

AUTODISPLAY VON PEPTIDBIBLIOTHEKEN UND SCREENING NACH NEUEN CATHEPSIN G INHIBITOREN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dirk Betscheider

aus Püttlingen

Juni 2008

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J. Jose

Koreferent: Prof. Dr. M. Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2008

Danksagung:

Ich danke Prof. Dr. Joachim Jose für die Möglichkeit der Promotion unter sehr angenehmen Bedingungen und für die Geduld.

Ich danke allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Jose für die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima.

Ich danke allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Hartmann für die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima.

Ich danke Prof. Dr. Lengauer und Somak Ray für die Kooperation.

Ich danke Karin Voigt für die Unterstützung in der heißen Phase.

Ich danke Elisa Winterer für Ihre Unterstützung und die Begleitung durch diesen Lebensabschnitt.

Ich danke allen Teilnehmern für viele angenehme Gespräche im Kaffeeraum.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich immer unterstützt haben.

Ich danke Irina für das Ertragen meiner Launen, die Unterstützung und Ihre Liebe.

Inhalt:

1	Zusammenfassung.....	9
2	Einleitung	11
2.1	Autodisplay – ein Verfahren zur Oberflächenexpression auf <i>E. coli</i>	13
2.1.1	Vorteile des Autodisplay gegenüber anderer Expressionssysteme	18
2.2	Das Target: humanes Cathepsin G	19
2.3	Die Leitstruktur: Peptid 15	20
2.4	Selektion positiver Varianten mithilfe der Durchflusszytometrie.....	21
2.5	Ziel der Arbeit	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Geräte	25
3.1.2	Chemikalien	26
3.1.3	Enzyme.....	28
3.1.4	Größenstandards für die Elektrophorese.....	28
3.1.5	Oligonukleotide.....	29
3.1.6	Nährmedien	32
3.1.7	Lösungen und Puffer	33
3.1.8	Bakterienstämme und Plasmide	36
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	38
3.2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
3.2.3	Arbeiten mit Proteinen	49
4	Experimente und Ergebnisse.....	55

4.1	Autodisplay von Peptidbibliotheken auf <i>E. coli</i> unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors	55
4.1.1	Markierung von humanem Cathepsin G	56
4.1.2	Zweischrittverfahren zur Target-abhängigen spezifischen Fluoreszenzmarkierung oberflächenexprimierter Peptide	58
4.1.3	Screening der Peptidbibliothek I mithilfe der Durchflusszytometrie	60
4.1.4	Neue Inhibitoren von Cathepsin G.....	63
4.1.5	Rationale Verbesserungen der Peptide.....	67
4.2	Einfluss des Expressionssystems auf das Autodisplay von Peptiden auf der Oberfläche von <i>E. coli</i>	72
4.2.1	Autodisplay von Peptidinhibitoren unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors	72
4.2.2	Einfügen einer AgeI Schnittstelle in die Linkerregion von pJM942	77
4.3	Optimierung der Target-abhängigen spezifischen Fluoreszenzmarkierung oberflächenexprimierter Peptide	84
4.3.1	Einschrittverfahren zur Target-abhängigen spezifischen Fluoreszenzmarkierung oberflächenexprimierter Peptide	84
4.3.2	Vergleich der beiden Markierungsmethoden zur Target-abhängigen spezifischen Markierung oberflächenexprimierter Peptide.....	86
4.3.3	Optimierung der eingesetzten Menge an humanem Cathepsin G.....	87
4.3.4	Optimierung der Inkubationsdauer mit humanem Cathepsin G	92
4.3.5	Erprobung eines Zusatzes von Tween 20 zur Waschlösung zur Reduktion unspezifischer Bindung der Markierungsreagenzien	94
4.3.6	Optimiertes Markierungsprotokoll.....	96
4.3.7	Optimierung der Geräteparameter des Durchflusszytometers mithilfe einer Kontrollfärbung	96
4.3.8	Optimierung der Selektion einzelner Varianten mittels FACS.....	102
4.4	Autodisplay von Peptidbibliotheken auf <i>E. coli</i> unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors	106

4.4.1	Autodisplay der Peptidbibliothek II	106
4.4.2	Autodisplay der Peptidbibliotheken III und IV	111
4.4.3	Neue Inhibitoren von Cathepsin G	116
5	Diskussion	125
5.1	Erstellung von Peptidbibliotheken	125
5.2	Autodisplay von Peptidinhibitoren und Peptidbibliotheken unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors	127
5.3	Hochdurchsatzscreening mithilfe der Durchflusszytometrie	128
5.4	Evolutionäre Entwicklung von Peptidinhibitoren – Evolution im Reagenzglas	130
5.5	Neue Peptidinhibitoren für humanes Cathepsin G	131
6	Literatur	135
7	Anhang	145
7.1	Publikationen	145
7.2	Tagungsbeiträge	145
7.3	Abkürzungsverzeichnis	146
7.4	Plasmidkarten der verwendeten Plasmide	148

1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Autodisplay dazu benutzt, Peptide und Peptidbibliotheken auf der Oberfläche von *E. coli* zu exprimieren. Es wurde gezeigt, dass Autodisplay eine Alternative zu etablierten Verfahren wie dem „Phage Display“ darstellt. Die Affinität einzelner Peptidvarianten zum Target wurde zur Markierung dieser Varianten ausgenutzt. Einzelne Varianten aus der Bibliothek wurden nach der Markierung mittels Fluoreszenz-gesteuerter Selektion im Durchflusszytometer ausgewählt. Durch Optimierung der Markierungs- und Selektionsverfahren gelang es, eine hohe Überlebensfähigkeit der ausgewählten *E. coli* Zellen sicherzustellen. Die selektierten Bakterienzellen konnten wieder in Kultur gebracht werden und die Sequenz ihrer oberflächenexprimierten Peptide durch DNA-Sequenzanalyse ermittelt werden. Aus dem Screening der Bibliothek I (Größe der Bibliothek: $1,15 \times 10^5$ Varianten) wurden drei neue peptidische Hemmstoffe (Peptid 1-3) für humanes Cathepsin G gefunden. Die Peptide 1-3 zeigten eine moderate Hemmung von humanem Cathepsin G (um 50 % bei 100 μM). Aus ihren Sequenzen konnte eine Konsensussequenz (Peptid 6 (KDIFV)) abgeleitet werden. Das Peptid 6 zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 11,7 μM (72 % Hemmung bei 100 μM) eine deutlich stärkere Hemmung als die Ausgangssequenzen. Ausgehend von Peptid 6 wurde durch rationale Veränderungen der Struktur ein neuer Peptidinhibitor (Peptid 6a (DIFFVF)) erhalten, der mit einem IC_{50} -Wert von 9,76 μM potenter war als Peptid 6. Peptid 6a wurde als neue Leitstruktur eingesetzt und es wurden drei neue Bibliotheken (Bibliothek II, III, IV) erstellt. Aus dem Screening der Bibliothek III (Größe der Bibliothek: $3,1 \times 10^7$ Varianten) wurden zwei neue, und aus dem Screening der Bibliothek IV (Größe der Bibliothek: $1,8 \times 10^8$ Varianten) wurden fünf neue Peptidinhibitoren erhalten. Der beste aus dem Screening der Bibliotheken stammende Inhibitor war Peptid 45 (LWGLLL) mit einem IC_{50} -Wert von 10,5 μM . Mit allen Peptiden aus dieser Arbeit wurde ein Protein-Peptid-Docking mit der Kristallstruktur von humanem Cathepsin G durchgeführt. Durch Auswertung der Daten aus dem Protein-Peptid-Docking konnte ein neues Inhibitorpeptid rational entwickelt werden (Peptid 50 (KIFFFV)). Dieses Peptid zeigte im Vergleich zur ersten Leitstruktur Peptid 15 (IC_{50} -Wert von 6,06 μM bei Peptid 50 im Vergleich zu 8,98 μM bei Peptid 15) eine geringfügig bessere Hemmung von humanem Cathepsin G und dient zugleich als Beispiel dafür, dass es gelungen war, virtuelle und reale Methoden erfolgreich miteinander zu kombinieren. Durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte die Eignung des Autodisplay in Verbindung mit einem Protein-Peptid-Docking zur Target-orientierten Evolution im Reagenzglas gezeigt werden.

Summary

Within the scope of this thesis, autodisplay was employed for expression of peptides and peptide libraries on the surface of *E.coli*. It was shown that autodisplay constitutes an alternative to established approaches such as “phage display”. The affinity of single peptide variants to the target was used for labelling of these variants. Single variants of the library were chosen after labelling by fluorescence-activated cell sorting in the flow cytometer. Optimised labelling and selection procedures assured a high survivability of the selected *E.coli* cells. Selected bacterial cells were recultured while the sequences of the peptides expressed on their surface were elucidated by DNA sequence analysis. Three new peptide inhibitors (peptide 1-3) of human Cathepsin G were identified from Library I (library size: 1.15×10^5 variants). Peptides 1-3 displayed a moderate inhibition of human Cathepsin G (approx. 50% inhibition at a concentration of 100 μM). Their sequences yielded a consensus sequence (peptide 6, KDIFV). Peptide 6 showed a considerably higher inhibition rate (72 % inhibition at a concentration of 100 μM with an IC_{50} value of 11.7 μM compared to the original sequences). Based on peptide 6, a new peptide inhibitor (peptide 6a (DIFVFFV)) was developed by rational structural amendments which proved to be more potent than peptide 6 (IC_{50} value of 9.76 μM). Peptide 6a was utilised as new lead structure and led to establishment of three new libraries (Library II, III and IV). Screening of Library III (library size: 3.1×10^7 variants) yielded two new peptide inhibitors while five new inhibitors were found in Library IV (library size: 1.8×10^8 variants). The most promising inhibitor detected by screening of the libraries was peptide 45 (LWGLLL) with an IC_{50} value of 10.5 μM . All peptides investigated in this thesis were subjected to protein-peptide-docking with the crystalline structure of human Cathepsin G. Analysis of the data from the docking experiments led to the rational development of a new peptide inhibitor (peptide 50, KIFFFFV). This peptide showed slightly improved inhibition of human Cathepsin G compared to the first lead structure peptide 15 (IC_{50} value of peptide 50: 6.06 μM ; IC_{50} value of peptide 15: 8.98 μM). This serves as an example that virtual and real methods were combined successfully. The results from this work prove the feasibility of the concept of *in vitro* target-oriented evolution.

2 EINLEITUNG

Der Fortschritt in der Erforschung physiologischer Zusammenhänge, das zunehmende Verständnis von Krankheiten auf molekularer Ebene (Zhang und Xu 2007), sowie das Auftreten neuer Krankheiten führen zu einem ständig wachsenden Bedarf an neuen Arzneistoffen. Bei der Entwicklung neuer potenzieller Arzneistoffe, die mit der gewünschten Zielstruktur (Target) interagieren, beschreitet die pharmazeutische und medizinische Chemie verschiedene Wege. Einerseits greifen pharmazeutische Unternehmen auf große bestehende Substanzdatenbanken zurück und durchsuchen („screenen“) diese nach Molekülen, die die gewünschte Wirkung auf das Target haben. Andererseits liefern kombinatorisch-chemische Syntheseverfahren aus einer festgelegten Anzahl von Edukten eine Vielzahl von Produkten (Mugnaini *et al.* 2005; Aina *et al.* 2007; Messeguer und Cortes 2007), also neue Substanzbibliotheken. Unabhängig davon, ob es sich um eine bestehende Substanzbibliothek oder eine durch ein kombinatorisch-chemisches Verfahren erstellte Bibliothek handelt, liegt eine Herausforderung im Screening nach den gewünschten Varianten. Eine Grundvoraussetzung, um die Vielzahl von Verbindungen effizient zu screenen, sind spezielle, hochdurchsatzfähige Screeningsysteme (High Throughput Screening, HTS). Eine beim Screening identifizierte Verbindung mit dem gewünschten Effekt („Hit“, Treffer) muss anschließend im Falle eines kombinatorisch-chemischen Ansatzes häufig einer aufwendigen und kostspieligen Analytik unterzogen werden, um ihre Struktur endgültig zu klären oder der Syntheseweg muss durch Einsatz spezieller Techniken zurückverfolgt werden können (Brenner und Lerner 1992). Des Weiteren muss ein nicht-kombinatorischer Syntheseweg zur Nachsynthese der als positiv gescreeenten Verbindung gefunden werden. Anerkennend muss festgestellt werden, dass auch auf diesem Gebiet in den letzten Jahren massive Fortschritte erzielt werden konnten. So ist es nun möglich, durch den Einsatz computergestützter Syntheseroboter und spezieller Algorithmen jederzeit die Reaktionsbedingungen und die Zusammensetzung jedes Reaktionsansatzes einzusehen (Pettersson *et al.* 2006).

Eine andere, zwar auf kurze peptidische Strukturen festgelegte Strategie zu Erstellung von Substanzbibliotheken besteht darin, die für die Peptide codierende DNA zu randomisieren (Sneeden *et al.* 2003), in ein Expressionssystem einzusetzen und in geeignete Wirtsorganismen einzubringen. Das Randomisieren kurzer DNA-Moleküle kann z. B. bei ihrer Synthese erfolgen, indem, statt wie im klassischen Fall bei jedem Syntheseschritt nur ein Nukleotid, dem Reaktionsansatz eine beliebige Mischung von Nukleotiden hinzugefügt wird. Durch die Wahl des Mischungsverhältnisses lässt sich die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmtes Nukleotid an einer definierten Stelle angefügt wird, festlegen. Als Träger dieser künstlich erzeugten Erbinformation werden einfach aufgebaute biologische Einheiten, wie Phagen, Bakterien oder Hefen benutzt.

Beim so genannten „Phage Display“ (Smith 1985) wird die für die Bibliothek codierende DNA in einen Phagenvektor eingesetzt und in Bakteriophagen eingebracht. Nach der Infektion von Bakterien mit diesen Phagen präsentiert jeder Phage eine Peptidvariante als Fusionsprotein eines seiner Hüllproteine auf seiner Oberfläche. Da es sich bei Phagen um Viren, also nicht um eigenständig lebensfähige Partikel handelt, ist man zur Vermehrung dieser Phagen auf Wirtszellen angewiesen (Hoess 2001). Um die Peptidvarianten für das Screening zugänglich zu machen, müssen die Phagen aus den Wirtszellen freigesetzt und aufgereinigt werden. Wird ein Treffer gefunden, so ist die Struktur des entsprechenden Peptids leicht über die DNA-Sequenz des Phagenplasmids zu ermitteln. Es handelt sich dabei um einen dreistufigen Prozess: In der ersten Stufe werden die Phagen in der Wirtszelle vermehrt und anschließend freigesetzt. In der zweiten Stufe werden affinitätsbasierte Techniken dazu benutzt, um Phagenpartikel mit den gewünschten Eigenschaften zu finden. Mit den so gewonnenen Phagen werden nun wiederum in der dritten Stufe neue Bakterienzellen infiziert, um die Partikel mit den gewünschten Eigenschaften zu vermehren. Trotz dieses aufwendigen Prozesses hat sich das Phage Display zu einem Standardverfahren in der Wirkstoffforschung entwickelt (Asanuma *et al.* 2008; Lanzillotti und Coetzer 2008).

Wird die Erbinformation in eigenständig lebensfähige Zellen, wie Hefen (McAleer *et al.* 1984; Chao *et al.* 2006) oder Bakterien (Jose 2006; Rutherford und Mourez 2006) eingebracht, fallen die Infektionsschritte weg. Es ist kein weiterer Organismus zur Vermehrung der Mikroorganismen erforderlich, was einen Vorteil gegenüber des „Phage Displays“ darstellt. Bei entsprechender Wahl des Expressionssystems ist es möglich, die Peptidbibliotheken auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Diese auf lebenden Zellen basierenden Verfahren bieten den Vorteil, dass die Peptidvarianten direkt und ohne Aufreinigung für das Screening zur Verfügung stehen. In beiden Fällen trägt die Zelle den Bauplan der auf ihrer Oberfläche befindlichen Peptidvariante in Form der Plasmid-DNA in sich. Somit ergibt sich wiederum eine direkte Verknüpfung der Wirkung mit der Sequenz der Peptidvariante. Die aus der Bibliothek gewonnenen Strukturen können als Leitstrukturen und somit als Ausgangspunkt für die rationale Entwicklung neuer Wirkstoffe dienen („rational design“). Ein weiterer entscheidender Vorteil dieser auf zur Selbstreplikation fähigen Einheiten beruhenden Systeme liegt darin, dass die einzelnen Einheiten nach der Selektion (z. B. im Durchflusszytometer) weiterhin lebensfähig sind und ohne weitere Zwischenschritte wieder in Kultur gebracht werden können. Somit eröffnet sich eine vielversprechende Alternative zum klassischen „rational design“. Indem die selektierten Varianten wiederum als Ausgangspunkt für neue Zufallsvariationen dienen können, wird eines der Grundprinzipien der Natur, die Evolution, durch mehrere Zyklen aus Selektion und Variation zu einem Handwerkszeug zur Entwicklung maßgeschneiderter Strukturen. Da man die Varianten aufgrund des Vorhandenseins bestimmter Eigenschaften hin selektiert und optimiert, bezeichnet man diese Vorge-

hensweise als zielgerichtete Evolution („directed evolution“). Da bei dieser zielgerichteten Evolution keine genauen Kenntnisse der Struktur, der Funktion oder des Wirkungsmechanismus notwendig sind, stellt sie die Methode der Wahl z. B. zur Entwicklung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften dar (Chartrain *et al.* 2000).

Aufgrund von Fortschritten auf dem Sektor der Bioinformatik finden immer mehr computerbasierte Ansätze Einzug in die Wirkstoffentwicklung (Phoebe Chen und Chen 2008). Mithilfe bioinformatischer Verfahren können riesige Datenbanken mit sehr geringem zeitlichen und finanziellen Aufwand auf mögliche Zielstrukturen hin durchsucht werden, es findet also ein so genanntes virtuelles Screening statt (Krovat *et al.* 2005; Vadivelan *et al.* 2008). Auch lassen sich die Interaktionen zwischen dem Targetprotein und den potenziellen Liganden immer genauer vorhersagen. Ausgehend von diesen Vorhersagen ist es dem Computer möglich, Strukturvorschläge für neue Leitstrukturen zu machen (Villar 2007). Diese Vorhersagen erfordern zurzeit allerdings noch ein ausgedehntes Training mit bekannten Strukturen zur Verfeinerung des Vorhersagealgorithmus.

Es liegt also der Schluss nahe, mithilfe einer Kombination aus dem Durchforsten von Bibliotheken nach Treffern, der zielgerichteten Evolution, den Daten aus Aktivitätstests und der Anwendung computerbasierter Methoden und Vorhersagen ein Pharmakophormodell zu entwickeln, das letztlich sozusagen als Negativ für neue Wirkstoffe dienen kann.

2.1 AUTODISPLAY – EIN VERFAHREN ZUR OBERFLÄCHEN-EXPRESSION AUF *E. COLI*

Sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien transportieren eine Vielzahl an Proteinen verschiedenster Funktion an ihre Zelloberfläche oder sekretieren diese in ihre Umgebung (Henderson *et al.* 2004). Darunter sind nicht nur Virulenzfaktoren, sondern auch für den Stoffwechsel oder die Interaktion mit ihrem Umfeld wichtige Proteine. Die Mechanismen beider Bakterientypen unterscheiden sich allerdings aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Zellhülle voneinander. Grampositive Bakterien müssen beim Transport von Proteinen an ihre Zelloberfläche lediglich eine Membran überwinden. Die Sekretion erfolgt hier stets über einen Sec-abhängigen Mechanismus (Navarre und Schneewind 1999). Gramnegative Bakterien stellen mit ihren zwei Zellmembranen deutlich höhere Anforderungen an die Transportmechanismen. Heute unterscheidet man fünf verschiedene Typen solcher Sekretionsmechanismen von gramnegativen Bakterien (**Tabelle 1**). Ein besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle auf den dieser Arbeit zugrunde liegenden Typ V Sekretionsmechanismus, den Autotransporter-Mechanismus (Henderson *et al.* 2004) gelegt werden. Bei dieser Sekretionsart enthält das Vorläufer-

protein des an die Oberfläche zu transportierenden Proteins bereits alle funktionellen Einheiten, die zum eigenständigen Transport über die äußere Membran an die Zelloberfläche erforderlich sind.

Tabelle 1: Übersicht über die Sekretionsmechanismen gramnegativer Bakterien.

Sekretionsmechanismus	Beispiel	Literatur
Typ I	Hämolysin aus <i>E. coli</i> Adenylat-Cyclase aus <i>Bordetella pertussis</i> Leukotoxin aus <i>Pasteurella haemolytica</i>	(Gentshev <i>et al.</i> 2002) (Ladant und Ullmann 1999) (Narayanan <i>et al.</i> 2002)
Typ II	Pullulanase aus <i>Klebsiella oxytoca</i> Cholera-Toxin aus <i>Vibrio cholerae</i> Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Pugsley und Possot 1993) (Sandkvist 2001b) (Sandkvist 2001a)
Typ III	YOP-Proteine <i>Yersinia spp.</i>	(Michiels <i>et al.</i> 1990)
Typ IV	Pertussis-Toxin aus <i>Bordetella pertussis</i>	(Farizo <i>et al.</i> 2000)
Typ Va Typ Vb Typ Vc	AIDA-I aus <i>E. coli</i> IgA1-Protease aus <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Resistenz-Protein aus <i>Bordetella Pertussis</i> NalP-Protease aus <i>Neisseria Meningitidis</i> FhaB-Protein aus <i>Bordetella Pertussis</i> Hia-Protein aus <i>Haemophilus influenzae</i>	(Benz und Schmidt 1992) (Pohlner <i>et al.</i> 1987) (Fernandez und Weiss 1994) (van Ulsen <i>et al.</i> 2003) (Coutte <i>et al.</i> 2001) (Meng <i>et al.</i> 2006)

Der Name Autotransporter spiegelt die Tatsache wider, dass die Sekretion aus dem Periplasma ohne Beteiligung anderer Proteine verläuft. Seit der ersten Beschreibung des Sekretionsmechanismus am Beispiel der IgA1-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner *et al.* 1987), der Prägung des Begriffs Autotransporter für eine neue Familie von sekretierten Proteinen in gramnegativen Bakterien (Jose *et al.* 1995), wächst die Zahl beschriebener, über diesen Mechanismus sekretierter Proteine ständig an (Henderson *et al.* 2004). Trotz der großen Vielfalt an Autotransporterproteinen enthalten alle Autotransporter (Typ Va Sekretionsmechanismus) drei funktionelle Einheiten: ein N-terminales Signalpeptid (SP), einen Passagier (P) und C-terminal die eigentliche Transportdomäne, das sogenannte β -Fass (β -barrel) (**Abbildung 1**). Die Passagierdomäne umfasst außer der für die biologische Funktion erforderlichen Sequenz auch noch ein Verbindungsstück (Linker, L), das für die vollständige Präsentation des Passagiers

auf der Zelloberfläche erforderlich ist. Ähnliche β -Fass-Strukturen kommen bei einer



Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Autotransporterfusionsproteins. SP: Signalpeptid, P: Passagier, L: Verbindungsstück oder „Linker“, T: Transportdomäne, das sogenannte β -Fass.

weiteren Familie von bakteriellen Außenmembranproteinen vor, den Porinen. Ein Beispiel ist das Maltoporin, dessen Struktur 1995 durch eine Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Schirmer *et al.* 1995). Die Pore des Maltoporins wird durch 18 gegenläufige β -Faltblattstrukturen gebildet. Zumindest für ein Autotransporterprotein (Sekretionsmechanismus: Typ Va), das NalP aus *Neisseria meningitidis*, konnte diese β -Fass-Struktur experimentell durch eine Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden (Oomen *et al.* 2004). Die Transportdomäne, die in dieser Arbeit zur Translokation von Passagieren an die Zelloberfläche zum Einsatz kommt, ist die des AIDA-I Protein (Adhesin Involved in Diffuse Adherence), ein Adhäsion aus *E. coli*. Die strukturellen Ähnlichkeiten (β -Faltblattstrukturen) des AIDA-I Proteins mit den beschriebenen Porinen und dem NalP legen nahe, dass es sich bei diesem Autotransporter wie bereits postuliert (Maurer *et al.* 1997) ebenfalls um eine solche β -Fass-Struktur handelt. Eine Modellvorstellung des β -Fasses von AIDA-I nach Maurer *et al.* (Maurer *et al.* 1997) liefert die **Abbildung 2**. Über den Mechanismus des Transports von Autotransporterproteinen an die Zelloberfläche existieren verschiedene Modelle (Henderson *et al.* 2004). Die für das Fusionsprotein codierende Sequenz wird translatiert. Das Signalpeptid dient als Erkennungssequenz für den Sec-Mechanismus, über den das Vorläuferprotein über die innere Membran transportiert wird und in den periplasmatischen Raum gelangt. Zur Abspaltung der Signalsequenz wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Eine Hypothese ist, dass das Signalpeptid beim Transport über die innere Zellmembran abgespalten wird (Henderson *et al.* 2004). Eine weitere Hypothese ist, dass die Abspaltung im Periplasma durch eine dort ansässige Signalpeptidase erfolgt (Charles *et al.* 1994). Das um die Signalsequenz verkürzte Intermediat lagert sich mit der C-terminalen Translokationseinheit unter Ausbildung einer β -Fass-Struktur spontan in die äußere Membran ein (Meyer *et al.* 1987; Henderson *et al.* 1998), wie Untersuchungen von Autotransportermutanten, bei denen die letzte Aminosäure ausgetauscht wurde, vermuten lassen, und verläuft dann weiter zum N-Terminus. Unmittelbar an das zuletzt eingelagerte β -Faltblatt schließt sich eine Verbindungssequenz an, deren Länge maßgeblich für die Präsentation des Passagiers auf der Zelloberfläche ist (Maurer *et al.* 1997). Im Lumen des β -Fasses bildet dieses Verbindungsstück eine extrazelluläre

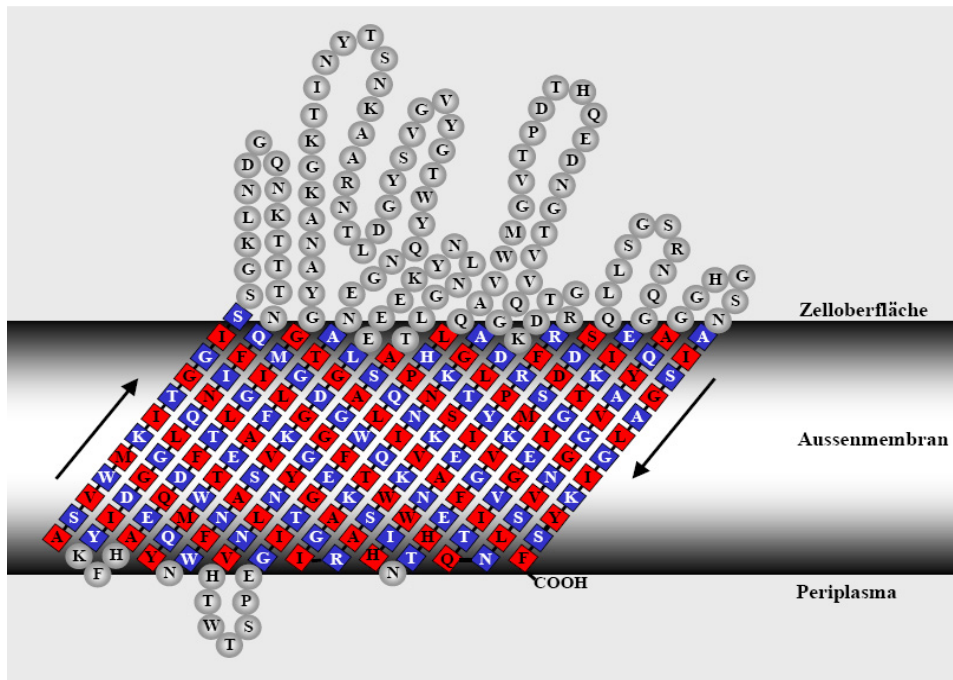


Abbildung 2: Modell des β -Fasses von AIDA-I in der äußeren Zellmembran von *E. coli* nach Maurer *et al.* (Maurer *et al.* 1997) entnommen aus Zangen (Zangen 2002). Nach diesem Strukturmodell befinden sich die Aminosäuren (1-Buchstabencode) mit eckiger Umrandung innerhalb, die rund umrandeten außerhalb der äußeren Zellmembran. Rot dargestellte Aminosäuren sind hydrophob und zur Membranseite gerichtet. Die übrigen (blauen) in der Membran liegenden Aminosäuren sind hydrophil und bilden die innere Seite des β -Fasses. Es wird postuliert, dass die erste transmembranäre Domäne, beginnend mit Alanin mit der antiparallelen C-terminalen Domäne in Wechselwirkung tritt und die Fassstruktur komplettiert.

Haarnadelschleife (Meyer *et al.* 1987; Benjelloun-Touimi *et al.* 1995) und faltet sich schließlich in eine α -Helix. Durch diesen Faltungsprozess wird der Passagier durch die Pore des β -Fasses nach außen gezogen und somit die Translokation auf die Zelloberfläche erreicht. Wenn man einen monomeren Mechanismus zugrunde legt und den Durchmesser der gebildeten Pore berücksichtigt, setzt diese Tatsache einen Transport im ungefalteten Zustand voraus (Klauser *et al.* 1992; Klauser *et al.* 1993), was durch experimentelle Befunde bei der Expression cysteinhaltiger Passagiere gestützt wird (Jose *et al.* 1996). Die Familie der Autotransporter wird bereits erfolgreich zur Oberflächenexpression verschiedener Proteine eingesetzt. So wurden mittels der Transportdomäne von AIDA-I das Enzym β -Lactamase (Lattemann *et al.* 2000) wie auch T-Zell-Epitope auf der Oberfläche von Bakterien exprimiert (Konieczny *et al.* 2000). Andere Autotransporter, wie beispielsweise VacA aus *Helicobacter pylori* (Fischer *et al.* 2001), VirG aus *Shigella flexneri* (Suzuki *et al.* 1995) oder SSP aus *Serratia marcescens* (Shimada *et al.* 1994) lassen sich ebenfalls zur Oberflächenexpression rekombinanter Proteine einsetzen. Neben dem Autotransporter-vermittelten Surface Display werden auch Fusionen mit anderen, in die Außenmembran integrierten Proteinen zur Oberflächenex-

pression rekombinanter Proteine eingesetzt (Georgiou *et al.* 1996; Daugherty *et al.* 1999).

Der Begriff Autodisplay bezeichnet ein von der Arbeitsgruppe Jose entwickeltes System zur Expression rekombinanter Peptide und Proteine auf der Zelloberfläche von *E. coli* (Jose *et al.* 1996; Maurer *et al.* 1997), das auf dem beschriebenen Typ Va Sekretionsmechanismus gramnegativer Bakterien beruht. Eine Modellvorstellung für den Ablauf der Sekretion nach Pohlner *et al.* (1987) ist in Abbildung 3 dargestellt. Zur

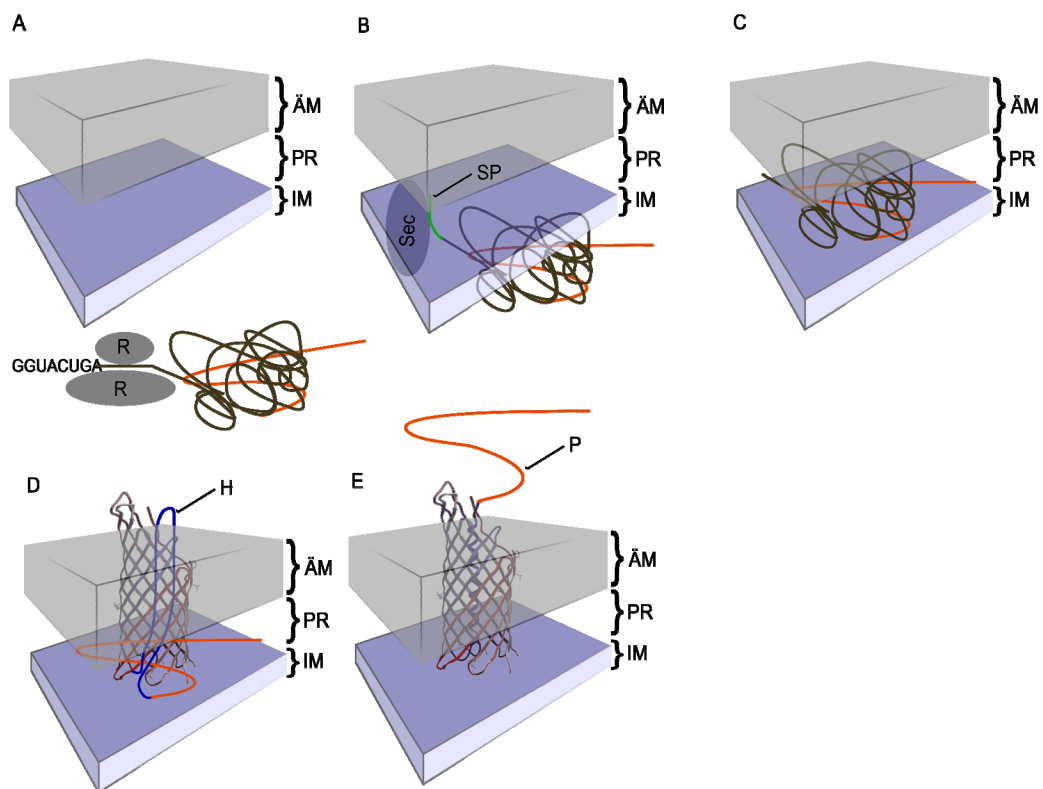


Abbildung 3: Modell des Autodisplay-Sekretionsmechanismus. A: Am Ribosom (R) wird die DNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins übersetzt. B: Das N-terminale Ende des Fusionsproteins (SP) stellt eine Signalsequenz dar. Es verankert sich in der inneren Membran und sorgt für den Transport des Fusionsproteins durch die innere Membran (IM) über den Sec-Mechanismus. C: Im periplasmatischen Raum (PR) erfolgt die Abspaltung des Signalpeptids. D: Die C-terminale Domäne des Fusionsproteins faltet sich unter Ausbildung eines β -Fasses aus 14 amphipatischen β -Faltblattstrukturen in die äußere Membran ein. Das Verbindungsstück des Fusionsproteins (L) bildet nun im Inneren dieses Fasses eine Haarnadelschleife (H) aus. E: Die Haarnadelschleife faltet sich zu einer α -Helix und zieht dabei den Passagier (P) durch das Lumen des β -Fasses nach außen.

Oberflächenexpression mittels Autodisplay muss ein künstliches Gen für ein Fusionsprotein, das den Passagier und alle für den Transport notwendigen Funktionseinheiten (Signalpeptid, Verbindungsstück, Transportdomäne) enthält, geschaffen werden. Das Verbindungsstück muss so gewählt werden, dass eine vollständige Präsentation des Pas-

sagiers an der Zelloberfläche gewährleistet wird. Das Autodisplay erwies sich, was die Wahl der Passagiere angeht, als sehr flexibel. So konnten erfolgreich kurze Peptide (Jose *et al.* 2005), Oligopeptide (Jose und Zangen 2005) und Enzyme (Esterase *EstA*, (Schultheiss *et al.* 2002)) in aktiver Form auf der Oberfläche präsentiert werden. Anhand von Experimenten mit der Oberflächenexpression von bovinem Adrenodoxin (Jose *et al.* 2002) und der Sorbitdehydrogenase (Jose und von Schwichow 2004) mittels Autodisplay konnte gezeigt werden, dass auch Passagiere, deren funktionelle Einheiten aus mehreren Monomeren bestehen, durch das Autodisplay in aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert werden können. Die hierbei an der Bakterienoberfläche exprimierten Passagiere liegen auf Plasmiden codiert vor. Es ist also stets möglich, einem bestimmten Phänotyp den entsprechenden Genotyp zuzuordnen. Über den Genotyp sind durch Standardverfahren der DNA-Sequenzanalyse zunächst die DNA-Sequenz und darüber schließlich die Primärstruktur der exprimierten Passagiere leicht zugänglich. Durch diese Verknüpfung ist eine Grundvoraussetzung für die Eignung des Systems als Oberflächenexpressionssystem für Peptid- und Proteinbibliotheken gegeben.

2.1.1 VORTEILE DES AUTODISPLAY GEGENÜBER ANDERER EXPRESSIONSSYSTEME

Das Autodisplay bietet gegenüber anderer Oberflächenexpressionssysteme eine Reihe von Vorteilen. Während andere Expressionssysteme bei der Expression von rekombinanten Proteinen mit einem verlangsamten Wachstum oder dem Absterben der Zellen zu kämpfen haben (Francisco und Georgiou 1994), lassen sich mithilfe des Autodisplays rekombinante Proteinmoleküle in der Größenordnung von 10^5 Molekülen auf der Oberfläche von einer *E. coli* Zelle exprimieren (Jose *et al.* 2001). Die Überlebensfähigkeit der Bakterien wird durch das Transportsystem nicht negativ beeinflusst. Die Tatsache, dass die in der Außenmembran überexprimierten Proteine bis zu 5 % des Gesamtproteins ausmachen (Maurer *et al.* 1997), entkräftet die These, dass eine geringe Expressionsrate zu dieser Verträglichkeit führt. Die exprimierten Passagiere liegen beim Autodisplay entweder mit ihrem C-Terminus kovalent mit der Bakterienzelle verbunden vor oder lassen sich durch Einfügen einer Erkennungssequenz für eine Außenmembranprotease in das Kulturmedium freisetzen. So ist es möglich, dasselbe Fusionsprotein, je nach verwendetem Bakterienstamm, entweder oberflächenständig zu exprimieren oder in den Überstand zu sekretieren. So kann z. B. eine Schnittstelle für die Außenmembranprotease OmpT in den Linker integriert werden. Eine Expression in einem OmpT-positiven Bakterienstamm wird zu einer Freisetzung des Passagiers in das Kulturmedium führen (Jose *et al.* 1996; Jose *et al.* 2001). Das rekombinante Protein kann aus dem Kulturmedium einfach von den Bakterien und den in deren Innerem vorhandenen Proteinen durch Zentrifugation abgetrennt werden. Ein Aufschluss der Bakterien und die aufwendige Aufreinigung des rekombinanten Proteins wie im Falle einer

zytosolischen Expression entfallen. Die Expression auf der Zelloberfläche von *E. coli* sorgt einerseits für eine freie Zugänglichkeit des Passagiers, andererseits werden die exprimierten Passagiere durch das Membranumfeld stabilisiert. Die Charakterisierung der Passagiere kann durch Ganzzell-Tests erfolgen, eine weitere Aufreinigung ist nicht notwendig (Jose 2006). Insbesondere bei der Aufklärung der Primärsequenz der Passagiere wie z. B. einer Inhibitorvariante einer Peptidbibliothek (diese Arbeit) ist die direkte Verknüpfung einer „screen-baren“ Eigenschaft mit dem im Zellinneren, in Form der für den Passagier codierenden DNA-Sequenz vorliegenden Etikett, ein großer Vorteil (Jose *et al.* 2005). Im Gegensatz zu den im „Phage Display“ eingesetzten Phagen ist *E. coli* zur Selbstreplikation fähig und verfügt über eine für die Analyse mit optischen Systemen, wie der Fluoreszenzmikroskopie oder der Durchflusszytometrie, ausreichende Größe (Francisco *et al.* 1993; Wentzel *et al.* 1999; Daugherty *et al.* 2000), womit der Zugang zu einem hochdurchsatzfähigen Analyse- und Selektionssystem gegeben ist. Die so selektierten Bakterien können ohne weitere Maßnahmen wieder in Kultur gebracht und so die entsprechenden Peptidvarianten vervielfältigt werden.

2.2 DAS TARGET: HUMANES CATHEPSIN G

Das Enzym humanes Cathepsin G (EC 3.4.21.20) ist eine Serinprotease aus der Trypsin-Familie (Peptidase S1 Familie). Cathepsin G wurde erstmals in den Vesikeln neutrophiler Granulozyten gefunden (Dewald *et al.* 1975). Ein Jahr später wurde es erstmals von Starkey und Barret isoliert (Starkey und Barrett 1976). Die Primärsequenz wurde 1988 von Watorek *et al.* (Watorek *et al.* 1988), die dreidimensionale Struktur schließlich von Hof *et al.* 1996 (Hof *et al.* 1996) aufgeklärt. Eine der lange bekannten Funktionen, die humanes Cathepsin G ausübt, ist der proteolytische Abbau phagozytierter Partikel (Starkey *et al.* 1977). Außerhalb neutrophiler Granulozyten wird die Aktivität von humanem Cathepsin G durch körpereigene Serpine, z. B. dem bei Entzündungsprozessen ausgeschütteten Inhibitor α 1-Antichymotrypsin, streng reguliert (Ferrer-Lopez *et al.* 1990). Eine Störung dieses Regelmechanismus führt zum proteolytischen Abbau gesunden Gewebes (z. B. Bindegewebe, Gefäßendothel), was zu chronisch entzündlichen Prozessen führt. Aufgrund dieser Tatsache wird eine Beteiligung von humanem Cathepsin G an der Entstehung und dem Verlauf chronischer Entzündungserkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder dem Lungenemphysem diskutiert (Travis *et al.* 1979). Humanes Cathepsin G zeigte *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten (Chertov *et al.* 1997). Die Rolle von humanem Cathepsin G bei der rheumatoiden Arthritis scheint auf dieser chemotaktischen Aktivität zu beruhen (Miyata *et al.* 2007). Auch bei verschiedenen vaskulären Erkrankungen wird eine Beteiligung von humanem Cathepsin G diskutiert. So führt ein Angriff von humanem Cathepsin G am Gefäßendothel zu einer gesteigerten Permeabilität und zum

ändern zu einer Anheftung von Thrombozyten an den Stellen der Gefäßschädigung, was schließlich zu einem Thrombus führen kann (Selak *et al.* 1988). In diesem Zusammenhang wird humanes Cathepsin G mit der Entstehung von Herz- oder Hirninfarkten in Verbindung gebracht (Herrmann *et al.* 2001). In der neueren Literatur sind weitere Funktionen von Cathepsin G beschrieben. Humanes Cathepsin G spielt eine Rolle bei der Aktivierung bestimmter Rezeptorentypen der sogenannten Protease aktivierten Rezeptoren (PARs), also bei der Signaltransduktion (Dulon *et al.* 2003; Schiemann *et al.* 2006; Ramachandran *et al.* 2007; Rafiq *et al.* 2008). Humanes Cathepsin G ist in der Lage, Angiotensin II direkt aus Angiotensinogen, das heißt ohne den Zwischenschritt Angiotensin I und unabhängig von Renin freizusetzen (Legedz *et al.* 2004). Dieser alternative Syntheseweg für Angiotensin II wird mit Problemen bei der Behandlung von Herzinsuffizienz und Bluthochdruck mit ACE-Inhibitoren („Angiotensin Converting Enzyme“) in Verbindung gebracht, da der Syntheseweg über humanes Cathepsin G von den ACE-Inhibitoren nicht blockiert wird und somit weiterhin das gefäßverengende Angiotensin II gebildet wird (Rykl *et al.* 2006). Nimmt man als Ursache für alle genannten Krankheitsbilder ein Missverhältnis zwischen körpereigenem Inhibitor und der Menge an außerhalb von neutrophilen Granulozyten vorliegendem humanem Cathepsin G an, so liegt es nahe, geeignete artifizielle Inhibitoren von humanem Cathepsin G zu entwickeln und zur Therapie oder Prophylaxe dieser Erkrankungen einzusetzen. Die Protease humanes Cathepsin G stellt in diesem Zusammenhang ein mögliches Target dar. Eine Reihe von Inhibitoren ist in der Literatur bereits beschrieben (Groutas *et al.* 1994; Gutschow und Neumann 1997; Gutschow *et al.* 1998; Schechter und Gutschow 2001; Gutschow *et al.* 2002), ein therapeutischer Einsatz erfolgt bislang jedoch nicht.

2.3 DIE LEITSTRUKTUR: PEPTID 15

Beim Peptid 15 handelt es sich um die auf 15 Aminosäuren verkürzte Teilsequenz EILIFWSKAIGYSFT, die die Aminosäuren 62-86 des C-reaktiven Proteins (CRP) umfasst, und die in der Lage ist, sowohl humane Leukozytenelastase ($K_i = 0,18 \mu\text{M}$) als auch humanes Cathepsin G ($K_i = 0,25 \mu\text{M}$) zu hemmen (Yavin und Fridkin 1998). Das CRP wird in der Leber gebildet (Du Clos 2000). Es eignet sich zur klinischen Kontrolle des Verlaufs von Entzündungsprozessen im Körper (Rosalki 2001), da seine Plasmakonzentration einerseits im Falle einer Entzündung innerhalb von 24 Stunden auf das bis zu tausendfache des normalen Wertes ansteigen kann und andererseits beim Abklingen der Entzündung auch genauso schnell wieder fällt (Ballou und Kushner 1992). Beim CRP handelt es sich um ein zyklisches, aus fünf identischen Untereinheiten aufgebautes Pentamer (Volanakis 2001), das spezifisch an Rezeptoren auf der Oberfläche von Granulozyten bindet (Buchta *et al.* 1987). Eine membranständige Protease ist für

den Abbau verantwortlich. Durch den Abbau entstehen teilweise Peptide, die im Gegensatz zum CRP in der Lage sind, humanes Cathepsin G und humane Leukozytenelastase zu hemmen (Vachino *et al.* 1988). Yavin *et al.* nahmen diesen Befund zum Anlass, um nach der Aufklärung der Struktur des CRP (Shrive *et al.* 1996) gezielt verkürzte Teilssequenzen des CRP auf Hemmung von humanem Cathepsin G und humaner Leukozytenelastase hin zu untersuchen (Yavin *et al.* 1996; Yavin und Fridkin 1998). Bei diesen Untersuchungen erwies sich das Peptid 15 als das potenteste der getesteten Peptide und sollte deshalb in dieser Arbeit als Leitstruktur dienen.

