFSEDDDYIDIVDSLVSPTDSDVSAGN ILQLFHGKSRIQRNLINLNAKF AFN  
 LYRVLKDQVNTFDNIF IAPVGI STAMGMISLGLKGETHEQVHSILHFKDFVNASSKYEITTIHNLFRK  
 LTHRLFRRNFGYTLRSVNDLYIQKQFPILLDFKTKVREYYFAEAQIADFSDPAFISKTNNHIMKLT KG  
 LIKDALENIDPATQMMILNCIYFKGSWVNKFPVEMTHNHNFR LNEREVVKVSMMQTKGNFLAANDQEL  
 DCDILQLEYVGGISMLIVVPHKMSGMKTLEAQLTPRVVERWQKSMTNRTREVLLPKFKLEKNYNLVES  
 LKLMGIRMLFDKNGNMAGISDQRI AIDLFKHQGTITVNEEGTQATTVTTVGF MPLSTQVRFTVDRPFL  
 FLIYEHRTSCLLFMGRVANPSRS

### **Fibrinogen A alpha**

ADSGEGDFLAEGGGVVRGPRVVERHQ SACKDSDWPFCSDEDKGLIDEV NQDFTNRINKLKNLSLFEYQKN  
 NKDSHSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVIEKVQKRLEVDIDIKIRSCRG  
 SCSRALAREVDLKDYEDQKQLEQKVPV DLPVPGNFKSQ LQKVPPEWKALTMELERPPGNEITRGGST  
 SYGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPGSSGTGGTATWKPGSSGPGSXSWSNSGSSGTGS  
 TGNQNP GSPRPGSTGTWNP GSSERGSAGHWTSESSVSGSTGQWHSESGSFRPDSPGSGNARPNPDWG  
 TFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEKVTSGSTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVT  
 KEVVTSEDGSDCPEAMD LGT LSGIGLGEFVSETESRGS ESGIFTNTKADEAGSE

## 7.2 Nukleinsäuren

### 7.2.1 Nukleinsäuren

Die natürlichen Bausteine von DNA und RNA werden durch die folgenden Abkürzungen angegeben (siehe **Tabelle 14**):

Buchstabe	Baustein	Name
<i>Einzelne Bausteine</i>		
A	A	Adenosin
C	C	Cytidin
G	G	Guanosin
T	T	Thymidin
U	U	Uracil
<i>Kombinationen</i>		
K	G oder T	
M	A oder C	
R	A oder G	
S	G oder C	
W	A oder T	
Y	C oder T	
B	G oder T oder C	
D	G oder T oder A	
H	A oder C oder T	
V	G oder C oder A	
N	A oder C oder G oder T	

**Tabelle 14:** IUPAC-IUB Kodierung für Nukleinsäurebausteine.

### 7.2.2 Nukleotidsequenzen der Klone

#### 7.2.2.1 Klone aus der Selektion

**T10-02 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT CTT TAC GTC CGG CGC TCG ACT GCG CAC ATC TTT GTT TAT GCG  
AAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-05 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTC TAC GAG TCC TGC GAG AAT AGC GAT CCT GGC CGT ACC TAC  
GCT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT



**T10-06 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GGC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-07 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCA GGT CGT GTC GGT  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-09 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT CTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-11 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-12 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGC GAT TAT GTT TCC GAT GTG TGT CGC GAC GGT GGG CGT ATC ATG  
TTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-13 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTG AAC TGG CCG AAT AAT CTG GAG GGC CGT GAC CCT TAC AAT  
CGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-14 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC GCC CTG ATT TAC GCC GTG AAG AAG CGC ATG GGG ATC GCT  
CAC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-15 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-16 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAT TTC GAT CCC GGC TTT TGC GTC TTC ACC AGC GAC CAT CTC  
GCC CCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-17 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAT ACG CAC AGT TCC AAG AGT AGC GAT CCG GGC CGG AAG CTT  
TGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-18 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT CAT AAC GAT CCG GGC CGG TAC TTT GTC GAG TAC GAG  
ACG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-19 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-20 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTC CAC GAG TCC TGC GAG AAT AGC GAT CCT GGC CGT ACC TAC  
GCT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-21 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAC TTC GAC AAC ATG TTC AGC AAT CTC GAT CCG GGT CGT CAT  
TGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-22 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG TTC AAT CAG TGG GAG GAC CCC GGC CGT ATG CGT GTC GGC  
TGT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-23 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT CAT AAC GAT CCG GGC CGG TAC TTT GTC GAG TAC GAG  
ACG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-24 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAT TCT TAT TGT GAG CTT ACT GAT CCG GGT CGC TGG ATT TCC  
GCC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-25 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TGG CGG CAT TAT AAT CCT AGC GAT GAT CCG GGC AGG GTC CAC  
TTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-26 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAT CGG TCT CCT CGC ATG TTT TAT AAT CGT TTC AAT TCT GCT  
TTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-27 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC AAT AGT TTG AGC GGC AGG AGT TTG CAC CCG GAT ATC GGG  
TTT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-28 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT TTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-29 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CCT TGT TGC TGC GAG AAT CGG GAT GTG GGC CGT TTG ATT  
CAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-30 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG TAT ACG AAT GAC TAC GAC GAT CCT GGC CGC ACT CTC AGC  
GGG ACC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-31 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TGG TTT GTC TAC ATC GAT CGC TGG GCG TAT GCT TCC TTT CGC  
CAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-32 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAC AAC TAT AAG CTG TGC GAG AGC GAC GTG GGC CGG CTT CTT  
TTT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-33 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TAT TAT ACG TAC AGC AAC GAC TTT ACC GAT GGT GGG CGG CAT ATC  
TTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-34 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTC TTC GAT CGC TAC GAC AGT GCT AGG GAC CCT GGG CGT CTC  
CTT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-35 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TGG CAG CGG TGC GGT ATG GCT GAG TTT ATC TGG CAT TTT CAG  
TGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-36 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-37 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC ATG TCG TTT ACG CGG CGT ACT GAG TCC GAT AAG TTG CAT  
TCC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-38 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC AAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-39 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTC TTC GAT CGC TAC GAC AGT GCT AGG GAC CCT GGG CGT CTC  
CTT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-41 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAT CGC AGT ATT CTC GTT CCG CGT TAC TTT GAG CTG TGG GCC  
AAC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-42 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GGC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-43 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAT ATC AAT TAT TGC GAT CCC GGC CGT GAC TGC GAC GGT CAC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-44 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAT TAC TCC AAT GAG AGC TCT GAC CCG GGG AGG CTT TGG CAC  
TGC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-45 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-46 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC TTT TGC ATG GGC CAG ATC TGC TTC CTG CGT TTT GCG CTT  
CAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-47 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT CAT GGC CCC GAC GTC AAC CAC GCT GAT CCG GGT CGC TAT TTT  
GAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-49 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT AAT CAC AAT CTC ATG AAT GAT CCC GGT CGC TTC TTC TGG CAC  
GAC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-50 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-52 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TAT TTG CAT CTT GAT AGC GAT CAC TTT GAC CCG GGC CGC ACC GTT  
TGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-53 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAG CGT AAC TAC AAC GAT TTT TGC GAT CCC GGT CGT GTC GGC  
CTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-54 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT CGG AAT TAC ACG AAT CCC TAC TGT GAT CCT GGT CGC CAG CAT  
GAG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-56 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC TTT TGC ATG GGC CAG ATC TGC TTC CTG CGT TTT GCG CTT  
CAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-57 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TTT TGG GAG ATT TAC TGG CAT TTG GAG TTC GCG GGC TTC GAT AGG  
GTC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-58 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT CTG GTC GAC TGT ATT TCG CAT GAT GAT CCG GGC CGT AGT GTT  
GGC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-59 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TGG TTG GTC TGC CGG CAT AGC AAG CGC TAT AAC TGC ATC TTT  
TTG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-60 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC TTG CAC GTC GTC GAG ATC GAG CGG CAC AGG ATT CGG TTT  
TTT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-61 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC GGC CAC TGT TTC GAG AAC TTC GGC GAC TCC TTC GAG CAC  
AAT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-62 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAC TAC TGG GCT TTT TGG CGC GTT TAC TTT CAG GTG GAT GGC  
TAC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-63 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAT GAC GCG GGT TTT TGC AAC TAT GAT CGG GAC CAC ATC TGG  
CCT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-66 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TAC GTT TAC TTG CTC CGT CAC GAC CAG CAC AGC TAT TAT CCG  
CCT TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-68 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT TTG CGC CTC GTC GGG TCT GAT CAT AAT TTT GAT GCC GTG GTC  
TGC TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**T10-71 (147)** TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG  
GGT ATG GGT ACC TGT GAC TTC GAC AAC ATG CTC AGC AAT CTC GAT CCG GGT CGT CAT  
TGG TCC GGA TCC CAT CAT CAT CAC CAC CAT AGT ATG AGC GGC AGT