2.4 SELEKTION POSITIVER VARIANTEN MITHILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Moderne Methoden der Wirkstoffentwicklung, wie die evolutive Entwicklung von Wirkstoffen oder Leitstrukturen mittels Autodisplay und anschließendem Screening erfordern ein leistungsfähiges Analysesystem. Im Falle des Autodisplays muss das Analysesystem in der Lage sein, in einem riesigen Überschuss von negativen Varianten wenige positive Varianten zu erkennen und diese auszusortieren. Neben diesem hohen Probendurchsatz spielt die Tatsache eine ebenso große Rolle, dass die Bakterienzellen nach der Selektion auch noch überlebensfähig sein müssen, um eine Identifizierung des exprimierten Peptids zu gewährleisten. Die Durchflusszytometrie hat sich bei der Analyse und Selektion eukaryontischer Zellen bereits zu einem Standardverfahren entwickelt. Sie wird z. B. dazu genutzt, um Veränderungen im Blutbild bei klinischen Studien zu erfassen (Tong *et al.* 2006; Matteucci und Giampietro 2008) oder um die Diagnose bestimmter Tumoren zu erleichtern (Karlsson *et al.* 2008; Ogata 2008). Auch bei der Analyse von Mikroorganismen hat die Durchflusszytometrie in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen, obwohl sich diese aufgrund der geringeren Größe als schwieriger gestaltet. Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, innerhalb einer Stunde bis zu 10^8 Zellen zu analysieren (Daugherty *et al.* 2000). Dieser hohe Durchsatz und die Möglichkeit einzelne Zellen zu selektieren, prädestiniert die Durchflusszytometrie förmlich für die Analyse von zellbasierten Bibliotheken. Die Durchflusszytometrie und das Fluoreszenz-gesteuerte Aussortieren von einzelnen Varianten einer Bibliothek kamen bereits beim Screening von auf Hefen (Feldhaus und Siegel 2004) und auf Bakterien (Rice *et al.* 2006) exprimierten Bibliotheken zu Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit kamen mehrere Durchflusszytometer zum Einsatz. In **Abbildung 4** ist die Funktionsweise eines Durchflusszytometers am Beispiel des FACS Aria™ (Becton Dickinson) schematisch dargestellt. Die Bakteriensuspension wird unter leichtem Überdruck in das Flüssigkeitssystem des Gerätes injiziert. In diesem wird eine laminare Strömung erzeugt und die Zellen soweit vereinzelt, sodass immer nur eine Zelle einen Laserstrahl passiert. Die dahinter angebrachten Detektoren registrieren die, durch die Wechselwirkung mit

der Zelle erzeugten, Veränderungen des Laserlichts oder die Veränderungen

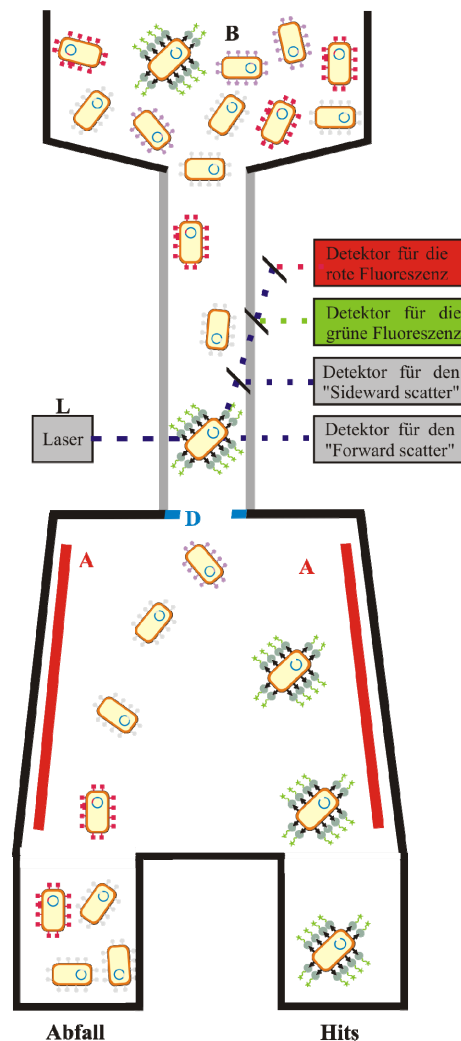


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers mit Sortierfunktion am Beispiel des FACSaria™. B: die zu analysierende Bakterien suspension wird nach der Markierung unter leichtem Überdruck in das Flüssigkeitssystem des Zytometers eingebracht. L: der durch das Zytometer erzeugte Strom aus Einzelzellen wird in einer Durchflussküvette mit Laserlicht bestrahlt. Die dadurch angeregte Fluoreszenz, die Transmission und das Streulicht werden in unterschiedlichen Detektoren erfasst. D: Durch eine Düse wird der Flüssigkeitsstrom in feine Einzeltröpfchen umgewandelt. Die entstandenen Tröpfchen enthalten nun im Idealfall nur eine Bakterienzelle. Die Steuerlogik des Zytometers erlaubt es, jedes Tröpfchen einzeln mit einer Ladung zu versehen. A: Zwischen den beiden Ablenkplatten wird ein konstantes elektrisches Feld aufgebaut. In diesem werden die geladenen Tröpfchen entsprechend ihrer Ladung in verschiedene Richtungen abgelenkt. Auf diesem Weg wird eine Auftrennung in gewünschte Tröpfchen (Hits) und ungewünschte Tröpfchen erreicht (Abfall).

in der Fluoreszenz im 90 ° Winkel zum einfallenden Laserlicht. Wird eine Zelle mit den gewünschten Charakteristika gefunden, so wird der umhüllende Flüssigkeitstropfen beim Verlassen der Düse elektrisch aufgeladen. Der geladene Flüssigkeitstropfen kann

nun durch Anlegen einer Hochspannung nach links oder nach rechts abgelenkt werden. So erfolgt die Trennung zwischen den Tröpfchen, die eine positive (humanes Cathepsin G bindende) Variante, und den Tröpfchen, die negative Varianten enthalten. Die Tröpfchen mit den positiven Varianten können entweder in einem Reaktionsgefäß, einer Agarplatte oder einer Mikrotiterplatte aufgefangen werden. In den beiden letzten Fällen ist es sogar möglich, jedes Tröpfchen an eine andere Position der Platte zu dirigieren.

2.5 ZIEL DER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe des Autodisplays Peptidbibliotheken auf der Oberfläche von *E. coli* zu exprimieren und somit zu zeigen, dass das Autodisplay eine Alternative zu bestehenden Systemen wie z. B. das „Phage Display“ darstellt. Durch Ausnutzung der Affinität eines Inhibitorpeptids zum Target humanes Cathepsin G sollten Varianten markiert werden, die in der Lage sind, humanes Cathepsin G zu binden. Diese Interaktion des Peptids mit dem Target sollte die Grundlage für die Selektion einzelner *E. coli* Zellen, die die Peptidvarianten auf der Oberfläche exprimieren, liefern. Markierte Bakterien sollten dann im Durchflusszytometer fluoreszenzgesteuert aussortiert werden und die exprimierte Peptidsequenz der Einzelzellklone durch DNA-Sequenzanalyse aufgeklärt werden. Nach der Synthese der Peptide sollten diese im Mikrotiterplattentest hinsichtlich ihrer Hemmung von humanem Cathepsin G untersucht werden. Parallel zur experimentellen Charakterisierung sollte eine computerbasierte Analyse der Peptid-Proteininteraktion (Protein-Peptid-Docking) erfolgen und mögliche Korrelationen mit den experimentellen Befunden aufgedeckt werden. Die gefundenen Peptidstrukturen sollten mithilfe eines evolutiven Ansatzes weiter verfeinert werden und ein besserer Inhibitor als die eingesetzte Leitstruktur Peptid 15 gefunden werden, um die Eignung des Autodisplays zur evolutiven Entwicklung von Peptidinhibitoren zu belegen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 GERÄTE

Tabelle 2: Bei den Experimenten verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Firma
-70 °C Gefriertruhe	HT2086	Hettich, Tuttlingen
Autoklav	3850 ELV	Systec, Wetztenberg
Brutschrank	P10825028	Memmert, Schwalbach
Durchflusszytometer	FACSAria™	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSScan™	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporator	Elektroporator 2510	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Gelkammern (Agarose)	Electrophoresis Sub System 150	Labnet, Edison, NJ, USA
Gelkammern (SDS-PAGE)	EC 120 Mini Vertical System	EC-Apparatus, St. Petersburg, NT, USA
Gelkammern (SDS-PAGE)	Mini Protean II	Bio-Rad, München
Heizblock	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet, Edison, NJ, USA
Heizrührer	RCT IKAMAG	IKA, Staufen
Kühl-Gefrierkombination	Fris88f	Thermo Fischer, Dreieich
Kühlzentrifuge	Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5C Plus	Kendro, Hanau
Mikrotiterplatten-Reader	Mithras LB 940	Berthold, Bad Wildbad
Mikrowelle	MW 1000	Alaska, Mannheim
pH - Meter	pH - Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	Genesys 6	Thermo Fischer, Dreieich
Reaktionsgefäßschüttler	Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocel	Reinstwasser, Eschborn
Schüttelinkubator	Minitron	Infors, Einsbach
Spülmaschine	Compact-Desinfektor G7783CD	Miele, Gütersloh
Thermocycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Primus 25/96	MWG Biotech, Ebersberg

Gerät	Bezeichnung	Firma
Tischzentrifuge	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	ET 6130	Heraeus, Hanau
Vortex	Reax-Top	Heidolph, Schwalbach
Waage	2357	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	790 584	Memmert, Schwalbach

3.1.2 CHEMIKALIEN

Tabelle 3: Für die Experimente eingesetzte Chemikalien.

Stoffbezeichnung	Firma	Artikelnummer
2-Mercaptoethanol, p.a. 99%	ROTH	Art. 42271
Agar - Agar nach Kobe I, pulv.	ROTH	5210.2
Agarose NEEU Ultraqualität	ROTH	2267.4
Albumin Fraktion V, biotinfrei $\geq 98\%$	ROTH	0163.2
Ammoniumacetat, p.a.	ROTH	7869.1
Ammoniumsulfat, p.a.	ACROS ORGANICS	205870010
Aprotinin $\geq 3,0$ PEU/mg	Roth	A162.2
Biotin Protein Labeling Kit	Roche	1 418 165
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	B2883
Borsäure, purum, p.a., 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	B6768
Bromphenolblau, Bromphenol Blue	ACROS ORGANICS	151350250
dNTP - Set, 4x 100 μ l (100mM)	Eppendorf	0032003206
Di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat, p.a.	MERCK	1.05099.1000
Dimethylsulfoxid, $\geq 99,5\%$ (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D5879
Di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	VWR PROLABO	28029.292
Dodecylsulfate Na-Salt, in Pellets, research grade	Serva	20765
EDTA , Dinatriumsalz , Dihydrat (Titrierkomplex) 99,0% p.a	ROTH	8043.2
Eppendorf PCR Master Mix	Eppendorf	733-0106
Essigsäure, 100 %, p.a., Normapur (z.B.)	VWR PROLABO	20104.334
Ethanol p.a.	ROTH	9065.1
Ethidiumbromidlösung 1 %	ROTH	2218.1
Fluorescein Labeling Kit	Roche	11 386 093 001
Glycerin, wasserfrei, min. 99,5%, p.a.	ROTH	3783.1
Hefeextrakt pulv. für die Bakteriologie	ROTH	2363.3

HABA/Avidin Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	H2153
HEPES, min. 99,5%, Buffer Grade	AppliChem	A1069,0250
IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)	Fermentas LIFE SCIENCES	R0392
Isopropanol, p.a.	VWR PROLABO	20922.320
Kaliumacetat, wasserfrei, min.99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	32309
Kaliumchlorid, p.a.	MERCK	1.04936.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK	1.04873.1000
Lithiumchlorid, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	L9650
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Normapur	VWR PROLABO	25108.295
Methanol Normapur, p.a.	VWR PROLABO	20847.422
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen	28004
Natriumacetat, wasserfrei, p.a., >99%	MERCK	1.06268.1000
Natriumchlorid, p.a.	J.T.Baker	JTBF02366740173
N-Laurylsarcosine Natrium-Salz, min 94%, for molecular biology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	L 9150-100G
Nile Blue A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	N0766
Orange G (C.I.16230) für die Mikroskopie	ROTH	0317.1
PMSF	Serva	6/0500153
Polyethylenglykol 8000, PEG 8000, Ph. Eur.	ROTH	0263.2
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Quiagen	27106
QIAquick Gel Extraction Kit 50	Qiagen	28704
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen	28304
Rotiphoese Gel 30 (37,5:1)	ROTH	3029.1
Streptavidin Dylight 649 conjugate, 1ml	Pierce (Perbio)	21824
Streptavidin-FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	S3267
Streptavidin-FITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	S3762
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Bachem Biochemicals GmbH	L-1400.0050
TEMED p.a., für die Elektrophorese	ROTH	2367.3
TRIS(Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan), Pufferan >99,9%, p.a.	ROTH	4855.2
TRIS-HCl(Tris-(hydroxymethyl) Aminomethan-Hydrochlorid), Pufferan >99,9%, p.a.	ROTH	9090.2
Triton X-100, for molecular biology	Serva	39795
Trypton / Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	ROTH	8952.2
Tween 20, Pharm. Eur.	ROTH	9127.1
X-Gal	Fermentas LIFE SCIENCES	R0401

3.1.3 ENZYME

Tabelle 4: In den Experimenten eingesetzte Enzyme.

Stoffbezeichnung	Firma	Artikelnummer
Agel	New England Biolabs	R0552S
BamHI	New England Biolabs	R0136S
BglII	New England Biolabs	R0144S
BshTI	Fermentas LIFE SCIENCES	ER 1461
Cathepsin G - BIOTINYLATED, EC 3.4.21.20	LEE BIOSOLUTIONS, INC.	186-55
Cathepsin G, EC 3.4.21.20, lyophilized	LEE BIOSOLUTIONS, INC.	186-12
DNase I, Deoxyribonuclease I	Serva	18525
DpnI	New England Biolabs	R0176S
EcoRI	TaKaRa	1040A
Klenow - Fragment 3'→5' exo ⁻	New England Biolabs	M0212S
Klenow (DNA-Polymerase I large Fragment)	New England Biolabs	M0210S
KpnI	New England Biolabs	R0142S
Lysozym	ROTH	8259.1
NcoI	New England Biolabs	R0193S
NdeI	New England Biolabs	R0111S
Pfu DNA Polymerase, recombinant	Fermentas LIFE SCIENCES	EP0501
SacII	New England Biolabs	R0157S
SexAI	New England Biolabs	R0605S
T4 DNA Ligase, 20000 units	New England Biolabs	M0202S
Trypsin aus Schweinepankreas, lyophilisiert	ROTH	2193.1
Vent® DNA-Polymerase	New England Biolabs	M0254S
XhoI	New England Biolabs	R0146S

3.1.4 GRÖßENSTANDARDS FÜR DIE ELEKTROPHORESE

Tabelle 5: Zur Größenbestimmung von DNA und Proteinen eingesetzte Standards.

Stoffbezeichnung	Firma	Artikelnummer
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs	N3231S
25 bp DNA Step Ladder	Promega	6451A
Felix (1KB) Marker	Qbiogene	MWFlx100
Jules (100bp) Marker	Qbiogene	NWJul300
Lambda Hind III Digest	New England Biolabs	N3012S
Prestained Protein Marker	New England Biolabs	P7708S

3.1.5 OLIGONUKLEOTIDE

Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Oligonukleotide. Unterstrichene Basen sind Bestandteile einer Restriktionsendonukleaseschnittstelle.

Name	Funktion	Sequenz
DB001 (oDBAgeI forward)	Forwardprimer zum Einbau der AgeI Schnittstelle in den Linker von pJM042 durch ortsgerichtete Mutagenese	CGGCAATACAG <u>ACCGGT</u> GAAACGGAAGTTATGC-TAC
DB002 (oDBAgeI reverse)	Reversprimer zum Einbau der AgeI Schnittstelle in den Linker von pJM042 durch ortsgerichtete Mutagenese	GTAGCATAACTTCGTT <u>CACCGGT</u> CTGTATTGCCG
DB003 (oDB19xs1)	hybridisiert mit DB004, liefert dabei kompatible Enden für XhoI und SacII, codiert für Peptid 6a	<u>TCGAGG</u> ACATCTTCGTTTTCGTT <u>CCGC</u>
DB004	hybridisiert mit DB003, liefert dabei kompatible Enden für XhoI und SacII, codiert für Peptid 6a	<u>GGAACG</u> AAAACGAAGATGTCC
DB005	hybridisiert mit DB006, liefert dabei kompatible Enden für XhoI und SacII, codiert für Peptid 6	<u>TCGAGAA</u> AGATATTTTTGTG <u>CCGC</u>
DB006	hybridisiert mit DB005, liefert dabei kompatible Enden für XhoI und SacII, codiert für Peptid 6	<u>GGCACAAA</u> AATATCTTTC
DB007 (DBLib5.1)	dient zur Erstellung des für eine 5-mer Peptidbibliothek codierenden Inserts nach Strategie II	ATATTACTGATTTG <u>CTCGAG</u> NNNNNNNNNNNNNNNN NGG <u>AGATCTACCGCGG</u> CTCCACATCTGATACC CGGCAATACAG <u>ACCGGT</u> GAAACGGAAGTTATGC

Name	Funktion	Sequenz
DB008 (DBLib6.1)	dient zur Erstellung des für eine 6-mer Peptidbibliothek codierenden Inserts nach Strategie II	ATATTACTGATTTGCTCGAGNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNGGAGATCTACCGCGGCTTCCCACATCTGAT ACCCGGCAATACAGACCGGTGAACGGAAGT- TATGC
DB009 (oDBxa forward2)	dient zur Amplifikation der Oligonukleotide DBLib5.1 und DBLib6.1 nach Strategie II, Forward-primer	ATATTACTGATTTGCTCGAG
DB010	das Oligonukleotid erlaubt die Sequenzanalyse des Passagiers in Autotransporterkonstrukten, bindet am Beginn des β -Fasses (Reversprimer)	CCTCCCATAATCCCTAAGGTAAAATCACCCAGTTG
DB011	dient zur Erstellung des für eine 5-mer Peptidbibliothek codierenden Inserts nach Strategie III	GGGTACCTC- GAGNNNNNNNNNNNNNNNNNGAATTCCCGCGGCTT CCCACATCTGATACCC
DB012	dient zum Auffüllen des zweiten Stranges von DB011, Ligation über XhoI und SacII	GGGTATCAGATGTGGGAAG
DB013	dient zur Erstellung des für eine 6-mer Peptidbibliothek codierenden Inserts nach Strategie III	GGGTACCTC- GAGNNNNNNNNNNNNNNNNNGAATTCCCGCGG CTTCCCACATCTGATACCC
DB014	hybridisiert mit DB013 und DB011 und dient zum Auffüllen des zweiten Stranges, Ligation über XhoI und AgeI	GCATAACTTCCGTTCACCGGTCTGTATTGCCGGG- TATCAGATGTGGGAAGCC

Name	Funktion	Sequenz
DB015 (oDBxa3 reverse)	dient zum Auffüllen der Oligonukleotide DB007 und DB008 nach Strategie II, Reversprimer, Ligation über XhoI und AgeI	GCATAACTTCCGTTTCACC
DZ015	hybridisiert mit DZ016 zur für Peptid 15 codierenden DNA und liefert nach der Hybridisierung kompatible Enden zur Ligation über XhoI und SacII	<u>TCGAGGAAATCCTGATCTTCTGGTCCAAAGA-</u> <u>CATCGGTTACTCCTTCACCCCGC</u>
DZ016	hybridisiert mit DZ015 zur für Peptid 15 codierenden DNA und liefert nach der Hybridisierung kompatible Enden zur Ligation über XhoI und SacII	<u>GGGGTGAAGGAGTAACCGATGTCTTTGGACCA-</u> <u>GAAGATCAGGATTTCC</u>
DZ019	hybridisiert mit DZ020 zur für Peptid 15+Epitop HA codierenden DNA und liefert nach der Hybridisierung kompatible Enden zur Ligation über XhoI und SacII	<u>TCGAGTACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTGA</u> <u>AATCCTGATCTTCTGGTCCAAAGACATCGGT-</u> <u>TACTCCTTCACCCCGC</u>
DZ020	hybridisiert mit DZ019 DZ020 zur für Peptid 15+Epitop HA codierenden DNA und liefert nach der Hybridisierung kompatible Enden zur Ligation über XhoI und SacII	<u>GGGGTGAAGGAGTAACCGATGTCTTTGGACCAGA</u> <u>AGATCAGGATTTTCAGCGTAGTCCGGAACGTCG-</u> <u>TACGGGTAC</u>

3.1.6 NÄHRMEDIEN

Alle Nährmedien wurden im Autoklaven bei 121 °C und 1,1 kg/cm² Druck für 20 min sterilisiert. Nicht autoklavierbare Zusätze (Glucose, Antibiotika) wurden sterilfiltriert und den abgekühlten Medien hinzugefügt.

LB MEDIUM

- 950 ml Reinstwasser
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g Trypton
- 10 g Kochsalz
- 16 g Agar (bei Festmedien)

Mit 5 M Natronlauge auf pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen und im Autoklaven sterilisieren.

PPM MEDIUM

- 15 g Proteose Pepton
- 5 g NaCl
- 1 g Zulkowsky-Stärke
- 1 g KH₂PO₄
- 0,8 g K₂HPO₄
- 232,5 ml Glycerin 86%

Mit 5 M Natronlauge auf pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen und im Autoklaven sterilisieren.

SOB MEDIUM

- 950 ml Reinstwasser
- 20 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,5 g Kochsalz
- 5 ml 2 M Magnesiumchloridlösung
- 10 ml 250 mM Kaliumchloridlösung

Mit 5 M Natronlauge auf pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen und im Autoklaven sterilisieren.

SOC MEDIUM

950 ml	Reinstwasser
20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
0,5 g	Kochsalz
5 ml	2 M Magnesiumchloridlösung
10 ml	250 mM Kaliumchloridlösung

Mit 5 M Natronlauge auf pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen. Nach Sterilisation im Autoklavieren auf ca. 60 °C abkühlen lassen und 20 ml sterilfiltrierte 1 M Glucoselösung hinzu geben.

TB MEDIUM

900 ml	Reinstwasser
16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	Kochsalz

Sterilisieren durch Autoklavieren und 100 ml einer sterilen 0,17 M KH_2PO_4 / 0,72 M K_2HPO_4 Lösung hinzu geben.

2x YT MEDIUM

900 ml	Reinstwasser
16 g	Trypton
10 g	Hefeextrakt
5 g	Kochsalz

Mit 5 M Natronlauge auf pH 7,5 einstellen und mit Reinstwasser auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen und im Autoklaven sterilisieren.

3.1.7 LÖSUNGEN UND PUFFER**AGAROSEGELELEKTROPHORESE**

1x TAE-Puffer	40 mM Tris, 10 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,8
Probenpuffer	30 % Glycerol, 10 mM EDTA, 0,02 % Bromphenolblau, (0,02 % Xylenylorange)

COOMASSIE FÄRBELOESUNG FÜR SDS GELE

Coomassie-Färbebad 0,25 g Coomassie-Brilliant-Blau, 90 ml Reinstwasser,
10 ml Eisessig

Coomassie-Entfärbelsg. 90 ml Reinstwasser, 10 ml Eisessig

ETHIDIUMBROMIDFÄRBELOESUNG

1 mg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer

ISOLIERUNG DER AUßENMEMBRAN

Tris-HCl 0,2 M Tris-HCl, pH 8,0

Saccharoselösung 1 M Saccharose in Reinstwasser

EDTA-Lösung 10 mM EDTA in Reinstwasser

Lysozym 2 mg/ml Lysozym in Reinstwasser

PMSF 100 mM PMSF in Isopropanol

Extraktionspuffer 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂,
2 % Triton X100

PBS-Puffer 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 8,0 g/l NaCl, pH 7,4

NICHT DENATURIERENDE ACRYLAMIDGELE

Die angegebenen Mengen sind für zwei Minigele ausreichend.

12 % Acrylamidgehalt: 4 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 3,93 ml Reinstwasser,
2 ml 5x TBE-Puffer, 0,07 ml 10 % Ammoniumper-
sulfatlösung

20 % Acrylamidgehalt: 6,6 ml Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 1,27 ml Reinstwasser,
2 ml 5x TBE-Puffer, 0,07 ml 10 % Ammoniumper-
sulfatlösung

NILE BLUE FÄRBELOESUNG

Stammlösung 1: 7,5 mg Nile Blue A in 15 ml DMSO gelöst; c = 0,5 mg/ml

Stammlösung 2: 1 ml Stammlösung 1 mit 9 ml DMSO versetzen; c = 0,05 mg/ml

PLASMIDISOLIERUNG NACH BIRNBOIM UND DOLEY

1 x TE-Puffer	10 mM Tris/HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA
Lösung 1	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA
Lösung 2	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Lösung 3	2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8)

SDS-GELEKTROPHORESE

Acrylamidlösung	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Sammel-Gel-Puffer	4x 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS, 0,4 % TEMED
Trenn-Gel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS, 0,4 % TEMED
Ammoniumpersulfat-Lsg.	0,2 g APS auf 1,8 ml Reinstwasser
Probenpuffer	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % Glycerol, 2 mM EDTA, 0,02 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS

SONSTIGE PUFFER**Kaliumphosphat-Puffer**

90 ml	Reinstwasser
2,31 g	KH ₂ PO ₄
12,54 g	K ₂ HPO ₄

Nach Lösen der Salze mit Reinstwasser auf 100 ml auffüllen und im Autoklaven sterilisieren.

5x TBE-PUFFER

900 ml	Reinstwasser
54,0 g	Tris
27,5 g	Borsäure
4 ml	0,5 M Na ₂ EDTA (pH = 8)

Mit Reinstwasser auf 1000 ml auffüllen und sterilfiltrieren.

3.1.8 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE

BAKTERIENSTÄMME

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genomdeterminanten	Literatur
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F ⁻ , dcm, ompT, lon, hsdS(Rb- mB-), gal, λ(DE3)	(Sambrook und Russel 2001)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), phoA, supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1	(Hanahan 1983)
<i>E. coli</i> JK321	ΔompT,proC,leu6,trpE38,entA,zih12::Tn10, dsbA::kan	(Jose <i>et al.</i> 1996)
<i>E. coli</i> UT5600	F ⁻ , ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14, tsx-67, Δ(ompT-fepC)266, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1	(Sambrook und Russel 2001)
<i>E. coli</i> UT5600 (DE3)	F ⁻ , ara-14, leuB6, secA6, lacY1, proC14, tsx-67, Δ(ompT-fepC)266, entA403, trpE38, rfbD1, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1, λ(DE3)	(Jose und Handel 2003)

PLASMIDE

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Nummer des Stammes	Konstruktion	Passagier	Eigenschaften
pDB001	H222	NdeI/BamHI Fragment aus pJM942 über NdeI/BamHI in pETSH4 eingesetzt	CTB	Induzierbare Prote- inexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz
pDB002	H238	NdeI/BamHI Fragment aus pDB007 über NdeI/BamHI in pETSH4 eingesetzt	CTB	Induzierbare Prote- inexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz, zusätzliche Agel Schnittstelle im Linker, Ampicillin- resistenz
pDB003	H239	codierende Sequenz für Peptid 15 mit zusätzlichem HA-Epitop als Hybrid der Oligonukleotide DZ019 und DZ020 über XhoI/SacII in pDB001 eingesetzt	Peptid 15+HA-Epitop	Induzierbare Prote- inexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz
pDB004	H240	codierende Sequenz für Peptid 15 als Hybridisierungsprodukt der Oligonukleotide DZ015 und DZ016 über XhoI/SacII in pDB001 eingesetzt	Peptid 15	Induzierbare Prote- inexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz

Bezeichnung	Nummer des Stammes	Konstruktion	Passagier	Eigenschaften
pDB005	H241	codierende Sequenz für Peptid 6 als Hybridisierungsprodukt aus den Oligonukleotiden DB005 und DB006 über XhoI/SacII in pDB001 eingesetzt	Peptid 6	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz
pDB006	H243	codierende Sequenz für Peptid 19 als Hybridisierungsprodukt der Oligonukleotide DB003 und DB004 über XhoI/SacII in pDB001 eingesetzt	Peptid 19	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz
pDB007	H242	Durch Site-Directed-Mutagenesis mit den Oligonukleotiden DB001 + DB002 wurde eine AgeI Schnittstelle im Linker von pJM942 erzeugt	CTB	wie pJM942, bis auf die zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker, Ampicillinresistenz
pDB008	H246	Hybridisierungsprodukt aus den Oligonukleotiden DB005 und DB006 über XhoI/SacII in pDB002 eingesetzt	Peptid 6	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz, zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker
pDB009 (pET-KDIFV K1)	H206	codierende Sequenz für Peptid 6 als Hybridisierungsprodukt aus den Oligonukleotiden DB005 und DB006 nach Verdau mit NdeI/KpnI über NdeI/KpnI in pET-Cyp13 eingesetzt	Peptid 6	Induzierbare Proteinexpression, langer Linker, Ampicillinresistenz
pDB010	H247	Hybridisierungsprodukt aus den Oligonukleotiden DB003 und DB004 über XhoI/SacII in pDB002 eingesetzt	Peptid 19	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, Ampicillinresistenz, zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker
pDB011	H276	für das Autotransportationsprotein codierende Sequenz aus pDB008 mit den Primern SH015+SH016 amplifiziert, mit NcoI/BclI geschnitten und in die 1. MCS von pAG005 über NcoI/BamHI eingesetzt	Peptid 6	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker, Kanamycinresistenz, zwei Multiple Cloning Sites

Bezeichnung	Nummer des Stammes	Konstruktion	Passagier	Eigenschaften
pDB012	H277	für das Autotransporter-fusionsprotein codierende Sequenz aus pDB010 mit den Primern SH015+SH016 amplifiziert, mit NcoI/BclI geschnitten und in die 1. MCS von pAG005 über NcoI/BamHI eingesetzt	Peptid 19	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker, Kanamycinresistenz, zwei Multiple Cloning Sites
pDB013	H332	für das Autotransporter-fusionsprotein codierende Sequenz aus pDB002 mit den Primern SH015+SH016 amplifiziert, mit NcoI und BclI geschnitten und in die 1. MCS von pAG005 über NcoI und BamHI eingesetzt	CTB	Induzierbare Proteinexpression, kurzer Linker aus pJM942, zusätzliche AgeI Schnittstelle im Linker, Kanamycinresistenz, zwei Multiple Cloning Sites
pKE19	H231	(Yoshio Nakano 1995)	nicht zutreffend	zu den verwendeten Autotransporter-plasmiden kompatibel, kodiert für eine Chloramphenicolresistenz und GFP
pDZ15HA	H185	(Zangen 2002)	P15 + Epitop HA	Linker auf die minimale für eine vollständige Lokalisation nach Außen notwendige Aminosäureanzahl verkürzt, Ampicillinresistenz
pJM942	H012	(Maurer <i>et al.</i> 1999)	CTB	Linker auf die minimale für eine vollständige Lokalisation nach Außen notwendige Aminosäureanzahl verkürzt, Ampicillinresistenz

3.2 METHODEN

3.2.1 ARBEITEN MIT BAKTERIEN

ANALYSE VON *E. COLI* IM DURCHFLUSSZYTOMETER

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden zu Beginn der Arbeiten in einem FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Die auf der Oberfläche

von *E. coli* mittels Autodisplay exprimierten Peptide wurden mit den in dieser Arbeit vorgestellten Markierungsverfahren mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grüne Fluoreszenz) markiert. Um die Unterscheidung in Bakterien und verunreinigende Partikel zu erleichtern, wurden die Bakterien zusätzlich mit dem Farbstoff RH414 markiert (rote Fluoreszenz). Die so behandelte Probe wurde dann im Zytometer vermessen und sortiert. Die Geräteparameter waren entsprechend der **Tabelle 9** eingestellt. Durch die Festlegung eines Schwellenwertes („threshold“) werden die von der Messung auszuschließenden Ereignisse definiert. Dieser Parameter wurde lediglich auf die rote Fluoreszenz gesetzt und auf einen Wert von 2000 eingestellt. Dies war notwendig, um Verunreinigungen, die das Ergebnis verfälscht hätten, nicht mit einzubeziehen. Mittels der Software Cellquest-Pro (Becton Dickinson, Heidelberg) wurden die Messdaten im Anschluss ausgewertet und dokumentiert.

Tabelle 9: Geräteeinstellungen am FACSCalibur™ / FACSSCAN™.

Parameter	Detektor	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E01	4,92	Log
P2	SSC	500	1,98	Log
P3	FL1	520	1,00	Log
P4	FL2	366	1,00	Log
P5	FL3	650	1,00	Log
P6	FL2-A	-	1,00	Lin

Im späteren Verlauf dieser Arbeit konnte auf ein Hochgeschwindigkeitszytometer der neuesten Generation, das FACSARIA™ zurückgegriffen werden. Die Geräteeinstellungen des FACSCalibur™ konnten nicht für Messungen mit dem neuen Zytometer benutzt werden. Die Bakterien wurden mittels der in dieser Arbeit vorgestellten Markierungsverfahren markiert und für die Messung auf eine optische Dichte von 0,2 mit PBS eingestellt. Die im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen, optimierten Geräteeinstellungen zur Analyse von *E. coli* im Durchfluszytometer sind in **Tabelle 10** dokumentiert.

Tabelle 10: Geräteeinstellungen für die Analyse von *E. coli* im FACSaria™.

Parameter Name	Bedeutung	Eingestellte Verstärkung	Modus
FSC	Größe des analysierten Partikels	40	log
SSC	Granularität des analysierten Partikels	308	log
FITC	grüne Fluoreszenz	535	log
APC	rote Fluoreszenz	680	log
Threshold	nur Messwerte, die oberhalb dieses Wertes liegen werden erfasst	700 FSC und 200 SSC	entfällt

AUSSORTIEREN EINZELNER VARIANTEN AUS EINER PEPTIDBIBLIOTHEK MITTELS FLUORESCENCE-ACTIVATED-CELL-SORTING (FACS) IM FACSARIA™

Zum Sortieren von auf der Oberfläche von *E. coli* exprimierter Bibliotheken wurden die Bakterien entsprechend des im Abschnitt „Markierung von *E. coli* mit humanem Cathepsin G“ beschriebenen Protokolls markiert. Zusätzlich zu dieser spezifischen Markierung erfolgte eine unspezifische Markierung aller *E. coli*, um eine sichere Unterscheidung in Bakterien und partikuläre Verunreinigungen zu erreichen. Im Anschluss an die Markierung erfolgten die Analyse der Bakterien im Durchflusszytometer und die Festlegung der Sortierkriterien. Zum Aussortieren der gewünschten Varianten wurden die in **Tabelle 11** aufgelisteten Einstellungen benutzt. Die Bakterien wurden sowohl in Flüssigmedien als auch auf Festmedien aussortiert.

Tabelle 11: Geräteeinstellungen für das Sortieren von *E. coli* im FACSaria™.

Parameter Name	Bedeutung	Eingestellte Verstärkung	Modus
FSC	Größe des analysierten Partikels	200	log
SSC	Granularität des analysierten Partikels	500	log
FITC	grüne Fluoreszenz	535	log
APC	rote Fluoreszenz	680	log
Threshold	nur Messwerte, die oberhalb dieses Wertes liegen werden erfasst	200 SSC	entfällt

BESTIMMUNG DER OPTISCHEN DICHTEN (OD_{578})

Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte verfolgt. Hierzu wurde während der ersten 3-4 h nach Beimpfen der Kultur stündlich, dann alle 10-30 min eine Probe aus dem Kulturkolben entnommen, mit dem verwendeten Flüssigmedium bzw. der Suspensionsgrundlage 1 : 10 verdünnt und die Absorption bei 578 nm gegen das reine Flüssigmedium gemessen. Die angegebenen Intervalle stellen Richtwerte dar und wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien individuell angepasst, um die gewünschte optische Dichte möglichst genau zu erreichen. Die abgelesene Absorption bei 578 nm entspricht nach der Berücksichtigung der Verdünnung der optischen Dichte (OD_{578}) der Bakteriensuspension.

KOMPETENTE ZELLEN

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Calciumchlorid Methode nach der Vorschrift aus Sambrook und Russel (2001) hergestellt.

Die Vorschrift zur Herstellung von Bakterienzellen zur Elektroporation aus Sambrook und Russel (2001) wurde wie folgt verändert. 25 ml LB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 200 Upm, 37 °C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden 500 ml YT-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben im Inkubator auf 37 °C vorgewärmt und anschließend mit der gesamten Übernachtskultur versetzt. Diese Hauptkultur wurde bis zu einer optischen Dichte (OD_{578}) von 0,35 inkubiert (37 °C, 250 Upm). Im Anschluss daran wurde die Hauptkultur auf vorgekühlte Zentrifugenbecher aufgeteilt und dann zwanzig Minuten auf Eis gestellt, wobei ein gelegentliches Schwenken für eine gleichmäßige Abkühlung der Bakteriensuspension sorgte. Die Bakterien wurden fünfzehn Minuten bei 1000 g, 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, jedes Sediment in 10 ml sterilem, eiskaltem Reinstwasser resuspendiert und mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 1000 g, 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Sediment in 10 ml steriler, eiskalter 10 %iger Glycerol-Lösung resuspendiert, mit eiskalter Glycerol-Lösung auf 100 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 1000 g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 10 ml steriler, eiskalter 10 %iger Glycerol-Lösung resuspendiert und zwanzig Minuten bei 1000 g, 4 °C in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend vorsichtig in 1 ml steriler, eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert. Die optische Dichte einer 1:100-Verdünnung der Bakteriensuspension wurde bei 578 nm gemessen und die unverdünnte Bakteriensuspension gegebenenfalls mit eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung auf $2-3 \times 10^{10}$ Zellen pro ml eingestellt. Die so vorbereitete Bakteriensuspension wurde in Aliquots zu je 50 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aufgeteilt, im Ethanol-Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

MARKIERUNG VON *E. COLI* MIT HUMANEM CATHEPSIN G (NACH ZANGEN)

20 ml LB-Medium wurden mit 200 µl einer Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes angeimpft und bis zu einer OD_{578} von zwei kultiviert. Es wurden genau so viele Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, dass sich nach Sedimentation und Resuspension in 1 ml PBS eine OD_{578} von eins einstellte. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde 10 min mit 1 ml PBS 3 % BSA geblockt, und das biotinylierte Enzym (20 µl Stammlösung/Endkonzentration 20 µg/ml) hinzugegeben. Auf eine 30 min Inkubation folgten drei Waschschrte mit je 1 ml PBS und Zugabe von 20 µl der Streptavidin-FITC Stammlösung. Wieder wurde 30 min inkubiert und drei

Mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Nun konnten die Zellen der durchflusszytometrischen Analyse unterzogen werden. Hierzu wurden sie in PBS zu einer OD₅₇₈ von 0,02 suspendiert (Zangen 2002; Jose und Zangen 2005).

MARKIERUNG VON *E. COLI* MIT HUMANEM CATHEPSIN G (NACH BETSCHEIDER)

Zur Markierung wurden 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterien beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 µl einer 1 mM IPTG-Lösung (Endkonzentration 20 µM) und anschließender Inkubation (1 h bei 28 °C) induziert. Von diesen Hauptkulturen wurde genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von 0,5 bezogen auf 1 ml lieferte. Die Sedimentation der Bakterien erfolgte bei allen Schritten der Markierung durch 10-sekündige Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge. Nach dreimaligem Waschen der Bakteriensuspensionen mit PBS 3 % BSA wurde die optische Dichte auf einen Wert von 0,2 mit 0,1 M HEPES-Puffer pH = 7,4 eingestellt. Dann wurden 196 µl dieser Suspensionen in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 4 µl der Enzymlösung (Endkonzentration 20 µg/ml) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien dreimal mit je 200 µl eiskaltem PBS gewaschen und anschließend wieder in 196 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurden dann im Falle der indirekten Markierung 4 µl Streptavidin-FITC-Konjugat hinzugegeben (Endkonzentration 20 µg/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Im Falle der direkten Markierung mit humanem Cathepsin G-FITC-Konjugat entfiel dieser Inkubationsschritt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 µl PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

MARKIERUNG VON *E. COLI* MIT NILE BLUE A

Der Farbstoff Nile Blue A wurde zur Färbung von Polyhydroxyalkansäuren im Zellinneren von Bakterien eingesetzt (Spiekermann *et al.* 1999). Dort wurden die Stämme *E. coli* JM109 und *E. coli* XL1-Blue als Negativkontrolle verwendet und zeigten dennoch eine schwache Fluoreszenz. Diese schwache Fluoreszenz war auch bei *E. coli* UT5600 (DE3) vorhanden (diese Arbeit) und konnte zur Färbung von *E. coli* zur Durchflusszytometrie ausgenutzt werden. Zur Markierung der Bakterien mit Nile Blue A wurden der Farbstoff in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml der Hauptkultur zugesetzt. Als Alternative hat sich ebenfalls der Zusatz von Nile Blue A in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml beim ersten Waschschrift mit PBS 3 % BSA und eine anschließende Inkubation der Bakterien für 10 min auf Eis während der spezifischen Markierung mit humanem Cathepsin G bewährt. Beide Verfahren eigneten sich zur

Markierung von *E. coli*-Zellen. Der Zusatz zur Hauptkultur führte zu etwas höheren mittleren Fluoreszenzen bei der Analyse der Zellen im Durchflussszytometer.

MARKIERUNG VON *E. COLI* MIT RH414

Der Farbstoff RH414 lagert sich reversibel in die äußere Membran von *E. coli* ein. Aufgrund seiner roten Fluoreszenz (Absorption bei 634 nm, Emission bei 718 nm) war es möglich, eine Doppelfärbung mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff durchzuführen. Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 10 µM erst unmittelbar vor dem Vermessen zugegeben, um eine Auswaschung während der Waschschrte zu verhindern.

STAMMHALTUNG

Zur Stammhaltung wurde eine Agarplatte mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterien dann mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens in ein 2 ml Reaktionsgefäß, das 1800 µl PPM-Medium enthielt überführt. Nach Resuspendieren der Zellen wurde die Bakteriensuspension auf zwei sterile mit Glaskugeln gefüllte Kryoröhrchen aufgeteilt und im Trockeneis / Ethanol Kältebad eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

ZELLANZUCHT

Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder in Flüssigkultur oder auf Festmedien. Zur Flüssigkultur wurden 20 ml LB-Medium ggf. mit Antibiotikum versetzt, mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C, 200 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Die eingesetzten Antibiotika und deren Konzentrationen sind in **Tabelle 12** aufgeführt. Am folgenden Tag wurde dann eine neue Kultur mit einem 200stel bis 1000stel der Übernachtskultur beimpft.

Tabelle 12: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration im Kulturmedium
Ampicillin	Amp	50 µg/ml oder 100 µg/ml
Chloramphenicol	Cm	34 µg/ml
Kanamycin	Kan	30 µg/ml

Zur Kultur der Bakterien auf Festmedien wurde eine Agarplatte mit einer Bakterienkolonie mittels einer Impföse beimpft und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN

AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Je nach der zu analysierenden Fragmentgröße kamen 0,8 %ige bis 1,5 %ige Agarosegele zum Einsatz. Entsprechend des gewünschten Agarosegehalts wurde die notwendige Menge an Agarose eingewogen und in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes wurde sichergestellt, dass die Agarose vollständig gelöst war. Die so hergestellte Agaroselösung konnte dann im Wärmeschrank bei 62 °C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden. Zum Gießen eines Gels wurde die Agarose auf die Gießtemperatur von ca. 40 °C abgekühlt und soviel davon in die Gießvorrichtung gegossen, dass die Gelstärke ca. ein 0,5 cm betrug.

Der Gelträger mit dem erstarrten Agarosegel wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Kammer eingesetzt. Die Proben wurden mit zehnfach konzentriertem Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Zusätzlich zu den Proben wurde stets mindestens eine Tasche mit einem DNA-Gemisch mit bekannten Fragmentgrößen als Bezugspunkt zur Fragmentgrößenbestimmung befüllt. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in Horizontalkammern der Firma Labnet bei einer konstanten Spannung von 8-12 V/cm, wobei sich die Laufstrecke nach den zu trennenden Fragmenten richtete. Nach Beendigung des Laufes wurde die DNA 20 Minuten in einer mit Ethidiumbromidfärbelösung gefüllten Wanne gefärbt.

BESTIMMUNG DER TRANSFORMATIONSEFFIZIENZ

Die Transformationseffizienz wurde wie von Sambrook und Russel (2001) beschrieben bestimmt.

AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN MITTELS ANIONENAUSTAUSCHER

Zur Aufreinigung von Nukleinsäuren wurden handelsübliche Anionenaustauschersäulen der Firma Qiagen und mitgelieferte Lösungen verwendet. Beim Aufreinigen der Nukleinsäuren wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

DIALYSE VON DNA-LÖSUNGEN

Die Dialyse von DNA-Lösungen erfolgte mithilfe von Filtermembranen der Firma Reinstwasser® gegen hochreines Wasser in einer Petrischale für 20 Minuten.

DNA-SEQUENZANALYSE

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach der Dideoxi-Methode Sanger *et al.* (1992) im Falle der Bibliotheken durch die Firma GATC und andernfalls durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität.

EXTRAKTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Banden nach der elektrophoretischen Trennung und der Färbung mit Ethidiumbromid mithilfe eines Skalpells auf dem Transilluminator unter UV-Licht ausgeschnitten. Die eigentliche Extraktion aus dem Agarosegel erfolgte durch handelsübliche Reagenziensätze nach dem mitgelieferten Standardprotokoll. Die Elution der DNA Fragmente aus der verwendeten Säule erfolgte, je nach gewünschter DNA-Konzentration, mit 8-30 µl Reinstwasser.

EXTRAKTION VON DNA AUS NICHT DENATURIERENDEN ACRYLAMIDGELEN

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Acrylamidgelen erfolgte nach der Methode aus Sambrook und Russel (2001).

FÄLLUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Fällung von Nukleinsäuren erfolgte aus einer Hochsalzlösung mit Hilfe von Alkoholen nach Sambrook und Russel (2001).

HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN

Sollten synthetische Oligonukleotide in Vektoren eingesetzt werden, wurden diese meist so synthetisiert, dass sie zueinander komplementär waren und nach Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Molekülen (Hybridisierung) zugleich schon über die, für die spätere Ligation notwendigen, zum Vektor kompatiblen Enden verfügten. Von den Oligonukleotiden wurde eine Stammlösung der Konzentration 100 µM in hochreinem Wasser hergestellt. Jeweils 10 µl der beiden Oligonukleotide wurden in einem 250 µl Reaktionsgefäß gemischt, 5 Minuten bei 95 °C im Thermocycler inkubiert und im Verlauf von 30 Minuten auf 4 °C abgekühlt. Von diesem Hybridisierungsansatz konnte nun die gewünschte Menge für die Ligation entnommen werden.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA-LÖSUNGEN

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Eine OD₂₆₀ von eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook und Russel 2001).

LIGATION

Um DNA Fragmente zu ligieren, wurde die T4 DNA-Ligase verwandt. In Gegenwart von ATP ist dieses Enzym in der Lage Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3' OH- und dem 5' Phosphatende doppelsträngiger DNA zu knüpfen. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes richtete sich nach den Vorgaben des Herstellers und enthielt einen dreifachen bis zehnfachen molaren Überschuss an DNA Fragmenten im Vergleich zum

Vektor. Die Reaktion wurde stets im Thermocycler über Nacht bei 4 °C und anschließender zehnmünütiger Inaktivierung der Ligase bei 65 °C durchgeführt.

NICHT DENATURIERENDE POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE

Die Herstellung von nicht denaturierenden Polyacrylamid Gelen und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook und Russel (2001).

SITE DIREKTED MUTAGENESIS

Zum Einbau einer neuen Restriktionsendonukleaseschnittstelle wurde eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt. Es wurden zwei Oligonukleotide konstruiert, die die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz trugen. Der Rest der Nukleotidsequenz war komplementär zum Vektor. Die Abfolge der einzelnen Schritte während der PCR war wie folgt. Zunächst erfolgte eine Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C. Die Hybridisierung der beiden Oligonukleotide erfolgte danach bei einer Temperatur von 68 °C für zwei Minuten. Im Anschluss daran wurde die komplette Vektorsequenz mithilfe einer DNA-Polymerase mit Proofreading Aktivität (Vent®, New England Biolabs)

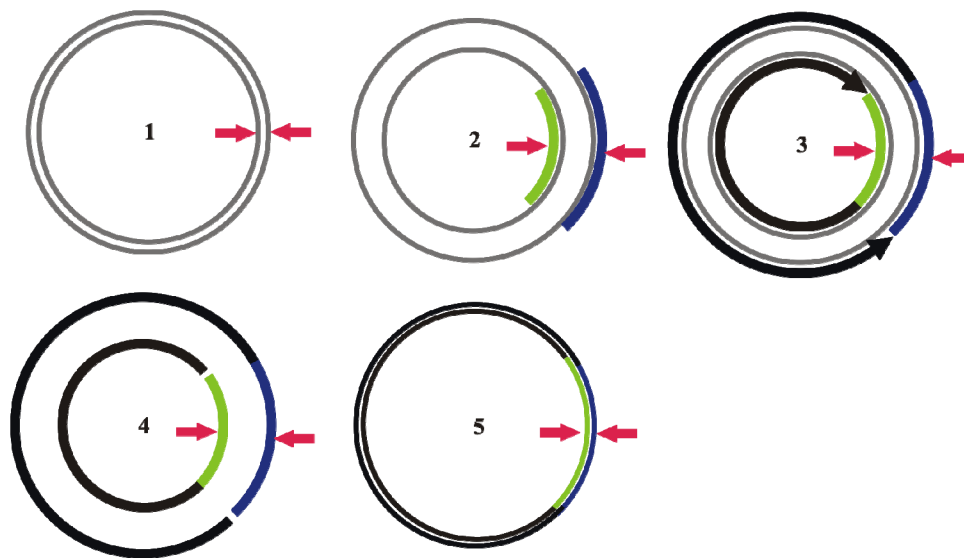


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer PCR-basierten ortsgerichteten Mutagenese. Ausgangspunkt für die ortsgerichtete Mutagenese war Plasmid-DNA. Der Bereich, der verändert werden sollte, ist durch Pfeile markiert (1). Es wurden zwei Oligonukleotidprimer konstruiert, die die gewünschte Mutation in der Mitte ihrer Sequenz trugen (2, Pfeile). Durch eine PCR mit den beiden Primern unter Verwendung einer Proofreading-DNA-Polymerase wurden, bis auf die gewünschte Mutation, exakte Kopien beider Stränge angefertigt (3). Die Matrizen-DNA wurde durch Verdau mit *DpnI* aus dem Reaktionsansatz entfernt (4). Nach der Transformation repariert *E. coli* die Einzelstrangbrüche (5).

während einer 5-minütigen Inkubation bei 75 °C amplifiziert. Diese Schrittfolge wurde 15-mal wiederholt. Im Anschluss an die PCR wurde der Reaktionsansatz mit 20 U des

Restriktionsenzym DpnI für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, um die DNA-Matrize zu degradieren. Die Restriktionsendonuklease DpnI schneidet nur methylierte, also durch die Bakterien synthetisierte DNA-Moleküle und dient zur Verminderung der Anzahl von Transformanten, die das Ausgangsplasmid tragen. Jeweils 2 µl, 5 µl, und 10 µl dieses Ansatzes wurden in je ein Aliquot elektrokompente Zellen durch Elektroporation transformiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die zielgerichtete Mutagenese ist in **Tabelle 13** und die dazu verwendeten Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die zielgerichtete Mutagenese.

Menge	Zusatz
1 µl	Vent® DNA Polymerase
1 µl	DNA-Matrize (50 ng/µl)
2 µl	10 mM dNTP-Mix
2 µl	10 µM DB001
2 µl	10 µM DB002
2 µl	10-fachVent®-Reaktionspuffer
10 µl	Reinstwasser

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für die PCR zur zielgerichteten Mutagenese.

Dauer	Temperatur	Zweck
5 min	95 °C	Initiale Denaturierung
1 min	95 °C	Denaturierung
2 min	61 °C	„Annealing“
5 min	68 °C	Amplifikation

PLASMIDISOLIERUNG NACH BIRNBOIM UND DOLY

Für Standardanwendungen wie die Kontrolle von Klonen, dem Restriktionsendonukleaseverdau oder für Polymerasekettenreaktionen wurde auf den Einsatz von fertigen Kits verzichtet und die Plasmid-DNA nach Birnboim und Doly (1979) isoliert. Hierzu wurde am Vorabend eine Agarplatte mit dem Plasmid tragenden Bakterienstamm beimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am folgenden Tag wurden die Bakterien mit einer Impföse von der Agarplatte abgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml TE-Puffer überführt. Die Bakterien wurden durch einminütige Zentrifugation bei 4000 g in der Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 250 µl Lö-

sung 1 (50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) vollständig resuspendiert. Zu der Bakteriensuspension wurden 300 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, durch mehrmaliges Kippen gemischt und ein bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 300 µl Lösung 3 (2,55 M Kaliumacetat (pH 4,8)) wurde erneut vorsichtig durch Kippen des Reaktionsgefäßes gemischt und acht Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und anschließend 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment einmal mit Isopropanol und einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, wobei jeweils zehn Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden verworfen, das Sediment nach Trocknen im Exsikkator in 50 µl Reinstwasser aufgenommen und zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

PLASMIDISOLIERUNG MITTELS ANIONENAUSTAUSCH

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in hochreiner Form wurden Anionenaustauschersäulchen als Bestandteil von fertigen Reagenziensätzen („Kits“) der Firma Qiagen eingesetzt. Die Plasmidisolierung wurde entsprechend der mitgelieferten Arbeitsanweisung durchgeführt, die aufgereinigte Plasmid-DNA mit 50- bis 100 µl Reinstwasser eluiert und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.* 1988) ermöglicht es mittels zweier Oligonukleotide und der Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase einen genau definierten Bereich eines DNA-Moleküls zu amplifizieren. Dieses Verfahren kam bei der Erstellung der Bibliotheken und der verwendeten Plasmide zum Einsatz. Die Produkte der DNA-Amplifikation wurden stets mithilfe einer Gelelektrophorese auf ihre korrekte Größe hin überprüft.

RESTRIKTIONSENDONUKLEASEVERDAU

Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen zum Restriktionsendonukleaseverdau wurde entsprechend der Vorgaben der Hersteller gewählt. Die Inkubation erfolgte bei der vom Hersteller geforderten Temperatur im Thermoblock, in der Regel für 2 Stunden, in besonderen Fällen über Nacht. Alternativ zu der Inkubation im Thermoblock war es für einige Restriktionsendonukleasen (**Tabelle 15**) möglich, eine stark verkürzte Inkubation in der Mikrowelle durchzuführen und so eine enorme Zeitersparnis zu erreichen. Sollte die DNA mit mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut werden, so wurde ein Parallelverdau durchgeführt. Nur in Ausnahmefällen oder wenn die DNA mit mehr als 2 Enzymen verdaut werden sollte, wurde ein sequenzieller Verdau durchge-

führt. Hierbei wurde die DNA nach Verdau aus dem Verdauansatz mit Hilfe eines „Kits“ der Firma Qiagen aufgereinigt. Diese Prozedur aus Verdau und Reinigung wurde entsprechend oft wiederholt. Im Anschluss an den Verdau wurde die DNA stets mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese oder einer Aufreinigung mit kommerziell erhältlichen Reagenziensätzen („Kits“) aufgereinigt.

Tabelle 15: Für den Verdau in der Mikrowelle geeignete Restriktionsenzyme und Reaktionsparameter.

Restriktionsenzym	Dauer und Leistungsstufe
BamHI	2 Umdrehungen (Med. High), 30 s
BglII	3 Umdrehungen (Med. High), 45 s
BshTI	3 Umdrehungen (Med. High), 45 s
EcoRI	2 Umdrehungen (Med. High), 30 s
KpnI	3 Umdrehungen (Med. High), 45 s
NcoI	2 Umdrehungen (Med. High), 30 s
NdeI	3 Umdrehungen (Med. High), 45 s
SacII	2 Umdrehungen (Med. High), 30 s
XhoI	2 Umdrehungen (Med. High), 30 s

TRANSFORMATION

Im Verlauf dieser Arbeit kamen zwei Methoden zur Transformation zur Anwendung. Für die Transformation von Bibliotheken kam die Elektroporation zum Einsatz, für alle anderen Transformationen meistens die sogenannte Calciumchlorid Methode (Sambrook und Russel 2001). Unabhängig von der verwendeten Methode wurden im Anschluss an die Transformation Volumina von 10 µl bis 200 µl auf Selektivagarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C bebrütet und die Transformationseffizienz bestimmt.

3.2.3 ARBEITEN MIT PROTEINEN

FÄRBUNG DER PROTEINE IM SDS-GEL

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im SDS Gel durch Inkubation in der Coomassie Lösung für zwei Stunden oder über Nacht angefärbt. Danach wurden die Gele so lange mit Entfärbelösung gewaschen, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren. Im Anschluss wurden die Gele mit Reinstwasser gewaschen und mithilfe der Videodokumentation oder eines Flachbettscanners dokumentiert.

KONJUGATION VON ENZYMEN MIT BIOTIN

Die Konjugation von Cathepsin G wurde mithilfe eines Reagenziensatzes der Firma Roche durchgeführt. Dieser benutzt einen D-Biotinoyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Biotin-7-NHS) als Markierungsreagenz. Der Biotin-7-NHS reagiert mit freien Aminogruppen des zu markierenden Proteins und bildet eine Amidbindung aus. Die Markierung wurde in 2 ml Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurde 1 mg Protein mit einem dreißigfachen molaren Überschuss an Markierungsreagenz in einem möglichst kleinen Volumen PBS (Gesamtvolumen des Markierungsansatzes 0,2 – 1 ml) bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren für zwei Stunden zur Reaktion gebracht. Nach der Inkubation erfolgte die Aufreinigung des Proteins durch Gelfiltration durch die im Kit enthaltenen Filtrationssäulen und anschließende Konzentrierung des Proteins. Als Alternative zur Verwendung der Gelfiltrationssäulen war auch eine Reinigung mithilfe der Größenausschlussmembranen der Firma Vivaspin möglich. Hierzu wurde der Markierungsansatz in ein Vivaspin-Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem fünffachen Volumen an PBS in Waschschritten durch Zentrifugation gereinigt. Nach Zugabe der Waschlösung (PBS) wurde das Protein vorsichtig durch sanftes auf und ab pipettieren von der Membran gespült. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch (s.u.) und die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml eingestellt. Zur Bestimmung des molaren Verhältnisses von humanem Cathepsin G und Biotin wurde eine fertige Reagenzmischung (HABA/Avidin Reagenz, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte nach der Produktdokumentation BK200 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

KONJUGATION VON ENZYMEN MIT FLUORESZEINISOTHIOCYANAT (FITC)

Die Konjugation von Cathepsin G mit Fluoreszeinisothiocyanat wurde analog zur Markierung mit Biotin unter Verwendung von Fluoresceinisothiocyanat-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Biotin-7-NHS) als Markierungsreagenz ebenfalls mit einem Kit der Firma Roche durchgeführt. Der Erfolg der Kopplungsreaktion lässt sich photometrisch ermitteln. Dazu wurden die Absorptionen bei 280 nm und 495 nm gemessen und mit Hilfe der unten stehenden **Formel 1** das molare Verhältnis

$$\frac{F}{P} = \frac{3,053 \cdot Abs(495 \text{ nm})}{Abs(280 \text{ nm}) - 0,255 \cdot Abs(495 \text{ nm})}$$

F:Farbstoff
P:Protein

Formel 1: Formel zur Berechnung des molaren Verhältnisses von Fluoreszenzfarbstoff zu Protein.

zwischen Protein und FITC errechnet.

KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte photometrisch nach Sambrook und Russel (2001).

KONZENTRIERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN

Die Konzentrierung von Proteinlösungen wurde mithilfe von im Handel erhältlichen Größenausschlussmembranen in Form von Zentrifugenröhrchen durch eine Reduktion des Lösemittelvolumens durchgeführt. Hierbei wurden Säulen der Firma Vivaspin® mit einer Ausschlussgrenze von 20.000 Da mit der zu konzentrierenden Proteinlösung befüllt und nach Angabe des Herstellers in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Dabei wurde der Fortschritt von Zeit zu Zeit durch Ablesen des noch vorhandenen Volumens mithilfe der Volumenskala der Zentrifugenröhrchen kontrolliert und bei Erreichen der gewünschten Volumenreduktion wurde die Filtermembran sorgfältig mit dem verbliebenen Volumen von Puffer gespült und in ein neues Gefäß überführt. Die endgültige Bestimmung der Proteinkonzentration wurde photometrisch durchgeführt.

ISOLIERUNG DER AUßENMEMBRAN VON *E. COLI*

Zur Isolierung der Außenmembranen wurde das Protokoll von Hantke (1981) leicht modifiziert. Die Bakterienkulturen wurden wie im **Abschnitt 3.2.1** beschrieben vorbereitet.

- Sediment in 0,5 ml Tris/HCL, 0,2 M, pH 8 resuspendieren und folgende Lösungen nacheinander zugeben:
 - 1 ml Tris-HCl, 0,2 M, pH 8
 - 0,1 ml 1 M Saccharose
 - 0,1 ml 10 mM EDTA-Lösung
 - 0,1 ml Lysozym-Lösung (10 mg/ml, immer frisch herstellen!)
- alle Proben 10 min. bei RT stehen lassen bis sich Sphäroblasten gebildet haben
- 50 µl einer 100 mM PMFS-Lsg. (in Isopropanol) zugeben, Endkonzentration: 0,5 mM
- 10 µl Aprotininlösung (10 mM HEPES, pH=8,0) zugeben, Endkonzentration: 1 µg/ml + 5 ml Extraktionspuffer (2 % Triton X 100, 50 mM Tris/HCL/ 10 mM MgCl₂)
- 100 µl DNase (1 mg/ml) zugeben
- schütteln, 20-30 min auf Eis stehen lassen bis die Lösung nicht mehr viskos ist

- abzentrifugieren, 5 min, 4500 Upm, Sediment verwerfen
- Überstand zentrifugieren, 10 min, 18000 Upm Überstand verwerfen, Sediment mit 10 ml PBS + 1 % n-Lauryl-Sarcosyl waschen (nicht resuspendieren!)
- zentrifugieren, 10 min, 18 000 Upm
- Überstand verwerfen, Sediment in 10 ml Reinstwasser resuspendieren und in 1 ml Reaktionsgefäß überführen
- zentrifugieren, 10 min, 15000 g, Überstand verwerfen
- Sediment in wenig (20-100 µl, gleiches Volumen wie Sediment) Reinstwasser resuspendieren und 1,5fache Menge 2x Sample-Buffer (SDS-Gel-Kit) zugeben
- 5 min bei 95 °C aufkochen, ca. 2-5 µl auf SDS-Gel auftragen oder im Kühlschrank lagern und vor Gebrauch erneut aufkochen

SDS-POLYACRYLAMIDELEKTROPHORESE

Die Analyse der Außenmembranenisolate erfolgte mittels SDS-PAGE. Dabei kamen je nach Größe der erwarteten Membranproteine 8- bis 20-prozentige Acrylamidgele zum Einsatz. Die Zusammensetzung der jeweiligen Gele wurde aus Sambrook und Russel (2001) entnommen. Die Verwendung eines Sammelgels bewirkte eine Aufkonzentrierung der Proteine und führte zu schärferen Banden. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und 15 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Trennung der Proteine erfolgt, je nach verwendeter Gelstärke, üblicherweise bei einer konstanten Spannung von 8-10 V/cm.

WESTERN-BLOT

Mithilfe einer Gleichspannung ließen sich die Proteine nach der Auftrennung zur weiteren Analyse auf eine Polyvinylidendifluorid Membran (PVDF-Membran) übertragen. Zu diesem Zweck kam eine Wet-Blotting-Apparatur der Firma BioRad zum Einsatz. Um ein Überhitzen der Apparatur zu vermeiden, wurde zum Blotten stets 4 °C kalter Transferpuffer benutzt. Zusätzlich wurde die Apparatur mit einem Kühlakku bestückt und komplett in ein Eisbad gestellt. Das Blotten erfolgte stets bei einer konstanten Spannung von 100 V über eine Stunde. Im Anschluss daran wurde die Membran in TBS/3% BSA über Nacht inkubiert.

VISUALISIERUNG DER BANDEN DES WESTERN-BLOT

Die Detektion der auf der PVDF-Membran adsorbierten Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen das zu detektierende Protein. Meist kam eine zweistufige Reaktion zum Einsatz. In der ersten Stufe wurde die Membran mit dem für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) für eine Stunde zur

Reaktion gebracht. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal mit TBS/0,1% Tween 20 gewaschen. In der zweiten Stufe wurde ein Antikörper verwendet (sekundärer Antikörper), der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS 0,1% Tween 20 wurde das Substrat für die Alkalische Phosphatase zugesetzt und solange inkubiert, bis die Banden die gewünschte Farbintensität erreicht hatten. Zur Dokumentation wurden die Westernblots mithilfe eines Flachbettscanners digitalisiert.

4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

4.1 AUTODISPLAY VON PEPTIDBIBLIOTHEKEN AUF *E. COLI* UNTER DER KONTROLLE EINES KONSTITUTIVEN PROMOTORS

Für die konstitutive Oberflächenexpression der Peptidbibliotheken wurde das Plasmid pJM942 als Vektor eingesetzt. Dieses Plasmid wurde bereits erfolgreich zur Expression von rekombinanten Peptiden mittels Autodisplay benutzt (Zangen 2002; Jose *et al.* 2005). Ein weiteres Auswahlkriterium war, dass die Linkerregion in pJM942 auf die für die erfolgreiche Translokation an die Zelloberfläche minimale Länge verkürzt worden war (Maurer *et al.* 1999). Beim späteren Screening der Bibliotheken sollten möglichst nur Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und dem Targetenzym zum Tragen kommen, nicht aber Wechselwirkungen von humanem Cathepsin G mit Teilen des Expressionssystems. Die für die CTB Untereinheit codierende DNA-Sequenz (306 bp) wurde in einem Schritt durch die Restriktionsendonukleasen SacII und XhoI ausgeschnitten und der Vektor (4032 bp) durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Als Passagier sollte nun ein für eine Peptidbibliothek codierendes DNA-Fragment in den Vektor eingesetzt werden. Die dafür notwendige Randomisierung erfolgte bereits bei der Synthese der Oligonukleotide, die unter Bedingungen stattfand, die den Einbau aller vier Nukleotide in gleichem Maße wahrscheinlich machten. Ausgehend von Peptid 15, für das bereits eine inhibitorische Wirkung auf humanes Cathepsin G beschrieben wurde (Yavin und Fridkin 1998), wurden zunächst zwei Oligonukleotide synthetisiert. Das DNA-Fragment wurde durch Hybridisierung der beiden Oligonukleotide generiert (**Abbildung 6**). Jedes Oligonukleotid verfügte an den Enden über einen konstanten Bereich und in der Mitte über 21 randomisierte Nukleotide. Nach Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Molekülen verfügte das doppelsträngige Produkt über eine variable Sequenz in der Mitte und den für die Ligation notwendigen, zum Vektor kompatiblen Enden. Zur Ligation wurden 500 ng geschnittener Vektor und ein 10-facher molarer Überschuss der für die Bibliothek codierenden DNA eingesetzt. Die Ligation mit dem geschnittenen Vektor lieferte die für die Bibliothek codierenden Plasmide. Diese wurden durch Elektroporation in *E. coli* UT5600 (DE3) transformiert. Um die Transformationseffizienz bzw. den Umfang der Peptidbibliothek zu bestimmen, wurde mit 200 µl des Transformationsansatzes eine serielle Verdünnungsreihe (1:10, 1:10², 1:10³, bis 1:10⁶) in SOC-Medium hergestellt und von jeder Verdünnungsstufe 100 µl auf Selektivagarplatten ausplattiert. Die verbleibenden 800 µl des Transformationsansatzes wurden mit Glycerin versetzt, so dass die Glycerinendkonzentration 20 % betrug und bei -20 °C zur späteren Verwendung gelagert. Nach Inkubation bei 37 °C

über Nacht wurden am Folgetag die Kolonien auf den einzelnen Platten ausgezählt und auf diesem Wege die Zahl von $1,15 \times 10^5$ teilungsfähigen Zellen in der Bibliothek ermittelt. Die Zahl der möglichen Sequenzen bei sieben variablen Aminosäuren beträgt 20^7 , also $1,28 \times 10^9$. Die Wahrscheinlichkeit, dass in der entstandenen Bibliothek Sequenzen doppelt enthalten sind, ist demnach mit 1 zu $1,11 \times 10^4$ sehr gering. Aufgrund dieser Tatsache kann von der Zahl der lebensfähigen Zellen direkt auf die Anzahl von Peptidvarianten in der Bibliothek geschlossen werden. Die Bibliothek enthielt demnach lediglich einen Bruchteil der möglichen Sequenzen.

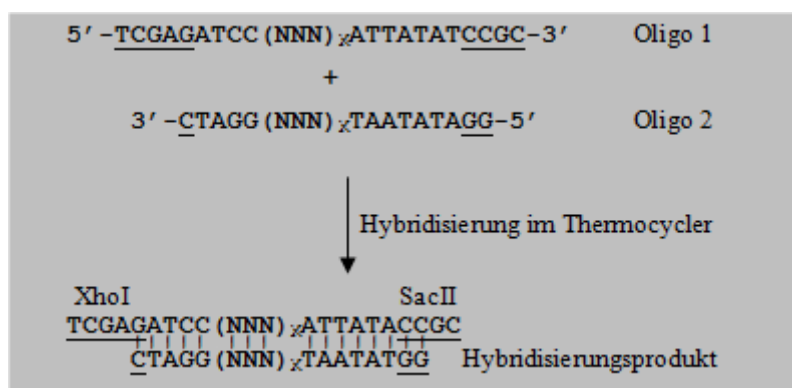


Abbildung 6: Strategie I zur Erstellung einer Peptidbibliothek. Nach erfolgter Hybridisierung bilden die Oligonukleotide ein doppelsträngiges DNA-Fragment, welches über die für die Ligation in den Vektor notwendigen Enden (unterstrichen) verfügt. Der Buchstabe x steht für die Anzahl der randomisierten Basentriplets. Bei der beschriebenen Bibliothek war $x = 7$.

4.1.1 MARKIERUNG VON HUMANEM CATHEPSIN G

Ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist die Markierung oberflächenexprimierter Peptide mit dem Targetenzym humanes Cathepsin G. Zur späteren Detektion des gebundenen Enzyms musste dieses mit einem Fluoreszenzlabel versehen werden. Dies erfolgte entweder durch direkte Konjugation des Enzyms mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC), oder mit Biotin. Im Falle der Konjugation mit Biotin erfolgt die Fluoreszenzmarkierung des Enzyms durch Ausnutzung der Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin, also in zwei Schritten (indirekte Markierung). Die Biotinylierung des Targetenzym erlaubt den Einsatz einer breiten Vielfalt an Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten. Für beide Markierungen wurde ein Kit der Firma Roche eingesetzt. Zur Markierung wurde 1 mg Enzym, gelöst in 200 μ l PBS pH = 7,4 in einem konisch zulaufenden Reaktionsgefäß aus Glas mit dem 40-fachen molaren Überschuss an Markierungsreagenz zwei Stunden unter leichtem Rühren bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige Markierungsreagenz wurde durch eine Sephadex-G25 Säule entfernt. Wie in der Produktdokumentation beschrieben, wurde das Eluat in fünf Fraktionen zu jeweils 0,5 ml in separate Reaktionsgefäße aufgefangen. Der Erfolg

der direkten Fluoreszenzmarkierung ließ sich durch photometrische Messungen überprüfen und das molare Verhältnis zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Protein berechnen (**Formel 1**). Im Falle der Biotinylierung von humanem Cathepsin G wurde der Erfolg der Kopplungsreaktion mittels Gelelektrophorese überprüft. Von jeder Fraktion wurden jeweils 5 µl auf zwei SDS-Gele zur Gelelektrophorese aufgetragen. Eines der Gele wurde mit Coomassie gefärbt, mit dem anderen wurde ein Western-Blot durchgeführt (**Abbildung 7**). Nach dem Blotten wurden die Proteinbanden durch Inkubation mit Streptavidin-Alkalische-Phosphatase und deren Substrat sichtbar gemacht. Im Anschluss an die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie kam es zu einer Volumenvergrößerung (etwa Faktor 2,5). Zur Aufkonzentrierung der Enzymlösung wurden nach dem Größenausschlussprinzip arbeitende Zentrifugenröhrchen (Vivaspin®) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa benutzt. Durch Zentrifugation in diesen Zentrifugenröhrchen war es nun einfach möglich, die gewünschte Proteinkonzentration einzustellen. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm im UV-Spektrometer bestimmt und mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt. Die Aufreinigung des Markierungsansatzes durch eine Gelfiltration wurde für beide Kopplungsvarianten nur jeweils einmal durchgeführt. Bei allen weiteren Kopplungsreaktionen wurde das überschüssige Markierungsreagenz durch fünffaches Waschen mit je 200 µl PBS (entsprechend dem Volumen des Markierungsansatzes) und anschließende Zentrifugation in den Vivaspin®-Zentrifugenröhrchen entfernt. Der Austausch der Aufreinigungsmethode zeigte bei keinem der Folgeexperimente einen Nachteil (nicht gezeigt), so dass die Markierungsprozedur in diesem Punkt vereinfacht werden konnte.

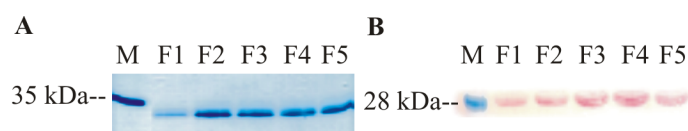


Abbildung 7: Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung von humanem Cathepsin G. Die gesammelten Fraktionen der Biotinylierungsreaktion wurden einer SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie unterzogen (A). Von einer zweiten SDS-PAGE wurde ein Western-Blot angefertigt und die Biotinylierung des Enzyms durch die spezifische Kopplung an Streptavidin-Alkalische-Phosphatase durch Zusatz des Phosphatasesubstrats sichtbar gemacht (B).

In Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Kopplungsreaktionen von humanem Cathepsin G mit FITC durchgeführt. Das molare Verhältnis von humanem Cathepsin G zu FITC betrug dabei 1 : 3,2 beziehungsweise 1 : 3,8. Das molare Verhältnis zwischen humanem Cathepsin G und Biotin wurde mithilfe einer fertigen Reagenzmischung, wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Kopplungsreaktionen mit Biotin durchgeführt. Die dabei ermittelten Verhältnisse von Protein zu Biotin lagen zwischen 1 zu 2,3 und 1 zu 3,4. Beide Kopplungsvarianten verliefen

erfolgreich. Die Entscheidung für eine der beiden Varianten konnte also von den jeweiligen Erfordernissen abhängig gemacht werden.

4.1.2 ZWEISCHRITTVERFAHREN ZUR TARGET-ABHÄNGIGEN SPEZIFISCHEN FLUORESZENZMARKIERUNG OBERFLÄCHENEXPRIMIERTER PEPTIDE

Basierend auf den beiden durchgeführten Markierungsarten von humanem Cathepsin G ergaben sich auch zwei Methoden zur Markierung oberflächenexprimierter Peptide. Bei der indirekten Markierung (**Abbildung 8**) kam biotinyliertes humanes Cathepsin G zum Einsatz. Zunächst wurden die peptidtragenden Bakterien mit biotinyliertem humanen Cathepsin G inkubiert. Die Markierungsmethode nutzt zur Markierung peptidtragender Bakterienzellen die Affinität einzelner Peptidvarianten zum Targetenzym aus. Es bildet sich ein Bakterienzelle-Peptid-Enzym-Komplex aus (**Abbildung 8 B**). Durch das Waschen wird das nicht gebundene Cathepsin G entfernt. Wird nun ein Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat zugesetzt, so wird die spezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zur Fluoreszenzmarkierung des humanen Cathepsin G ausgenutzt (**Abbildung 8 C**). Das überschüssige Streptavidin-Farbstoff-Konjugat wird durch Waschen entfernt. Danach sind lediglich die Bakterienzellen fluoreszenzmarkiert, die auf ihrer Oberfläche einen Bindungspartner für humanes Cathepsin G exprimieren (**Abbildung 8 D**).

Aus früheren Arbeiten (Zangen 2002) stand bereits ein Expressionsplasmid zur Verfügung, mit dessen Hilfe ein Fusionspeptid aus Peptid 15 und einem HA-Epitop auf der Oberfläche von *E. coli* konstitutiv exprimiert werden konnte. Dieses Plasmid sollte für die ersten Experimente benutzt werden. Zur Markierung wurden jeweils 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur der zu markierenden Zellen beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Von diesen Hauptkulturen wurde jeweils genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von 1,2 bezogen auf 1 ml lieferte. Die peptidtragenden Bakterien (UT5600 (DE3) pDZ15HA) und die Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) wurden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS 3 % BSA gewaschen und auf eine optische Dichte von eins eingestellt. 980 µl dieser Bakteriensuspension wurden mit 20 µl humanem Cathepsin G (Endkonzentration von 20 µg/ml) 30 min auf Eis inkubiert und erneut dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und wieder in 980 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde mit 20 µl Streptavidin-FITC Konjugat (Endkonzentration von 20 µg/ml) versetzt und die Suspension ebenfalls wieder 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 1 ml PBS wurden die Bakterien auf eine optische Dichte von 0,2 verdünnt und im Durchflusszytometer analysiert.

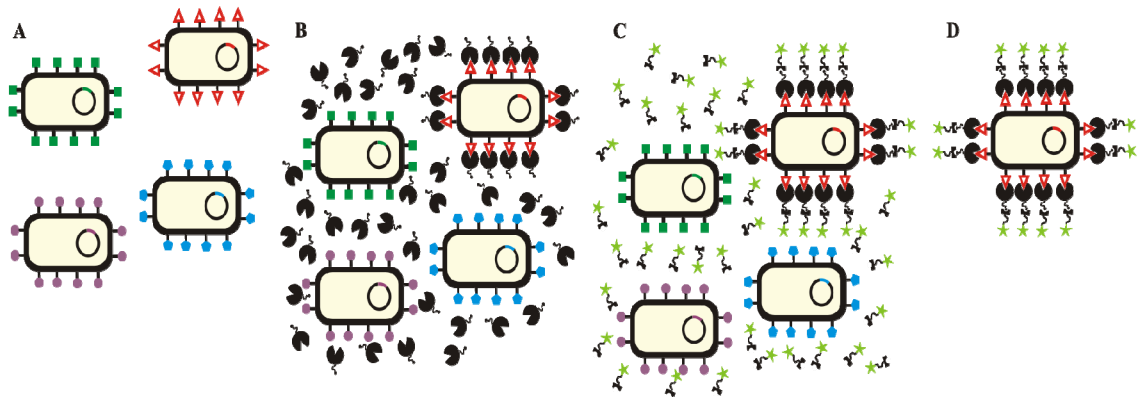


Abbildung 8: Target-abhängige spezifische Fluoreszenzmarkierung oberflächenexprimierter Peptide mithilfe von biotinyliertem humanen Cathepsin G (Zweischrittverfahren). Die peptidtragenden Bakterienzellen (A) wurden mit biotinyliertem humanen Cathepsin G inkubiert (B). Nach dem Waschen bleiben nur die spezifisch gebundenen Cathepsin G Moleküle zurück und können mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Streptavidin markiert werden (C). Die peptidtragende Bakterienzelle ist somit fluoreszenzmarkiert (D) und kann mithilfe dieses Labels von nicht markierten Zellen unterschieden werden.

Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von 30000 Bakterienzellen ist in **Abbildung 9** dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (UT5600 (DE3)),

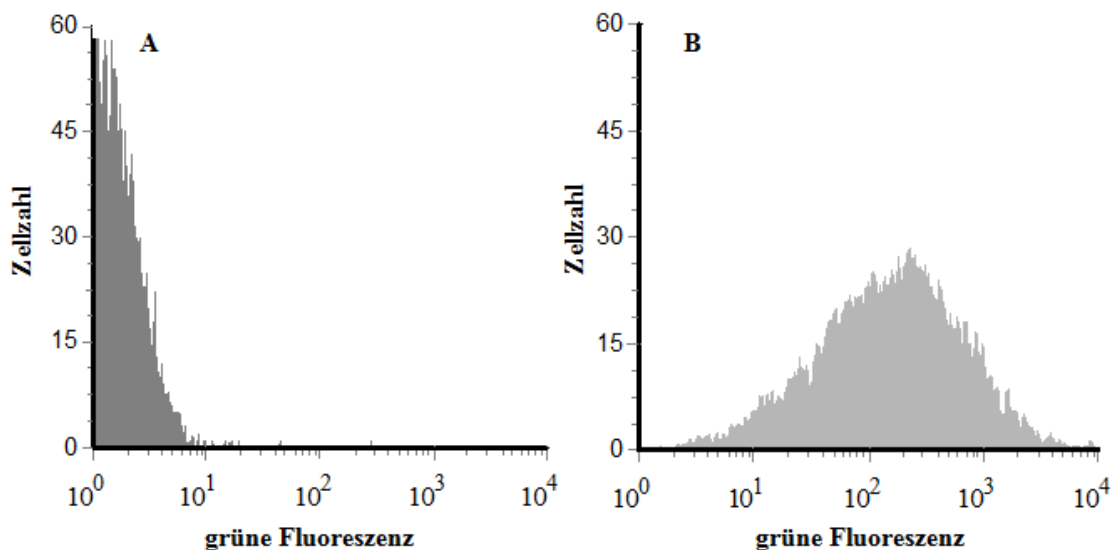


Abbildung 9: Spezifische Markierung Peptid 15HA-tragender *E. coli*. Das auf der Oberfläche der Bakterienzellen vorhandene Peptid wurde mittels des Zweischrittverfahrens fluoreszenzmarkiert. A: Kontrolle (UT5600 (DE3)); B: Autodisplay eines Autotransporterfusionsproteins aus Peptid 15 und einem HA-Epitop (UT5600 (DE3) pDZ15HA).

Abbildung 9 A) wiesen die Bakterienzellen, die ein Fusionspeptid aus Peptid 15 und einem HA-Epitop auf ihrer Oberfläche trugen (UT5600 (DE3) pDZ15HA, **Abbildung 9 B)** einen um den Faktor 108 höheren Mittelwert der grünen Fluoreszenz

auf. Somit war gezeigt, dass die verwendete Markierungsmethode eine spezifische Markierung oberflächenexprimierter Peptide ermöglicht.

4.1.3 SCREENING DER PEPTIDBIBLIOTHEK MIT HILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Mit der Durchflusszytometrie stand ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung sehr großer Bakterienpopulationen und zur Selektion einzelner Zellen zur Verfügung. 1 ml LB-Medium wurde mit 20 µl des Transformationsansatzes angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Diese nicht optimalen Wachstumsbedingungen für *E. coli* wurden gewählt, um die Teilungsrate von *E. coli* herabzusetzen. Auf diesem Weg sollte verhindert werden, dass durch Zellteilung zu viele Kopien der gleichen Peptidvariante entstehen. Zur Selektion einzelner Varianten wurden die Bakterien mithilfe eines Zweischrittverfahrens über das Targetenzym mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Jose *et al.* 2005). Im ersten Schritt wurden die Bakterien nach dreimaligem Waschen mit je einem Milliliter eiskaltem PBS mit biotinyliertem humanen Cathepsin G für 30 min auf Eis inkubiert. Die natürliche Affinität des Enzyms zu einem Inhibitor sorgte dafür, dass das Enzym nur an bestimmte Bakterienzellen, nämlich an die *E. coli*-Zellen bindet, die einen geeigneten Bindungspartner (Peptid) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je einem Milliliter eiskaltem PBS konnten die Bakterien mit Streptavidin-FITC markiert werden. Zusätzlich zur Markierung mit dem Selektionsmarker (humanes Cathepsin G) wurden die Bakterienzellen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff RH414, der sich in die äußere Membran von *E. coli* reversibel einlagert, markiert (**Abbildung 10**). Die Markierung mit diesem zweiten Farbstoff erleichtert die Abgrenzung der Bakterienzellen zu verunreinigenden Partikeln aus den verwendeten Lösungen. Die Doppelfärbung erlaubte die eindeutige Diskriminierung der verunreinigenden Partikel von den Bakterien (rote Fluoreszenz) und eine Unterscheidung in humanes Cathepsin G bindende und in nicht bindende Bakterien (grüne Fluoreszenz). Zur Festlegung der Sortierkriterien wurden zunächst Kontrollzellen im Durchflusszytometer analysiert. Aus den vorangegangenen Experimenten mit Kontrollzellen ließ sich ableiten, dass die zu sortierenden Bakterienzellen eine rote Fluoreszenz und eine grüne Fluoreszenz von mindestens 200 haben sollten (**Abbildung 10**). Es wurde eine Region (R1) definiert, welche die Bakterien mit der höchsten grünen Fluoreszenz enthielt, was etwa 3 % der gesamten Bakterienpopulation entsprach (**Abbildung 11**). Es wurden 1000 Bakterien in ein mit 25 ml vorgewärmtem 2xLB-Medium gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß aussortiert. Durch den Sortiervorgang verdoppelte sich das Volumen nahezu. Zur Volumenreduktion wurden die Bakterien aus der Bakteriensuspension 20 min bei 4 °C und 4000 g sedimentiert und sorgfältig in 500 µl

LB-Medium resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde vollständig auf zwei Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bebrütet. Am folgenden Tag fanden sich 132 Einzelkolonien auf den Platten. Die Zahl der überlebensfähigen Zellen entsprach nicht der erwarteten Zellzahl (132 wieder angewachsene Zellen im Vergleich zu 1000 erwarteten). Es war davon auszugehen, dass bei einer Überlebensrate von 13,2 %

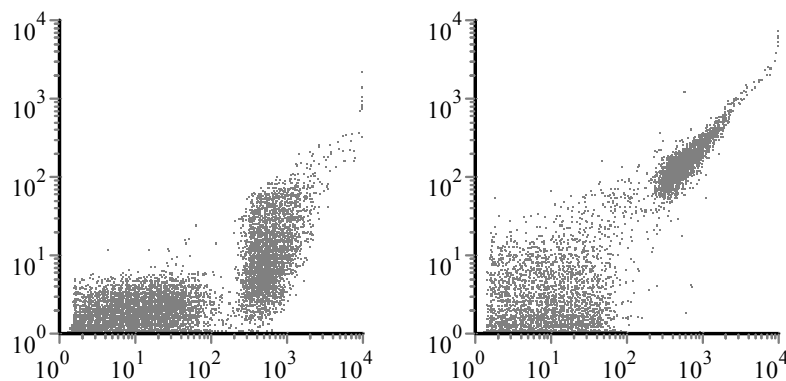


Abbildung 10: Kombination der Kontrollmarkierung von *E. coli* mit dem Fluoreszenzfarbstoff RH414 und der spezifischen Markierung oberflächenexprimierter Peptide. Es wurden jeweils 10000 Bakterienzellen im FACSCalibur™ analysiert. Zur besseren Differenzierung der Bakterienzellen von verunreinigenden Partikeln wurden die Bakterien doppelt gefärbt. Die spezifische Markierung der exprimierten Peptide erfolgte mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-FITC (grüne Fluoreszenz). Als zweite Markierung wurde der Fluoreszenzfarbstoff RH414 (rote Fluoreszenz) benutzt. Dieser Farbstoff lagert sich in die äußere Membran aller Bakterien ein, was eine Differenzierung der Zellen von verunreinigenden Partikeln erleichtert. A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), B: Peptid 15HA-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDZ15HA).

ein Großteil womöglich hochaktiver Peptide durch den Screening- und Selektionsprozess verloren gingen. Mögliche Ursachen hierfür könnten die durch die Sortierung bedingte starke Verdünnung und die dadurch notwendige Aufbereitung der Bakteriensuspension vor dem Ausplattieren sein, wodurch die Überlebensfähigkeit herabgesetzt worden sein könnte. Für das Screening weiterer Bibliotheken sollte daher der Screeningprozess an sich im Hinblick auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien analysiert und optimiert werden.

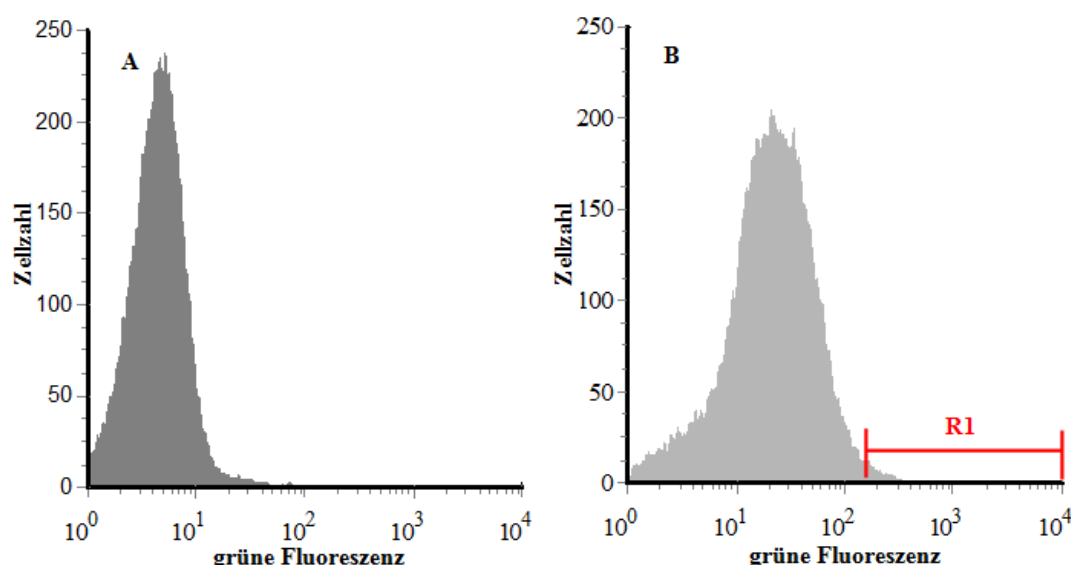


Abbildung 11: Screening einer oberflächenexprimierten Peptidbibliothek mittels Durchflusszytometrie und die Fluoreszenz-gesteuerte Sortierung („fluorescence activated cell sorting“, FACS) einzelner Varianten. Es wurden jeweils 100000 Bakterienzellen im FACSCalibur™ analysiert. A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) mittlere Fluoreszenz (mF) = 5; B: Bibliothek tragende Zellen (UT5600 (DE3) Bibliothek I), mF = 21. 1000 *E. coli* Zellen, die eine hohe grüne Fluoreszenz aufwiesen (R1) wurden mittels FACS selektiert.

Von den wieder angewachsenen *E. coli* wurden fünf Einzelzellklone gepickt, deren Plasmid-DNA isoliert und diese sequenziert. Auf diesem Weg konnte die Primärstruktur der auf der Oberfläche der Bakterien exprimierten Peptide ermittelt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Plasmide die codierende Sequenz für drei unterschiedliche Peptidvarianten enthielten (**Abbildung 12**). Eine weitere Sequenz war identisch mit Klon 1 und die fünfte enthielt den leeren Vektor. Das Betrachten der Ergebnisse der DNA-Sequenzanalyse offenbarte auch Schwächen der verwendeten Strategie I zur Erzeugung der für die Bibliothek codierenden Inserts. So kam es zu Leserasterverschiebungen („frame-shifts“) und Deletionen. Möglich ist z. B., dass nach der Hybridisierung die beiden Einzelstränge nicht unbedingt durchgängig zueinander komplementär sein müssen. Ebenso möglich wäre, dass nach der Hybridisierung der beiden Einzelstränge nicht immer die korrekten überhängenden, zum Vektor kompatiblen Enden entstanden sein mussten und es so nach der Ligation zu „frame-shifts“ kam.

Klon 1:																	
AAATTACTGA TTTGCTCGAG CGCAACACCC AGCATACCAA CATTTATGCG																	
K	L	L	I	C	S	S	A	T	P	S	I	P	T	F	M	R	Frame 1
N	Y	*	F	A	R	A	Q	H	P	A	Y	Q	H	L	C	E	Frame 2
I	T	D	L	L	E	R	N	T	Q	H	T	N	I	Y	A		Frame 3
51 AAAGATATTT TTGTGCGTAT CAGAATCTCT AGCTGGAAAA AGAGAGATGG																	
K	I	F	L	C	V	S	E	S	L	A	G	K	R	E	M	A	Frame 1
R	Y	F	C	A	Y	Q	N	L	*	L	E	K	E	R	W		Frame 2
K	D	I	F	V	R	I	R	I	S	S	W	K	K	R	D	G	Frame 3
Klon 2:																	
1 AAATTACTGA TTTGCTCGAG GGCAACACCC AGCATACCAA CATTTATGCG																	
K	L	L	I	C	S	R	A	T	P	S	I	P	T	F	M	R	Frame 1
N	Y	*	F	A	R	G	Q	H	P	A	Y	Q	H	L	C	E	Frame 2
I	T	D	L	L	E	G	N	T	Q	H	T	N	I	Y	A		Frame 3
51 AAAGATATTT TTGTGTCAGA ATCTCTAGCT GGAAAAAGAG AGATGGCTAT																	
K	I	F	L	C	Q	N	L	*	L	E	K	E	R	W	L	S	Frame 1
R	Y	F	C	V	R	I	S	S	W	K	K	R	D	G	Y		Frame 2
K	D	I	F	V	S	E	S	L	A	G	K	R	E	M	A	I	Frame 3
Klon 3:																	
1 AAATTACTGA TTTGCTCGAG GGCATTCCGC AGCATACCAA CATTTATGCG																	
K	L	L	I	C	S	R	A	F	R	S	I	P	T	F	M	R	Frame 1
N	Y	*	F	A	R	G	H	S	A	A	Y	Q	H	L	C	E	Frame 2
I	T	D	L	L	E	G	I	P	Q	H	T	N	I	Y	A		Frame 3
51 AAAGATATTT TTGTGTCAGA ATCTCTAGCT GGAAAAAGAG AGATGGCTAT																	
K	I	F	L	C	Q	N	L	*	L	E	K	E	R	W	L	S	Frame 1
R	Y	F	C	V	R	I	S	S	W	K	K	R	D	G	Y		Frame 2
K	D	I	F	V	S	E	S	L	A	G	K	R	E	M	A	I	Frame 3

Abbildung 12: Ausschnitte aus den Sequenzen der Plasmid-DNA dreier Klone aus dem Screening der Peptidbibliothek.

4.1.4 NEUE INHIBITOREN VON CATHEPSIN G

Die Sequenzanalyse der Plasmid-DNA der drei Einzelzellklone aus der Bibliothek und die Übersetzung in die entsprechenden Proteinsequenzen ergab eine sehr große Homologie der Peptidsequenzen (**Tabelle 16**). So unterschieden sich die Varianten nur in den ersten drei Aminosäuren. Das C-terminale Ende (Aminosäuren 4 bis 15) war identisch.

Tabelle 16: Sequenzen der Peptide aus dem Screening der Peptidbibliothek.

Name	Sequenz
P1	RNTQHTNIYAKDIFV
P2	GNTQHTNIYAKDIFV
P3	GIPQHTNIYAKDIFV

Der nächste Schritt bestand darin zu testen, ob die gefundenen Peptide inhibitorische Wirkung auf Cathepsin G besitzen. In der Literatur fanden sich bereits beschriebene Systeme zur Bestimmung der Hemmung von humanem Cathepsin G (Nakajima *et al.*

1979; Yavin und Fridkin 1998). Hierbei wird ein künstliches Peptid (n-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-Nitroanilid, **Abbildung 13**) eingesetzt und dessen Spaltung, die ein Maß

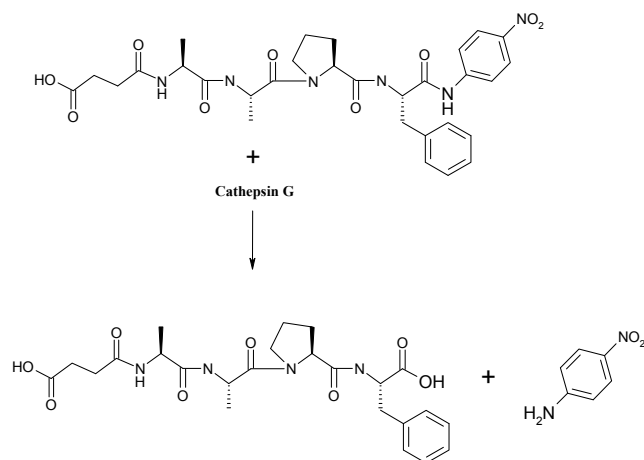


Abbildung 13: Spaltung des farblosen Peptidanalogs zum farbigen Produkt 4-Nitroanilin. Die Bildung 4-Nitroanilins wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Photometer verfolgt.

für die Enzymaktivität darstellt, bei 405 nm im UV/Vis-Spektrometer verfolgt. Diese Arbeitsweise erfüllt zwar die Forderung nach einer einfachen, nicht jedoch nach einer hochdurchsatzfähigen Methode. Mit einem Mikrotiterplatten-Photometer stand eine Apparatur zur Verfügung, die es erlaubt, photometrische Messungen im Mikrotiterplattenformat durchzuführen und so den Probendurchsatz deutlich zu steigern. Hierzu wurde der Enzymaktivitätstest auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten übertragen und weiter angepasst. Ein Ablaufschema des in dieser Arbeit benutzten Aktivitätstests für humanes Cathepsin G ist in **Abbildung 14** dargestellt. Als Kontrollen wurden der Reaktion anstelle der Peptidlösung reines Dimethylsulfoxid (100 % Aktivität) und anstelle des Enzyms HEPES-Puffer (Kontrolle der Autohydrolyse des Substrats) zugesetzt.

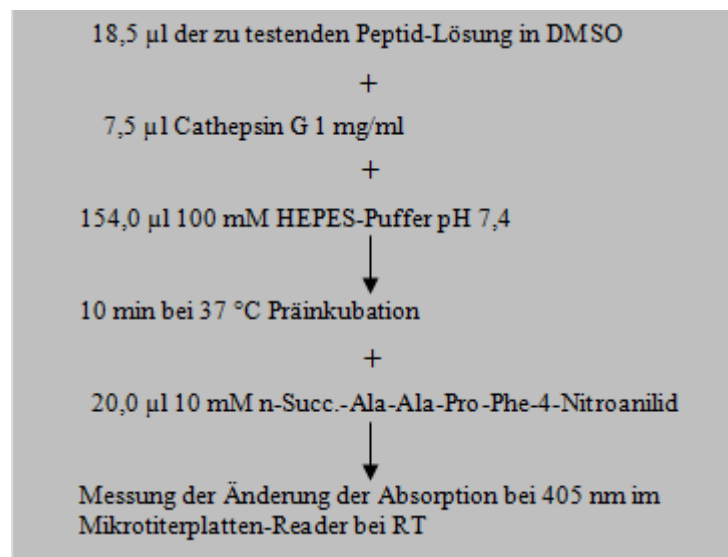


Abbildung 14: Schema des Aktivitätstests für humanes Cathepsin G.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Peptidinhibitoren wurden zunächst die Enzymaktivitäten, wobei die Enzymaktivität proportional zur Absorption bei 405 nm ist, in Anwesenheit dreier verschiedener Konzentrationen des Inhibitors bestimmt (Abbildung 15).

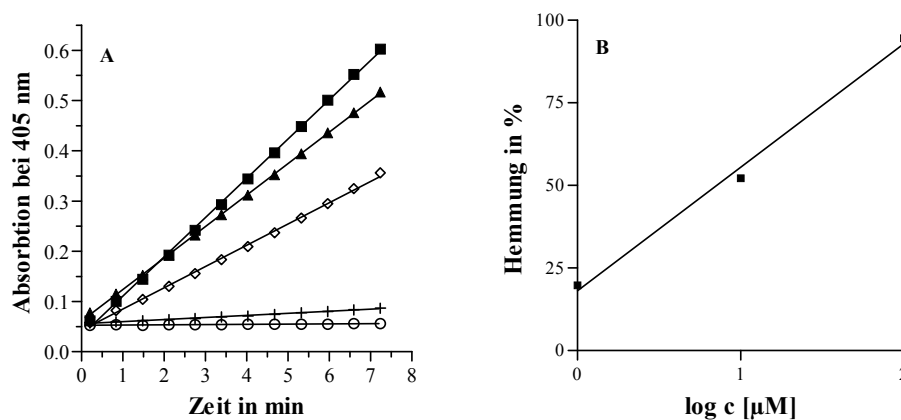


Abbildung 15: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von Peptid 15 mithilfe des Mikrotiterplattenassays.

Die Bestimmung erfolgte jeweils als Dreifach Bestimmung. Zur besseren Übersicht wurde auf eine Darstellung der Fehlerindikatoren in den Diagrammen verzichtet, da diese die Symbole unkenntlich gemacht hätten. A: Enzymaktivität bei Anwesenheit dreier Konzentrationen des Peptids. ○ Nullwert (ohne humanes Cathepsin G); ■ Kontrolle (ohne Peptid 15); ▲ 1 µM Peptid 15; ◇ 10 µM Peptid 15; + 100 µM Peptid 15. B: grafische Ermittlung des IC_{50} -Wertes aus den Daten aus A.

Aus den durch Regressionsanalyse erhaltenen Steigungen ließen sich die prozentualen Hemmwerte ermitteln. Eine Auftragung der prozentualen Hemmung gegen den dekadischen Logarithmus der verwendeten Inhibitorkonzentration erlaubte es, den IC_{50} -Wert aus der wiederum durch Regressionsanalyse erhaltenen Geradengleichung zu ermitteln.

Der auf diese Weise als Kontrolle bestimmte IC_{50} -Wert für Peptid 15 betrug $8,98 \mu M$. Außer dem IC_{50} -Wert sollte zusätzlich noch der K_i -Wert bestimmt werden, da dieser im Gegensatz zum IC_{50} -Wert von den verwendeten Substrat- und Enzymkonzentrationen unabhängig sein sollte. Statt der genaueren, aber material- und zeitaufwendigen experimentellen Bestimmung des K_i -Wertes wurden die K_i -Werte in dieser Arbeit aus dem IC_{50} -Wert rechnerisch ermittelt (Cheng und Prusoff 1973). Mit dieser Berechnungsmethode stand ein Hilfsmittel zur schnellen Bestimmung von K_i -Werten von Inhibitoren zur Verfügung. Für das Peptid 15 ergab die Berechnung einen K_i -Wert von $0,98 \mu M$. Dieser Wert unterscheidet sich von dem aus Literatur für Peptid 15 bekannten K_i -Wert von $0,25 \mu M$ (Yavin und Fridkin 1998). Der Unterschied zwischen den beiden Werten kommt durch die Bestimmungsmethode zustande. In dieser Arbeit wurde der K_i -Wert aus dem IC_{50} -Wert, der von der verwendeten Substrat- und Enzymkonzentration abhängig ist, berechnet und nicht wie bei Yavin *et al.* experimentell bestimmt. Zur genauen Bestimmung der K_i -Werte wäre die experimentelle Bestimmung vorzuziehen gewesen. Um einen groben Vergleich zwischen den von Yavin *et al.* getesteten Peptiden und den Peptiden aus dieser Arbeit vorzunehmen, reichte die Genauigkeit allerdings aus.

Die aus dem Screening der Bibliotheken erhaltenen Peptide wurden synthetisiert und mit dem bereits etablierten Mikrotiterplatten-Testsystem auf Hemmung von humanem Cathepsin G getestet. Die dabei erhaltenen Hemmdaten sind in der untenstehenden Tabelle dokumentiert (**Tabelle 17**). Mit Hemmdaten um die 50 % zeigten die neuen Peptide eine schwache und deutlich schlechtere Hemmung von humanem Cathepsin G als das Ausgangs-peptid Peptid 15. Auch die Diversität der Sequenzen war noch sehr

Tabelle 17: Hemmung von humanem Cathepsin G durch die Peptide aus dem Screening der Bibliothek.

Name	Sequenz	Hemmung bei $100 \mu M$
P1	RNTQHTNIYAKDIFV	50,0 %
P2	GNTQHTNIYAKDIFV	53,2 %
P3	GIPQHTNIYAKDIFV	49,4 %

gering. Als mögliche Ursache hierfür kommt die für die Erstellung des für die Bibliothek codierenden DNA-Fragmentes verwendete Strategie I infrage. Bei der verwendeten Strategie ist es nicht ausgeschlossen, dass gewisse Basenpaarungen bei der Hybridisierung mit höherer Wahrscheinlichkeit erfolgen als andere. Diese und die bereits bei der Auswertung der Ergebnisse der Sequenzanalyse festgestellten Schwächen der Strategie I führten zu dem Entschluss, bei der Erstellung weiterer Bibliotheken eine andere Strategie zu verfolgen und so dieses Manko zu beseitigen.

4.1.5 RATIONALE VERBESSERUNGEN DER PEPTIDE

Im Hinblick auf die Tatsache, dass die Sequenzen der Peptide aus der Bibliothek ab der vierten Aminosäure identisch waren, lag der Schluss nahe, Verkürzungen der Peptide vorzunehmen und diese verkürzten Varianten ebenfalls auf eine Hemmung von humanem Cathepsin G hin zu überprüfen. Auf diesem Weg entstanden Peptid 4 und Peptid 5 (**Tabelle 18**). Diese Verkürzungen der Peptidsequenzen am N-Terminus führten zu einer deutlichen Abnahme der Hemmung. Von der Synthese weiterer und längerer Peptide in Anlehnung an die Konsensussequenz wurde abgesehen. Zum einen schien es zweifelhaft, dass auf diesem Wege potentere Inhibitoren erhalten werden können, zum anderen war es das Ziel, möglichst kurze Peptide zu erhalten, die dann als Leitstruktur für neue Inhibitoren von humanem Cathepsin G dienen können.

Tabelle 18: Auswirkungen der rationalen Veränderungen der Peptide auf die Hemmung von humanem Cathepsin G. n.b.: Wert nicht bestimmt

Name	Sequenz	% Hemmung. bei 100 μM	IC_{50} [μM]	K_i [μM]
P1	RNTQHTNIYAKDIFV	50,0	n.b.	n.b.
P2	GNTQHTNIYAKDIFV	53,2	n.b.	n.b.
P3	GIPQHTNIYAKDIFV	49,4	n.b.	n.b.
P4	NIYAKDIFV	15,9	n.b.	n.b.
P5	YAKDIFV	4,5	n.b.	n.b.
P6	KDIFV	71,2	11,7	2,2
P6a	DIFVFV	80,8	9,76	1,18
P6b	DDFFVFV	75,1	12,87	1,56
P6c	DIFLFV	68,4	13,25	1,61
P6d	KDIFVFV	22,9	n.b.	n.b.
P6e	DAFFVF	19,8	n.b.	n.b.
P7	KDIF	34,0	n.b.	n.b.
P8	DIFV	15,9	n.b.	n.b.
14	FWSKDIFY	56,0	n.b.	n.b.
15	EILIFWSKDIFYSFT	94,6	8,98	0,98
P18	DIFVV	34,0	n.b.	n.b.

Vergleicht man die Sequenzen der neuen Inhibitoren mit den Sequenzen der beiden bereits bekannten Inhibitoren Peptid 14 und Peptid 15, so zeigte sich auf den ersten Blick eine Konsensussequenz bestehend aus den Aminosäuren Lysin, Asparaginsäure und Isoleucin (KDI), die in allen fünf Peptidsequenzen enthalten war (**Abbildung 16**). Auch C-terminal nach dieser in den fünf verglichenen Sequenzen enthaltenen Konsensussequenz sind Ähnlichkeiten in den Sequenzen zu erkennen. In Richtung des C-Terminus folgten noch eine aromatische Aminosäure: bei den Peptiden aus der Bibliothek ein Phenylalanin, bei den Peptiden 14 und 15 ein Tyrosin. Die Tatsache, dass die Amino-

säure Glycin in den Peptiden aus dem Screening der Bibliothek I nicht vorhanden war, wurde nicht weiter berücksichtigt. Die Aminosäure Glycin besitzt keine Seitenkette, mit der sie Interaktionen mit dem Enzym eingehen könnte, deshalb wurde der Effekt, den die Aminosäure auf die Interaktion mit dem Enzym hat, als nicht essenziell eingestuft. Auch die Ergebnisse des Protein-Peptid-Docking ließen keine starke Abhängigkeit von dieser Aminosäure erkennen (nicht gezeigt).

Die C-terminale Aminosäure Valin bei den Bibliothekspeptiden liegt deprotoniert vor, ist also polar und könnte möglicherweise den Platz des Serins einnehmen. Leider lieferte das verwendete Programm zum Protein-Peptid-Docking bei den langen Peptiden keine eindeutigen Lösungen, so dass diese Annahme nicht durch Dockingdaten gestützt werden konnte.

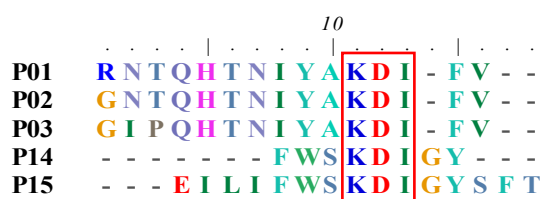


Abbildung 16: „Multiple Sequence Alignment“ der drei Peptidsequenzen aus dem Bibliotheks-screening mit den beiden bereits bekannten Inhibitoren (Peptid 14, Peptid 15 (Yavin und Fridkin 1998)). Am C-Terminus ist in allen Sequenzen eine Konsensussequenz aus den Aminosäuren KDI (roter Rahmen) vorhanden.

Die drei Peptide aus der Bibliothek wiesen darüber hinaus eine Übereinstimmung in den auf diese drei Aminosäuren folgenden beiden Aminosäuren Phenylalanin und Valin (FV) auf. Es lag also nahe, die erweiterte Konsensussequenz KDIFV als freies Peptid zu synthetisieren und ebenfalls auf Hemmung von Cathepsin G zu testen. Das Peptid 6 zeigte dabei mit einer Hemmung von 71,2 % eine deutlich stärkere Hemmung als jedes der drei Ausgangspeptide aus der Bibliothek. Eine Verkürzung des Peptids um eine Aminosäure vom N-Terminus her oder die Verkürzung des Peptids um eine Aminosäure vom C-Terminus her führte zu einer deutlichen Abnahme der Hemmung (Tabelle 18).

Die rasanten Fortschritte und die zunehmende Bedeutung computergestützter Methoden in der Entwicklung neuer Arzneistoffe, sowie die faszinierende Aussicht, Auswirkungen von Veränderungen an bestehenden Molekülen mithilfe des Computers vorherzusagen und somit Kosten und Zeit zu sparen, legen den Schluss nahe, die Interaktion eines Peptids mit humanem Cathepsin G auf diesem Weg zu untersuchen. Der Ausgangspunkt für eine solche Analyse ist die Kristallstruktur des Proteins (Hof *et al.* 1996). Für das Protein-Peptid-Docking steht eine breite Vielfalt verschiedener Programme mit unterschiedlichem Leistungsumfang zur Verfügung (Taylor *et al.* 2002; Bursulaya *et al.* 2003;

Maiorov und Sheridan 2005; Orry *et al.* 2006). Zusätzlich zu der Bestimmung der Hemmung von humanem Cathepsin G wurde am Max-Planck-Institut für Bioinformatik in Saarbrücken jede Peptidsequenz einem Protein-Peptid-Docking gegen die Kristallstruktur (Protein Database code: 1aug) des Enzyms unterzogen. Für die Dockingberechnungen wurde das ICM-Programmpaket (ICM-Pro, Version 3.5.a, Molsoft, LaJolla, USA), das ein Docking mit einem flexiblen Liganden und ebenso mit flexiblen Seitenketten des Proteins erlaubt (Abagyan und Totrov 2001), ausgewählt. Dieses Programm errechnet mehrere mögliche Anordnungen und Orientierungen des Peptids auf der Oberfläche des Enzyms. Diejenigen zwanzig Docking-Lösungen mit den niedrigsten berechneten freien Energien wurden in einer Datei abgespeichert. Die **Abbildung 17** zeigt das Ergebnis des Protein-Peptid-Dockings für das Peptid 6. Ein interessanter Ansatzpunkt für eine weitere Verbesserung ergab sich aus dem Vergleich der Peptide 8 und 18. Diese unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur durch

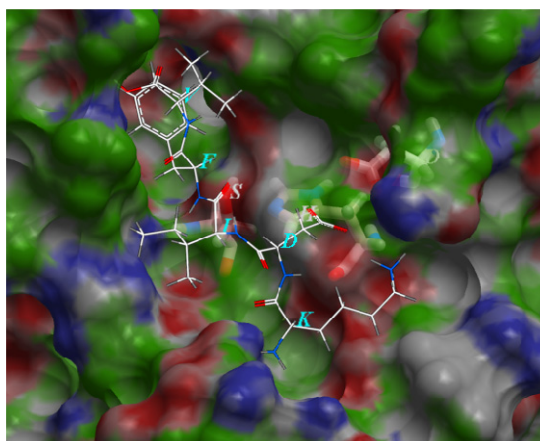


Abbildung 17: Protein-Peptid-Docking des Peptids 6 (KDIFV) gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

das C-terminale Valin, in ihrer inhibitorischen Wirkung allerdings um mehr als Faktor zwei. Am C-Terminus scheint also ein hydrophober Bereich für die Hemmung von humanem Cathepsin G essenziell zu sein. Deshalb sollte nun untersucht werden, wie sich eine weitere Verlängerung dieses hydrophoben Bereiches bei den Peptiden 6 und 8 auswirkt. Hierzu wurde zunächst das Peptid 8 um die Aminosäure Valin in Richtung des C-Terminus verlängert (Peptid 18), was bereits zu einer messbaren Erhöhung der Hemmung führte. Schließlich wurde das Peptid 8 um die Aminosäuren Phenylalanin und Valin C-terminal verlängert (P6a) und wiederum die Hemmdaten ermittelt (**Tabelle 18**). Mit dem Peptid 6a (DIFVFV) wurde der bis zu diesem Zeitpunkt potenteste Peptidinhibitor dieser Arbeit erhalten. Die **Abbildung 18** zeigt das Ergebnis des

Protein-Peptid-Dockings des Peptids 6a. Der IC_{50} -Wert lag bei $9,76 \mu M$

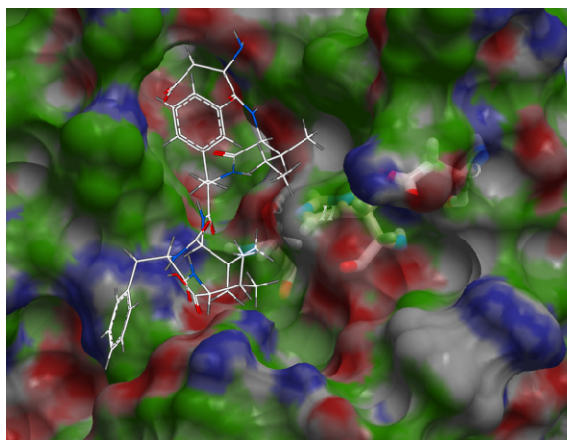


Abbildung 18: Protein-Peptiddocking des Peptids 6a (DIFVFFV) gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

im Vergleich zu $11,7 \mu M$ bei Peptid 6 und $4,5 \mu M$ bei Peptid 15. Eine Verlängerung des Peptids 6 um die Aminosäuren Phenylalanin und Valin am C-Terminus führte hingegen zu einem nahezu vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung (Peptid 6d). Mit den Peptiden 6 und 6a standen somit neue Leitstrukturen für die weitere Entwicklung von Hemmstoffen für humanes Cathepsin G zur Verfügung. Ferner konnten nun Bakterienzellen, die diese Peptide auf ihrer Oberfläche exprimieren, generiert werden und als Kontrolle dienen.

Als neuer Ausgangspunkt für rationale Veränderungen sollte nun das Peptid 6a dienen. Zunächst wurden zwei Aminosäureaustausche in der Peptidsequenz von Peptid 6a vorgenommen. An Position zwei wurde die Aminosäure Isoleucin durch die Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht. Damit sollte dem Ergebnis des Protein-Peptid-Dockings Rechnung getragen werden, das an dieser Stelle unpolare Wechselwirkungen mit dem Enzym vorhergesagt hatte (Peptid 6b). Das Peptid 6b wurde gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G gedockt (**Abbildung 19 P6b**). Als zweites sollte das Valin an Position vier durch das etwas weniger voluminöse Leucin ersetzt werden (Peptid 6c). Auch dieses Peptid wurde einem Protein-Peptid-Docking unterzogen (**Abbildung 19 P6c**). Beim Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Alanin an Position zwei sollte die Hypothese überprüft werden, dass dadurch das darauf folgende Phenylalanin besser

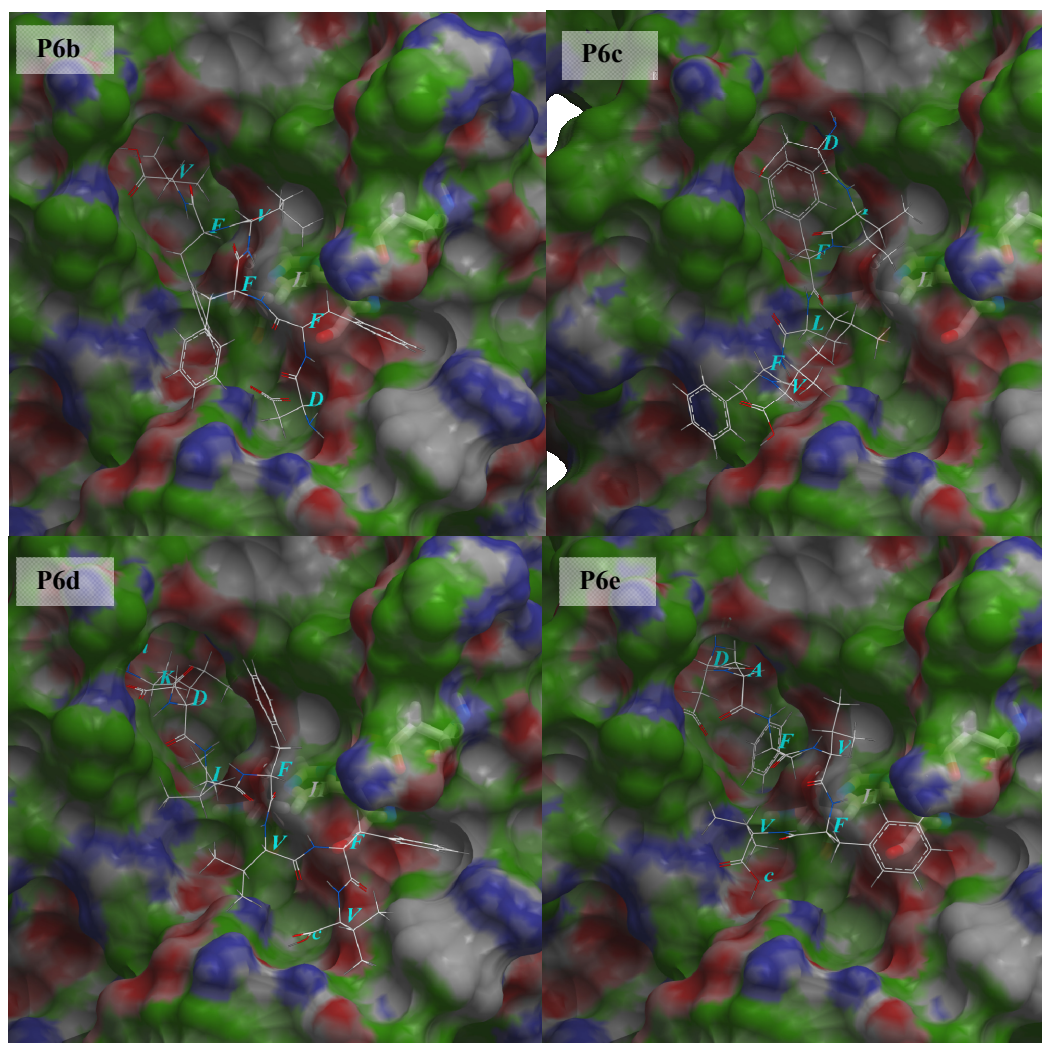


Abbildung 19: Protein-Peptiddocking der Peptide 6a (DIFVVFV), 6b (DFFVVFV), 6c (DIFLFV), 6d (KDIFVVFV) gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

mit dem Enzym wechselwirken könnte (Peptid 6e, **Abbildung 19 P6e**). Eine weitere Veränderung der Sequenz des Peptids 6a lag noch nahe: die Kombination von Peptid 6 mit Peptid 6a – also das Einfügen der Aminosäure Lysin an Position eins des Peptids 6a (Peptid 6d, **Abbildung 19 P6d**). Neben der virtuellen Untersuchung der veränderten Peptide wurden auch die Hemmdaten bestimmt und in **Tabelle 18** zusammengestellt.

4.2 EINFLUSS DES EXPRESSIONSSYSTEMS AUF DAS AUTODISPLAY VON PEPTIDEN AUF DER OBERFLÄCHE VON *E. COLI*

4.2.1 AUTODISPLAY VON PEPTIDINHIBITOREN UNTER DER KONTROLLE EINES INDUZIERBAREN PROMOTORS

Die Tatsache, dass die exprimierten Peptide das Wachstum der Bakterien negativ beeinflussen könnten, wurden zum Anlass genommen, die Expression der Peptide von außen steuerbar zu machen. Dazu bot es sich an, ein Expressionssystem zu benutzen, bei dem die Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht. In der Arbeitsgruppe Jose wurde das pET System der Firma Novagen (MERCK, Darmstadt) bereits erfolgreich für das Autodisplay der Sorbitol-Dehydrogenase eingesetzt (Handel 2003). Ausgehend von dem Plasmid pETSH4 (Handel 2003) sollte ein Plasmid generiert werden, das die bereits erfolgreich eingesetzte Autotransporter-Translokationseinheit aus dem Plasmid pJM942 unter die Kontrolle des induzierbaren T7 Promotors aus pETSH4 stellt. Da das Plasmid pETSH4 seinerseits schon über eine für ein Autotransporter-Fusionsprotein codierende Sequenz verfügte, waren auch entsprechende kompatible Restriktionsendonukleaseschnittstellen bereits vorhanden. Der Vektoranteil wurde aus pETSH4 durch den Verdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI (Fragmentlänge: 5895 bp) erhalten. Die für das Autotransporter-Fusionsprotein codierende Sequenz wurde aus dem mit den gleichen Enzymen geschnittenen Plasmid pJM942 (Fragmentlänge: 1139 bp) gewonnen. Beide Fragmente wurden nach dem Verdau durch Agarosegelelektrophorese gereinigt, die aufgereinigten Fragmente mit T4 DNA-Ligase zum Plasmid pDB001 ligiert, in *E. coli* UT5600 (DE3) transformiert und der korrekte Verlauf der Experimente durch Analyse der aufgenommenen Plasmid-DNA kontrolliert.

Mit dem Plasmid pDB001 stand die Möglichkeit offen, die Expression der Peptid 15-Varianten und des Peptids 6 unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors zu stellen. Dazu wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und SacII geschnitten und durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Das dabei entstandene große Fragment (6728 bp) sollte als Vektor zum Einsatz der für die Peptide codierenden Fragmente dienen. Analog zur bereits beschriebenen Generierung der Bibliothek wurden hier ebenfalls wieder zwei zueinander komplementäre für die Peptide codierende Oligonukleotide so miteinander hybridisiert, dass nach Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oligonukleotiden bereits die zu den verwendeten Restriktionsendonukleasen XhoI und SacII kompatiblen Enden vorhanden waren. Die verwendeten Oligonukleotide und die daraus resultierenden Peptide können aus der **Tabelle 19** entnommen werden. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidpaare und der daraus hervorgegangen Plasmide.

verwendetes Oligo-nukleotidpaar	codiertes Peptid	Bezeichnung des Plasmids
DZ019 + DZ020	YPYDVDPDYAEILIFWSKDIGYSFT	pDB003
DZ015 + DZ016	EILIFWSKDIGYSFT	pDB004

ohne weitere Aufreinigung in 10-fachem molaren Überschuss zum Vektor zur Ligation eingesetzt werden. Ein Teil jedes Ligationsansatzes wurde nach Dialyse gegen Reinstwasser zur Transformation in *E. coli* UT5600 (DE3) eingesetzt. Nach der erfolgreichen Transformation der Plasmide in *E. coli* musste nun die Funktionsfähigkeit des Autotransporter-Fusionsproteins in den erhaltenen Stämmen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die Außenmembranen der neuen Stämme isoliert und die Außenmembranproteine in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung des Polyacrylamidgels nach der Coomassie-Färbung ergab für alle drei untersuchten Stämme eine Lokalisierung des Fusionsproteins in der Außenmembran von *E. coli*. Aufgrund des mitexprimierten HA-Epitops konnte für die pDB003-tragenden Bakterien zusätzlich eine immunologische Nachweismethode angewendet werden. Hierzu wurde das Außenmembranisolat auf zwei Gelen aufgetrennt. Eines wurde für eine Coomassie-Färbung benutzt. Aus dem anderen Gel wurden die Proteine durch Elektrophoretik auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Membran wurde zunächst mit einem Mäuse Anti-HA-Antikörper behandelt. Zur Detektion wurde im Anschluss daran ein Ziegen Anti-Maus-Antikörper verwendet, der zusätzlich mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Die Kopplung an Alkalische Phosphatase ermöglichte durch Umwandlungen ihres farblosen Substrates zu einem violetten Produkt die spezifische Visualisierung der Banden des Fusionsproteins (**Abbildung 20**). Hierbei war im Falle der Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors sowohl bei der Coomassie-gefärbten SDS-Page als auch bei dem fertig entwickelten und sensitiveren Immunoblot kein Signal ohne eine vorhergehende Induktion der Proteinexpression zu sehen (**Abbildung 20** Spur 2), das heißt, es konnte keine Basalexpression nachgewiesen werden. Im Isolat des Peptids 15HA konstitutiv exprimierenden Stammes, das als Kontrolle mit aufgetragen worden war und auch im Außenmembranisolat des pDB003 enthaltenen Stammes waren deutlich Signale bei der erwarteten Größe zu sehen. Somit war der Nachweis erbracht, dass die induzierbare Proteinexpression geglückt war und mit der konstitutiven Expression vergleichbare Ergebnisse liefert. Außerdem wurde zumindest für dieses Konstrukt keine sogenannte Basalexpression beobachtet, es erfolgte also keine nachweisbare Proteinexpression ohne vorhergehende Induktion. Zusätzlich zu den bereits gezeigten Experimenten wurde die Oberflächenständigkeit und die Funktion der Peptidpassagiere der Autotransporter-Fusionsproteine

durch Markierung der Zellen mit biotinyliertem humanen Cathepsin G

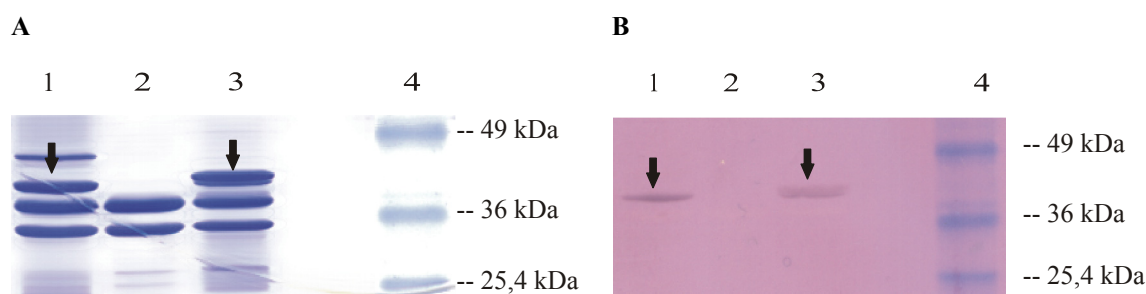


Abbildung 20: Vergleich der konstitutiven Proteinexpression und der induzierbaren Proteinexpression am Beispiel des Peptids 15 mittels SDS-PAGE und Western-Blot der Außenmembranisolate. A: Spur 1: Außenmembranisolat des Peptid 15 konstitutiv exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDZ15HA; Spur 2: Außenmembranisolat des Peptid 15 induzierbar exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDB003, nicht induziert; Spur 3: Außenmembranisolat des Peptid 15 induzierbar exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDB003, induziert. B: Western-Blot der Außenmembranisolate. Spur 1: Außenmembranisolat des Peptid 15 konstitutiv exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDZ15HA; Spur 2: Außenmembranisolat des Peptid 15 induzierbar exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDB003, nicht induziert; Spur 3: Außenmembranisolat des Peptid 15 induzierbar exprimierenden Stammes UT5600 (DE3) pDB003, induziert. Die Banden des Peptid 15-Autotransporterfusionsproteins sind durch die Pfeile markiert. In Spur 4 ist jeweils ein Größenstandard zur Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine aufgetragen.

und Streptavidin-FITC kontrolliert. Die so markierten Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse der Analyse von jeweils 10000 Kontrollzellen, Peptid 15HA konstitutiv exprimierenden und Peptid 15HA induzierbar exprimierenden *E. coli* Zellen ist in **Abbildung 21** dargestellt. Beide peptidtragenden Stämme konnten durch ihren im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich erhöhten mittleren Fluoreszenzwert von diesen unterschieden werden. Mit den erhaltenen Ergebnissen konnte die Oberflächenständigkeit der Peptide und ihr funktionsfähiger Zustand nachgewiesen werden. Das Autodisplay von Peptidinhibitoren unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors wirkte sich weder auf Expression der Peptidinhibitoren noch auf die Markierung negativ aus. Gerade im Hinblick auf die geplante Expression von Peptidbibliotheken, sollte die Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors Vorteile bringen, da die Bakterien nicht ständig rekombinante Proteine bilden, die sich auf das Wachstum und die Überlebensfähigkeit der Bakterien negativ auswirken können. Der nächste Schritt war nun, die neuen Inhibitoren von humanem Cathepsin G Peptid 6 (KDIFV) und 6a (DIFVFV) ebenfalls auf der Oberfläche von Bakterien zu exprimieren und zu markieren. Dazu musste zuerst das für die Peptide codierende DNA-Fragment in das Expressionsplasmid pDB002 eingesetzt werden.

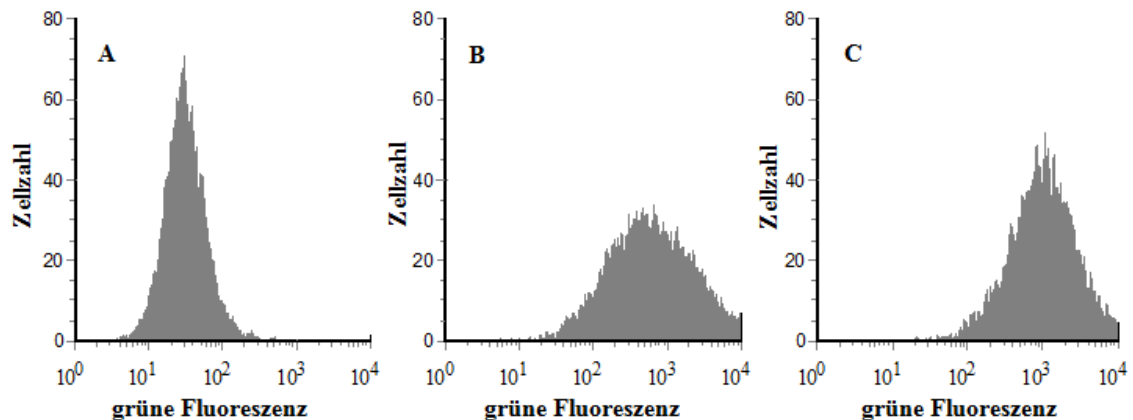


Abbildung 21: Einfluss des Expressionssystems auf das Autodisplay von Peptid 15HA. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenzen (mF) nach Analyse von jeweils 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSaria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 30); B: konstitutive Expression von Peptid 15HA (UT5600 (DE3) pDZ15HA, mF = 661); C: induzierbare Expression von Peptid 15HA (UT5600 (DE3) pDB003, mF = 1055), nach Induktion.

Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und SacII verdaut (2h, 37 °C), das Verdauemuster mithilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Das größte DNA-Fragment (6728 bp) sollte als Vektor zur Aufnahme der codierenden Sequenzen für die beiden Peptide dienen. Analog zur Erstellung des Inserts für die Bibliothek I (Strategie I, **Abbildung 6**) wurden je zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die für die beiden Peptide codieren und nach ihrer Hybridisierung bereits die zum Einsetzen in den Vektor erforderlichen kompatiblen Enden aufwiesen (XhoI und SacII). Zur Ligation wurden 50 ng geschnittener Vektor und jeweils ein 10-facher molarer Überschuss an Peptidinsert eingesetzt. Die Ligation mit dem geschnittenen Vektor lieferte dann die Plasmide pDB008 (Autodisplay von Peptid 6) und pDB010 (Autodisplay von Peptid 6a). Von beiden Ligationsansätzen wurden je 3 µl durch Elektroporation in *E. coli* UT5600 (DE3) transformiert. Die Analyse der aus den Transformanten isolierten Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen und eine darauf folgende Agarosegelelektrophorese bestätigte die Korrektheit der von den Zellen aufgenommenen Plasmide. Zur Markierung der oberflächenexprimierten Peptide wurden jeweils 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur der zu markierenden Zellen beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 20 µl 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration von 20 µM) und anschließende einstündige Inkubation bei 28 °C induziert. Von diesen Kulturen wurde jeweils genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optischen Dichte von 1,2 bezogen auf 1 ml lieferte. Als Kontrolle diente wiederum der Stamm UT5600 (DE3) und die weitere Vorgehensweise entsprach der Markierung der Peptid 15HA-exprimierenden Zellen. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von 10000

markierten Bakterienzellen ist in **Abbildung 22** dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollzellen (UT5600 (DE3), **Abbildung 22 A**) wiesen die Bakterienzellen, die das Peptid 6 auf ihrer Oberfläche trugen (UT5600 (DE3) pDB008, **Abbildung 22 B**) einen um den Faktor 50 höheren Mittelwert der grünen Fluoreszenz auf.

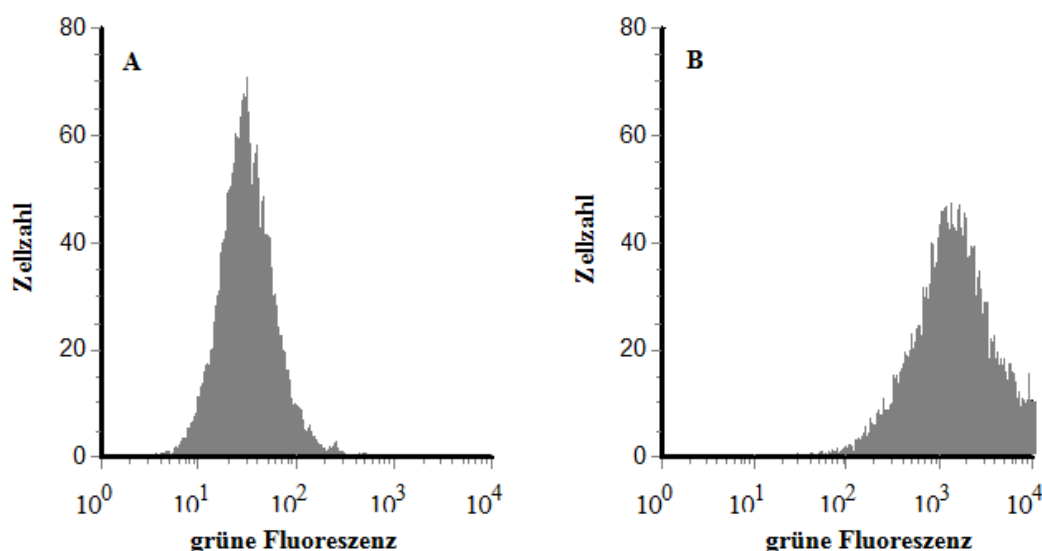


Abbildung 22: Spezifische Markierung nach dem Zweischnittverfahren und Nachweis der Oberflächenständigkeit des Peptids 6 (KDIFV) durch Analyse im Durchflusszytometer. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenzen (mF) von 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACSAria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 30); Peptid 6-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB008, mF = 1512).

Auch von den Peptid 6a-tragenden Bakterienzellen wurden 30000 Bakterienzellen nach der Markierung mit Cathepsin G nach dem Zweischnittverfahren im Durchflusszytometer analysiert und das Ergebnis in **Abbildung 23** dokumentiert. Wiederum zeigten die Peptid 6a-tragenden Zellen (UT5600 (DE3) pDB010, **Abbildung 23 B**) im Vergleich zu den Kontrollzellen (UT5600 (DE3), **Abbildung 23 A**) eine deutlich höhere grüne Fluoreszenz (Faktor 32). Die oberflächenexprimierten Peptide 6 (KDIFV) und 6a (DIFVFV) lassen sich also mit der vorgestellten Methode ebenso spezifisch markieren, wie zuvor das Peptid 15HA. Ein weiterer Befund lässt sich aus diesen Ergebnissen ebenfalls ableiten. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Markierung nach der vorgestellten Methode ist die Oberflächenständigkeit und Zugänglichkeit der exprimierten Peptide für das Enzym humanes Cathepsin G. Folglich kann die vorgestellte spezifische Markierung auch als Nachweis der Oberflächenständigkeit von Peptiden dienen. Verläuft die Markierungsreaktion erfolgreich, so muss der Bindungspartner für das humane Cathepsin G an der Oberfläche der Bakterien zugänglich sein. Hingegen lässt sich nicht unterschei-

den, ob das exprimierte Peptid nicht in der Lage ist, das Enzym zu binden oder ob es nicht frei zugänglich vorliegt.