**7.2.2.2 Klone aus der Startbibliothek**

(nur randomisierte Region)

**P-01** TGT ATG CTC CGC GGG TTG GGC TCT TGC AGG TCG GGG TTA TTA TAT CTC C  
**P-02** TGT GTG TTC GGG TAC AAG GGT CCT CGT TAT GAG CGG TAC GGT TCC AGT TCC  
**P-03** TGT GGG AGT TGT CGT GAC CGG CAC TAT TGC TCC CAT CAC AGG TGG GTT TCC  
**P-04** TGT CCC GTC TAT TAT CAG CAG AAC CGC CGT GGG CTC TAG AGT ATG GCG TCC  
**P-05** TGT CAT TGC TGG TTT TCG TGG CAC TGT AAC GGT TGC AAT GGT AGG ATG TCC  
**P-06** TGT CAT TGC TGG TTT TCG TGG CAC TGT AAC GGT TGC AAT GGT AGG ATG TCC  
**P-07** TGT GAG CAG ATC TTT GTC CAT AGC TTG GGA TCG TCT CGG GAA CAC GAG CTC C  
**P-08** TTG TTT TTG GAG GCA GCG TCT CGG GAC GTT ATC ACT GAG TAC CTT TAT TCC  
**P-09** TGT TTC GAG AAG TCG ACC GGT TAG GAC TCG CAG GAC AGG GAC TGG AGG TCC  
**P-11** TGT GTT AGA ATC GCG GCG TCA CGT ATT AGT ACA AAT AAC AAG TAT TTT TCC  
**P-12** TGT GGG GGT TGT CCT GAC CGG CAC TAT TGC TCC CAT CAC AGG TGG GTT TCC  
**P-13** TGT GGC ATG GGC TGC AAG ATG CGT TAT GGT TGT TGG CCT CAC AGG CCT TCC  
**P-14** TGT CTT CAT GAC CAC ATG AGG CTC CGG TAT CTG TGG GTC CGT GAC TCC  
**P-15** TGT GGT GGC AAT GCC TGC TAC TAT GTT AGC CAC TGG AAG GTG TAC CAT TCC  
**P-17** TGT GGT GGC AGG CAT ACT GTT TTG TCC CTT GGC TTG GCC GCG TCG GGT CC  
**P-18** TGT CCT ATT AGT ACC CGG TAT TAT CAT CAT AAG CTG AGC TAC CAC TTC TCC  
**P-19** TGT CCT ATT AGT ACC CGG TAT TAT CAT CAT AAG CCT GAG CTA CCA CTT CTC C  
**P-20** TGT TAT TCT CGT AGG TTG TTG CAT GCC AAG TAC CAC GTC CAG CTC GGG TCC  
**P-21** TGT CGG TGT TGG CAT GGG GAC GAC GAG TCC AGT AAC AGT CTT TTT CAC TCC  
**P-23** TGT CGG CCC TGC TAG CGG GCT TAT TCC CAG GGC TGC GTT CAG TAT CTC TCC  
**P-24** TGT AGT ATC CCA GCA ATG GCC GGA ACG CTG CTC GGG GGG GTG ATA CTA TCC  
**P-25** TGT GTG AAC TGC CTT TTG GGG CAC GGT CGT CGT TGT TGG GGC GAT TCT CC  
**P-26** TGT TGC CAG TTC AAT CTC TGG TTC TTC TAG CGG CTG TCC AGT CC  
**P-27** TGT GGC CAC CCG CTG TCG TGC GTG GTC TGG TAC GCC TTG ATC CAT CAG TCC  
**P-28** TGT ACG TTC CGC GAG AGT GAT TCT TAG CTT CAC AGC GAT AAT TTC ACG TCC  
**P-29** TGT TAT TTC GCG TGC CGC GAT TAT CCT CAC TAT AGC CAT AAG GGG TTT TCC  
**P-30** TGT TGC GTC ATC TTC TGT GGC ACT ATC ACT GGC GCC GGA ATT GTT ATT CC  
**P-31** TGT TAG AGC TCG CAG GAC GCG GGC ACG TGC GGG TTT GCG ATT CTG GAG TCC  
**P-32** TGT TGC CTT TAT TGC GAG CTG CTT TAT TCC TTG GAC TAG ACG TGC GAG TCC  
**P-33** TGT TAT CAC CTT ATT TGG CGT AGT ATC TTC GTT AAC TTC CGA CTC AAT TCC  
**P-34** TGT CAT TGG AAT TGG GGC GTT TAT TTT GAT TGT GGT AAT TCC GTG GGT CC  
**P-35** TGT ATT TAG AGG CTC AAG GGT TTT TCG TCT TTG CAT GAC TTC CTT TTT TCC  
**P-36** TGT TAG GAT GGC GAC AGG AGC GGC AGT AAC AAA AAA AAA AAA AAA AAC C

### 7.2.3 Vektor pGEM-4Z

#### 7.2.3.1 Vektorkarte

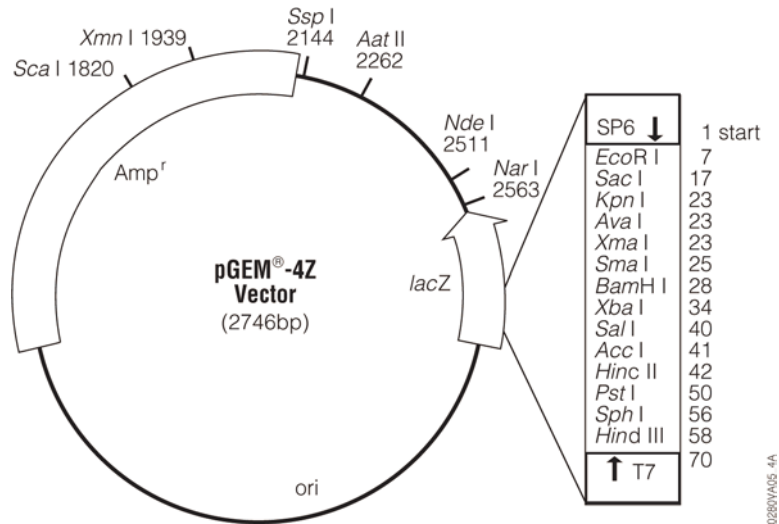


Abbildung 43: Vektorkarte pGEM-4Z

#### 7.2.3.2 Multiple cloning site

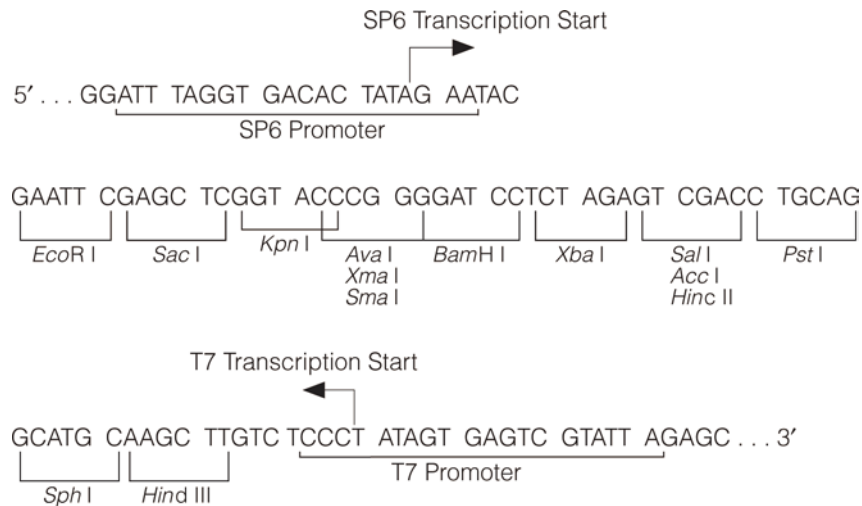


Abbildung 44: Multiple cloning site pGEM-4Z

**7.2.3.3 Sequenz pGEM-4Z**

```

1    GAATACGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCCTCTAGAG TCGACCTGCA
51   GGCATGCAAG CTTGTCTCCC TATAGTGAGT CGTATTAGAG CTTGGCGTAA
101  TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTCC
151  ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT
201  GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG
251  TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG
301  GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT
351  CGCTGCGCTC GGTTCGTTCCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
401  GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
451  GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC
501  TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
551  CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC
601  GTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC
651  TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT
701  CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA
751  GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT
801  CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
851  CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
901  TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGAA
951  CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
1001 GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT
1051 TTTTGTGTTG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG
1101 ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACCTA
1151 CGTTAAGGGA TTTTGGTTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
1201 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT
1251 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
1301 GCGATCTGTC TATTTTCGTT ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA
1351 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
1401 TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG
1451 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC
1501 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCCGCCAG
1551 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
1601 CGCTCGTCGT TTGGTATGGC TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG
1651 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG
1701 GTCCTCCGAT CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG

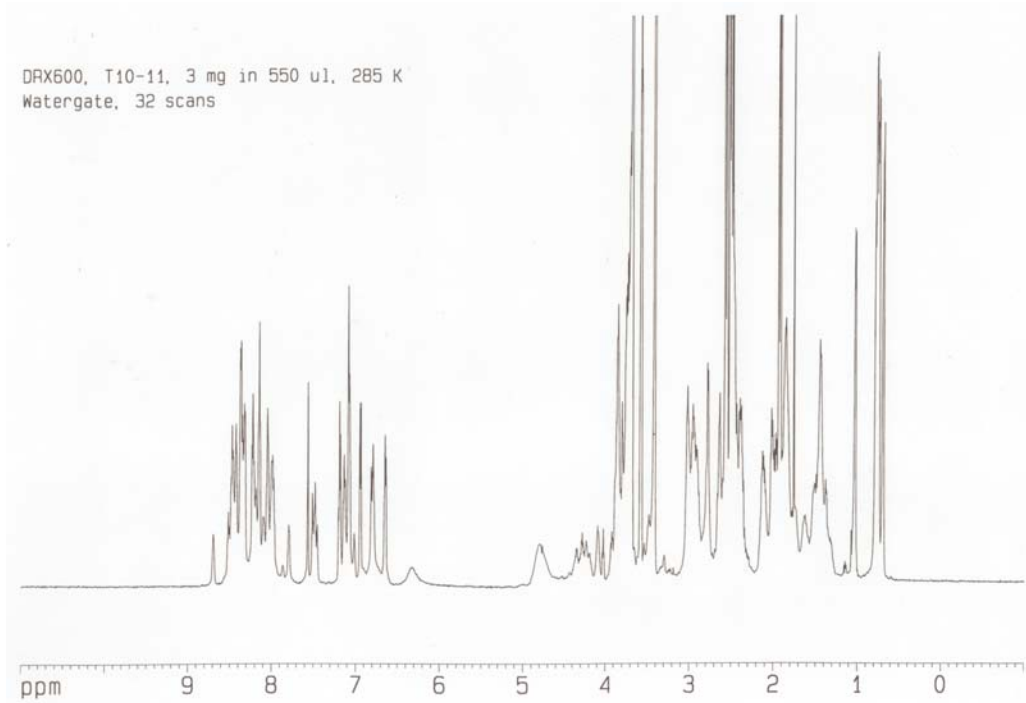
```