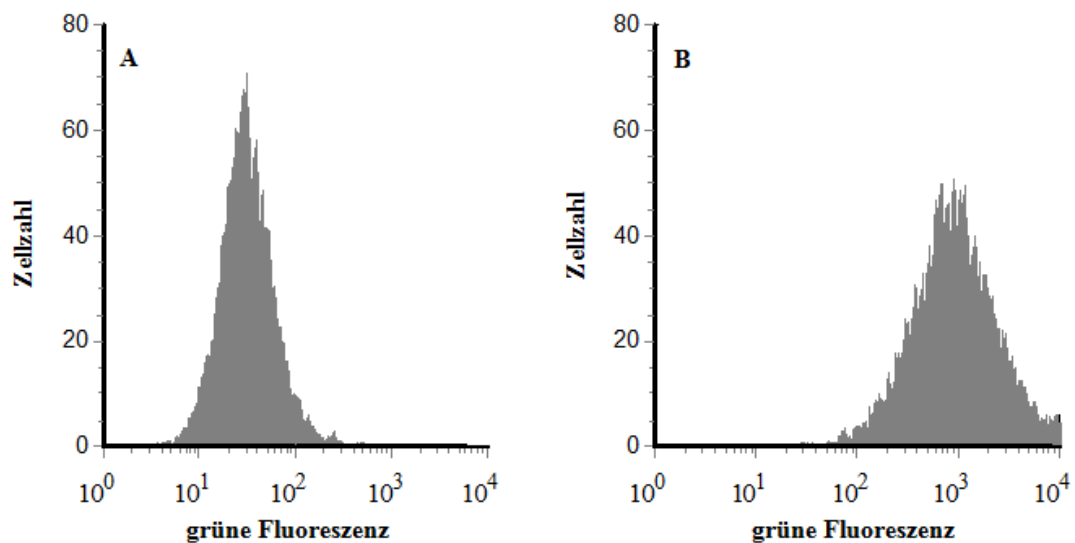


Abbildung 23: Spezifische Markierung mittels des Zweischrittverfahrens und Nachweis der Oberflächenständigkeit des Peptids 6a (DIFVfV) durch Analyse im Durchflusszytometer. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) von 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACSaria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 30); B: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010, mF = 947).

4.2.2 EINFÜGEN EINER AGEI SCHNITTSTELLE IN DIE LINKERREGION VON PJM942

Der geplante Wechsel der Strategie zur Bibliothekserstellung warf ein neues Problem auf. Das für die Bibliothek codierende doppelsträngige DNA-Fragment war lediglich zwischen 24 und 27 bp lang. Diese geringe Länge hätte die notwendige Aufreinigung nach dem Restriktionsverdau sehr erschwert, da die korrekte Auswahl des Fragmentes aufgrund des geringen Größenunterschiedes zu den durch den Verdau angefallenen Enden sehr schwierig ist und eine große Fehlerquelle darstellt. Zur Lösung dieses Problems sollte das DNA-Fragment entsprechend der Vektorsequenz verlängert werden und so die Analytik des für die Bibliothek codierenden Inserts erleichtert werden. Da die zur Auswahl stehenden Plasmide in dem infrage kommenden Sequenzbereich über keine passenden Restriktionsendonukleaseschnittstellen verfügten, musste eine solche eingefügt werden. Hierzu bot sich eine Punktmutation der Base 431 von einem Adenin zu einem Thymin an, wodurch eine neue AgeI-Schnittstelle entstand (**Abbildung 24**). Um diese Punktmutation herbeizuführen, wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die bis auf die auszutauschende Base zu der Vektorsequenz komplementär war. Die auszutauschende Base sollte sich nach Möglichkeit in der Mitte der Oligonukleotidsequenz befinden. Diese Oligonukleotide sollten bei einer Polymera-

sekettenreaktion als Oligonukleotidprimer und die zu verändernde Plasmid-DNA (pDB001, pJM942) als DNA-Matrize dienen. Die Plasmid-DNA (50 ng) wurde dazu zunächst alkalisch denaturiert. Dieser Schritt, bei dem die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden, sollte später bei der Transformation die Anzahl von Klonen,

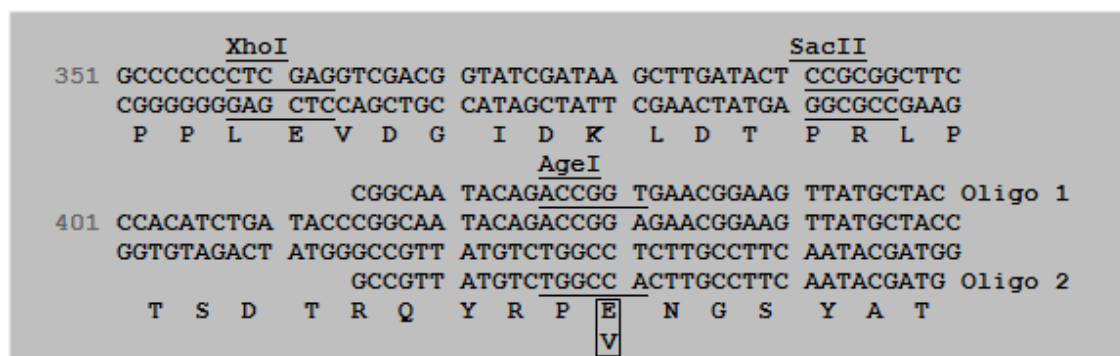


Abbildung 24: Einfügen einer AgeI Schnittstelle in die Linkerregion von pJM942. Mit Hilfe der beiden Oligonukleotide oDBAgeI 1 und oDBAgeI 2 wurde an der Nukleotidposition 431 des Plasmids pJM942 ein Adenin gegen ein Thymin durch PCR basierte Site Directed Mutagenesis ersetzt, wodurch eine AgeI Schnittstelle entstand. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sind unterstrichen, der durch den Basentausch erfolgte Aminosäureaustausch ist durch einen Rahmen markiert.

die die unveränderte DNA tragen herabsetzen, da die Empfängerzellen einzelsträngige DNA degradieren. Im Anschluss wurde mittels PCR das komplette Plasmid durch eine spezielle, thermostabile DNA-Polymerase (Vent® Polymerase) amplifiziert, die in der Lage war, den synthetisierten DNA-Strang zu überprüfen und so möglicherweise während der Synthese zusätzlich eingefügte Mutationen zu korrigieren („Proofreading“-Aktivität). Im Reaktionsansatz noch enthaltene Matrizen-DNA wurde durch die Restriktionsendonuklease DpnI, welche ausschließlich methylierte DNA-Moleküle verdaut, entfernt. Das Restriktionsenzym wurde hitzeinaktiviert, die Reaktionsansätze dialysiert und in *E. coli* transformiert. Durch Analyse der Plasmid-DNA der Transformanten konnte gezeigt werden, dass der Einbau der AgeI-Schnittstelle erfolgreich war. Es entstand das Plasmid pDB007. Das Erzeugen der AgeI-Schnittstelle in dem Plasmid pDB001 gelang nicht durch ortsgerichtete Mutagenese. Stattdessen wurde das Plasmid pDB007 mit den bewährten Restriktionsenzymen NdeI und BamHI verdaut und das dabei entstandene kleine Fragment (1139 bp), das die gewünschte Mutation enthielt, über ein Agarosegel aufgereinigt. Dieses Fragment ließ sich nun problemlos in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen und aus dem Agarosegel aufgereinigten Vektor pDB001 (5895 bp) einsetzen. Auf diesem Wege wurde das Plasmid pDB002 erhalten, das sich vom Plasmid pDB001 nur durch die zusätzliche AgeI-Schnittstelle unterschied. Untersucht werden musste nun, ob sich der durch den Einbau der neuen Restriktionsschnittstelle AgeI bei den Plasmiden pDB002 und pDB007 bedingte Aminosäureaustausch der polaren Aminosäure Glutaminsäure gegen die unpolare Amino-

säure Valin auf den Translokationsmechanismus auswirkt. Hierzu wurde die äußere Membran der beiden Bakterienstämme isoliert und die Außenmembranproteine mithilfe einer SDS-Page aufgetrennt. Nach erfolgter Trennung und anschließender Färbung der Proteinbanden mit Coomassie-Färbelösung konnte im Gel eine korrekte Bande für das in beiden Plasmiden codierte Autotransporter-CTB-Fusionsprotein gefunden werden (**Abbildung 25**). Die Integration der Autotransporter-Fusionsproteine in die

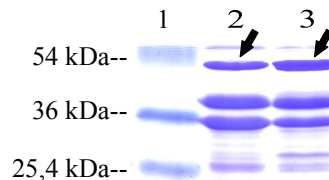


Abbildung 25: Kontrolle der Expression und der Lokalisation des Passagiers (CTB) aus pDB007 und pDB002 in der Außenmembran anhand einer SDS-PAGE (12,5 %) der Außenmembranisolate. Spur 1: Größenstandard, Spur 2: Außenmembranisolat von pDB007, Spur 3: pDB002 nach einstündiger Induktion. Die Banden des Autotransporter-Fusionsproteins sind durch die Pfeile markiert.

Außenmembran wurde also durch Aminosäureaustausch nicht beeinflusst. Es lagen zwei neue Plasmide vor, die als Vektoren für Peptidbibliotheken dienen konnten.

VERGLEICH DER KONSTITUTIVEN UND DER INDUZIERBAREN OBERFLÄCHENEXPRESSION VON PEPTIDEN MITTELS AUTODISPLAY

Zum Vergleich der konstitutiven Proteinexpression mit der induzierbaren Proteinexpression sollten die codierenden Sequenzen für die bereits bekannten Peptide 6 und 6a in die Vektoren pDB002 (induzierbare Proteinexpression) und pDB007 (konstitutive Proteinexpression) eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pDB002 und pDB007 mit den Restriktionsenzymen XhoI und SacII geschnitten und die geschnittene DNA über ein Agarosegel aufgereinigt. Analog zur bereits beschriebenen Generierung der Plasmide pDB003 und pDB004 wurden hier ebenfalls wieder zwei zueinander komplementäre, für die Peptide codierende Oligonukleotidpaare so miteinander hybridisiert, dass nach Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oligonukleotiden bereits die zu den verwendeten Restriktionsendonukleasen XhoI und SacII kompatiblen Enden vorhanden waren. Die verwendeten Oligonukleotide und die daraus resultierenden Peptidsequenzen können aus der **Tabelle 20** entnommen werden. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden ohne weitere Aufreinigung in zehnfachem molaren Überschuss zum Vektor zur Ligation eingesetzt. Je 3 µl jedes Ligationsansatzes wurden nach Dialyse zur Transformation in *E. coli* UT5600 (DE3) eingesetzt. Nach der Markierung der Bakterienzellen mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-FITC, wurden die Bakterien im Durchflusszytometer vermessen. Die Ergebnisse der Messung von jeweils 10000 Bakterienzellen bestätigten die

korrekte Funktion der veränderten Transportdomäne (**Abbildung 26**). Alle Peptide ließen sich markieren und die Fluoreszenz der peptidtragenden Bakterien war dabei stets

Tabelle 20: Übersicht über die Konstruktion der Plasmide und deren Eigenschaften.

Bezeichnung	Oligonukleotidpaar	Peptidsequenz	Vektor	induzierbare Proteinexpression
pDB005	DB005 + DB006	KDIFV	pDB007	nein
pDB006	oDB19xs + DB004	DIFVFV	pDB007	nein
pDB008	DB005 + DB006	KDIFV	pDB002	ja
pDB010	oDB19xs + DB004	DIFVFV	pDB002	ja

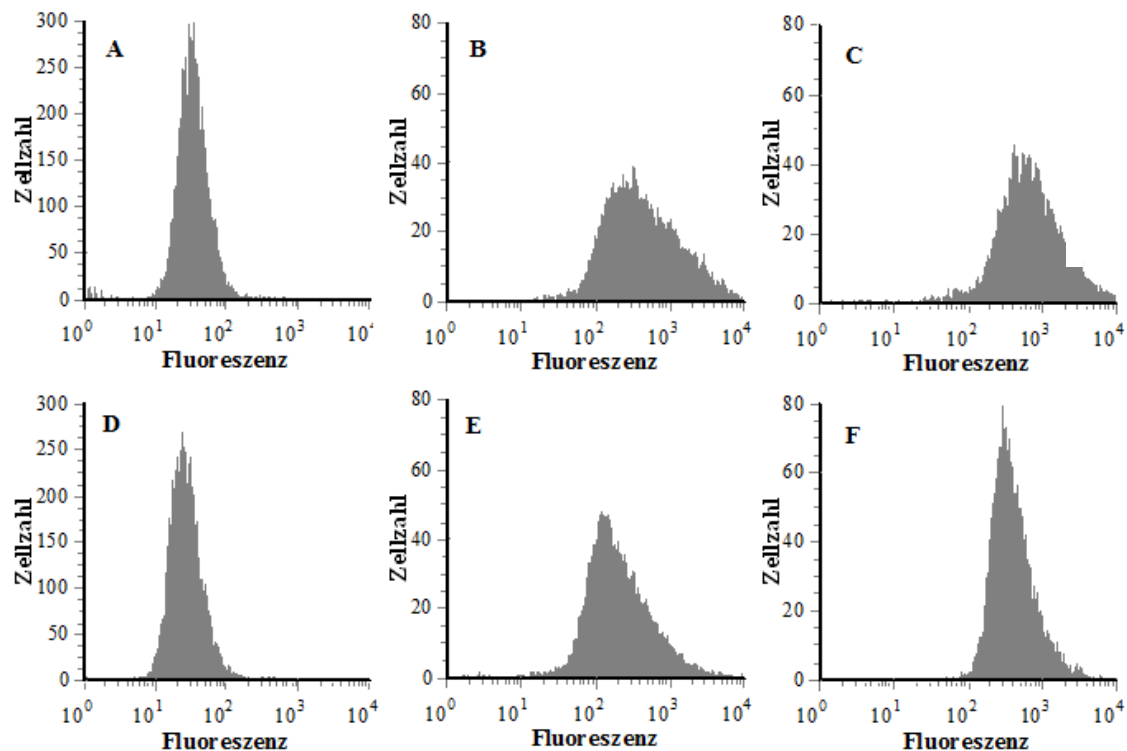


Abbildung 26: Vergleich der konstitutiven und der induzierbaren Oberflächenexpression der Peptide 6 und 6a mithilfe der Durchflusszytometrie. Vergleich der mittleren Fluoreszenzen (mF) nach Analyse von jeweils 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACS Aria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB002, nach einstündiger Induktion), mittlere Fluoreszenz (mF) 40. B: Peptid 6-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB008, nach einstündiger Induktion), mF = 866. C: Peptid 6a-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010, nach einstündiger Induktion), mF = 1142. D: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB007), mF = 33. E: Peptid 6-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB005), mF = 379. F: Peptid 6a-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB006), mF = 529.

deutlich größer als die der Kontrollzellen. Die Messung erlaubte es, die induzierbare und die konstitutive Proteinexpression miteinander zu vergleichen. Wie schon bei Pep-

tid 15HA führte die Oberflächenexpression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors nach der Markierung mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-FITC zu höheren Fluoreszenzmittelwerten (**Abbildung 26 B und C**) als bei Oberflächenexpression unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors (**Abbildung 26 E und F**). Dieser Effekt war bei den Peptiden 6 und 6a mit einer Verdopplung der Fluoreszenzwerte noch ausgeprägter als bei Peptid 15HA.

AUTODISPLAY VON PEPTIDEN UNTER VERWENDUNG DES pCOLADUET-1™ SYSTEMS

Mit dem Plasmid pDB002 lag zwar ein Vektor für die Oberflächenexpression von Peptidbibliotheken unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors vor, allerdings handelt es sich hierbei um einen aufgrund des gewählten Expressionssystems 7034 bp großen Vektor. Bei dieser Größe war mit einer herabgesetzten Transformationsrate zu rechnen. Mit dem Expressionsplasmid pCOLA-Duet-1™ (Novagen) stand ein deutlich kleineres Plasmid (3719 bp) zur Verfügung, das als weiteren Vorteil über eine zweite Multiple-Cloning-Site (MCS) zur Aufnahme einer weiteren codierenden DNA-Sequenz verfügt (**Abbildung 27**). Bevor es möglich war, die codierende Sequenz des Autotransporter-Fusionsproteins in diesen Vektor einzusetzen, mussten zunächst zwei, in pCOLADuet-1™ bereits vorhandene, aber für die Klonierung erforderliche Schnittstellen (XhoI und AgeI) aus dem Vektor entfernt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das Plasmid mit XhoI geschnitten, das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert und der Reaktionsansatz mithilfe eines Reagenziensatzes aufgereinigt. Anschließend wurden die aus dem Restriktionsverdau resultierenden, überhängenden Enden durch Inkubation mit Klenow-Enzym unter Anwesenheit von Desoxynukleotiden in glatte Enden überführt, mit T4-DNA-Ligase wieder zu einem geschlossenen Plasmid ligiert und in UT5600 (DE3) transformiert. Die korrekte Entfernung der Restriktionsschnittstelle wurde nach Plasmidisolierung durch drei unabhängige Verdau-Experimente mit XhoI und anschließender gelelektrophoretischer Analyse nachgewiesen. In gleicher Weise wurde nun aus dem Plasmid die AgeI-Erkennungssequenz entfernt. In die erste MCS des so veränderten Vektors (pAG004) konnte nun das Autotransporter-Fusionsprotein eingesetzt werden. Hierzu wurde die codierende Sequenz des Autotransporter-Fusionsproteins mithilfe einer PCR unter Verwendung zweier Oligonukleotidprimer aus den bestehenden Plasmiden amplifiziert. Als DNA-Matrize dienten die Plasmide pDB002 (Passagier: CTB), pDB008 (Passagier: Peptid 6) und pDB010 (Passagier: Peptid 6a) (**Tabelle 21**). Der erste Oligonukleotidprimer SH015 bindet an das 5'-Ende der codierenden Sequenz des Autotransporter-Fusionsproteins der Matrize und erweitert dieses um eine NcoI-Schnittstelle. Der zweite Oligonukleotidprimer SH016 bindet an das 3'-Ende der codierenden Sequenz des Autotransporter-Fusionsproteins der Matrize und fügt dort eine BclI-Schnittstelle an. Die Auswertung einer Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte bestätigte die korrekte Größe (1420 bp) der PCR-

Produkte. Diese wurden nach Aufreinigung aus dem Gel und anschließender Inkubation mit den Restriktionsenzymen NcoI und BclI, das zu BamHI kompatible

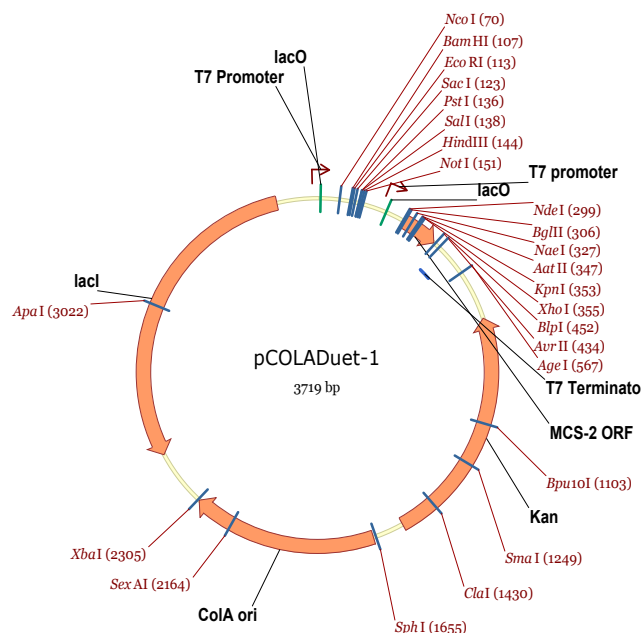


Abbildung 27: Plasmidkarte des Plasmids pCOLADuet-1™.

Enden liefert, in das mit NcoI und BamHI geschnittene Plasmid pAG004 ligiert. Die so gewonnenen Plasmide pDB011, pDB012 und pDB013 wurden in UT5600 (DE3) transformiert. Die erhaltenen Klone wurden auf die Aufnahme des Plasmids kontrolliert, indem eine Plasmidisolierung, ein anschließender Verdau mit NdeI und BamHI und eine Analyse des Verdauumusters durch Agarosegelelektrophorese durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Plasmid-DNA aller untersuchten Klone nach dem Verdau die erwarteten Fragmente (3550 bp, 857 bp, 401 bp) lieferte und die Klone die gewünschte DNA aufgenommen hatten. Der Nachweis, dass der Wechsel des

Tabelle 21: Konstruktion der Plasmide pDB011, pDB012 und pDB013.

zur PCR verwendete DNA-Matrize	Passagier des Auto- transporters	Bezeichnung des pColADuet Derivats
pDB008	Peptid 6	pDB011
pDB010	Peptid 6a	pDB012
pDB007	CTB	pDB013

Expressionssystems die Funktionalität des Autotransporter-Systems nicht beeinflusst, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie erbracht. Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) Peptid 6-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB011) und Peptid 6a-exprimierende

Bakterien wurden mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649 markiert und im Durchflusszytometer vermessen. Die Messergebnisse sind in **Abbildung 28** dokumentiert. Das Autodisplay von Peptiden und die Markierung oberflächenexprimierter Peptide wurde durch den Wechsel des Expressionssystems auf das pCOLADuet-1TM-System nicht gestört. Die peptidtragenden *E. coli* konnten nach der Markierung einwandfrei von den Kontrollzellen unterschieden werden. Die mittleren roten Fluoreszenzen unterschieden sich im Falle des Peptids 6 um Faktor 42 und im Falle von Peptid 6a um Faktor 50 von der mittleren Fluoreszenz der Kontrollzellen. Das Plasmid pDB013 verfügt über zwei Vorteile. Zum einen lag die Transformationseffizienz im Vergleich zu pDB002 um eine Zehnerpotenz höher, was auf die im Vergleich zu pDB002 geringere Größe (5090 bp im Vergleich zu 7034 bp) zurückzuführen sein könnte. Zum anderen blieb durch die zweite MCS die Möglichkeit offen, eine für ein weiteres Protein codierende Sequenz (z. B. GFP) auf dem gleichen Plasmid unterzubringen.

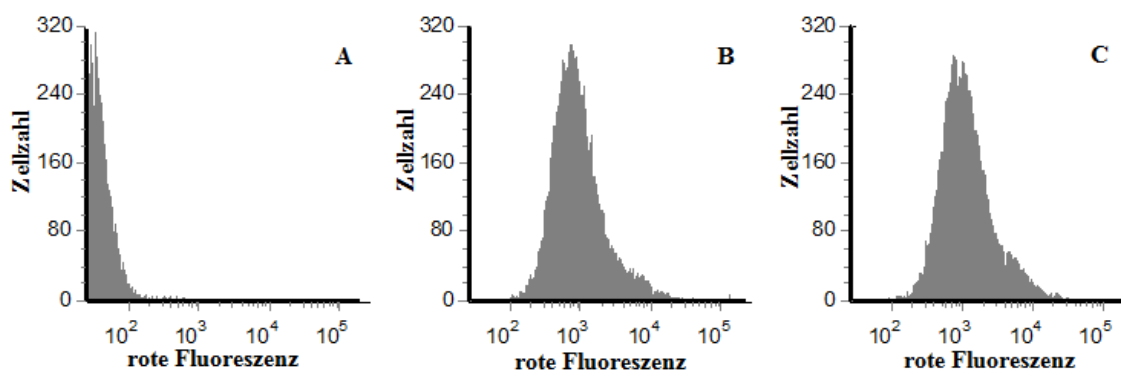


Abbildung 28: Kontrolle der Oberflächenexpression der in den pCOLADuetTM Varianten codierten Fusionsproteine mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse. Vergleich der mittleren roten Fluoreszenzen (mF) nach Analyse von jeweils 30000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSAriaTM). Die Bakterien wurden nach der Anzucht und Induktion nach dem Zweischrittverfahren fluoreszenzmarkiert. A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB002), mF = 40. B: Peptid 6-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB011), mF = 1680. C: Peptid 6a-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB012), mF = 1993.

EINFLUSS DER LINKERLÄNGE AUF DAS AUTODISPLAY VON PEPTIDEN

Im Rahmen der Untersuchung von Einflüssen des verwendeten Expressionssystems auf das Autodisplay von Peptiden sollte noch der Einfluss der Linkerlänge des Autotransporter-Fusionsproteins untersucht werden. Kontrollzellen (UT5600 (DE3)), Peptid 6-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB009), deren Autotransporter-Fusionsprotein eine lange Linkerregion (162 Aminosäuren) hat und Peptid 6-exprimierende Bakterien, deren Autotransporter-Fusionsprotein eine kurze Linkerregion (64 Aminosäuren) aufweist, wurden mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-FITC markiert und im Durchflusszytometer vermessen. Die Messergebnisse sind in **Abbildung 29**

dargestellt. Die mittlere grüne Fluoreszenz beider Stämme unterschied sich nicht deutlich voneinander. Im Vergleich mit den Kontrollzellen fluoreszierten die peptidtragenden *E. coli* um etwa den Faktor 20 stärker. Die durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass die untersuchten Veränderungen in der Linkerregion des Autotransporters keinen Einfluss auf die Markierung der Bakterien mit humanem Cathepsin G haben. Da die längere Linkerregion keine Vorteile erkennen ließ, wurde für alle folgenden Experimente die kürzere Linkerregion gewählt.

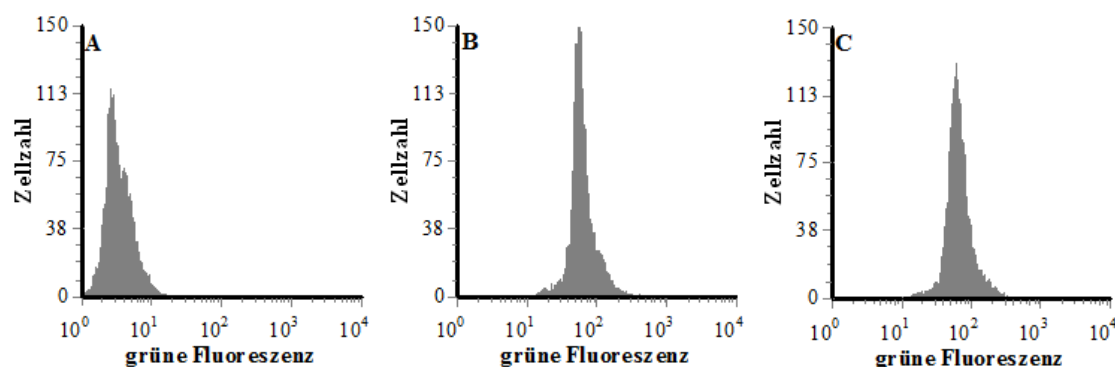


Abbildung 29: Einfluss der Linkerlänge auf das Autodisplay von Peptid 6 und die spezifische Markierung nach dem Zweischrittverfahren. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) nach Analyse von 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSScan™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 3), B: Peptid 6-exprimierende Zellen mit langem Linker (UT5600 (DE3) pDB009, mF = 61) und C: Peptid 6-exprimierende Zellen mit kurzem Linker (UT5600 (DE3) pDB008, mF = 63).

4.3 OPTIMIERUNG DER TARGET-ABHÄNGIGEN SPEZIFISCHEN FLUORESCENZMARKIERUNG OBERFLÄCHENEXPRIMIERTER PEPTIDE

4.3.1 EINSCHRITTVERFAHREN ZUR TARGET-ABHÄNGIGEN SPEZIFISCHEN FLUORESCENZMARKIERUNG OBERFLÄCHENEXPRIMIERTER PEPTIDE

Setzt man zur Markierung von oberflächenexprimierten Peptiden direkt fluoreszenzmarkiertes humanes Cathepsin G ein, so vereinfacht sich der Markierungsprozess. Die peptidtragenden Bakterienzellen werden mit fluoreszenzmarkiertem humanem Cathepsin G inkubiert, wobei wiederum die Affinität von humanem Cathepsin G zu einzelnen Peptidvarianten zur Markierung ausgenutzt wird (**Abbildung 30 B**). Nach dem Waschen sind dann lediglich die humanes Cathepsin G-bindenden Bakterienzellen fluoreszenzmarkiert (**Abbildung 30 C**). Der Vorteil dieser Methode liegt hauptsächlich in einem Zeitgewinn durch die Reduktion der notwendigen

Waschschritte. Der Nachteil besteht darin, dass man auf den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff festgelegt bleibt. Diese Methode ist also in dieser Hinsicht weniger flexibel als die Markierung nach dem Zweischriftverfahren mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und einem Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat, das leicht ausgetauscht werden kann.

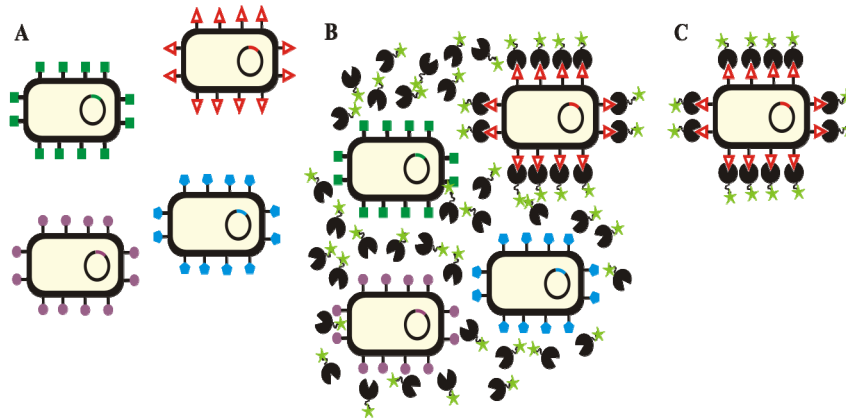


Abbildung 30: Target-abhängige spezifische Fluoreszenzmarkierung oberflächenexprimierter Peptide mit Hilfe von humanem Cathepsin G-FITC (Einschrittverfahren). Die peptidtragenden Bakterienzellen (A) wurden mit humanem Cathepsin G-FITC inkubiert (B). Nach dem Waschen bleiben nur die spezifisch gebundenen Cathepsin G-FITC Moleküle zurück. Die peptidtragende Bakterienzelle ist somit fluoreszenzmarkiert (C) und kann mithilfe dieses Labels von nicht markierten Zellen unterschieden werden.

Zur Markierung der oberflächenexprimierten Peptide wurden jeweils 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur der zu markierenden Zellen beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 20 µl 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration von 20 µM) und anschließende einstündige Inkubation bei 28 °C induziert. Von diesen Kulturen wurde jeweils genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von OD = 1 bezogen auf 1 ml lieferte. Die peptidtragenden Bakterien (UT5600 (DE3) pDB010) und die Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) wurden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS 3 % BSA gewaschen und auf eine optische Dichte von 0,25 bezogen auf 1 ml eingestellt. Die Bakterien wurden sedimentiert und in 196 µl 0,1 M HEPES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µl Cathepsin G-FITC-Konjugat (Endkonzentration von 20 µg/ml) wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 µl eiskaltem PBS wurden die markierten Bakterien in 1 ml PBS aufgenommen und in je ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz der Kontrollzellen (UT5600 (DE3), **Abbildung 31 A**) mit der mittleren grünen Fluoreszenz der Peptid 6a-exprimierenden Zellen (UT5600 (DE3) pDB010, **Abbildung 31 B**) zeigt auch bei dieser Markierungsmethode eine deutliche Verschiebung der positiven Bakte-

rienzen zu höheren Fluoreszenzen hin (Faktor 21). Somit eignet sich auch diese Methode dazu, oberflächenexprimierte Peptide spezifisch zu markieren.

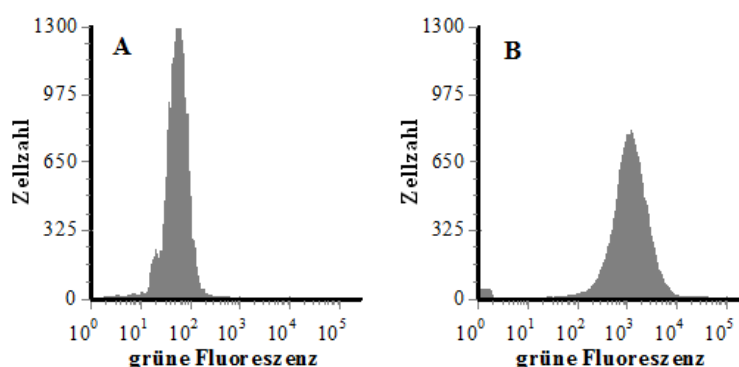


Abbildung 31: Target-abhängige spezifische Markierung mittels des Einschrittverfahrens und anschließende Analyse im Durchflusszytometer. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) von 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACSARIA™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 50); B: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010, mF = 1030)

4.3.2 VERGLEICH DER BEIDEN MARKIERUNGSMETHODEN ZUR TARGET-ABHÄNGIGEN SPEZIFISCHEN MARKIERUNG OBERFLÄCHENEXPRIMIERTER PEPTIDE

Nachdem beide Markierungsmethoden getestet waren, sollte nun ein Vergleich beider Methoden in einem Experiment durchgeführt werden. Dazu wurden Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) und Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010) einmal direkt und einmal indirekt mit Cathepsin G fluoreszenzmarkiert. Die Markierung wurde hierbei wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse von nach beiden Methoden markierten *E. coli* Zellen zeigte keine großen Unterschiede zwischen den beiden Markierungsmethoden: Bei beiden Methoden konnten Bakterienzellen, die Peptidinhhibitoren exprimierten von den Kontrollzellen ohne Peptidinhibitor eindeutig unterschieden werden (**Abbildung 32**). Die Markierungsmethoden konnten also als gleichwertig angesehen werden. Die Entscheidung, welche Methode angewendet werden soll, konnte somit von den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes abhängig gemacht werden.

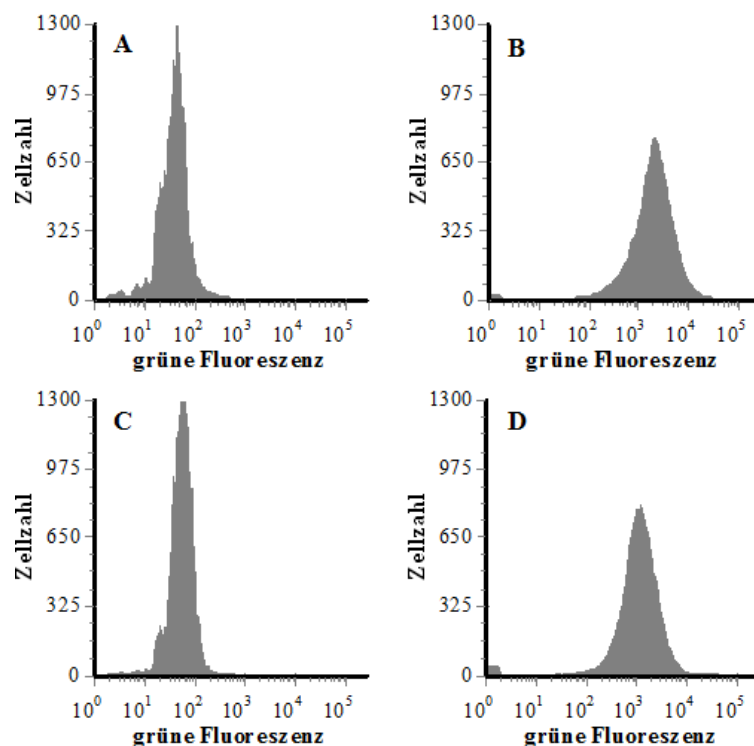


Abbildung 32: Vergleich des Zweischnittverfahrens mit dem Einschnittverfahren zur spezifischen Markierung oberflächenexprimierter Peptide am Beispiel von Peptid 6a-exprimierenden *E. coli*. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) von 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACS Aria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach dem Zweischnittverfahren markiert, mF = 48; B: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010) nach Zweischnittverfahren markiert, mF = 2038; C: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach dem Einschnittverfahren markiert, mF = 54; D: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010) nach dem Einschnittverfahren markiert, mF = 1578.

4.3.3 OPTIMIERUNG DER EINGESETZTEN MENGE AN HUMANEM CATHEPSIN G

In früheren Arbeiten wurde die Anzahl der Autotransporter-Fusionsproteine in der Außenmembran einer *E. coli*-Zelle zum einen durch Titration (Jose *et al.* 2001) und zum anderen durch Fluoreszenzmarkierung bestimmt (Handel 2003). Die dort ermittelten Zahlenwerte von $1,18 \times 10^5$ bzw. von $4,7 \times 10^5$ Autotransporter-Fusionsproteinen in der Außenmembran einer Zelle konnten als Anhaltspunkt dienen. Zu bedenken galt allerdings, dass dort Proteine (bovines Adrenodoxin, Sorbitol-Dehydrogenase) exprimiert wurden und andere Expressionssysteme zum Einsatz kamen. Wie von Handel beschrieben wurde zur Bestimmung der Molekülzahl auf der Oberfläche von *E. coli* die mittlere grüne Fluoreszenz von fünf verschiedenen Bead-Typen, die sich in der Anzahl auf ihrer Oberfläche gebundener FITC-Moleküle unterschieden, im Durchflusszytometer bestimmt (Tabelle 22). Im Anschluss daran konnte aus den Herstellerangaben (Zahl der FITC-Moleküle auf den Beads) und den ermittelten Fluoreszenzmittelwerten eine

Kalibriergerade erstellt werden (**Abbildung 33**). Durch lineare Regression konnte daraus die Geradengleichung ($R = 0,998$) ermittelt werden (**Formel 2**).

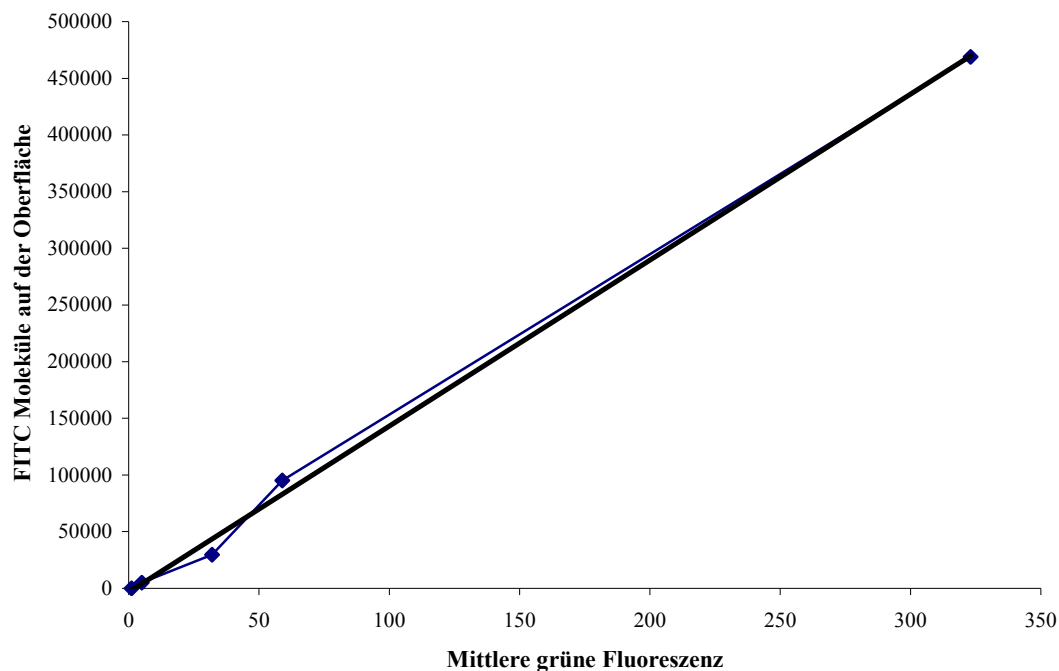


Abbildung 33: Bestimmung der Molekülzahl an exprimiertem Peptid P15HA mithilfe der mittleren Fluoreszenz nach Markierung mit humanem Cathepsin G (Zweischrittverfahren). Als Standards wurden mit einer definierten Menge an FITC beschichtete Beads im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden fünf Beadtypen analysiert, die sich nur in der Anzahl an FITC-Molekülen auf ihrer Oberfläche unterschieden und die gemessenen mittleren grünen Fluoreszenzen gegen die Anzahl der FITC-Moleküle in einem Diagramm aufgetragen. Anhand dieser Kalibrierfunktion lässt sich die Anzahl der Moleküle über die durch lineare Regression ermittelte Geradengleichung berechnen.

Zur Bestimmung der Anzahl an Autotransporter-Fusionsproteinen wurden 20 ml LB-Medium mit 200 μ l aus einer Übernachtskultur von Peptid 15HA exprimierenden *E. coli* (UT5600 (DE3) pDZ15HA) beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Von dieser Hauptkultur wurde genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von 0,5 bezogen auf 1 ml lieferte. Die peptidtragenden Bakterien wurden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS 3 % BSA gewaschen und auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Das Einstellen auf diese geringe optische Dichte sollte sicherstellen, dass das Markierungsreagenz im Überschuss vorliegt. 1 ml dieser Bakteriensuspension wurde mit 20 μ l humanem Cathepsin G 30 min (Endkonzentration von 20 μ g/ml) auf Eis inkubiert und erneut dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und wieder mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde mit 20 μ l Streptavidin- FITC-Konjugat versetzt (Endkonzentration von 20 μ g/ml) und die Suspension ebenfalls wieder

Tabelle 22: Mittlere grüne Fluoreszenzen der Quantum TM 26 Beads (Bangs Laboratories Inc., Fishers, USA)

Beadtyp	mittlere Fluoreszenz	FITC-Einheiten
A	1,14	0
B	5	5035
C	32	29620
D	59	95320
E	323	468786

30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 1 ml PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden die gleichen Geräteeinstellungen wie zur Ermittlung der Kalibriergeraden benutzt. Dies erlaubte die Berechnung der Anzahl oberflächenexprimierter Peptide durch Einsetzen des Fluoreszenzmittelwertes (138) der Peptid 15HA-exprimierenden Bakterien in die Geradengleichung (**Formel 2**). Es ergab sich eine Anzahl von rund 200000 Molekülen auf der Oberfläche, wenn man vereinfacht ein Verhältnis von eins zu eins (unter Berücksichtigung des Protein / Farbstoffverhältnisses) zwischen biotinyliertem Cathepsin G und Streptavidin-FITC-Konjugat annimmt. Eine solche Ermittlung der Anzahl an exprimierten Peptiden kann allerdings nur eine Schätzung darstellen, da die tatsächliche Stöchiometrie für die Reaktion von Biotin mit Streptavidin im Markierungsansatz (theoretisch vier zu eins) nicht bekannt war.

$$f(x) = 1464,2 \cdot x - 3281,9$$

Formel 2: Geradengleichung zur Bestimmung der Autotransportermolekülzahl auf der Zelloberfläche.

Ausgehend von 200000 Peptidmolekülen auf der Zelloberfläche einer Zelle ließ sich nun rechnerisch überprüfen, ob in den verwendeten Markierungsprotokollen genügend Cathepsin G eingesetzt worden war. Bei den vorliegenden Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass eine optische Dichte von 1 einer Bakterienzahl von 10^8 pro ml entspricht (Sambrook und Russel 2001) und humanes Cathepsin G ein Molekulargewicht von 25439,67 g / mol besitzt. Wie aus der Tabelle (**Tabelle 23**) entnommen werden kann, wurde Cathepsin G bei den bisherigen Markierungsexperimenten in fünfzigfachen Überschuss zur Markierung eingesetzt. So lag der Schluss nahe, die Auswirkungen einer Reduktion der Cathepsin G Menge auf die Markierung experimentell zu untersuchen. Dazu wurden je 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur

von Peptid 6a-exprimierenden *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) und Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 μ l einer 1 mM IPTG-Lösung (Endkonzentration von 20 μ M) und anschließender Inkubation (1 h bei 28 °C) induziert. Von diesen Hauptkulturen wurde genau die Menge an Bakterien-suspension entnommen und in jeweils drei 2 ml Reaktionsgefäße überführt, die eine optische Dichte von 1,2 bezogen auf 1 ml lieferte.

Tabelle 23: Geschätzte molekulare Verhältnisse zwischen Cathepsin G und den exprimierten Peptiden.

Cathepsin G Menge	Mol Cathepsin G	Cathepsin G Moleküle	Anzahl oberflächen-exprimierter Peptide bei OD = 1
5 μ l	$0,49 \cdot 10^{-9}$	$2,96 \cdot 10^{14}$	$2 \cdot 10^{13}$
10 μ l	$0,93 \cdot 10^{-9}$	$5,38 \cdot 10^{14}$	$2 \cdot 10^{13}$
20 μ l	$1,97 \cdot 10^{-9}$	$1,08 \cdot 10^{15}$	$2 \cdot 10^{13}$

Die zu markierenden Bakterien wurden dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS 3 % BSA gewaschen und auf eine optische Dichte von 1 eingestellt. Abweichend von den vorangegangenen Markierungen wurden die Zentrifugationsschritte ebenfalls verändert. Nach dem bisherigen Protokoll (12000 g, 1 min) wurden sehr kompakte Bakteriensedimente erhalten, die sich nur schlecht resuspendieren ließen. Abhilfe schaffte die Umstellung aller Zentrifugationsschritte während der Markierung auf eine zehnssekündige Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge. Die maximale, unter diesen Bedingungen erreichte kurzzeitige Zentrifugalkraft betrug 10000 g. Je 1 ml dieser Bakterien-suspension wurde mit 5 μ l, 10 μ l und 20 μ l humanem Cathepsin G versetzt (Endkonzentration von 5 μ g/ml, 10 μ g/ml und 20 μ g/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde dreimal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und wieder mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Alle Ansätze wurden mit 20 μ l Streptavidin-FITC Konjugat (Endkonzentration von 20 μ g/ml) versetzt und ebenfalls wieder 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 1 ml PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert (**Abbildung 34**). Die verwendeten Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers sind in unten stehender Tabelle (**Tabelle 24**) dokumentiert.

Tabelle 24: Übersicht über die der Messung zugrunde liegenden Geräteeinstellungen des Durchflusszytometers.