1751 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG  
1801 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA  
1851 TGCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG  
1901 CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG  
1951 GCGAAAACCTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC  
2001 CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT  
2051 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGAAAAA AGGGAATAAG  
2101 GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT CAATATTATT  
2151 GAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT  
2201 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCGG CGCACATTTT CCCGAAAAGT  
2251 GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA  
2301 ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT  
2351 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA  
2401 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG  
2451 GCGGGTGTCG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG  
2501 AGAGTGCACC ATATGCGGTG TGAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA  
2551 ATACCGCATC AGGCGCCATT CGCCATTCAG GCTGCGCAAC TGTGGGAAG  
2601 GGCGATCGGT GCGGGCCTCT TCGCTATTAC GCCAGCTGGC GAAAGGGGGA  
2651 TGTGCTGCAA GGCGATTAAG TTGGGTAACG CCAGGGTTTT CCCAGTCACG  
2701 ACGTTGTAAC ACGACGGCCA GTGAATTGGA TTTAGGTGAC ACTATA

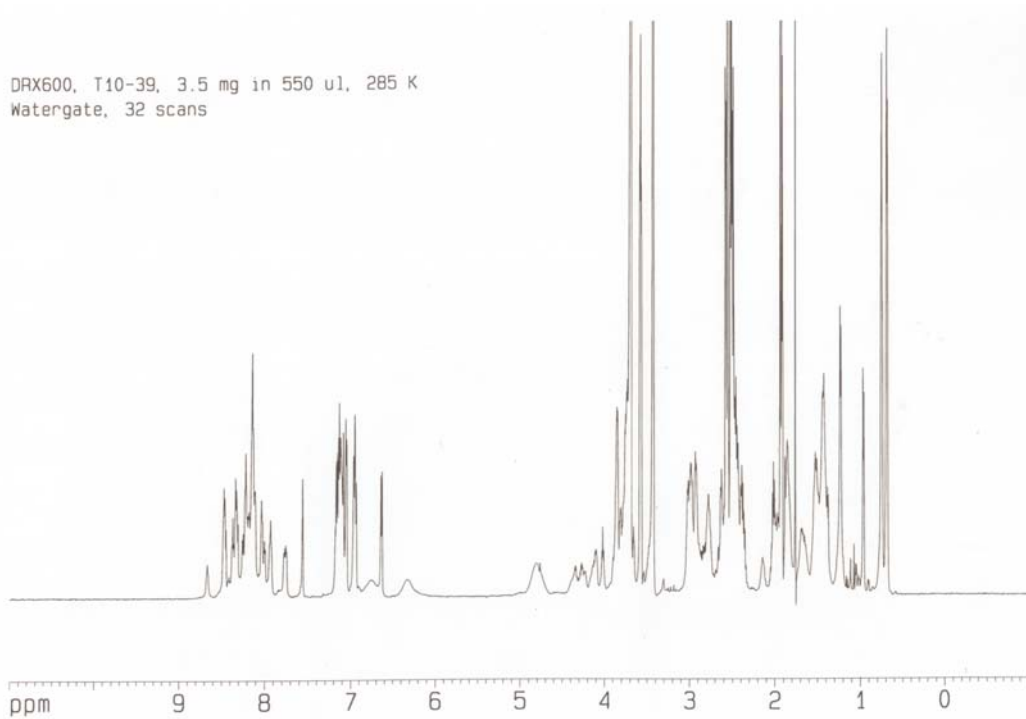


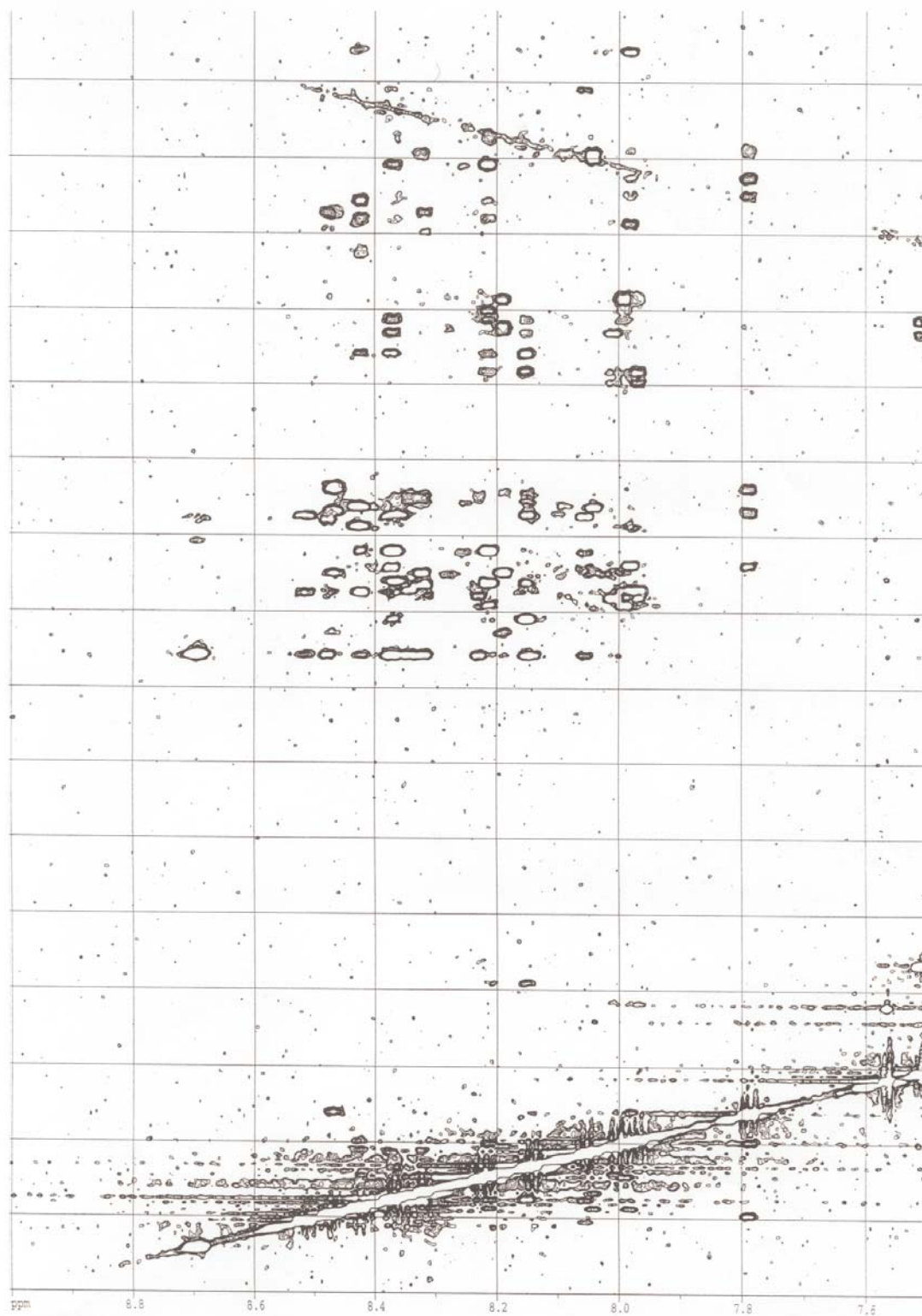
## 7.3 NMR-Spektren

### T10-11

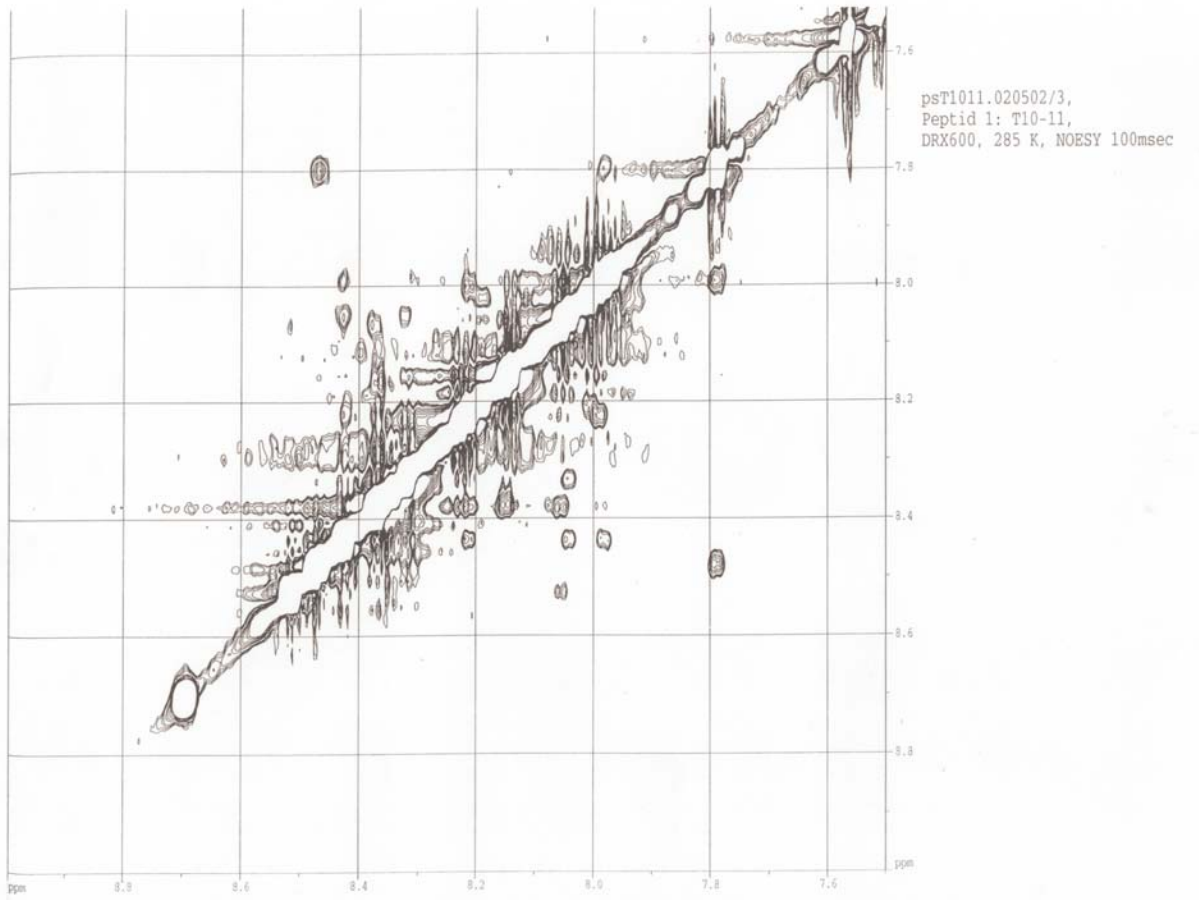


### T10-39



**T10-11 NOESY**

**T10-11 NOESY (Detail)**



## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
aPC	aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (1 Zerfall pro Sekunde)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (Komplementär-DNA)
Ci	Curie ( $3.7 \cdot 10^{10}$ Bq)
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CPG	<i>controlled pore glass</i>
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl) N,N,N',N',-tetraacetat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton

L	Liter
M	Molar
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	Molekulargewicht
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotetraacetat
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotid-5'-triphosphat
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PC	Protein C
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tdt	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TM	Thrombomodulin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	<i>unit</i> (Einheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

## 7.5 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** (A) Puromycin-Molekül, (B) 3'-Ende einer Tyrosyl-tRNA. Die Unterschiede zwischen den beiden Molekülen sind farblich hervorgehoben. Über die 5'-Hydroxylgruppe des Puromycin erfolgt eine kovalente Bindung an das 3'-Ende des DNA-Linkers, welcher wiederum mit der für das Peptid kodierenden RNA verknüpft ist. .5
- Abbildung 2:** Mechanismus der Puromycin-vermittelten Fusion von RNA und dem entsprechenden kodierten Peptid. (A) Als Ausgangsmaterial wird eine chimäre RNA-DNA-Puromycin-Bibliothek eingesetzt. (B) In vitro Translation: das Ribosom bindet die RNA und bewegt sich auf dem Templat in Richtung des 3'-Endes. Die Aminosäuren der wachsenden Peptidkette sind als schwarze Kreise dargestellt. (C) Das Ribosom erreicht die Verbindungsstelle RNA-DNA und pausiert, das Puromycin kann in die A-Stelle eintreten, wo es kovalent mit dem Peptid verknüpft wird. (D) Freisetzung der gebildeten Fusionsmoleküle. ....6
- Abbildung 3:** Das RNA-DNA-Puromycin-Ligationsprodukt wird im Ribosom kovalent an das Peptid geknüpft. ....7
- Abbildung 4:** Selektionsschema. (A) Ausgehend von der dsDNA der Bibliothek wird die mRNA, die mit dem Puromycin (P) verknüpft ist, erzeugt. (B) Durch in vitro Translation werden die mRNA Display Peptide hergestellt (Aminosäuren als graue Kreise dargestellt). (C) Nach der reversen Transkription wird die Bibliothek in den Selektionsschritt eingesetzt und auf die Eigenschaften gegenüber einem immobilisierten Targetmolekül untersucht. (D) Durch PCR werden die funktionalen Sequenzen angereichert. ....8
- Abbildung 5:** Blutgerinnungskaskade. Thrombin (IIa) spielt eine zentrale Rolle. Die Pfeile verdeutlichen jeweils die Regulation des angegebenen Schrittes; dick gezeichnete Pfeile sind Reaktionen, die von Thrombin katalysiert werden. (wichtigste Abkürzungen: aPC = aktiviertes Protein C, ATIII = Antithrombin III, PC = Protein C, PCI = Protein C Inhibitor, PS = Protein S, TM = Thrombomodulin) .....10
- Abbildung 6:** Struktur von humanem  $\alpha$ -Thrombin (nach Lit.<sup>[68]</sup>, pdb: 1HAH). Farblich hervorgehoben sind die wichtigen Seitenketten der Exosite-1 (rot), der Exosite-2 (blau) und dem katalytischen Zentrum (gelb).....11
- Abbildung 7:** Selektionsschema. (a) *Large Scale* PCR, (b) *Large Scale* Transkription, (c) Ligation mit dem DNA-Puromycin-Linker, (d) Translation und Generierung der mRNA Display Peptide, (e) Aufreinigung, (f) RT, (g) Selektionsschritt, (h) Waschen, (i) Elution, (j) PCR, (k) Transkription, (l) Klonierung .....16
- Abbildung 8:** Schema für die DNA-Sequenz der kompletten Bibliothek (TK = Transkriptionsstart, TMV-TE = Tabakmosaikvirus *translation enhancer*). .....19