Parameter Name	Bedeutung	Eingestellte Verstärkung	Modus
FSC	Größe des analysierten Partikels	40	log
SSC	Granularität des analysierten Partikels	308	log
FITC	grüne Fluoreszenz	535	log
APC	rote Fluoreszenz	680	log
Threshold	nur Messwerte, die oberhalb dieses Wertes liegen, werden erfasst	700 FSC und 200 SSC	entfällt

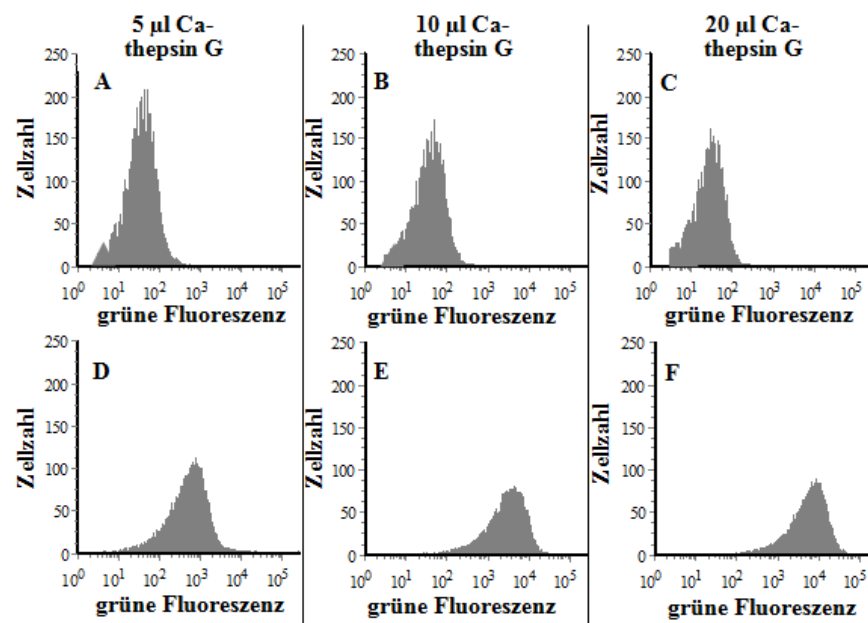


Abbildung 34: Einfluss der Menge an humanem Cathepsin G auf die Markierung nach dem Zweischnittverfahren. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) von je 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACSaria™). Sowohl die Kontrollzellen als auch die Peptid 6a-tragenden Zellen wurden jeweils mit 5 µl, 10 µl, 20 µl humanem Cathepsin G für dreißig Minuten inkubiert und nach dem Protokoll des Zweischnittverfahrens weiterbehandelt. A: Kontrollzellen UT5600 (DE3) mit 5 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 5 µg/ml) inkubiert, mF = 60; B: Kontrollzellen UT5600 (DE3) mit 10 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 10 µg/ml) inkubiert, mF = 55; C: Kontrollzellen UT5600 (DE3) mit 20 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 20 µg/ml) inkubiert, mF = 61; D: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) mit 5 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 5 µg/ml) inkubiert, mF = 1986; E: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) mit 10 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 10 µg/ml) inkubiert, mF = 2560; F: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) mit 20 µl biotinyliertem humanen Cathepsin G (Endkonzentration: 20 µg/ml) inkubiert, mF = 8172.

In allen drei Ansätzen konnten die peptidtragenden Bakterienzellen eindeutig von den Kontrollzellen unterschieden werden. Die mittlere grüne Fluoreszenz nahm bei den pep-

tidtragenden Bakterien proportional zur eingesetzten Cathepsin G Menge zu, während die mittleren grünen Fluoreszenzen der Kontrollen nahezu unverändert blieben. Für das spätere Aussortieren positiver Varianten einer Bibliothek war es wünschenswert, dass der Abstand zwischen der positiven und negativen Population möglichst groß ist. Eine Reduktion der Cathepsin G Menge kam nicht infrage, da dadurch beide Populationen dichter zusammenrücken. Eine weitere Erhöhung des Überschusses an humanem Cathepsin G um den Faktor 10 führte lediglich zu einer minimalen Steigerung der mittleren grünen Fluoreszenz (154 im Vergleich zu 134, nicht gezeigt). Um Markierungsreagenzien zu sparen, wurde bei allen folgenden Markierungen die eingesetzte Zellzahl auf ein Fünftel ($OD = 0,2$) reduziert, wodurch von allen Markierungsmaterialien ebenfalls nur noch ein Fünftel gebraucht wurde.

4.3.4 OPTIMIERUNG DER INKUBATIONSDAUER MIT HUMANEM CATHEPSIN G

Ein weiterer Parameter, dessen Auswirkungen auf die Markierung getestet wurde, ist die Inkubationsdauer mit humanem Cathepsin G während der Markierung. Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Markierungsergebnisses von der Inkubationszeit mit humanem Cathepsin G während der Markierung wurden je 20 ml LB-Medium mit 200 μ l aus einer Übernachtskultur von Peptid 6a-exprimierenden *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) und Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 μ l einer 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration von 20 μ M) und anschließender Inkubation (1 h bei 28 °C) induziert. Von diesen Hauptkulturen wurde genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in jeweils vier 2 ml Reaktionsgefäße überführt, die eine optischen Dichte von 0,5 bezogen auf 1 ml lieferte. Bei der Markierung wurden wieder alle Zentrifugationsschritte auf eine zehnsekündige Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge verkürzt. Nach dreimaligem Waschen der Bakteriensuspensionen mit PBS 3 % BSA wurde die optische Dichte auf einen Wert von 0,2 mit 0,1 M HEPES-Puffer pH = 7,4 eingestellt. Jeweils 196 μ l dieser Suspensionen wurden mit 4 μ l der Lösung von humanem Cathepsin G-FITC-Konjugat versetzt (Endkonzentration 20 μ g/ml). Nach 5 min, 10 min, 20 min und 30 min Inkubation bei 37 °C wurde jeweils ein Aliquot von den Kontrollzellen und den peptidtragenden Zellen dreimal mit je 200 μ l eiskaltem PBS gewaschen, wieder in 196 μ l eiskaltem PBS resuspendiert, mit je 4 μ l Streptavidin-FITC-Konjugat versetzt (Endkonzentration 20 μ g/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 μ l PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert (**Abbildung 35**). Bereits nach fünf Minuten Inkubationsdauer mit humanem Cathepsin G ließen sich die peptidtragenden Bakterien eindeutig von den Kontrollzellen unterscheiden (Fluoreszenzzunahme um den Faktor 25,

Abbildung 35 A und E). Nach zehnminütiger Inkubation mit humanem Cathepsin G-FITC-Konjugat nahm der Mittelwert der grünen Fluoreszenz der peptidtragenden Zellen noch weiter zu (Fluoreszenzzunahme um den Faktor 55, **Abbildung 35 B und F**). Die

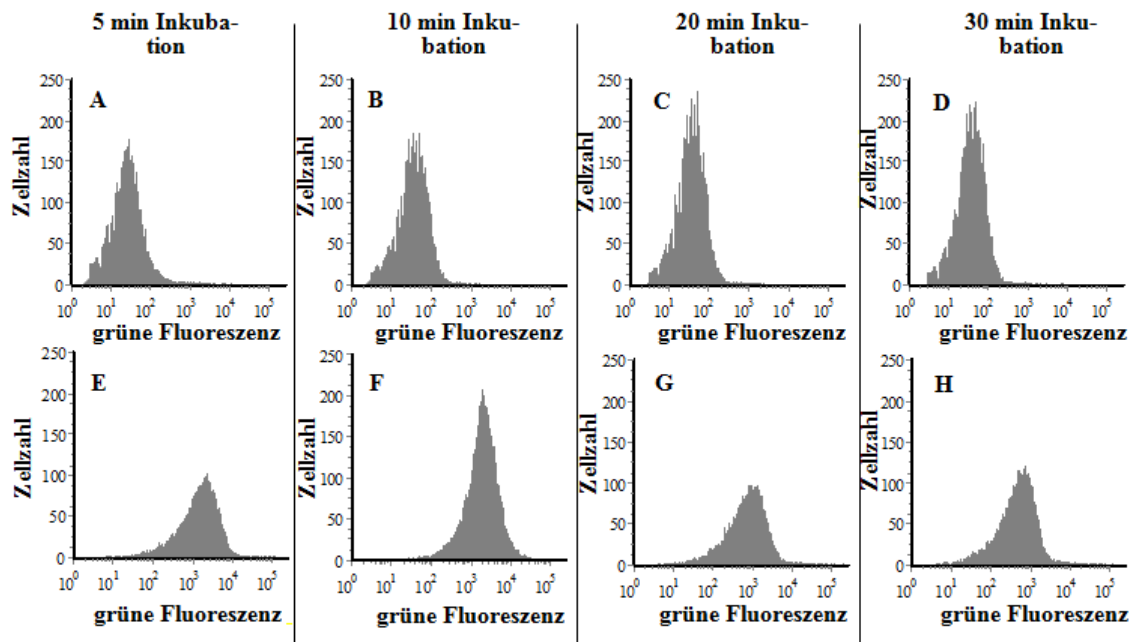


Abbildung 35: Auswirkung der Inkubationsdauer mit humanem Cathepsin G auf die Markierung nach dem Einschrittverfahren. Sowohl von den Kontrollzellen als auch von den Peptid 6a-tragenden Zellen wurde nach 5-, 10-, 20- und 30-minütiger Inkubationsdauer mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G jeweils ein Aliquot entnommen und nach der Protokoll des Einschrittverfahrens weiterbehandelt. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenz (mF) von je 30000 Bakterienzellen nach Analyse im Durchflusszytometer (FACS Aria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach 5-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 117; B: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach 10-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 58; C: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach 20-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 61; D: Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) nach 30-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 63; E: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) nach 5-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 2867; F: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) nach 10-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 3168; G: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) nach 20-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 2091; H: Peptid 6a-exprimierende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) nach 30-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem humanen Cathepsin G, mF = 1458.

durchflusszytometrische Analyse der Markierungsansätze, die 20 min (**Abbildung 35 C und G**), beziehungsweise 30 min (**Abbildung 35 D und H**) inkubiert wurden, zeigten abnehmende Mittelwerte der grünen Fluoreszenz (Fluoreszenz nur noch um Faktor 34 bzw. 23 erhöht). Eine maximale Markierung der Bakterien war also bereits nach einer Inkubationsdauer von 10 min erreicht. Auffällig war, dass die mittleren Fluoreszenzen ab einer Inkubationsdauer mit humanem Cathepsin G von 10 min

wieder abnehmen. Ein Grund für diese Abnahme der mittleren Fluoreszenz könnte in der Tatsache begründet sein, dass es sich beim Target humanes Cathepsin G um eine Protease handelt. Die Linkerregion könnte Schnittstellen für Cathepsin G enthalten, was zu einem Verlust des oberflächenexprimierten Inhibitorpeptids und damit auch zu einem Verlust der Fluoreszenz geführt haben konnte. Für zukünftige Markierungsexperimente konnte, basierend auf diesen Ergebnissen, die Inkubationsdauer mit dem Targetenzym von 30 min auf 10 min verkürzt werden und dadurch nicht nur eine Zeitersparnis erreicht werden, sondern auch die Markierung deutlich verbessert werden.

4.3.5 ERPROBUNG EINES ZUSATZES VON TWEEN 20 ZUR WASCHLÖSUNG ZUR REDUKTION UNSPEZIFISCHER BINDUNG DER MARKIERUNGS-REAGENZILIEN

Nachdem die Auswirkungen der Inkubationszeit und der eingesetzten Enzymmenge auf die Markierungsreaktion überprüft wurden, sollte nun getestet werden, ob sich die Zahl der Waschschrirte von drei Waschschrirten auf einen Waschschrirte reduzieren lässt. Zur Klärung dieser Frage wurden je 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernacktkultur von Peptid 6a-exprimierenden *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB010) und Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 µl einer 1 mM IPTG-Lösung (Endkonzentration 20 µM) und anschließender Inkubation (1 h bei 28 °C) induziert. Von diesen Hauptkulturen wurde genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von 0,5 bezogen auf 1 ml lieferte. Die Sedimentation der Bakterien erfolgte bei allen Schritten der Markierung durch zehnsckündige Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge. Nach dreimaligem Waschen der Bakteriensuspensionen mit PBS 3 % BSA wurde die optische Dichte auf einen Wert von 0,2 mit 0,1 M HEPES-Puffer pH = 7,4 eingestellt. Jeweils zweimal 196 µl dieser Suspensionen wurden in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 4 µl der Lösung von biotinyliertem humanen Cathepsin G versetzt (Endkonzentration 20 µg/ml) und 10 min bei 37 °C inkubiert. Je ein Aliquot der Kontrollzellen und der peptidtragenden Zellen wurde einmal mit je 200 µl eiskaltem PBS gewaschen, wieder in 196 µl eiskaltem PBS resuspendiert, mit je 4 µl Streptavidin-FITC-Konjugat versetzt (Endkonzentration 20 µg/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem einmaligen Waschen mit je 200 µl PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Das jeweils verbleibende Aliquot der Kontrollzellen und der peptidtragenden Zellen wurde einmal mit je 200 µl eiskaltem PBS, dem 0,1 % TWEEN 20 zugesetzt worden war, gewaschen, wieder in 196 µl eiskaltem PBS resuspendiert, mit je 4 µl Streptavidin-FITC-Konjugat versetzt (Endkonzentration 20 µg/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem einmaligen Waschen mit 200 µl PBS 0,1 % TWEEN 20 wurden die Bakterien in 1 ml PBS re-

suspendiert und im Durchflusszytometer analysiert (**Abbildung 36**). Die Reduktion der Anzahl der Waschschrte wirkte sich negativ auf das Markierungsergebnis aus. Das Auftreten zweier Bakterienpopulationen in der Histogrammdarstellung der Analyseergebnisse der Kontrollzellen legt den Schluss nahe, dass es teilweise zu einer unspezifischen Bindung des Enzyms oder des Streptavidin-FITC-Konjugats gekommen sein könnte (**Abbildung 36 A**). Diese unspezifische Bindung konnte zwar durch den Zusatz von 0,1 % TWEEN 20 gemindert, aber nicht völlig aufgehoben werden (**Abbildung 36 B**). Bei den Peptid 6a-exprimierenden Zellen war eine leichte Verschiebung des Fluoreszenzmittelwertes zu niedriger Fluoreszenz hin zu beobachten,

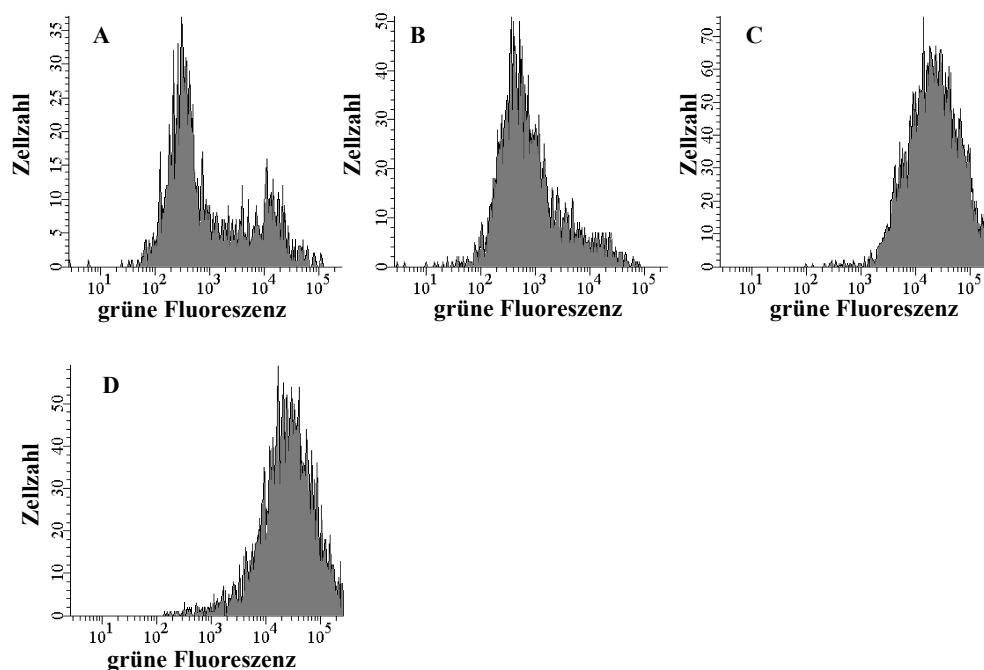


Abbildung 36: Auswirkung des Zusatzes von 0,1 % Tween20 zur Waschlösung bei der Markierung nach dem Zweischrittverfahren. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenzen (mF) nach Analyse von jeweils 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSaria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB002)) nach einmaligen Waschen mit PBS, mF = 5290; B: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB002)) nach einmaligem Waschen mit 0,1 % TWEEN 20, mF = 2822; C: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010) nach einmaligen Waschen mit PBS, mF = 42503; D: Peptid 6a-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB010) nach einmaligem Waschen mit 0,1 % TWEEN 20, mF = 39787.

wenn der Waschlösung 0,1 % TWEEN 20 zugesetzt worden war (**Abbildung 36 C und D**). Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass der Zusatz von 0,1 % TWEEN 20 zur Waschlösung keinen Ersatz für die zwei fehlenden Waschschrte darstellt. Bei weiteren Markierungen wurde deshalb auf diesen Zusatz verzichtet und die Anzahl der Waschschrte bei drei belassen.

4.3.6 OPTIMIERTES MARKIERUNGSPROTOKOLL

Die durchgeführten Optimierungen zur Verbesserung des Markierungsprotokolls sind im folgenden Abschnitt nochmals zusammengefasst. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde zur Markierung nur noch dieses optimierte Protokoll benutzt. Zur Markierung wurden 20 ml LB-Medium mit 200 µl aus einer Übernachtskultur der zu untersuchenden Bakterien beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Bei einer optischen Dichte von 0,6 wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 µl einer 1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration 20 µM) und anschließender Inkubation (1 h bei 28 °C) induziert. Von diesen Hauptkulturen wurde genau die Menge an Bakteriensuspension entnommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die eine optische Dichte von 0,5 bezogen auf 1 ml lieferte. Die Sedimentation der Bakterien erfolgte bei allen Schritten der Markierung durch zehnstündige Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge. Nach dreimaligem Waschen der Bakteriensuspensionen mit PBS 3 % BSA wurde die optische Dichte auf einen Wert von 0,2 mit 0,1 M HEPES-Puffer pH = 7,4 eingestellt. Dann wurden 196 µl dieser Suspensionen in frische 2 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 4 µl der Lösung von Enzym (Endkonzentration 20 µg/ml) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien dreimal mit je 200 µl eiskaltem PBS gewaschen und anschließend wieder in 196 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurden dann im Falle der indirekten Markierung 4 µl Streptavidin-FITC-Konjugat hinzugegeben (Endkonzentration 20 µg/ml) und 30 min auf Eis inkubiert. Im Falle der direkten Markierung mit humanem Cathepsin G-FITC-Konjugat entfiel dieser Inkubationsschritt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit je 200 µl PBS wurden die Bakterien in 1 ml PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

4.3.7 OPTIMIERUNG DER GERÄTEPARAMETER DES DURCHFLUSSZYTOMETERS MIT HILFE EINER KONTROLLFÄRBUNG

Die in früheren Arbeiten (Sambrook und Russel 2001; Zangen 2002; Handel 2003) etablierten Geräteeinstellungen bezogen sich auf ein FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) und konnten nicht in Verbindung mit dem neueren FACS Aria™ (Becton Dickinson, Heidelberg) benutzt werden. Aus den genannten Arbeiten war auch bekannt, dass es zur Optimierung der Geräteeinstellungen sehr wichtig ist, eine klare Unterscheidung zwischen verunreinigenden Partikeln und Bakterienzellen treffen zu können. Anstelle des sehr teuren Fluoreszenzfarbstoffes RH414, der in früheren Arbeiten benutzt wurde, wurde der kostengünstige Fluoreszenzfarbstoff Nile Blue A benutzt. Dieser Farbstoff wird häufig für die Färbung von Nervengewebe für die Fluoreszenzmikroskopie benutzt. Er färbt aber ebenfalls im Inneren der Bakterien vorhandene Polyhydroxyalkansäurederivate (Spiekermann *et al.* 1999). Der *E. coli* Stamm UT5600 wurde in der

genannten Literatur als Negativkontrolle benutzt, zeigte aber eine geringe Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop. Die Idee war nun zu untersuchen, ob diese geringe Fluoreszenz für eine Detektion von Nile Blue A gefärbten *E. coli* mithilfe des Durchflusszytometers ausreicht. Dem Kulturmedium der Hauptkulturen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Nile Blue A in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Während der Wachstumsphase sollte der Fluoreszenzfarbstoff in die Bakterienzellen aufgenommen werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, schien Nile Blue A das Wachstum der Bakterien nicht zu beeinflussen (Spiekermann *et al.* 1999). Um die grundlegende Eignung des Farbstoffes Nile Blue A zur Kontrollmarkierung von *E. coli* für die Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden UT5600 (DE3)-Zellen, die in der Wachstumsphase mit Nile Blue A in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt worden waren, mit UT5600 (DE3)-Zellen ohne Zusatz des Farbstoffs im Durchflusszytometer verglichen (**Abbildung 37**). Die mit Nile Blue A behandelten Zellen ließen sich anhand der roten Fluoreszenz eindeutig von nicht behandelten

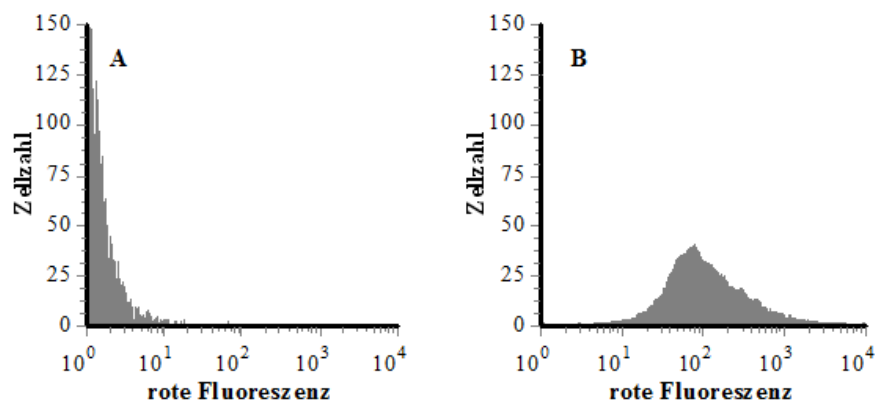


Abbildung 37: Färbung von *E. coli* mit Nile Blue A. Analyse von jeweils 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSARIA™). Während der Anzucht wurde dem Kulturmedium einer Hauptkultur der Farbstoff Nile Blue A in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. A: Kontrollzellen ohne Nile Blue A Zusatz (UT5600 (DE3)); B: Kontrollzellen mit Nile Blue A Zusatz (UT5600 (DE3)).

Zellen unterscheiden. Im Anschluss daran wurden Kontrollzellen und Peptid 6-tragende Zellen entsprechend des optimierten Markierungsprotokolls mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und anschließend mit Streptavidin-FITC-Konjugat inkubiert und so die oberflächenständigen Peptide fluoreszenzmarkiert, um die Verträglichkeit von Nile Blue A mit der spezifischen Färbung oberflächenexprimierter Peptide zu testen. Die Ergebnisse der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse von 10000 *E. coli* Zellen ist in **Abbildung 38** dargestellt. Die Annahme, dass sich *E. coli* UT5600 (DE3) mit Nile Blue A für die Durchflusszytometrie anfärben lassen, wurde durch das durchgeführte Experiment bestätigt. Im Vergleich zu den lediglich mit biotinyliertem huma-

nen Cathepsin G und anschließend mit Streptavidin-FITC-Konjugat markierten Kontrollzellen (**Abbildung 38 A**) zeigten die zusätzlich mit Nile Blue A gefärbten Kontrollzellen eine stärkere rote Fluoreszenz (**Abbildung 38 B**). Nun blieb noch zu überprüfen, ob der neue Farbstoff die spezifische Markierung mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und mit Streptavidin-FITC-Konjugat negativ beeinflusst. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Peptid 6-tragenden *E. coli* Zellen (**Abbildung 38 C**) konnten eindeutig von den gleich behandelten Kontrollzellen (**Abbildung 38 B**) unterschieden werden. Der Fluoreszenzfarbstoff Nile Blue A stellte also eine kostengünstige Alternative zu dem zuvor genutzten Fluoreszenzfarbstoff RH414 dar.

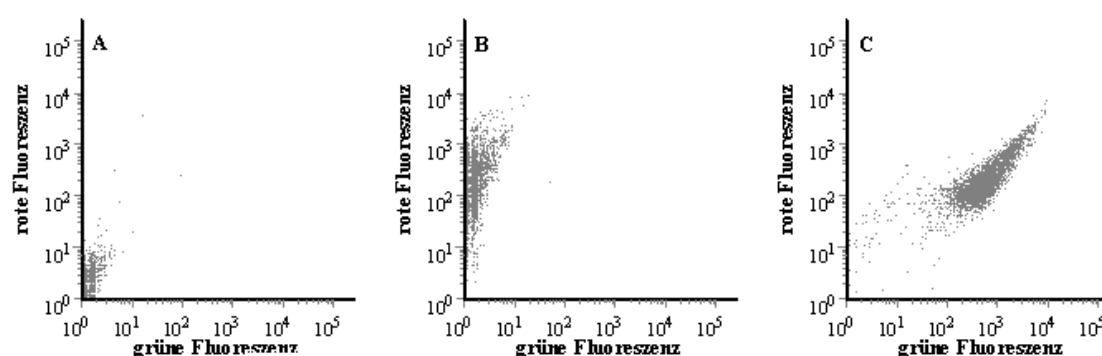


Abbildung 38: Kombination der unspezifischen Färbung von *E. coli* mit Nile Blue A mit der spezifischen Färbung des oberflächenexprimierten Peptids. Analyse von jeweils 10000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACS Aria™). Während der Anzucht wurde dem Kulturmedium der Hauptkulturen der Farbstoff Nile Blue A hinzugegeben und die Bakterien nach dem Zweischnittverfahren gefärbt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. A: Kontrollzellen nur mit biotinyliertem Cathepsin G und mit Streptavidin-FITC markiert (UT5600 (DE3)), B: Kontrollzellen mit Nile Blue A gefärbt (UT5600 (DE3)), C: Peptid 6-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB008).

Ein weiterer Ansatz, Bakterienzellen von verunreinigenden Partikeln zu unterscheiden, bestand darin, die Bakterien dazu zu veranlassen, zellintern ein Fluoreszenzlabel zu produzieren. Der Arbeitsgruppe stand ein Plasmid zur Verfügung, das für das grün fluoreszierende Protein (GFP) codiert und mit den verwendeten Autotransporterplasmiden kompatibel ist. Bakterienzellen, die beide Plasmide enthielten, exprimierten auf der Zelloberfläche ein Peptid und zellintern GFP. Zunächst wurden je 20 ml LB-Medium mit je 200 µl einer Übernachtskultur von GFP bildenden *E. coli* Zellen (UT5600 (DE3) pKE19) und Kontrollzellen beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden 1 ml der Kulturen dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit PBS auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt. Jeweils 30000 Kontrollzellen und GFP-exprimierende Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert und die Analyseergebnisse in **Abbildung 39** dokumentiert. Wie erwartet ließen sich die GFP-

exprimierenden *E. coli* eindeutig von den Kontrollzellen unterscheiden. Das GFP ließ sich also als internes Label für *E. coli* in der Durchflusszytometrie benutzen.

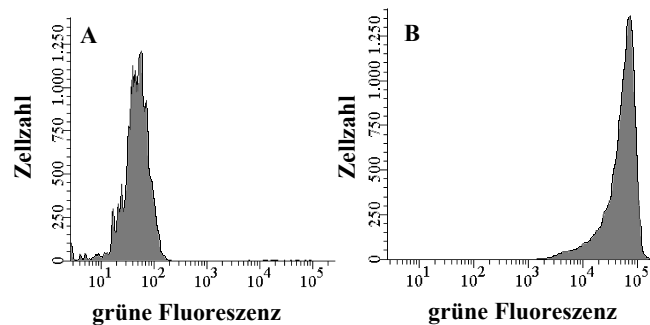


Abbildung 39: Expression von GFP als internes Fluoreszenzlabel für *E. coli* für die Durchflusszytometrie. Vergleich der mittleren grünen Fluoreszenzen (mF) nach Analyse von jeweils 30000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACS Aria™). A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3), mF = 62; B: GFP-bildende Zellen (UT5600 (DE3) pKE19), mF = 15882.

Eine Schwierigkeit musste allerdings noch überwunden werden. Das GFP und der bei der spezifischen Markierung verwendete Fluoreszenz Farbstoff (FITC) emittieren nach Anregungen durch Laserlicht Licht ähnlicher Wellenlänge (GFP: $\lambda_{\text{max}} = 509 \text{ nm}$, FITC: $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), welches im Durchflusszytometer vom gleichen Detektor registriert wird. Eine gleichzeitige Verwendung dieser beiden Farbstoffe ist ausgeschlossen, da sich die Signale von GFP und FITC überlagern würden. Eine Lösung für dieses Problem bestand darin, ein anderes Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat für die spezifische Markierung oberflächenexprimierter Peptide zu benutzen. Es wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (Dylight 649) gewählt, dessen Emissionsmaximum ($\lambda_{\text{max}} = 649 \text{ nm}$) sich deutlich vom Emissionsmaximum von GFP ($\lambda_{\text{max}} = 509 \text{ nm}$) unterschied und dadurch sichergestellt war, dass beide Fluoreszenzsignale von verschiedenen Detektoren registriert werden. Kontrollzellen (UT5600 (DE3), Peptid 15-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB003) und Peptid 6-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB009) wurden entsprechend des zuvor vorgestellten Protokolls mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649®-Konjugat inkubiert. Die so gefärbten Bakterien wurden im Durchflusszytometer analysiert und die Ergebnisse dieser Analyse in **Abbildung 40** dargestellt. Die mittlere rote Fluoreszenz (mF) der Kontrollzellen betrug 65, die mF der Peptid 15-exprimierenden Zellen 1061 und die mF der Peptid 6-exprimierenden Zellen 1120. Die beiden ein Peptid exprimierenden Stämme konnten deutlich von den gleich behandelten Kontrollzellen anhand des höheren Fluoreszenzmittelwertes für die rote Fluoreszenz unterschieden werden. Diese Ergebnisse bestätigten die Annahme, dass sich das Streptavidin-FITC-Konjugat einfach durch das Streptavidin-Dylight 649-Konjugat ersetzen lässt. Durch den Wechsel des Streptavidin-Konjugats war es nun möglich, die spezifische Markierung oberflächenständiger Pepti-

de mit der zellinternen Expression des GFP, also der spezifischen Markierung aller *E. coli* Zellen, zu kombinieren.

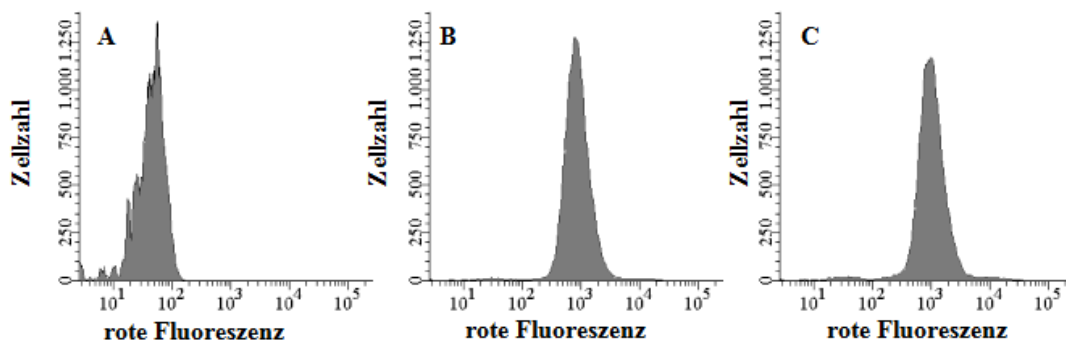


Abbildung 40: Überprüfung der Eignung des roten Fluoreszenzfarbstoffs Streptavidin-Dylight 649 zur spezifischen Markierung oberflächenexprimierter Peptide nach dem Zweischnittverfahren. A: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pDB002, mittlere Fluoreszenz (mF) = 65); B: Peptid 15HA-tragende Zellen (UT5600 (DE3) pDB003, mF = 1061); C: Peptid 6-tragende *E. coli* (UT5600 (DE3) pDB009, mF = 1120).

Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19 und Peptid 6-exprimierende Zellen (UT5600 (DE3) pDB008) wurden mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649®-Konjugat inkubiert. Zusätzlich zu den so behandelten Bakterien wurden auch unbehandelte Kontrollzellen im Durchflusszytometer analysiert und die Ergebnisse dieser Analyse in **Abbildung 41** dargestellt. Ein Vergleich der unbehandelten Kontrollzellen (**Abbildung 41 A**) mit den markierten Kontrollzellen (**Abbildung 41 B**) zeigte nur eine geringfügige Steigerung der roten Fluoreszenz. Auffällig war, dass neben der erwarteten, grün fluoreszierenden Population (Quadrant Q4 in der Abbildung) noch eine weitere Population mit geringer grüner Fluoreszenz zu erkennen war (Quadrant Q3 in der Abbildung). Eine Hypothese wäre, dass es sich bei dieser Population um Zelltrümmer handeln könnte, die durch die Vorbereitung der Bakterien auf die Durchflusszytometrie entstanden sein könnten. Bei der Probenvorbereitung könnte ein Teil der Bakterien zerstört worden sein, wobei das darin vorhandene GFP in die Waschlösung freigesetzt worden sein könnte. Eine zweite Hypothese wäre, dass es sich hierbei um verunreinigende Partikel handelt. Betrachtet man die Analyseergebnisse der Peptid 6-exprimierenden *E. coli* (**Abbildung 41 C**), so sind dort neben der erwarteten sowohl grün als auch rot fluoreszierenden Population (Quadrant Q2 in der Abbildung), zwei weitere Populationen (Quadrant Q1 und Q3 in der Abbildung) zu erkennen. Überträgt man die für die Kontrollzellen aufgestellte Hypothese auf die Peptid exprimierenden Zellen, so wird die Hypothese durch die Analyseergebnisse gestützt. Im Quadranten Q1 könnten sich Zelltrümmer befinden, die im Gegensatz zu den Kontrollzellen auch einen Bindungspartner (Peptid 6) für humanes Cathepsin G exprimiert haben und somit

erwartungsgemäß eine größere rote Fluoreszenz bei gleichzeitiger niedriger grüner Fluoreszenz aufweisen. Bei den weder grün noch rot fluoreszierenden Partikeln im Quadranten Q3 (**Abbildung 41 C**) könnte es sich um Bakterien handeln, die kein Peptid exprimierten oder um sonstige verunreinigende Partikel. Durch diese Art von Doppelfärbung der *E. coli* Zellen konnte zwischen intakten Bakterienzellen und verunreinigenden Partikeln unterschieden werden. Erst diese Unterscheidung machte es möglich, optimierte Geräteeinstellungen für das FACSaria™ zu ermitteln (**Tabelle 25**) und die Analyse gegebenenfalls auf Bakterienzellen einzuschränken (**Abbildung 41 D und E**). An dieser Stelle galt es noch zu bedenken, dass es bei einer Expression zweier rekombinanter Genprodukte in einer Zelle zu einer gegenseitigen Beeinflussung in der

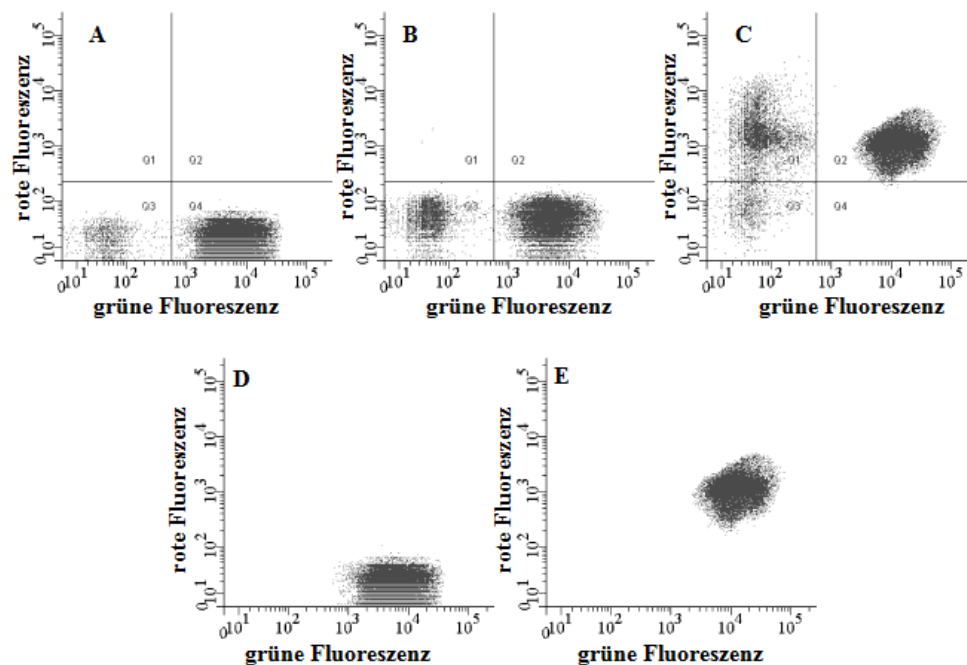


Abbildung 41: Optimierung der Einstellungen des Durchflusszytometers durch Kombination der spezifischen Färbung eines oberflächenständigen Peptids nach dem Zweischrittverfahren mit der zytoplasmatischen Expression von GFP als internem Label zur Markierung von *E. coli*. A: unmarkierte GFP-exprimierende Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19); B: nach dem Zweischrittverfahren behandelte Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19); C: Autodisplay von Peptid 6, zusätzliche Expression von GFP und anschließende Färbung nach dem Zweischrittverfahren (UT5600 (DE3) pKE19 + pDB008). D: unmarkierte GFP-exprimierende Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19) nach Eingrenzung der Analyse auf Bakterien; E: Autodisplay von Peptid 6, zusätzliche Expression von GFP und anschließende Färbung nach dem Zweischrittverfahren (UT5600 (DE3) pKE19 + pDB008) nach Eingrenzung der Analyse auf Bakterien.

Expressionsstärke der Einzelprodukte kommen kann. Ein Vergleich der mittleren Fluoreszenzen eines Peptid 6-exprimierenden Stammes nach der Inkubation mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649®-Konjugat mit einem ebenso

behandelten Bakterienstamm, der zusätzlich zu Peptid 6 noch das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, zeigten bei der durchflusszytometrischen Analyse keine großen Unterschiede in ihren mittleren Fluoreszenzen. Eine störende gegenseitige Beeinflussung konnte also nicht festgestellt werden. Für spätere Experimente war es noch erforderlich zu überprüfen, ob die Bereitschaft der Bakterien zur Aufnahme von Plasmid-DNA durch das für GFP codierende Plasmid herabgesetzt wurde. Um dies zu klären, wurde die Transformationseffizienz für beide Bakterienstämme (UT5600 (DE3) und UT5600 (DE3) pKE19) bestimmt. Die Transformationseffizienz lag für beide

Tabelle 25: Optimierte Geräteeinstellungen für das Durchflusszytometer (FACSAria™) zur Analyse von *E. coli*.

Parameter Name	Bedeutung	Eingestellte Verstärkung	Modus
FSC	Größe des analysierten Partikels	40	log
SSC	Granularität des analysierten Partikels	308	log
FITC	grüne Fluoreszenz	375	log
APC	rote Fluoreszenz	680	log
Threshold	nur Messwerte, die oberhalb dieses Wertes liegen, werden erfasst	700 FSC und 200 SSC	entfällt

Stämme je nach Charge zwischen 10^8 und 10^9 Transformanten pro μg Plasmid-DNA. Somit konnte gezeigt werden, dass die Transformationseffizienz durch das zusätzlich in den Zellen vorhandene Plasmid pKE19 nicht herabgesetzt worden war.

4.3.8 OPTIMIERUNG DER SELEKTION EINZELNER VARIANTEN MITTELS FACS

Für den weiteren Fortgang der Experimente war es wichtig zu prüfen, inwiefern sich die Markierung mit humanem Cathepsin G, die Analyse und das Aussortieren der markierten Zellen im Durchflusszytometer auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien auswirken. Da Kunststoffgefäße in der Lage sind, Proteine und Bakterienzellen unspezifisch zu absorbieren, wurden diese unspezifischen Bindungsstellen durch Absättigung mit Rinderserumalbumin besetzt. Zur Kontrolle der Überlebensfähigkeit wurde ein Teil der Hauptkultur entnommen und während der Markierung, der Analyse und dem Sortieren im Durchflusszytometer auf Eis aufbewahrt (Kontrollsuspension). Ein weiteres Aliquot der Hauptkultur wurde zur Markierung mit humanem Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649® benutzt. Das Probenröhrchen wurde vor Beginn der Markierung gewogen. Nach der Markierung wurden die markierten Zellen im Durchflusszytometer analysiert und ein Teil davon in ein gewogenes, mit einem Milliliter LB-Medium gefülltes

Probenröhrchen aussortiert (Messsuspension). Zum Sortieren von *E. coli* mithilfe des Durchflusszytometers war es wichtig, Geräteeinstellungen zu wählen, bei denen das Durchflusszytometer alle in der Probe enthaltenen Partikel erfassen und verarbeiten kann. Der Schwellenwert wurde auf den kleinsten möglichen Wert eingestellt und die Verstärkungen für den Forwardscatter und den Sidescatter erhöht, so dass alle Partikel analysiert werden konnten und insbesondere keine Bakterienzellen unterhalb des Schwellenwerts lagen. Für Partikel unterhalb des Schwellenwerts ist das Zytometer „blind“, das heißt Bakterien, die keine humanes Cathepsin G-bindende Peptide exprimieren, könnten nicht selektiert werden und die Folgekulturen verunreinigen. Bei den Sortierungen zur Ermittlung der optimalen Einstellungen wurde das Durchflusszytometer so eingestellt, dass alle Bakterienzellen aussortiert wurden. Nach dem Sortieren wurden die aussortierten Bakterien auf Eis gelagert. Durch die dokumentierten Gewichte der Probenröhrchen war es nun möglich, das durch den Sortiervorgang entnommene Probenvolumen und die durch das Durchflusszytometer erfolgte Verdünnung der Probe zu ermitteln. Durch diese Vorgehensweise sollte sichergestellt werden, dass zur Beurteilung der Überlebensfähigkeit solche Volumina der Kontrollsuspension und der Messsuspension auf Selektivagarplatten ausplattiert werden konnten, die rechnerisch zur gleichen Anzahl von Kolonien führen sollten. Nach dem Ausplattieren wurden die Agarplatten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf beiden Platten ausgezählt. Diese Bestimmung wurde dreimal durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Kolonienzahl auf den Platten, auf die Messsuspension ausplattiert worden war, lediglich 2-10 % unter der Kolonienzahl auf den Platten lag, auf die die Kontrollsuspension ausplattiert worden war (**Tabelle 26**). Somit konnte keine signifikante Beeinflussung der Überlebensfähigkeit der Bakterien durch die Markierungsprozedur und das anschließende FACS gezeigt werden. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die Überlebensfähigkeit der Bakterien auch noch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Einer dieser Faktoren ist die Zeit, die zwischen der Markierung und der Analyse verging: Mit zunehmender Aufbewahrungszeit nahm die Zahl der toten Zellen und der Zelltrümmer zu, wobei die Markierung über einen Zeitraum von ca. einem Monat stabil blieb (nicht gezeigt).

Tabelle 26: Einfluss der Markierungsprozedur und des FACS auf die Überlebensfähigkeit der aussortierten Bakterien. Mittels FACS wurden 1000 *E. coli* Zellen in Flüssigmedium aussortiert und von dieser Bakteriensuspension wurden genau das Volumen, welches zu 250 Kolonien führen sollte, ausplattiert.

Kolonien nach Inkubation bei 37 °C für 10 h Kontrollsuspension	Kolonien nach Inkubation bei 37 °C für 10 h Messsuspension	Überlebensrate in %
250 Kolonien	245 Kolonien	98
205 Kolonien	185 Kolonien	90
238 Kolonien	221 Kolonien	93

Die in den vorhergehenden Experimenten ermittelten optimierten Geräteeinstellungen zum Sortieren von *E. coli* sind in **Tabelle 27** aufgelistet. Die **Abbildung 42** zeigt das Ergebnis einer Sortierung von UT5600 (DE3) pKE19, bei der die grüne Fluoreszenz des exprimierten GFP als Sortierkriterium benutzt wurde. Beim Aussortieren der Bakterien wurde zum einen die sogenannte „Purity“ Einstellung des FACSARIA™ (**Abbildung 42 A**) und zum anderen die „single cell“ Einstellung des Durchflusszytometers benutzt (**Abbildung 42 B**).

Tabelle 27: Optimierte Geräteeinstellungen für das Durchflusszytometer (FACSARIA™) zum Sortieren von *E. coli*.

Parameter Name	Bedeutung	Eingestellte Verstärkung	Modus
FSC	Größe des analysierten Partikels	200	log
SSC	Granularität des analysierten Partikels	500	log
FITC	grüne Fluoreszenz	535	log
APC	rote Fluoreszenz	680	log
Threshold	nur Messwerte, die oberhalb dieses Wertes liegen werden erfasst	200 SSC	entfällt

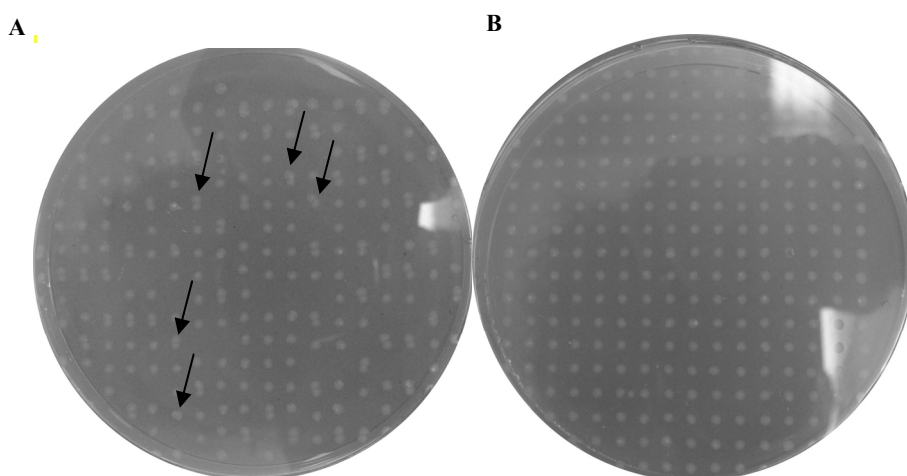


Abbildung 42: Fluoreszenz-gesteuertes Aussortieren von *E. coli* Einzelzellen auf Agarplatten.

A: Peptid 6-exprimierende *E. coli* mit „purity“ Einstellung des Durchflusszytometers aussortiert; B: Peptid 6-exprimierende *E. coli* mit der „single cell“ Einstellung des Durchflusszytometers aussortiert. Die Pfeile markieren in einander übergehende Bakterienkolonien, die Folge von ungeeigneten Sortiereinstellungen waren.

Die „single cell“ Einstellung lieferte dabei deutlich bessere Ergebnisse. Mit dieser Einstellung werden nur Tröpfchen aussortiert, die erstens den Sortierkriterien entsprechen und zweitens nur eine einzige Bakterienzelle enthalten. Tröpfchen, die zwei oder mehr positive Zellen oder eine Mischung aus positiven und negativen Zellen enthalten, werden verworfen. Bei der Sortierung auf Agarplatten oder auf Mikrotiterplatten war darauf zu achten, dass die dafür benötigte Einzelzellablage des Durchflusszytometers nur mit

einer bestimmten Geschwindigkeit arbeiten kann. Beim Sortieren einer Bibliothek bedeutete dies, dass der auszusortierende Teil der Population nicht zu groß sein durfte, da sonst pro Sekunde mehr Zellen zum Aussortieren vorhanden waren als die Einzelzellablage in der Lage war zu verarbeiten. Die Bakteriensuspension wurde in solchen Fällen mit PBS so lange weiterverdünnt, bis die Geschwindigkeit der Einzelzellablage ausreichte, um alle positiven Zellen zu verarbeiten. Um keine positiven Zellen zu verlieren, durfte die zu sortierende Probe nur circa alle 2 s ein zu sortierendes Tröpfchen enthalten.

AUFREINIGUNG EINER MISCHKULTUR VON *E. COLI* MIT HILFE DES „FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING“ (FACS)

Eine weitere Aufgabe bestand darin zu überprüfen, ob das Durchflusszytometer zur Aufreinigung der gewünschten Zellen (positive Zellen) aus einer Mischung von positiven und negativen Zellen eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Kontrollzellen und Peptid 6a-exprimierende Zellen mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und anschließend mit Streptavidin-FITC inkubiert. Bei dieser Markierung wurde mit Absicht die Menge an biotinyliertem humanen Cathepsin G auf ein Viertel (Endkonzentration: 5 µg/ml) reduziert. Damit sollte erreicht werden, dass beide Populationen bei der späteren Analyse im Durchflusszytometer dicht beisammen liegen. Die Analyseergebnisse der markierten Bakterienzellen sind in **Abbildung 43** dargestellt. Wie erwartet lagen die Populationen der Kontrollzellen und der Peptid 6a-tragenden Zellen dicht zusammen (**Abbildung 43 A**). Zur Aufreinigung wurde eine Sortierregion definiert, die alle Bakterien beinhaltete, deren Fluoreszenzwerte rechts von der in das Diagramm eingezeichneten senkrechten Linie lagen. In der Ausgangsmischung entsprach dies rund 35 % der gesamten Bakterienzahl. Nach einer Sortierrunde wurden die aussortierten Bakterien erneut analysiert und die Analyseergebnisse in **Abbildung 43 B** dargestellt. Nun wiesen 56 % der Bakterien Fluoreszenzwerte rechts von der senkrechten Linie auf, was einer Anreicherung um den Faktor 1,7 entspricht. Nach der zweiten Sortierrunde lagen rund 90 % der Fluoreszenzwerte in der Sortierregion (Faktor 2,6). Nach drei Runden des fluoreszenzaktivierten Sortierens war die Anreicherung soweit vorangeschritten, dass die Probe nun 95,2 % positive Bakterien enthielt und keine zweite Population mehr zu erkennen war. Es war also möglich, mit Hilfe des Durchflusszytometers aus einer Mischung zweier Bakterienstämme die gewünschten Bakterien mit einer hohen Reinheit herauszusortieren.

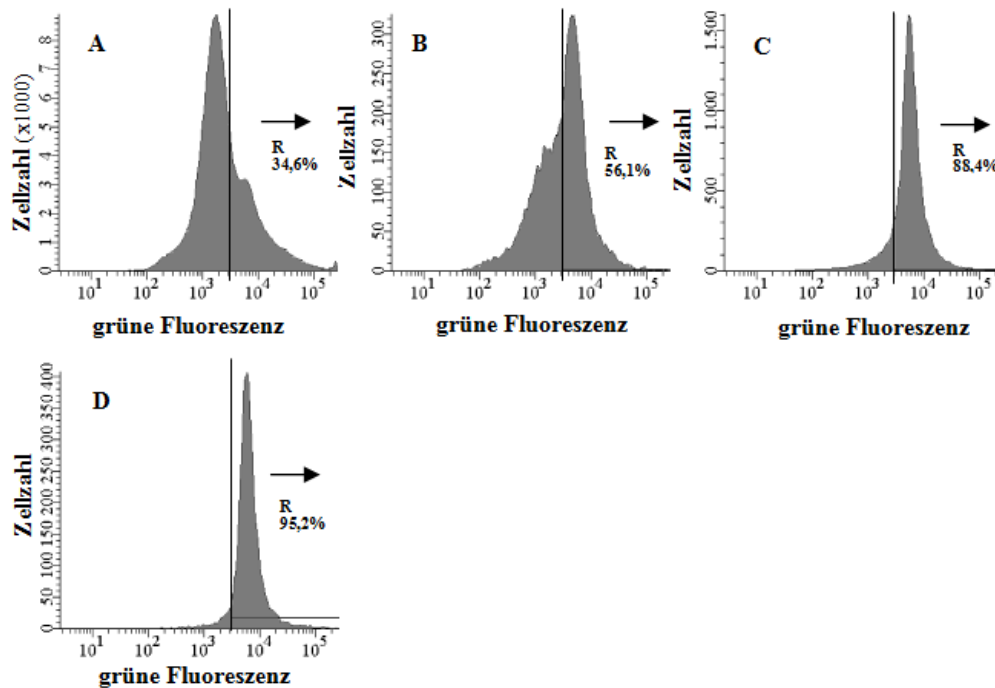


Abbildung 43: Aufreinigung einer 3:1 Mischkultur von negativen und positiven Zellen mittels FACS. Kontrollzellen (UT5600 (DE3)) und Peptid 6a-tragende Zellen UT5600 (DE3) pDB010 wurden nach der Anzucht nach dem Zweischnittverfahren markiert, im Verhältnis 3:1 gemischt und im Durchflusszytometer (FACSARIA™) analysiert (A). Die senkrechte Linie im Histogramm markiert das Sortierfenster: alle Bakterien rechts dieser Linie wurden aussortiert. Nach jeder Sortierrunde wurden die aussortierten Zellen erneut analysiert. B: nach einer Runde FACS; C: nach zwei Runden FACS; D: Ergebnis nach drei Runden FACS.

4.4 AUTODISPLAY VON PEPTIDBIBLIOTHEKEN AUF *E. COLI* UNTER DER KONTROLLE EINES INDUZIERBAREN PROMOTORS

4.4.1 AUTODISPLAY DER PEPTIDBIBLIOTHEK II

Nach den Erfahrungen aus der ersten Bibliothek stand fest, dass mehrere Veränderungen hinsichtlich der Erstellung und der Konzeption des für die Peptidbibliothek codierenden Oligonukleotid-Inserts notwendig waren. Es ist denkbar, dass während der Hybridisierung fehlerhafte Paarungen auftreten, bei denen nach der Korrektur durch die Bakterienzelle nicht immer durchgehend codierende Sequenzen entstehen, oder dass es für eine bestimmte Sequenz keinen komplementären Partner gibt. Beide Faktoren verringern die maximal mögliche Zahl an Varianten. Ein weiterer Ansatzpunkt für eine Verbesserung stellte das verwendete Expressionssystem dar. Eine Expression unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors könnte dazu führen, dass die Expression der Peptide zu verlangsamtem Wachstum oder gar zum Absterben der Zellen führen. Durch

beide Vorgänge bestünde die Möglichkeit, eventuell hoch potente Peptide zu verlieren. Die neuen Peptidbibliotheken sollten erstens nach einer veränderten Strategie erstellt werden und zweitens sollte die Expression der Peptide steuerbar sein.

Bei der Strategie II handelt es sich um einen PCR-basierten Ansatz (Sneeden *et al.* 2003). Hierzu wurde ein sehr langes Oligonukleotid (Oligo 1) erstellt, das am 5'-Ende die variable Sequenz und die zur Klonierung benötigte Restriktionsschnittstelle enthielt. Die Sequenz in 3'-Richtung nach dem variablen Bereich entsprach bis auf eine neue Restriktionsschnittstelle der Sequenz aus dem verwendeten Vektor. Die in das Oligonukleotid eingefügte Schnittstelle sollte die Kontrolle erleichtern, ob eine Bakterienzelle das für die Bibliothek codierende Plasmid trägt. Mithilfe des Oligo 2, das als Oligonukleotidprimer diente, wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt und der zu Oligo 1 komplementäre Strang synthetisiert (**Abbildung 44**). Nach 12-15 Zyklen wurde die PCR beendet und das doppelsträngige Produkt mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und AgeI verdaut. Die geschnittene DNA wurde über 20%iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt und die Korrektheit der Verdauschritte anhand der Fragmentgrößen kontrolliert. Die Synthese des komplementären Stranges durch eine PCR unter Verwendung einer „Proofreading“-fähigen DNA-Polymerase sorgte dafür, dass stets korrekte Basenpaarungen vorliegen sollten. Verschiebungen des Leserasters oder Abbrüche in der Proteinbiosynthese des Fusionsproteins aufgrund von Fehlpaarungen einzelner Nukleotide konnten so minimiert werden. Zur Ligation wurde das für die Bibliothek codierende Insert in zehnfachem molaren Überschuss zum geschnittenen Vektor eingesetzt. Es wurden 500 ng Plasmid-DNA in *E. coli* UT5600 (DE3) durch Elektroporation transformiert und die Größe der Bibliothek II bestimmt. Die nach der Strategie II erstellte Bibliothek II enthielt $2,3 \times 10^6$ lebensfähige Zellen pro 500 ng Plasmid-DNA.



Abbildung 44: Strategie II zur Erstellung des für die Peptidbibliothek codierenden Inserts. Das Oligonukleotid, das die variable Sequenz enthält (Oligo 1) und der Oligonukleotidprimer (Oligo 2) hybridisieren miteinander (A). Anschließend wird das Hybridisierungsprodukt mithilfe einer PCR zu einem Doppelstrang aufgefüllt (B). Dieser wird durch zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten (C) und kann in den ebenso geschnittenen Vektor eingesetzt werden. Basen, die Bestandteil der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease sind, sind unterstrichen. Durch die Polymerase aufgefüllte Basen sind in grau dargestellt. Auf diesem Weg wurden eine 5mer Peptidbibliothek ($n = 5$) erstellt.

SCREENING DER PEPTIDBIBLIOTHEK II MITHILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Mit 800 μ l des Transformationsansatzes wurden 20 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterien wurden 3 h bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Nach 3 h wurde die Proteinexpression durch Zusatz von 20 μ l IPTG (Endkonzentration von 20 μ M) und Inkubation für 1 h bei 28 °C und 200 Upm induziert. Die Bakterien wurden mit biotinyliertem humanen Cathepsin G und Streptavidin-Dylight 649 markiert und im Durchflusszytometer vermessen. Die Messergebnisse sind in **Abbildung 45** dargestellt. Um die Bakterien mit der höchsten roten Fluoreszenz wurde eine rechteckige Region (P1) gelegt und das Durchflusszytometer dazu veranlasst, diese Bakterien auszusortieren.

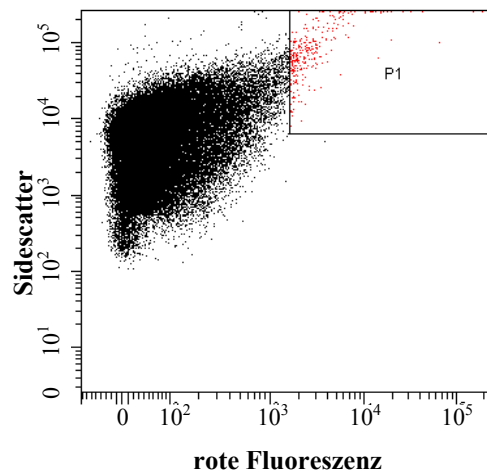


Abbildung 45: Screening einer oberflächenexprimierten Peptidbibliothek mithilfe der Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Selektion einzelner Varianten nach Markierung nach dem Zweischnittverfahren. *E. coli* Zellen mit der stärksten roten Fluoreszenz (P1) wurden mittels FACS selektiert.

Aus den zuvor durchgeführten Experimenten mit Kontrollzellen war bekannt, dass von der Höhe der Fluoreszenzmittelwerte nicht auf die inhibitorische Potenz des Peptides geschlossen werden konnte. Dieser Umstand erschwerte die Auswahl des Bereichs, aus dem die Bakterien aussortiert werden sollten. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden willkürlich mehrere Sortierregionen definiert, die unterschiedliche Bereiche der Bakterienpopulation beinhalteten, aber nie mehr als 1 % der gesamten Bakterienzahl enthielten. Aus diesen Regionen wurde dann jeweils eine Bakterienzelle in eine mit je 150 μ l LB-Medium pro Kavität gefüllte Mikrotiterplatte verbracht. Insgesamt wurden so 384 Bakterienzellen auf vier Mikrotiterplatten aussortiert. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Platten dupliziert, zu jeder Kavität 50 μ l 86 %iges Glycerol hinzugeben, mithilfe eines Trockeneis/Ethanol Kältebades eingefroren und bei -70 °C gelagert. Von insgesamt fünf Klonen der duplizierten Platten wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt und Basensequenz des für die Bibliothek codierenden Bereichs durch DNA-Sequenzanalyse bestimmt. Die Auswertung der Sequenzanalyseergebnisse zeigte, dass alle fünf untersuchten Klone eine Deletion an der gleichen Stelle aufwiesen (**Abbildung 46**). Alle untersuchten Sequenzen aus dem Screening der Bibliothek zeigten

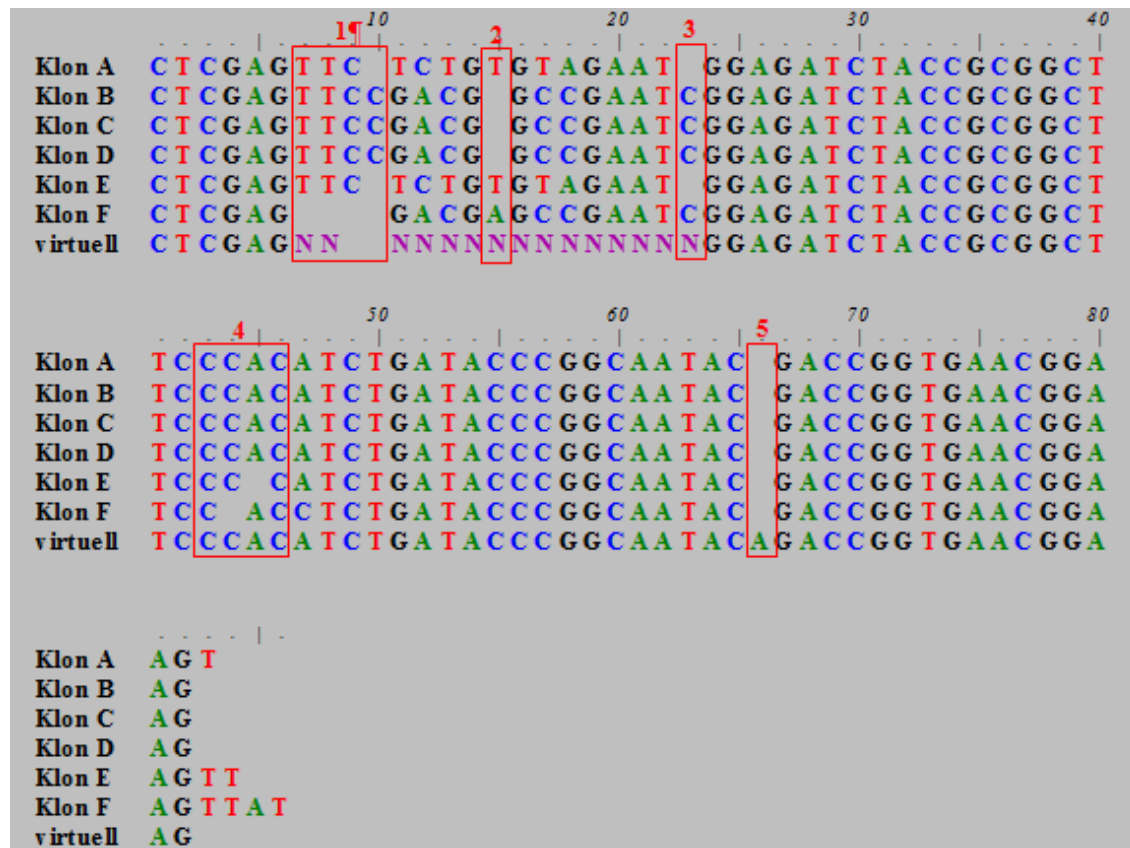


Abbildung 46: Ausschnitte aus den Nukleotidsequenzen der Plasmid-DNA der selektierten Varianten aus der oberflächenexprimierten Peptidbibliothek. Zur besseren Orientierung ist zusätzlich zu den Sequenzen der Klone auch die Ausgangssequenz (virtuell) dargestellt. Bereiche, die Auffälligkeiten enthielten sind mit roten Rahmen gekennzeichnet. Besonders auffällig war, dass alle Klone aus der Bibliothek eine Deletion an der gleichen Stelle auf (Position 66, Rahmen 5) aufwiesen: Es fehlte ein Adenosin.

an der Basenposition 66 eine Deletion eines Adenosins. Da alle Klone diese Mutation aufwiesen, lag die Vermutung nahe, dass es sich um eine auf das Oligo 1 zurückgehende Mutation handelte. Die Deletion könnte zu einer Verschiebung des Leserahmens und schließlich zum Abbruch der Proteinbiosynthese des Fusionsproteins geführt haben. Außer dieser einen, in allen untersuchten Klonen vorhandenen Deletion, gab es noch weitere auffällige Bereiche in den Sequenzen (Rahmen 1-4). Diese kommen allerdings nicht in allen Klonen vor, deshalb lag der Schluss nahe, dass diese ungewollten Mutationen auf die Strategie II zur Erstellung der Bibliothek zurückzuführen waren. Parallel zur Sequenzanalyse wurden die aussortierten Klone nochmals gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen. In dieser Reanalyse unterschieden sich die mittleren Fluoreszenzen der Kontrollzellen und der Klone aus dem Screening der Bibliothek kaum noch. Als Schlussfolgerung blieb festzuhalten, dass zur Erstellung des für die Bibliothek codierenden Inserts zukünftig ein anders Verfahren zum Einsatz kommen sollte. Außerdem musste beim Screening der Bibliothek ein Fehler passiert sein, denn sonst war das Auftreten von „falsch-positiven“ Varianten nicht zu erklären. Eine Überprüfung der

Markierungsreagenzien ergab, dass die verwendete Charge des Streptavidin-Dylight-Konjugats eine ungewöhnlich hohe unspezifische Bindung zeigte. Dieser Chargenwechsel erfolgte ungünstigerweise mitten in der Markierung. Die Kontrollzellen wurden mit der intakten Charge markiert, für die Bibliothek wurde die defekte Charge benutzt. Die defekte Charge führte zu Artefakten, die dann aussortiert wurden.

4.4.2 AUTODISPLAY DER PEPTIDBIBLIOTHEKEN III UND IV

Zur Erstellung von Peptidbibliotheken kam nun eine weitere Strategie zum Einsatz (Noren und Noren 2001; Schultheiss 2003). Bei dieser Strategie III wird mit zwei jeweils am Ende zueinander komplementären Oligonukleotiden gearbeitet (**Abbildung 47**). Das erste Oligonukleotid wurde so konstruiert, dass es die Erkennungssequenz für das gewünschte Restriktionsenzym, den für die Bibliothek codierenden variablen Bereich, eine daran anschließende Restriktionsschnittstelle zur schnellen Kontrolle der Klone und schließlich eine Konstante für die Hybridisierung mit dem zweiten Oligonukleotid notwendige Sequenz aus dem Vektor inklusive der zweiten Restriktionsschnittstelle enthielt. Das zweite Oligonukleotid besteht aus einem zum ersten Oligonukleotid komplementären für die Hybridisierung notwendigen Bereich. Seine weitere Sequenz ist identisch zur Vektorsequenz. Nach der Hybridisierung der beiden Oligonukleotide wurde das Hybridisierungsprodukt mithilfe der Klenow-DNA-Polymerase zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid aufgefüllt, mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und AgeI verdaut und über ein 20 %iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt. Die korrekte Prozessierung konnte auch hier wiederum anhand der Größenänderung des Oligonukleotids erkannt werden. Nach Ligation wurde das Bibliothek tragende Plasmid in *E. coli* UT5600 (DE3) pKE19 durch Elektroporation transformiert. *E. coli* UT5600 (DE3) pKE19 stellt einen Stamm dar, der das für das GFP-codierende, zu den Bibliotheksplasmiden kompatible Plasmid pKE19, enthält. Mithilfe der Strategie III wurden zwei Peptidbibliotheken (Bibliothek III und Bibliothek IV) erstellt. Die Größe der Bibliothek III betrug $3,1 \times 10^7$ und die der Bibliothek IV betrug $1,8 \times 10^8$ Varianten. Bei diesen Bibliotheksgrößen musste erstmalig damit gerechnet werden, dass eine Peptidvariante doppelt vorkam. Die Anzahl der möglichen Sequenzen betrug $6,4 \times 10^7$ (20^6), die Wahrscheinlichkeiten für doppelte Peptidvarianten waren für Bibliothek III 0,5 zu 1 und für Bibliothek IV 2,8 zu 1. Die zur Kontrolle durchgeführte Plasmidisolierung und anschließende Sequenzanalyse der Plasmid-DNA ergab keine Verschiebungen des Leserrahmens oder sonstige unerwünschte Effekte.

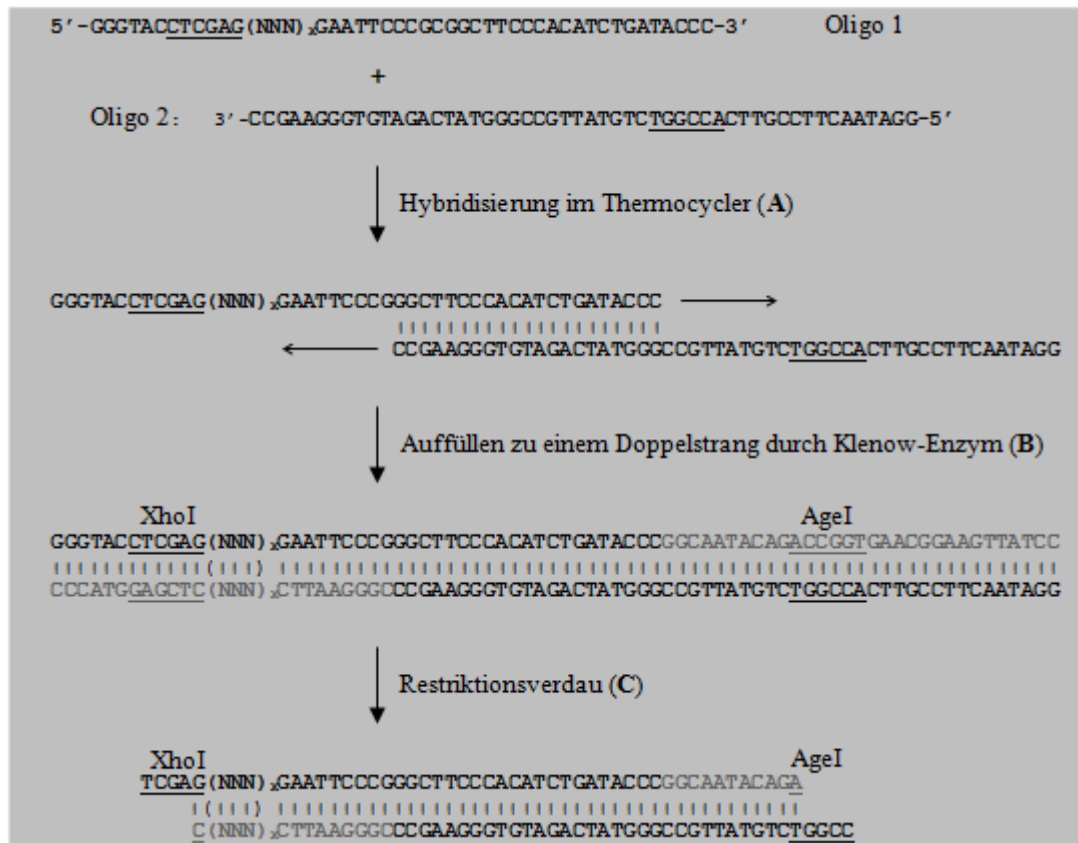


Abbildung 47: Strategie III zur Erstellung des für die Peptidbibliothek codierenden Inserts. Das Oligonukleotid, das die variable Sequenz enthält (Oligo 1) und das zweite Oligonukleotid (Oligo 2) hybridisieren miteinander. Anschließend wird das Hybridisierungsprodukt mit Hilfe des Klenow-Fragments zu einem Doppelstrang aufgefüllt (A). Durch Auffüllen mit Klenow-Enzym entsteht ein doppelsträngiges Produkt (B). Dieses wird durch zwei Restriktionsendonukleasen geschnitten (C) und kann in den ebenso geschnittenen Vektor eingesetzt werden. Basen, die Bestandteil der Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease sind, sind unterstrichen. Durch die Polymerase aufgefüllte Basen sind in grau dargestellt. x = 6.

SCREENING DER BIBLIOTHEKEN III UND IV MIT HILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Screening der neuen Bibliotheken erfolgte wiederum mithilfe eines Durchflusszytometers (FACS Aria™). Zur Selektion einzelner Varianten wurden die Bakterien mithilfe des bewährten Zweischriftverfahrens über das Targetenzym mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im ersten Schritt wurden die Bakterien mit biotinyliertem Cathepsin G inkubiert. Im Anschluss daran konnten die Bakterien durch Streptavidin-DyeLight 649 mit einem roten Fluoreszenzlabel markiert werden. Zusätzlich zur Markierung mit dem Selektionsmarker (biotinyliertes humanes Cathepsin G und Streptavidin-DyeLight 649) kam mit dem GFP ein zweiter, von den Bakterienzellen selbst gebildeter Marker zum Einsatz. Auf diesem Wege war nun eine eindeutige Unterscheidung zwischen GFP-bildenden Bakterienzellen und verunreinigenden Partikeln möglich. Als Negativkontrolle diente der Stamm *E. coli* UT5600 (DE3) pKE19, der

lediglich das für die grüne Fluoreszenz verantwortliche für GFP-codierende Plasmid trägt. Zur Analyse und zur späteren Sortierung im Durchflusszytometer wurden die Negativkontrolle und die peptidtragenden Bakterienzellen nach dem gleichen Färbeprotokoll behandelt. Die Analyse von jeweils 30000 Bakterienzellen ist in der Abbildung (**Abbildung 48**) dargestellt. Die Anregungs- und Emissionsspektren von GFP (grüne Fluoreszenz) und dem zweiten Fluoreszenzfarbstoff DyeLight 649 (rote Fluoreszenz) unterscheiden sich hinreichend, so dass es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung der Fluoreszenz kommt. Die Analyse der Negativkontrolle ergab, dass es sich bei über 80 % der analysierten Ereignisse um grün fluoreszierende Bakterienzellen handelte. Bei den restlichen Ereignissen handelte es sich größtenteils um partikuläre Verunreinigungen, wie ein zur Kontrolle durchgeführtes Sortierexperiment dieser nicht grün fluoreszierenden, negativen Population auf eine Selektionsagarplatte und anschließende Inkubation über Nacht bei 37 °C zeigte. Hierbei bildeten lediglich circa 3% der aussortierten Partikel Kolonien auf der Agarplatte. Bei der Analyse der Bakterienzellen, die jeweils eine Peptidvariante der Bibliothek in großer Zahl auf ihrer Oberfläche trugen (im folgenden vereinfacht als Peptidbibliothek bezeichnet), wiesen ebenfalls deutlich über 80 % der Ereignisse eine grüne Fluoreszenz auf. Auffällig war hier, dass außer den circa 3 % nicht fluoreszierenden Bakterien noch circa 10% ebenfalls nicht grün fluoreszierende, aber rot fluoreszierende Partikel vorhanden waren. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um peptidtragende, aber nicht mehr intakte Bakterienzellen. Weiterhin zeigte die Analyse der Peptidbibliothek eine gut zu erkennende zweite Population mit hoher grüner und roter Fluoreszenz. Die Bibliothek enthielt also Bakterienzellen, die in der Lage waren, humanes Cathepsin G spezifisch zu binden. Ausgehend von diesen Analyseergebnissen wurde eine Sortier-Region (G1) definiert, die ungefähr 0,9% der Gesamtzahl der Bakterien umfasst. Beim Screening der Bibliothek wurden aus 200000 analysierten Bakterienzellen 96 Bakterienzellen aus der Region G1 in eine Mikrotiterplatte mit Selektionsmedium und weitere 270 Bakterienzellen auf eine Selektionsagarplatte aussortiert. Beim Screening von Peptidbibliotheken war es aus Speicherplatzgründen nicht möglich, die Gesamtzahl der gescreenten Bakterienzellen in einer Abbildung darzustellen. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der dargestellten Bakterienzellen auf 30000 reduziert. Nach Bebrüten über Nacht bei 37 °C wurden von zwölf Einzelzellklonen eine Plasmidisolierung, ein anschließender Kontrollverdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI und eine gelelektrophoretische Analyse durchgeführt. Mithilfe des entstandenen Fragmentmusters war es eindeutig möglich Klone, die das korrekte Plasmid aufgenommen hatten, zu identifizieren. Zehn dieser Klone wurden wieder angezogen, mit humanem Cathepsin G nach dem Zweischnittverfahren markiert und einer Reanalyse im Durchflusszytometer unterzogen. Bei den verbleibenden zwei Klonen war das Ergebnis der Kontrolle der enthaltenen Plasmid-DNA nicht eindeutig, so dass diese Klone nicht weiter untersucht wurden. Das Analyseergebnis von sechs

Klonen ist in **Abbildung 49** festgehalten. Vier Klone konnten zur Markierung nicht

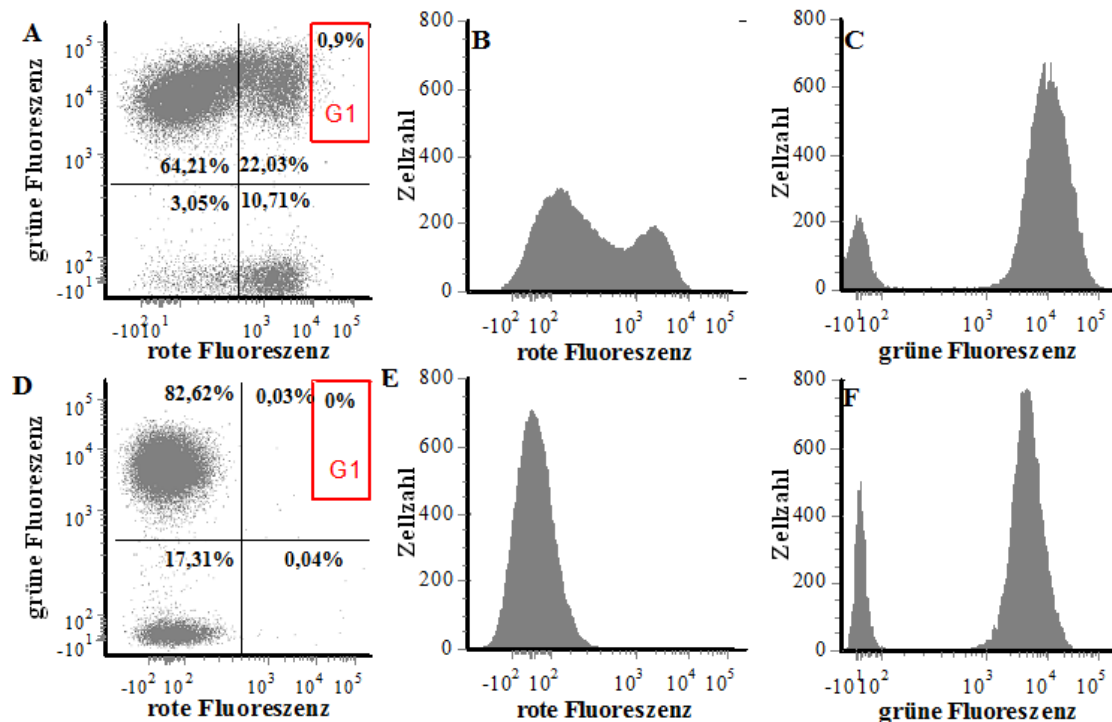


Abbildung 48: Screening der Peptidbibliothek IV im Durchflusszytometer (FACS Aria™) und Selektion einzelner Varianten. Sowohl die peptidtragenden Zellen (Peptidbibliothek) (A-C) als auch die Kontrollzellen (D-F) wurden nach der Anzucht und Induktion nach dem Zweischrittverfahren mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Dylight 649 markiert. Zusätzlich zu diesem externen, roten Label zur Selektion exprimierten die *E. coli*-Zellen intern GFP, um eine leichtere Differenzierung der *E. coli* Zellen von Verunreinigungen zu ermöglichen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Analyse von 30000 Zellen. A: rote und grüne Fluoreszenz der der peptidtragenden *E. coli*-Zellen (*E. coli* UT5600 (DE3) pKE19 pDBLib6.2). Deutlich ist eine zweite Population aus stärker rot fluoreszierenden Bakterien zu erkennen. Aus dieser zweiten Population wurden die am stärksten rot fluoreszierenden Bakterien (G1) durch FACS selektiert. B: rote Fluoreszenz der Bibliothekszellen, C: die grüne Fluoreszenz der Bibliothekszellen. D: rote und grüne Fluoreszenz der Kontrollzellen (*E. coli* UT5600 (DE3) pKE19). E: rote Fluoreszenz der Kontrollzellen, F: grüne Fluoreszenz der Kontrollzellen.

wieder in Kultur gebracht werden. Die Klone C7, B10 und F10 zeigten in der Histogramm-Darstellung Andeutungen einer zweiten Population. Daraufhin wurden diese drei Klone einer erneuten Sortierung auf Selektionsagarplatten zu unterzogen, um das Vorliegen einer Mischkultur auszuschließen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde von jeder Platte eine Kolonie selektiert und aus dieser eine Kultur zur erneuten Markierung mit humanem Cathepsin G hergestellt. Diese wurden dann erneut im

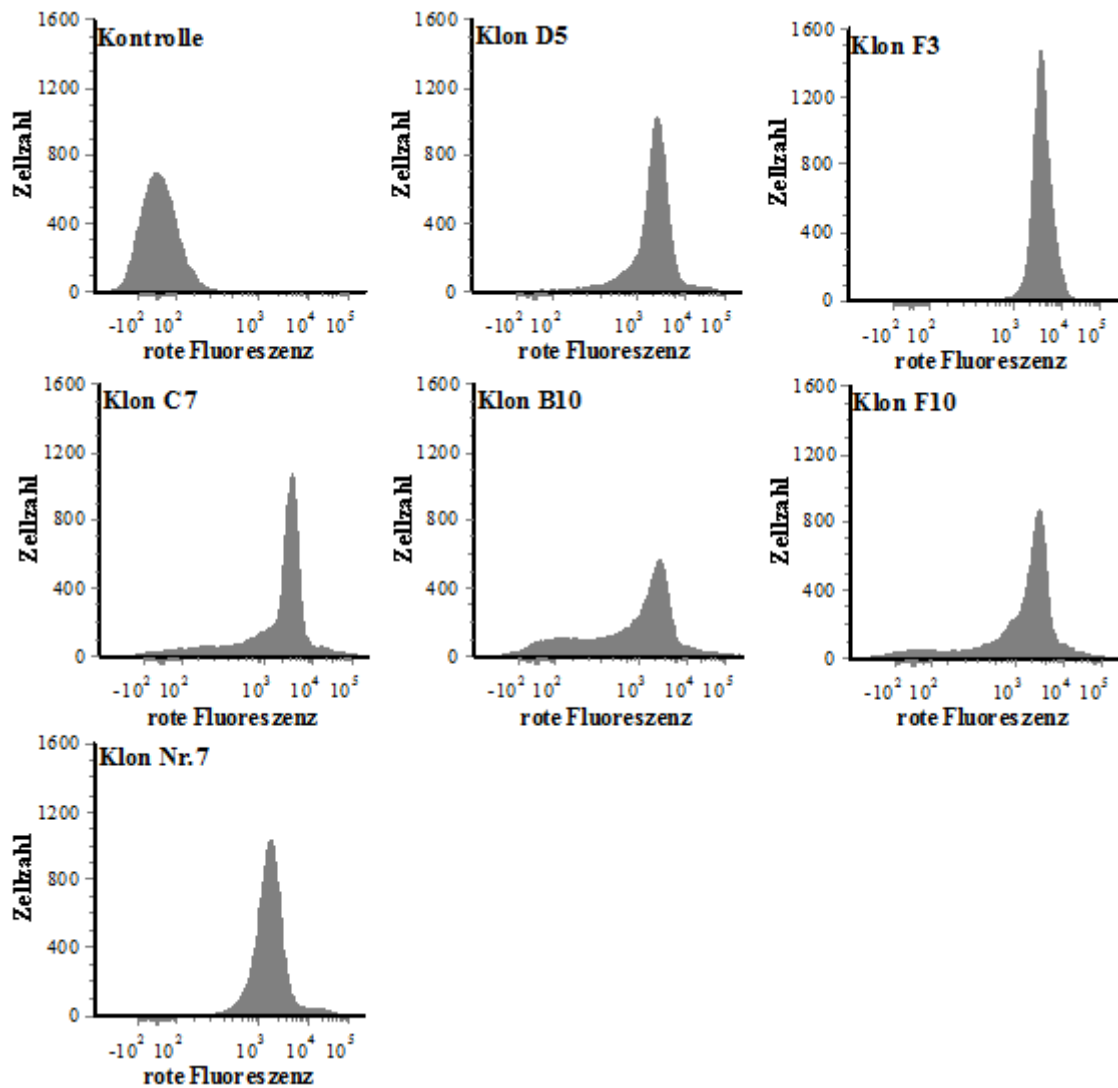


Abbildung 49: Reanalyse der aussortierten Zellen im Durchflusszytometer nach erneuter Markierung nach dem Zweischrittverfahren. Vergleich der mittleren roten Fluoreszenz (mF) nach Analyse von 30000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSARIA™). Kontrolle: Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19), mF = 83; Fluoreszenz der aussortierten Zellen (UT5600 (DE3) pKE19 + jeweilige Peptidvariante): Klon D5, mF = 2567; Klon F3, mF = 4213; Klon C7, mF = 2530; Klon B10, mF = 1679; Klon F10, mF = 2356; Klon Nr.7, mF = 1821.

Durchflusszytometer analysiert (**Abbildung 50**). In allen drei Fällen wurde durch diese Vorgehensweise eine scharf definierte Population erhalten. Nun konnte von allen Einzelzellklonen eine Plasmidisolierung und anschließende DNA-Sequenzanalyse durchgeführt werden. Tatsächlich enthielten alle sechs analysierten Einzelzellklone codierende Sequenzen für unterschiedliche Peptidvarianten.

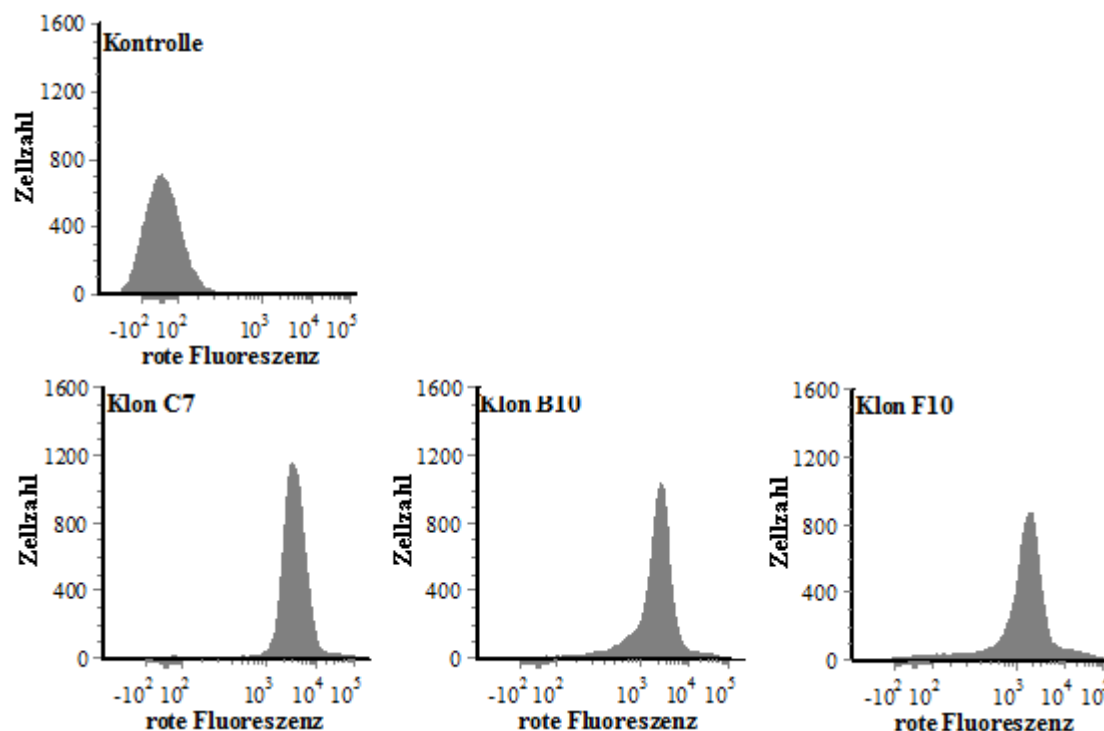


Abbildung 50: Reanalyse der aussortierten Zellen C7, B10 und F10 im Durchflusszytometer nach erneutem Aussortieren und Markierung mit humanem Cathepsin G nach dem Zweischnittverfahren. Vergleich der mittleren roten Fluoreszenz (mF) nach Analyse von 30000 Bakterienzellen im Durchflusszytometer (FACSARIA™). Kontrolle: rote Fluoreszenz der Kontrollzellen (UT5600 (DE3) pKE19), mF = 103; rote Fluoreszenz des jeweiligen Einzelzellklons aus dem Screening der Bibliothek (UT5600 (DE3) pKE19 + jeweilige Peptidvariante) Klon C7, mF = 3102; Klon B10, mF = 2835; Klon F10, mF = 2046.

4.4.3 NEUE INHIBITOREN VON CATHEPSIN G

Die Klone aus dem Screening der Bibliothek III und IV wurden wieder angezogen und die Plasmid-DNA isoliert. Aus dem Screening der Bibliothek III (nicht gezeigt) wurden die Klone Nr.2 und Nr.7, aus dem Screening der Bibliothek IV wurden die Klone B10, C7, D5, F3 und F10 erhalten. Die Nukleotidsequenz des Bereichs, der für die Peptidbibliothek codiert, wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestimmt. Die Auswertung der Sequenzanalyse zeigte weder Verschiebungen des Leserahmens noch unerwartete Abbruchsequenzen. Entgegen dem Ergebnis der Sequenzanalyse der Einzelzellklone aus der Bibliothek I ergab die Sequenzanalyse diesmal eine hohe Diversität der enthaltenen codierenden Sequenzen der Peptidvarianten (**Abbildung 51**) die errechnete Homologie betrug rund 23 %.

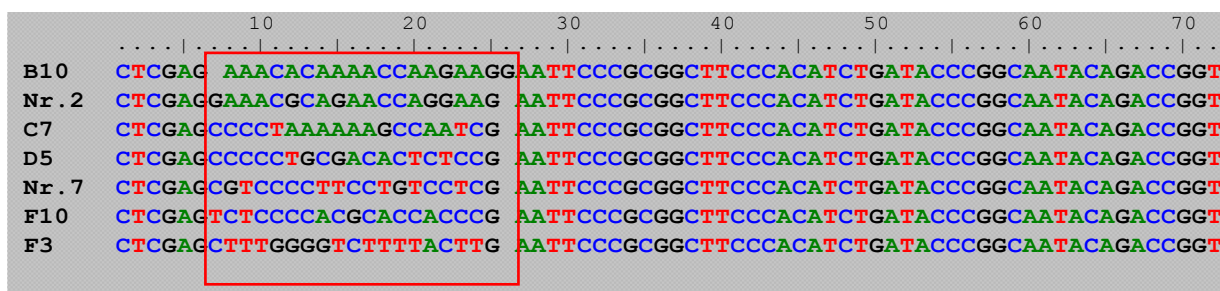


Abbildung 51: Ausschnitte aus den Nukleotidsequenzen der Plasmid-DNA der selektierten Varianten aus den oberflächenexprimierten Peptidbibliotheken. Der randomisierte, für die Peptide der Peptidbibliothek codierende Sequenzbereich ist durch einen Rahmen in obiger Abbildung markiert.