- Abbildung 9:** Sequenz der DNA-Bibliothek, wobei T7 = T7 RNA-Polymerase-Promotorsequenz, TK = Transkriptionsstart, TMV-TE = Tabakmosaikvirus-*translation-enhancer*-Sequenz, Met = Startcodon, Cys = fixiertes Cystein, His = Histidin-Tag; Restriktionsschnittstellen für KpnI und BamHI sind unterstrichen; 123 - Codonpositionen 1, 2 und 3 des Aminosäure-Triplets..... 20
- Abbildung 10:** Aminosäureverteilung (schwarz – geladene AA, dunkelgrau – hydrophobe AA, hellgrau - hydrophile AA) der randomisierten Region, der gesamten Sequenz (konstante Regionen sind mit berücksichtigt) der Bibliothek, sowie der Bibliothek ohne den Histidin-Anker im Vergleich..... 22
- Abbildung 11:** Zusammensetzung der Basengemische der einzelnen Codonpositionen für die Synthese (**A**, **B** und **C** entsprechend den Basenpositionen 1, 2 und 3 des Codon-Triplets)..... 23
- Abbildung 12:** (**A**) Struktur des DNA-Puromycin-Linkers. Links der Poly(dA)-Teil, in der Mitte der flexible Bereich mit jeweils drei Polyethylenglycol-Einheiten und rechts das Puromycin-Molekül. Der eingebettete d(ACC)-Teil soll das 3'-Ende einer tRNA nachahmen. (**B**) Sequenz des Splint-Oligonukleotids. Über den Poly(dT)-Bereich hybridisiert dieser mit dem Poly(dA)-Teil des DNA-Puromycin-Linkers und mit dem 3'-Ende mit der RNA der Bibliothek. (**C**) Schematische Darstellung des Ligationsschrittes. Der Splint ist and die mRNA und den DNA-Puro-Linker hybridisiert. 25
- Abbildung 13:** Optimierung der Ligation. Analytisches Polyacrylamidgel zu den in **Tabelle 5** aufgelisteten Experimenten. Die Nummern der Banden **1 – 8** entsprechen der Numerierung in **Tabelle 5**. Zusätzlich sind in Spur **9** radioaktiv markiertes DNA-Puro und in Spur **10** radioaktiv markierte RNA zum Vergleich aufgetragen. .... 27
- Abbildung 14:** Optimierung von Hochsalzbedingungen. Tricin-SDS Polyacrylamidgel zur Optimierung der Salzkonzentration nach der Translation. In Spur **1** ist das Ergebnis nach der Translation gezeigt. Es ist noch kein Fusionsprodukt zu detektieren, nur das freie Peptid. Die Bahnen **2 – 9** zeigen die Ergebnisse der Zugabe von 300, 400, 500 oder 600 mM Kalium (**2 – 5**) und von 50, 60, 75 und 100 mM Magnesium (**6 – 9**). Man erkennt, dass bei der Einstellung von Hochsalzbedingungen die Bande des freien Peptids geringer wird und bei hohem Molekulargewicht, welches etwa dem der RNA entspricht eine neue Bande auftaucht (das Molekulargewicht der RNA von etwa 50 kDa ändert sich nur wenig, wenn diese mit dem Peptid verknüpft ist)..... 28
- Abbildung 15:** Lysatanteil. Gezeigt ist ein Tricin-SDS Polyacrylamidgel für die Verwendung von unterschiedlichen Lysatanteilen während der Translation. Spur **1** zeigt eine Negativkontrolle ohne das mRNA Display Templat, hier entsteht weder das freie Peptid noch das fusionierte Produkt. In den Bahnen **2 – 5** sind Translationsreaktionen mit Lysatanteilen von 40%, 30%, 20% und 10% aufgetragen..... 29
- Abbildung 16:** Reinigung und RT. Dargestellt ist ein Tricin-SDS Gel der einzelnen Reinigungsschritte mit anschließender RT. In Spur **1** ist eine Negativkontrolle ohne

- mRNA Display Templat gezeigt, in Spur **2** das Ergebnis nach der Translation: man erkennt die Bande des freien Peptids und des mRNA Display Peptids. Die Bahnen **3** bis **5** enthalten jeweils eine Probe nach der Oligo dT Reinigung (**3**), der Ni-NTA Reinigung (**4**) und nach der Entsalzung über eine NAP-Säule (**5**). In Spur **6** ist das zu höherer elektrophoretischer Mobilität verschobene Produkt nach der RT gezeigt.....31
- Abbildung 17:** Stabilität und Reinheit. Gezeigt sind die Tricin-SDS Gele zur Stabilität von Thrombin bei verschiedenen Temperaturen. Inkubation erfolgte für jeweils 240 Minuten bei 4°C (**A**), 25°C (**B**) und 37°C (**C**). Als Größenstandard wurde ein *Low Range* Protein Marker mit den angegebenen Proteingrößen aufgetragen (jeweils Spur **M**). .....32
- Abbildung 18:** Kopplung an die Matrix. Dargestellt ist ein Tricin-SDS Gel zur Analyse der Kopplungseffizienz mit der Sepharose-Matrix. Der Längenmarker (**M**) verdeutlicht die Größen der Proteine. In Spur **1**, **2** und **3** sind 50, 100 und 250 ng Thrombin vor der Kopplung und in den Bahnen **4**, **5** und **6** die gleichen Mengen nach der Kopplung aufgetragen. Die Bande in Spur **7** verdeutlicht eine 240-fach höhere Menge an aufgetragenem Protein, wie in Spur **4**. Die Kopplung ist somit nahezu vollständig, der Anteil an nicht auf der Matrix immobilisiertem Thrombin vernachlässigbar. ....33
- Abbildung 19:** Selektionsverlauf. Dargestellt ist der Verlauf der Selektion bezogen auf die Bindung der Bibliothek an die Selektionsmatrix im jeweiligen Zyklus. Die Balken repräsentieren den an die Säulenmatrix gebundenen Anteil der Gesamtradioaktivität. Angegeben sind die Zyklenzahl und das Waschvolumen in jedem Zyklus in Säulenvolumen (SV). .....37
- Abbildung 20:** Sequenzierung. Hier dargestellt sind die aus der Sequenzierung von 72 Klonen erhaltenen unterschiedlichen Sequenzen. Zur Übersichtlichkeit sind nur die 15 Aminosäuren des randomisierten Bereichs wiedergegeben. Die Zahlen in Klammern stehen für die Häufigkeit der jeweiligen Sequenz. Einzelne Aminosäuren sind gemäß ihrer Konserviertheit farbig unterlegt. Hochkonservierte Positionen sind schwarz hinterlegt und Austausch von Aminosäuren innerhalb der gleichen Gruppe (hydrophil oder hydrophob) grau.....38
- Abbildung 21:** Sequenzen der verkürzten Konstrukte der Peptide. ....41
- Abbildung 22:** Bindung an die Säulenmatrix. Im Diagramm verdeutlichen die Balken die Bindung der freien <sup>35</sup>S-markierten Peptide der einzelnen gezeigten Konstrukte an die Thrombin-derivatisierte Sepharose. Unter dem jeweiligen Balken ist die entsprechende Analyse über ein Tricin-SDS Gel gezeigt (Ly = Peptid im gesamten Lysat, elu = eluiertes Peptid).....42
- Abbildung 23:** Bindungsanalyse der freien Peptide der einzelnen dargestellten Konstrukte. ....43
- Abbildung 24:** Kompetitionsstudie für T10-39 His<sup>-</sup> mit Thrombin in Lösung. In Spur **1** ist das Lysat aufgetragen und in den Spuren **2 – 9** die Eluate von der Thrombinmatrix. Dabei



- wurde in den Bahnen **3 – 9** Thrombin in den folgenden Konzentrationen zugegeben: 1, 10, 50, 100, 400, 1000 und 2000 nM. .... 44
- Abbildung 25:** Kompetitionsstudien mit freiem Thrombin. Aufgetragen sind jeweils die Konzentration an Thrombin gegen die prozentuale Inhibition. Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) ermittelt sich aus der Konzentration bei halbmaximaler Inhibition. .... 45
- Abbildung 26:** *pH-Scouting* für die Immobilisierung von T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**), Konzentration jeweils 50  $\mu\text{g/mL}$ . Dargestellt sind die Kurven für die Anreicherung der Peptide auf der Chip-Oberfläche für unterschiedliche pH-Werte (10 mM Acetat-Puffer mit pH 3.5 (**a**), 4.0 (**b**), 4.5 (**c**), 5.0 (**d**) und 5.5 (**e**)) ..... 46
- Abbildung 27:** Oberflächenplasmonresonanz. Gezeigt sind die Bindungskurven von Thrombin (THR, 1 - 5000 nM) an den auf der Chip-Oberfläche immobilisierten Peptiden der Klone T10-11 (**A**) und T10-35 (**B**). Die Keile verdeutlichen jeweils steigende Thrombinkonzentrationen. Im oberen Teil ist die Zeit gegen die Bindungsantwort (*response units* = RU) aufgetragen und im unteren Abschnitt die Konzentration gegen die erhaltenen RU's. Die unten angegebenen  $K_d$ -Werte stellen die Konzentration bei halbmaximaler Sättigung dar. .... 47
- Abbildung 28:** Schematische Darstellung der Bindungsepitope von Thrombin. .... 48
- Abbildung 29:** Konkurrenz in Lösung. Dargestellt sind die Bindungskurven bei einer konstanten Thrombin-Konzentration von 50 nM. Die Peptide T10-11 und T10-39 wurden immobilisiert und Thrombin bei Zusatz der entsprechenden Inhibitoren in Konzentrationen von 1 – 2500 nM über die Flusszellen geleitet. Die Keile symbolisieren jeweils steigende Konzentrationen der angegebenen Inhibitoren. .... 49
- Abbildung 30:** Bindungskurven für  $\alpha$ -Thrombin und  $\gamma$ -Thrombin an die Peptide von T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**). Die Bindungsaffinität zu  $\gamma$ -Thrombin ist deutlich reduziert. .... 50
- Abbildung 31:** Skizzierte Darstellung des Prinzips der überlappenden Peptid-Analyse. .... 51
- Abbildung 32:** Schematische Darstellung des SPOT-Assays. Das Peptid (rosa) ist kovalent an die Cellulosemembran gebunden. Thrombin (THR) bindet an das Peptid. Das Thrombin wird daraufhin von einem murinen Anti-Thrombin-Antikörper ( $m\alpha\text{THR Ab}$ ) gebunden. Anschließend wird die konstante Region des Mausantikörpers von einem Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper ( $r\alpha m \text{ Ab}$ ), der an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, erkannt. Letztlich wird das Chemilumineszenzsubstrat (ECL = *enhanced chemiluminescence*) durch die HRP gespalten und man detektiert ein Lichtsignal. .... 52
- Abbildung 33:** Peptid-Arrays zur Bestimmung des Minimalmotivs von Klon T10-11 (**A**) und Klon T10-39 (**B**). Die Zahlen verdeutlichen die jeweiligen Peptide auf der Cellulosemembran. In der oberen Zeile (**a**) sind die regulären Peptide und in der unteren (**b**) diejenigen mit Cystein-Serin-Austausch aufgetragen. Die von Thrombin gebundenen Peptide sind jeweils durch den roten Balken markiert. .... 52