Aus den DNA-Sequenzen wurden die entsprechenden Peptidsequenzen abgeleitet und deren Hemmung von humanem Cathepsin G ermittelt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in der **Tabelle 28** dokumentiert.

Tabelle 28: Hemmung von humanem Cathepsin G durch die neuen Peptide aus dem Screening der Bibliotheken III und IV.

Name	Sequenz	IC ₅₀ [μM]	K _i [μM]
P43 (C7)	PLKKPI	15,59	1,89
P44 (D5)	PPATLS	21,48	2,60
P45 (F3)	LWGLLL	10,54	1,28
P46 (F10)	SPHAPP	17,22	2,09
P47 (B10)	KHKTKK	95,28	11,55
P48 (Nr.2)	ETQNQE	19,88	2,41
P49 (Nr.7)	RPLPVL	39,76	4,82

Die aus dem Screening der Bibliothek III erhaltenen Peptide wurden wieder einem Protein-Peptid-Docking gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G unterzogen. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in **Abbildung 52** dargestellt.

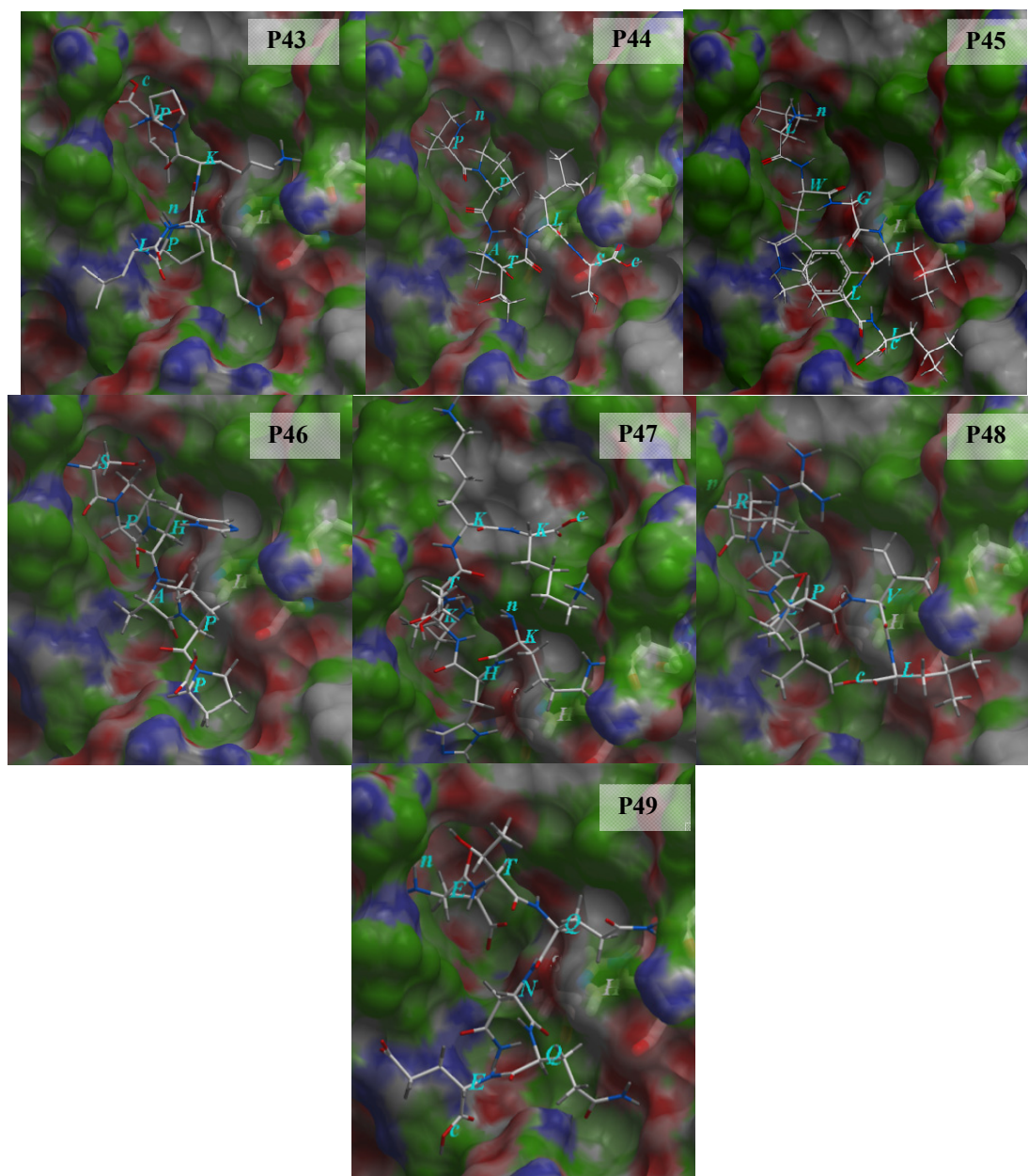


Abbildung 52: Protein-Peptiddocking der Peptide aus dem Screening der Bibliotheken gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

KORRELATION DER DOCKINGERGEBNISSE MIT DER EXPERIMENTELL ERMITTELTEN HEMMUNG VON HUMANEM CATHEPSIN G

Nach dem Protein-Peptid-Docking lag es nahe, die dabei ermittelten freien Energien mit den bereits experimentell bestimmten Hemmdaten in Bezug zu setzen. Bei Vorliegen einer Korrelation zwischen den Daten sollten niedrige Energiewerte, die für einen stabilen Komplex stehen, zu einer hohen Hemmung führen. Um dies zu prüfen, wurden für alle in dieser Arbeit getesteten Peptide, die die Aktivität von humanem Cathepsin G zu

mehr als 60 % hemmen und nach dem gleichen Bindungsmodus (N-Terminus in der S1 Bindungstasche des Enzyms) an humanes Cathepsin G binden, die dekadischen Logarithmen der IC_{50} -Werte gegen die berechneten Energien aufgetragen. Das erhaltene Diagramm (**Abbildung 53**) lässt eine Korrelation der beiden Parameter vermuten. Eine Regressionsanalyse der Daten zeigt einen Korrelationskoeffizienten von 0,82, also eine mäßige Korrelation. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Anzahl an untersuchten Peptiden (6 Peptide) noch zu gering ist, um eine verlässliche Aussage zu treffen. Auf eine entsprechende Untersuchung der Peptide, die nach einem anderen Modus an humanes Cathepsin G binden wurde aufgrund der geringen Anzahl an Peptiden, die die geforderte Bedingung (Hemmung von humanem Cathepsin G über 60 %) erfüllen verzichtet.

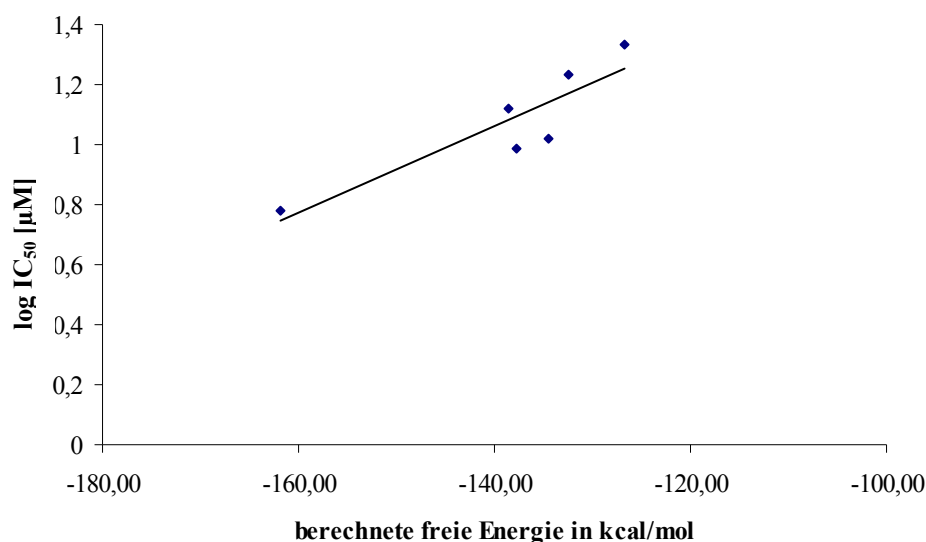


Abbildung 53: Korrelation zwischen den ermittelten IC_{50} -Werten und den berechneten freien Energien der Peptide. In das Diagramm wurden alle Peptide aufgenommen, die eine Hemmung von humanem Cathepsin G größer 60 % aufwiesen und nach dem gleichen Bindungsmodus (N-Terminus in der S1 Bindungstasche des Enzyms) an humanes Cathepsin G binden.

SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DEM PROTEIN-PEPTID-DOCKING

Die Auswertung der Ergebnisse des Protein-Peptid-Dockings ergab, dass alle Peptidinhibitoren tatsächlich im oder in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms (Aminosäuren: H57, D102, S195) binden. Auch die Besonderheiten der Substrat-Bindungstasche von Cathepsin G wurden von dem Programm sehr gut wiedergegeben. Humanes Cathepsin G besitzt im Gegensatz zu den verwandten Proteasen wie Chymotrypsin oder humane Leukozytenelastase eine S1-Bindungstasche, die sowohl voluminöse ungeladene Aminosäuren als auch basische Aminosäuren akzeptiert. Auf diesem Weg konnte ermittelt werden, welche Aminosäuren der Peptide in welche Bindungstaschen des En-

zyms binden könnten. Die Häufigkeiten, mit denen die einzelnen Aminosäuren in den entsprechenden Bindungstaschen vorhergesagt wurden, sind in der **Tabelle 29**

Tabelle 29: Übersicht über die Häufigkeit mit der eine Aminosäure eine bestimmte Bindungstasche besetzt hat (Ergebnisse aus dem Protein-Peptid-Docking).

Aminosäure		Position					
		P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Glycin	G	0	0	0	2	1	0
Alanin	A	2	2	3	3	0	0
Valin	V	2	2	3	6	7	<u>10</u>
Leucin	L	0	2	2	3	4	2
Isoleucin	I	4	<u>7</u>	<u>11</u>	<u>8</u>	2	2
Phenylalanin	F	2	4	9	<u>8</u>	<u>12</u>	3
Tyrosin	Y	0	2	1	0	1	1
Tryptophan	W	0	0	1	0	0	0
Asparaginsäure	D	5	6	5	1	2	1
Glutaminsäure	E	1	1	1	0	1	0
Asparagin	N	1	0	2	0	0	0
Glutamin	Q	0	1	0	1	0	0
Serin	S	5	1	0	0	0	2
Threonin	T	1	0	0	1	1	0
Cystein	C	0	2	0	0	0	0
Methionin	M	1	0	0	0	1	2
Prolin	P	4	<u>7</u>	6	3	3	1
Histidin	H	0	0	2	0	1	0
Arginin	R	2	1	0	1	0	2
Lysin	K	<u>7</u>	6	2	5	2	2

dokumentiert. Zwei Peptide wurden basierend auf dieser Analyse konstruiert Peptid 50a (KIIFV) und Peptid 50 (KIFFV). Bei der Entscheidung welches der beiden Peptide synthetisiert werden sollte, kamen zwei Tatsachen zum Tragen. Zum einen lieferte das Protein-Peptid-Docking für Peptid 50 (**Abbildung 54**) eine niedrigere freie Energie. Stärker gewertet wurde zum anderen die Tatsache, dass bei den getesteten Peptiden die Peptide mit der Aminosäure Phenylalanin an Position P1 eine stärkere Hemmung von

humanem Cathepsin G zeigten. Sowohl im Protein-Peptid-Docking, als auch im Test auf Hemmung von humanem Cathepsin G wurden für Peptid 50 jeweils die besten Werte dieser Arbeit erhalten. Mit einem IC_{50} -Wert von 6,06 μM und einem K_i -Wert von 0,73 μM stellt dieses, durch rationale Verbesserungen

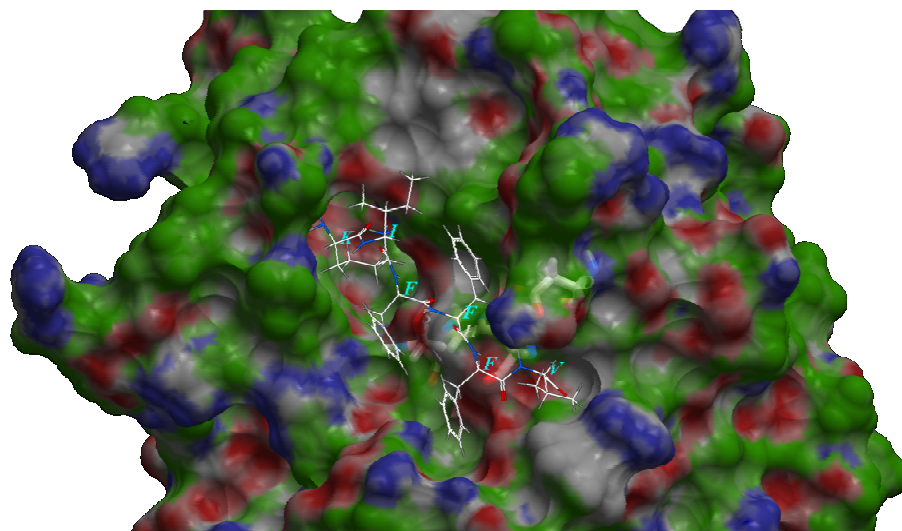


Abbildung 54: Protein-Peptiddocking des Peptids 50 mit der Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

entstandene Peptid den besten in dieser Arbeit untersuchten Peptidinhibitor für humanes Cathepsin G dar. Dieser neue Inhibitor ist potenter als das als Leitstruktur eingesetzte Peptid 15. Die ermittelten Hemmdaten sowie die berechneten freien Energien beider Peptide sind in der **Tabelle 30** zusammengefasst. Zudem besteht Peptid 50 aus nur mehr sechs Aminosäuren, wodurch es sich besser als Leitstruktur für weitere Inhibitoren eignet.

Tabelle 30: Vergleich der Hemmdaten und der berechneten freien Energien der Peptide 15 und 50.

Name	Sequenz	% Hem. 100 μM	IC_{50} [μM]	K_i [μM]	Energie in kcal/mol
P50	KIFFFV	85,8	6,06	0,73	-161,77
P15	EILIFWSKAIGYSFT	94,6	8,98	0,98	-208,33

BEI PEPTID 27 HANDELT ES SICH UM EIN SUBSTRAT VON CATHEPSIN G

An dieser Stelle soll kurz auf die Verlässlichkeit der verwendeten computerbasierten Vorhersagen am Beispiel des Peptids 27 (VPKILM) eingegangen werden. Bei Peptid 27 handelt es sich um ein Peptid, das von unserem Kooperationspartner (Somak Ray, Max-Planck Institut für Bioinformatik, Saarbrücken) anhand rationaler Gesichtspunkte basierend auf den Protein-Peptid-Docking-Berechnungen konstruiert worden war. Das Prote-

in-Peptid-Docking dieses Peptids (**Abbildung 55**) ließ aufgrund seiner geringen freien Energie im Komplex mit humanem Cathepsin G (-136,48 kcal/mol) eine hohe Affinität des Peptids zu humanem Cathepsin G erwarten. Der experimentelle Befund zeigte jedoch nahezu keine Hemmung von humanem Cathepsin G durch Peptid 27 (23,5 % Hemmung bei 100 μ M).

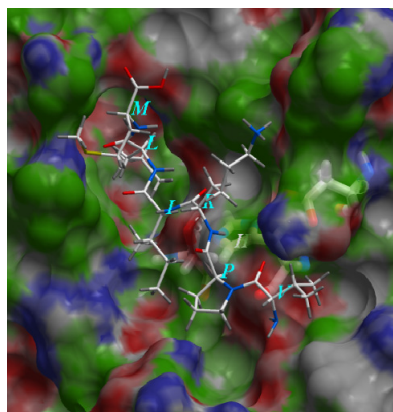


Abbildung 55: Protein-Peptid-Docking des Peptids P27 gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. grün: hydrophobe Bereiche; rot: Wasserstoffbrückenakzeptoren; blau: Wasserstoffbrückendonatoren; grau: nicht einzuordnen in Bezug auf diese Eigenschaften.

Die nahe liegende Erklärung hierfür war die Annahme, dass dieses Peptid ein Substrat für das Enzym darstellt. In diesem Fall sollten sich die durch die Spaltung entstandenen Abbauprodukte des Peptids P27 im Reaktionsansatz nachweisen lassen. Durch die Auswertung der Docking-Ergebnisse erschien die Spaltung des Peptids zwischen den Aminosäuren Isoleucin und Methionin als wahrscheinlich. Um diese Annahme experimentell zu bestätigen, wurden Proben hergestellt, die mithilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht wurden. Als Kontrolle dienten Lösungen des Enzyms in Wasser und im Reaktionspuffer, reiner Reaktionspuffer, das verwendete Reinstwasser und Lösungen des Peptids in Reaktionspuffer sowie in Reinstwasser. Der Vergleich des Spektrums des vollständigen Reaktionsansatzes (Puffer, Enzym, P27) mit dem Kontrollspektrum (Puffer, Enzym) wies ein neues Signal auf, das der Masse des angenommenen Spaltproduktes (VPKI) entsprach (nicht gezeigt). Einer der Schwachpunkte des verwendeten Programmes konnte somit aufgedeckt werden: das Programm ermöglicht es (noch) nicht in Inhibitoren oder Substrate zu unterscheiden. Eine hohe Affinität und damit eine niedrige freie Energie besaßen beide. Die **Tabelle 31** liefert eine Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten Peptide.

Tabelle 31: Übersicht über die ermittelten Daten aller Peptide dieser Arbeit.

Bezeichnung Px	Sequenz	Inh. bei 100 μ M in %	IC ₅₀ -Wert [μ M]	K _i -Wert [μ M]	Energie in kcal/mol
1	RNTQHTNIYAKDIFV	49,00%	n.b.	n.b.	-148,05
2	GNTQHTNIYAKDIFV	50,00%	n.b.	n.b.	-135,72
3	GIPQHTNIYAKDIFV	53,20%	n.b.	n.b.	-132,69
4	NIYAKDIFV	38,40%	n.b.	n.b.	-176,04
5	YAKDIFV	50,20%	n.b.	n.b.	-151,47
6	KDIFV	72,00%	11,7	2,2	-129,99
6d	DAFVFV	19,80%	n.b.	n.b.	-126,38
6a	DIFVFV	80,80%	9,76	1,18	-137,74
6b	DFVFV	75,10%	12,87	1,56	-158,85
6c	DIFLFV	68,40%	13,25	1,61	-138,56
6e	KDIFVFV	22,90%	n.b.	n.b.	-153,44
7	KDIF	25,90%	n.b.	n.b.	-104,17
8	DIFV	1,90%	n.b.	n.b.	-104,14
9	KSIFV	22,00%	n.b.	n.b.	-125,57
10	KDIFF	30,80%	n.b.	n.b.	-130,73
13	KDIFI	17,70%	n.b.	n.b.	-131,37
14	FWSKDIFY	56,00%	n.b.	n.b.	-180,08
15	EILIFWSKAIGYSFT	94,60%	8,98	0,98	-208,33
16	KNIFV	37,00%	n.b.	n.b.	-130,93
17	KD	0,00%	n.b.	n.b.	n.b.
18	DIFVV	34,00%	n.b.	n.b.	-114,06
20	DDIFV	32,10%	n.b.	n.b.	-116,48
21	MDIFV	19,10%	n.b.	n.b.	-111,59
25	DKFVFV	8,50%	n.b.	n.b.	-158,65
27	VPKILM	23,50%	n.b.	n.b.	-136,48
28	VPILM	n.b.	n.b.	n.b.	-118,34
29	KEIFLM	n.b.	n.b.	n.b.	-144,71
30	KIIKHR	n.b.	n.b.	n.b.	-146,09
31	PPPPPP	n.b.	n.b.	n.b.	-103,88
32	PPRPPP	n.b.	n.b.	n.b.	-133,44
33	FVFV	0,00%	n.b.	n.b.	-116,63
37	DIFKFV	n.b.	n.b.	n.b.	-156,64
38	LPPRLP	33,70%	n.b.	n.b.	-126,33
39	CLPPPP	n.b.	n.b.	n.b.	-108,96
40	DCIAIF	n.b.	n.b.	n.b.	-123,52
41	ECKAIF	22,00%	n.b.	n.b.	-132,70
42	PSSSLR	14,10%	n.b.	n.b.	-138,13
43	PLKKPI	64,60%	15,59	1,89	-139,86
44	PPATLS	56,20%	21,48	2,60	-126,82
45	LWGLLL	77,60%	10,54	1,28	-134,55
46	SPHAPP	61,30%	17,22	2,09	-132,40
47	KHKTKK	51,10%	95,28	11,55	-156,54
48	ETQNQE	58,30%	19,88	2,41	-147,72
49	RPLPVL	57,00%	39,76	4,82	-135,29
50	KIFFFV	84,80%	6,06	0,73	-161,77
50a	KIIFV	n.b.	n.b.	n.b.	-138,39
51	KEIFV	22,00%	n.b.	n.b.	-127,05

5 DISKUSSION

Die Expression von Peptidbibliotheken durch Verfahren wie das „Phage Display“ oder die Oberflächenexpression auf Hefezellen haben sich bei der Suche nach neuen Leitstrukturen als potente Alternative zur klassischen Entwicklung bewährt (Asanuma *et al.* 2008; Lanzillotti und Coetzer 2008). Mit dem Autodisplay steht ein bakterielles System zur Oberflächenexpression rekombinanter Proteine auf *E. coli* zur Verfügung. Dieses System hat sich bereits bei der Oberflächenexpression einer Vielzahl rekombinanter Proteine als erfolgreich erwiesen (Jose 2006). Peptide wurden bereits durch Autodisplay erfolgreich auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert und die Zugänglichkeit der Peptide für affinitätsbasierte Markierungen benutzt (Zangen 2002; Jose und Zangen 2005). Die Voraussetzungen für den Einsatz des Autodisplay zur Expression von Peptidbibliotheken waren geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob Autodisplay eine alternative Plattform zu den etablierten Verfahren („Phage Display“, „Yeast Surface Display“) darstellt und zur evolutiven Entwicklung von Peptidinhibitoren eingesetzt werden kann. Mit dem Peptid 15 lag bereits eine Leitstruktur vor, die das Target humanes Cathepsin G hemmt und auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert werden konnte. Es galt nun Peptidbibliotheken zu erstellen und diese mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* zu exprimieren. Die Bibliothek tragenden Bakterien sollten dann mit dem Targetenzym markiert werden und markierte Zellen mittels Fluoreszenz-aktivierter Selektion von nicht markierten Zellen abgetrennt werden. Die Ergebnisse der Selektion sollten dann wiederum in die Entwicklung neuer Bibliotheken einfließen und so das Prinzip der Evolution aus der Natur ins molekularbiologische Labor übertragen werden.

5.1 ERSTELLUNG VON PEPTIDBIBLIOTHEKEN

Ein Ansatz, den steigenden Bedarf an neuen Leitstrukturen und Arzneistoffen zu decken ist es, Substanzbibliotheken zu erstellen. Die kombinatorische Chemie ist ein gängiges Verfahren zur Erstellung solcher Bibliotheken (Krier *et al.* 2005). Die Synthese erfolgt nach den Gesetzen der Kombinatorik: Die Vielfalt an Produkten richtet sich nach der Anzahl der Synthesebausteine und den Synthesebedingungen. Als biologisches System ist Autodisplay, wie auch das „Phage Display“, bei der Wahl der Synthesebausteine auf die natürlichen Bausteine des Lebens, die Aminosäuren, limitiert. Das Autodisplay ist im Gegensatz zu kombinatorisch chemischen Verfahren auf Strukturen beschränkt, die sich aus den natürlich vorkommenden Aminosäuren aufbauen lassen. Bedenkt man, dass unser Körper zur Steuerung von einer Vielzahl seiner Körperfunktionen auf genau solche peptidischen Strukturen angewiesen ist, so wandelt sich dieser vermeintliche Nachteil zu einem Vorteil. Bei der Mehrzahl an pharmazeutisch relevanten Targets

handelt es um Proteine, also Moleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Die natürlichen Steuerelemente und Interaktionspartner sind häufig wiederum Proteine oder Peptide. Daraus lässt sich ableiten, dass sich aus diesen Bausteinen auch ein Arzneistoff oder die Vorstufe eines Arzneistoffes zur Behandlung von Erkrankungen entwickeln lassen sollte. Das Ziel war es, durch Autodisplay eine Peptidbibliothek auf der Oberfläche von *E. coli* zu exprimieren. Der erste Schritt bei der Umsetzung dieses Ziels war es, ein geeignetes Verfahren zur Erstellung der Peptidbibliotheken zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Strategien zur Erstellung von Peptidbibliotheken eingesetzt. Jede dieser drei Strategien wies sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Der Einsatz zweier komplementärer Oligonukleotide, die nach der Hybridisierung die für die Peptidbibliothek codierende DNA mitsamt der zur Ligation in den Vektor notwendigen kompatiblen Enden liefern (Strategie I), ist ein einfaches und schnelles Verfahren. Diesem Vorteil stehen die Nachteile einer geringen Zahl von Transformanden und einer geringen Anzahl von Varianten gegenüber. Eine mögliche Ursache für die geringe Zahl lebensfähiger Zellen ist, dass es im Hybridisierungsansatz möglicherweise nicht für jedes einzelsträngige DNA-Molekül den vollständig komplementären Partner gibt und es so zu Fehlpaarungen kommen kann. Diese Fehlpaarungen könnten schließlich zum Verlust der für die Ligation in den Vektor erforderlichen kompatiblen Enden führen und so die Ligation erschweren oder verhindern. Nach der Transformation wurden lediglich $1,15 \times 10^5$ (pro 500 ng Plasmid-DNA) teilungsfähige *E. coli* Zellen erhalten. Eine zur Kontrolle durchgeführte Transformation eines unter den gleichen Bedingungen ligierten Kontrollansatzes lieferte $1,8 \times 10^7$ (pro 500 ng Plasmid-DNA) lebensfähige Zellen. Im Falle der Bibliothek lag die Zahl der Transformanden vier Zehnerpotenzen unter der Kompetenz ($2,3 \times 10^9$ Bakterienkolonien pro μg Plasmid-DNA) der verwendeten Zellen und zwei Zehnerpotenzen unter der Kontrolle, was die vorgestellte These der Fehlpaarungen stützt. Eventuelle Fehlpaarungen können außerdem dazu geführt haben, dass zwar ein Ligationsprodukt entstanden ist, es aber aufgrund der Fehlpaarungen zu Verschiebungen im Leseraster („frame-shift“) des Autotransporter-Fusionsproteins gekommen sein könnte. Denkbar ist, dass das so veränderte Autotransporter-Fusionsprotein zum Verlust der Funktionalität des Autotransporters geführt hat und der Transport an die Zelloberfläche verhindert wurde. Möglich ist auch, dass die Verschiebungen zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese geführt haben. Der Wechsel zu einer Strategie, bei der der zweite Strang der DNA mithilfe einer DNA-Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität synthetisiert wird, sollte diese Problematik umgehen und sicher stellen, dass stets durchgehend komplementäre DNA-Moleküle entstehen (Strategie II und Strategie III). Der Versuch, den zu randomisierenden Bereich und alle für die Ligation notwendigen Schnittstellen auf einem langen Oligonukleotid zu integrieren, warf neue Schwierigkeiten auf. Bei der nach der Strategie II erstellten Peptidbibliothek konnte die Zahl der teilungsfähigen Zellen zwar um zwei Zehnerpotenzen gesteigert

werden ($3,1 \times 10^7$ teilungsfähige Zellen pro 500 ng Plasmid-DNA), aber die Sequenzanalyse der Klone ergab einen Fehler in der Sequenz des Autotransporter-Fusionsproteins, der zu Verschiebungen des Leserasters führte. Dieser Fehler war auf die fehlerhafte Synthese des der Bibliothek zu Grunde liegenden Oligonukleotids zurückzuführen. Der gewünschte Erfolg konnte mit der Strategie III erzielt werden. Der zu klonierende Bereich wird bei dieser Strategie auf beide Oligonukleotide aufgeteilt. Ein Oligonukleotid trägt die variable Sequenz, das andere Oligonukleotid dient zum Auffüllen mithilfe einer DNA-Polymerase und verlängert die doppelsträngige DNA. Die größte mit dieser Strategie erstellte Bibliothek umfasste $1,8 \times 10^8$ teilungsfähige Zellen pro 500 ng Plasmid-DNA (Kompetenz der verwendeten *E. coli*: $2,1 \times 10^{10}$ pro μg Plasmid-DNA).

5.2 AUTODISPLAY VON PEPTIDINHIBITOREN UND PEPTID-BIBLIOTHEKEN UNTER DER KONTROLLE EINES INDUZIERBAREN PROMOTORS

In der Literatur finden sich Hinweise, dass sich kurze Peptide negativ auf das Wachstum von Bakterien auswirken können (Nedjar-Arroume *et al.* 2008; Nilsson *et al.* 2008). Die Überexpression eines rekombinanten Proteins oder Peptids kann für die Bakterien einen Selektionsnachteil darstellen, was zu einem verlangsamten Wachstum führen kann. Im Falle des Autodisplay von Peptidbibliotheken besteht bei einer Expression unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors die Gefahr, dass bestimmte Peptidvarianten verloren gehen, weil die entsprechende Bakterienzelle einen zu großen Selektionsnachteil hat oder das exprimierte Peptid antibakterielle Eigenschaften hat. Ein Peptid mit antibakteriellen Eigenschaften könnte bei der Anzucht bereits zu einem Absterben der Bakterienzelle, die es exprimiert oder, je nach der antibakteriellen Potenz, auch zum Absterben weiterer Zellen und somit zum Verlust weiterer Peptidvarianten führen. Aus diesem Grund wurden die Peptidbibliotheken im Rahmen dieser Arbeiten bevorzugt unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (T7 Promotor, pET System, Novagen®, MERCK) exprimiert. Durch den Zusatz eines Induktors lässt sich die Proteinexpression zeitlich steuern. Auf diesem Weg sollten sich die beschriebenen negativen Effekte einschränken lassen. Das als Leitstruktur eingesetzte Peptid 15 wurde unter der Kontrolle beider Promotoren exprimiert. Dadurch war es möglich, die Auswirkung des Wechsels des Expressionssystems zu untersuchen. Es konnten keine negativen Auswirkungen auf die Proteinexpression festgestellt werden. Im Gegenteil: Die Auswertung diverser Proteinelektrophoresen zeigte, dass die Proteinmenge im Falle der Expression unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors, wie erwartet, bei gleicher Ausgangszellzahl zunahm. Im Falle des Peptids 15 mit zusätzlichem Epitop HA konnte gezeigt

werden, dass ohne vorherige Induktion keine mit Coomassie-Färbung oder mit einem Western-Blot nachweisbare Expression erfolgte.

5.3 HOCHDURCHSATZSCREENING MITHILFE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Durchsuchen von Bibliotheken in der vorgestellten Größenordnung erfordert ein leistungsfähiges Screeningssystem. Bei der Analyse eukaryontischer Zellen z. B. in der medizinischen Diagnostik (Baumgartner *et al.* 2008; Karlsson *et al.* 2008) hat sich die Durchflusszytometrie zu einem Standardverfahren entwickelt. Bei der Analyse von Mikroorganismen und der Fluoreszenz-aktivierten Selektion (FACS) einzelner Zellen hat die Durchflusszytometrie an Bedeutung gewonnen (Dane *et al.* 2006). Die durchflusszytometrische Analyse von Peptidinhibitor-tragenden *E. coli* wurde in der Arbeitsgruppe Jose bereits etabliert (Jose und Zangen 2005). Die Selektion der gewünschten Peptidvarianten sollte durch FACS erfolgen. Die Peptide auf der Oberfläche der Bakterienzellen wurden mit den vorgestellten Verfahren markiert. Sowohl das Einschrittverfahren als auch das Zweischrittverfahren eignen sich gleichermaßen zur Markierung von Peptiden und Peptidbibliotheken auf der Oberfläche von *E. coli*, so dass die Entscheidung von den Erfordernissen des jeweiligen Experiments abhängig gemacht werden kann. Wie die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, ist es wichtig, die Bakterien zusätzlich zur der Markierung, die zur Selektion benutzt werden soll, mit einer alle Bakterien färbenden Methode zu markieren, damit eine bessere Unterscheidung der Bakterienzellen von partikulären Verunreinigungen ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden vorgestellt. Die Färbungen der Bakterien mit Nile Blue A und RH414 erlaubten eine einfache Unterscheidung zwischen Bakterien und Verunreinigungen. Die dritte Methode bestand darin, ein fluoreszierendes Protein im Zytosol der Bakterien zu exprimieren. Diese zusätzliche Expression des zusätzlichen Proteins scheint *E. coli* nicht auffällig im Wachstum zu behindern. Zwei Vorteile sind offenkundig, denn bei der Expression einer internen Kontrolle sind keine zusätzlichen Schritte zur Kontrollmarkierung notwendig, was Zeit und Kosten spart. Die verwendeten spezifischen Markierungsmethoden für Peptide sind affinitätsbasierte Verfahren, sie beruhen auf der Affinität einzelner Peptide für das Enzym humanes Cathepsin G und erlauben die Markierung der dazugehörigen Bakterienzelle. Bei der anschließenden Selektion mittels FACS werden demnach Peptidvarianten selektiert, die eine Affinität zum Enzym humanes Cathepsin G aufweisen. Die Frage, ob es sich bei den selektierten Peptidvarianten um Inhibitoren handelt, muss in einem späteren Schritt geklärt werden. Die Affinität eines Peptids zum Targetenzym ist eine Voraussetzung für eine Hemmung des Enzyms, nicht jedoch ein Garant dafür. Die Tatsache, dass es sich bei dem Screeningverfahren um ein Verfahren handelt, das auf der Affinität einzelner

Peptide zu humanem Cathepsin G beruht, erklärt auch, warum von einer vorhandenen Fluoreszenz bei der durchflusszytometrischen Analyse nicht ohne weiteres auf inhibitorische Eigenschaften des Peptides geschlossen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine aussagekräftige Korrelation zwischen den Fluoreszenzmittelwerten bei der Analyse im Durchflusszytometer und den bestimmten Hemmdaten gefunden werden. Eine weitere Tatsache, warum keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, könnte sein, dass der Fluoreszenzmittelwert einer Bakterienzelle von der Anzahl der gebundenen Fluoreszenzmoleküle und somit letztendlich von der Anzahl der auf der Oberfläche exprimierten Peptide abhängt. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass ein hochaffines Peptid, das aber in geringer Zahl auf der Zelloberfläche vorhanden ist, den gleichen oder gar einen kleineren Fluoreszenzmittelwert in der durchflusszytometrischen Messung liefert als ein Peptid, das in hoher Zahl auf der Oberfläche vorhanden ist, aber eine geringere Affinität aufweist. Primär korreliert der Fluoreszenzmittelwert mit der Anzahl der auf der Oberfläche der Bakterien vorhandenen Peptide und ist somit von der Expressionsstärke des Autotransporter-Fusionsproteins abhängig. Ein weiteres Problem, das seine Ursache im affinitätsbasierten Screening hat, ist die Definition der Auswahlkriterien zum Aussortieren „positiver“ Varianten. Aufgrund der diskutierten Abhängigkeiten des Selektionsparameters Fluoreszenz von der Anzahl der Peptidmoleküle auf der Zelloberfläche und deren Affinität zum Targetenzym konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass hohe Fluoreszenzwerte auch zu den besten Peptidinhibitoren führen müssen. Diese Frage kann erst beantwortet werden, wenn die Hemmdaten der Peptidvariante vorliegen. Im FACS erfolgt die Selektion einzelner *E. coli* immer aufgrund der Affinität, nicht aufgrund einer Hemmung von humanem Cathepsin G. Bei der Definition der Auswahlkriterien wurde in einen Fluoreszenzbereich, in dem sich ausschließlich die Kontrollzellen befanden, und einen Bereich höherer Fluoreszenzen, in dem keine Kontrollzellen zu finden waren, unterschieden. Der Fluoreszenzbereich der positiven Zellen wurde in mehrere Teilbereiche unterteilt, um sicher zu stellen, dass auch Peptidvarianten, die in geringer Zahl exprimiert wurden und deshalb zu einer geringeren Fluoreszenz führen, selektiert wurden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass mit dem beschriebenen Screeningsystem auf Bindung an humanes Cathepsin G gescreent wurde, wurden Bakterienzellen aus allen Teilbereichen der positiven Zellen selektiert. Auf diesem Weg sollte sichergestellt werden, dass keine potenten Inhibitoren durch eine nicht korrekte Wahl der Sortierungskriterien verloren gehen und die selektierten Varianten aus dem gesamten Bereich der humanes Cathepsin G bindenden *E. coli* stammen.

5.4 EVOLUTIVE ENTWICKLUNG VON PEPTIDINHIBITOREN – EVOLUTION IM REAGENZGLAS

Die Evolution stellt ein Grundprinzip des Lebens dar. Sie ist verantwortlich für die gesamte Vielfalt des Lebens auf der Erde. Es handelt sich um ein so erfolgreiches Prinzip, dass in verschiedenen Bereichen versucht wird, es zu kopieren. Die Expression von Peptidbibliotheken auf lebenden Zellen erlaubt es nun, dieses Prinzip auf die Entwicklung maßgeschneiderter Peptide zu übertragen. Alle in der Bibliothek enthaltenen Peptidvarianten wurden einem Auswahlprozess, der Markierung mit humanem Cathepsin G, unterzogen. Bakterienzellen, die humanes Cathepsin G bindende Peptide exprimieren, werden selektiert. Der Mensch übernimmt also die Rolle der Natur und sorgt dafür, dass nur bestimmte Varianten überleben (Selektion). Im Anschluss an die Selektion erfolgte eine Charakterisierung der Peptide. Diese Charakterisierung umfasste die Bestimmung der Hemmwerte und ein Protein-Peptid-Docking gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G. Peptide, die in der Lage waren, das Targetenzym zu hemmen, dienten als Vorlage der rationalen Generierung neuer Peptide, lieferten Anhaltspunkte für neue Variationsmöglichkeiten und waren der Ausgangspunkt für neue Bibliotheken (Variation). Die Schritte, die Teil der in dieser Arbeit umgesetzten Strategie, der evolutiven Entwicklung von Peptidinhibitoren waren, sind in **Abbildung 56** dargestellt. Im Rahmen der Arbeit wurden drei Entwicklungszyklen durchgeführt. Im ersten Zyklus wurden drei Inhibitoren, im zweiten Zyklus fünf und im dritten Zyklus wiederum drei Inhibitoren durch das Screening der Bibliotheken gefunden. Der limitierende Faktor war nicht das Fehlen von positiven Varianten, sondern es konnte aus zeitlichen Gründen nur ein Bruchteil der erhaltenen Varianten untersucht werden. Auch diese geringe Anzahl von positiven Varianten reichte aus, um das Funktionieren der Methode („Proof of Concept“) zu bestätigen.

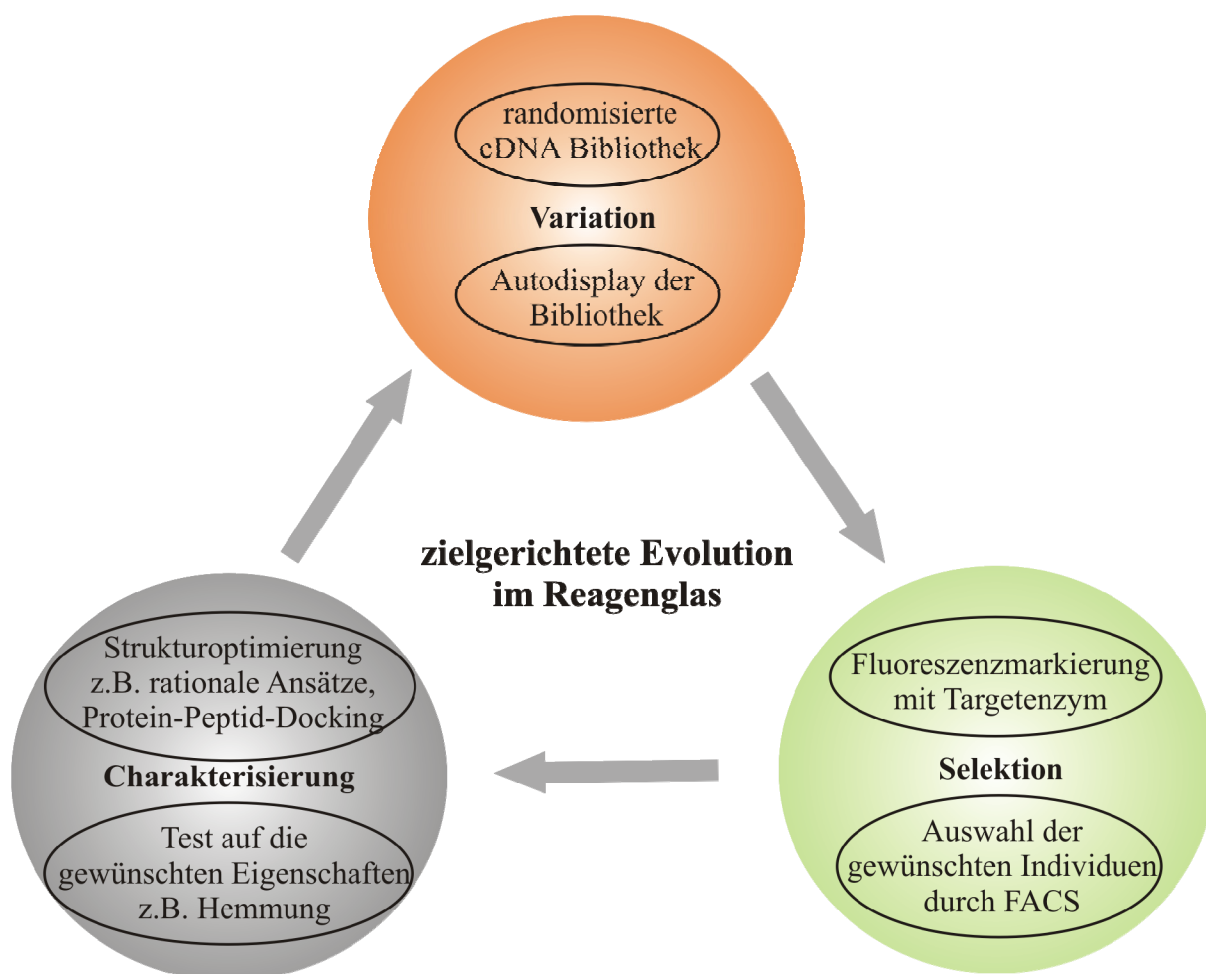


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Evolution im Reagenzglas. Eine Wiederholung der Schritte Variation, Selektion (und Charakterisierung) führt zu einer schrittweisen Verbesserung der Eigenschaften des Peptids. Das Ergebnis ist eine evolutiv optimierte Peptidstruktur.

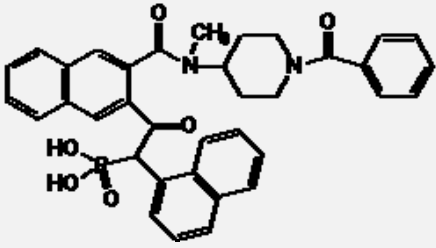
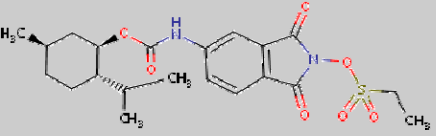
5.5 NEUE PEPTIDINHIBITOREN FÜR HUMANES CATHEPSIN G

Die Entwicklung von neuen Arzneistoffen war seit den 90igern geprägt von der „rule of five“ (Lipinski *et al.* 1996; Lipinski 2003). Die dort gestellten Anforderungen an einen Arzneistoffkandidaten konnten von Peptiden meist nicht erfüllt werden. Nach der verbreiteten Meinung eigneten sich Peptide lediglich als Vorlage für nichtpeptidische Arzneistoffe. Der Vorteil von Peptid- oder Proteinbibliotheken wurde jedoch erkannt und in die moderne Arzneistoffentwicklung einbezogen. Den Nachteilen wie z. B. einem hohen First-Pass-Effekt oder einer geringen Bioverfügbarkeit wurden mit der Entwicklung neuer Darreichungsformen begegnet (Morimoto *et al.* 2008). Die Entwicklung therapeutischer Peptide wird zurzeit stark vorangetrieben (Huther und Dietrich 2007; Lee und Burnett 2007; Banks 2008). Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Reihe neuer Peptidinhhibitoren für das Enzym humanes Cathepsin G gefunden werden. Zur Generie-

rung neuer Peptidstrukturen wurde auf einen biologischen Ansatz (evolutive Entwicklung von Enzyminhibitoren), das Autodisplay von Peptidbibliotheken, zurückgegriffen. Nachdem neue Strukturen vorlagen, konnten diese für ein Protein-Peptid-Docking gegen die Kristallstruktur von humanem Cathepsin G und für rationale Optimierungen benutzt werden. Obwohl das Protein-Peptid-Docking erfolgreich für die Entwicklung neuer Inhibitoren eingesetzt werden konnte, wurde im Falle des Peptids 27 auch ein Schwachpunkt dieser bioinformatischen Methode aufgedeckt. Beim Protein-Peptid-Docking konnte nicht in Inhibitoren oder Substrate unterschieden werden. Sowohl der evolutive Ansatz als auch der rationale Ansatz führten zu neuen Hemmstoffen. Die Tatsache, dass der beste hier vorgestellte Inhibitor das Resultat einer Kombination beider Verfahren ist, verdeutlicht welchen Vorteil eine Verzahnung verschiedener Methoden darstellt. Die Ursache, warum keiner der rational erstellten Inhibitoren beim Screening der Bibliothek gefunden werden konnte, könnte in der immensen Vielfalt der in der Bibliothek enthaltenen Peptide liegen. Im Falle einer 7-mer Peptidbibliothek gäbe es $1,28 \times 10^9$, im Falle einer 6-mer Peptidbibliothek gäbe es rechnerisch $6,4 \times 10^7$ verschiedene Peptidvarianten. Die Chance einen bekannten Inhibitor zu selektieren war demnach mit 1 zu $1,08 \times 10^4$ bei der