- Abbildung 34:** Übersicht über die einzelnen Sequenzen der Peptid-Analyse (**Abbildung 33**). Die roten Balken verdeutlichen wiederum die gebundenen Peptide von Klon T10-11 (**A**) und Klon T10-39 (**B**). Rosa unterlegt sind die überlappenden Sequenzen. Konstante Regionen sind blau, die randomisierte Region grau und der fixierte Cysteinrest grün dargestellt. ....53
- Abbildung 35:** Längenanalyse. Dargestellt sind die Längenanalysen für T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**). Jeder SPOT in der unteren Hälfte verdeutlicht ein gebundenes Peptid (insgesamt sind 66 Peptide aufgetragen, jedoch nur die mit erfolgter Bindung detektierbar). In der oberen Hälfte sind die gebundenen Peptide ihrer Sequenzlänge entsprechend als graue Balken dargestellt. Man erkennt die Verkürzung der Motive vom N- und C-terminalen Ende bis hin zum kleinsten gebundenen Motiv. ....54
- Abbildung 36:** Substitutionsanalyse der ermittelten Minimalmotive von T10-11 (**A**) und T10-39 (**B**). In der linken und rechten Spalte ist jeweils dunkelgrau unterlegt das entsprechende Minimalmotiv gekennzeichnet (Numerierung erfolgte gemäß der Aminosäureabfolge). Für jede Aminosäureposition findet sich in der entsprechenden Zeile die Wildtyp-Sequenz (wt) und der Austausch gegen die jeweils angegebene Aminosäure, welche durch die hellgrau unterlegte Spalte festgelegt ist.....55
- Abbildung 37:** Chromogenes Substrat für Thrombin: H-D-Phenylalaninyl-L-Pipecoyl-L-Argininyl-p-Nitroanilid-2HCl (S-2238).....57
- Abbildung 38:** Relative Thrombinaktivität normalisiert gegen die Kontrollreaktion ohne zusätzliches Peptid. Die Kurven verdeutlichen die Aktivität von Thrombin bei Zusatz der jeweiligen Peptide: T10-11 (—◆—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.....58
- Abbildung 39:** Gerinnungszeit. Die Kurven verdeutlichen den Einfluss der jeweiligen Peptide auf die Zeit bis zum Auftreten der Gerinnung: T10-11 (—●—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.....59
- Abbildung 40:** Chromogenes Substrat für aPC: *pyro*-Glutaminyl-Prolyl-Argininyl-*p*-Nitroanilid-HCl (S-2366). ....60
- Abbildung 41:** Aktivierung von Protein C. Aufgetragen ist die Konzentration der Peptide gegen die relative Aktivierung von Protein C: T10-11 (—●—), T10-39 (—■—), P-11 (—▲—). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.....61
- Abbildung 42:** Codonsonne. Von innen nach außen gelesen erhält man aus den Basen der einzelnen Positionen des Codon-Tripletts die entsprechende Aminosäure.....116
- Abbildung 43:** Vektorkarte pGEM-4Z .....127
- Abbildung 44:** Multiple cloning site pGEM-4Z .....127

## 7.6 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verschiedene Proteine, die an humanes $\alpha$ -Thrombin binden, deren Bindungsmotive und die Stelle der hauptsächlichen Interaktion. Zahlen bezeichnen die jeweilige Aminosäureposition im Protein. ....	12
<b>Tabelle 2:</b> Aminosäureverteilung in der randomisierten Region. ....	21
<b>Tabelle 3:</b> Berechnung der Gesamtkorrekturfaktoren für Phosphoramidite bezüglich ihrer Masse und der Kopplungseffizienz (nach Lit. <sup>[92]</sup> ).....	23
<b>Tabelle 4:</b> Benötigtes Volumen Acetonitril zum Auflösen der entsprechenden Phosphoramidite. ....	24
<b>Tabelle 5:</b> Optimierung der Verhältnisse von RNA zu DNA-Puro und dem Splint. Angaben in $\mu$ M.....	26
<b>Tabelle 6:</b> Codonanalyse der Start-Bibliothek. Insgesamt wurden 493 Codons sequenziert und die kodierten Aminosäuren ermittelt. Angegeben ist die jeweilige Aminosäure, wie oft diese gefunden wurde und die Abweichung von der gewünschten Verteilung. ....	34
<b>Tabelle 7:</b> Zusammenfassung über die Herstellung der mRNA Display Peptid Bibliothek für die Selektion.....	36
<b>Tabelle 8:</b> Dargestellt sind die Ergebnisse der BLAST-Suche auf Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz der selektierten Peptide mit Proteinen aus der GenBank. Im Fettdruck ist jeweils die Sequenz angegeben, die in die Suche eingespeist wurde. Zu jeder Suche sind 4 Sequenzen mit den <i>E Values</i> und der Herkunft angegeben. Jede gefundene Sequenz ist mit der Suche verglichen, wobei ein + einer Übereinstimmung innerhalb derselben Aminosäurekategorie (z.B. hydrophil, hydrophob) entspricht. Die Zahlen geben die Position der Sequenz innerhalb des Proteins wider.....	41
<b>Tabelle 9:</b> Immobilisierungsparameter für die Kopplung der jeweiligen Peptide auf den Sensorchip. ....	46
<b>Tabelle 10:</b> Matrix für die Substitutionsanalyse. Am Beispiel der Sequenz von Klon T10-11 ist dargestellt, wie in jeder Spalte in <b>Abbildung 36</b> die jeweilige Aminosäure der Wildtyp-Sequenz (wt) gegen hier Alanin ausgetauscht wird. Identisch erfolgen die Austausche für die restlichen Aminosäuren.....	56
<b>Tabelle 11:</b> Konzentrationen von Nukleinsäuren bei einem OD-Wert von 1,000. ....	74
<b>Tabelle 12:</b> Molare Absorptionskoeffizienten der Nukleotidbasen. ....	75
<b>Tabelle 13:</b> Aminosäuren ( $M_r$ : Molekulare Masse, IEP: isoelektrischer Punkt, un: unpolare, aliphatische Seitenketten, ar: aromatische Seitenketten, pu: polare ungeladene Seitenketten, ne: negativ geladene Seitenketten, po: positiv geladene Seitenketten). ....	115
<b>Tabelle 14:</b> IUPAC-IUB Kodierung für Nukleinsäurebausteine. ....	121

## 7.7 Danksagungen

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, für die Vergabe des Themas und die Betreuung dieser Dissertation von Mai 1999 bis Juni 2002.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch, Institut für Entwicklungsbiologie der Universität Bonn, für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Jack W. Szostak, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, der mir einen Forschungsaufenthalt ermöglichte und seinen Mitarbeitern, vor allem Anthony Keefe, die mich während der Zeit so freundlich betreuten.

Herrn Prof. Dr. Jens Schneider-Mergener und Herrn Dr. Ulrich Reineke von JERINI AG, Berlin für die Zusammenarbeit.

Herrn Oberarzt Prof. Dr. Bernd Pötzsch, Universitätsklinikum der Universität Bonn, für die Einweisung in die funktionalen Thrombin-Studien und die Bereitstellung der Geräte.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oschkinat, FMP Berlin, für die freundliche Hilfe bei den NMR-Spektren.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises, sowohl aus München, wie auch aus Bonn für das stets angenehme Arbeitsklima, die intensive Zusammenarbeit, die angeregten Diskussionen und die gelungenen Stunden jenseits des Laboralltags. Besonders den mitgereisten Kollegen Gerhard Sengle und Günter Mayer für die Einweisung in das molekularbiologische Arbeiten und Stefan Jäger und Oliver Thum, die mir den Neuanfang in Bonn sehr erleichtert haben.

Gerhard Sengle und Andreas Tauer für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Familie, die mich stets unterstützt und gefördert und somit so vieles ermöglicht hat.

Zum Schluss meiner Freundin Nastaran und ihrer Familie, für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis.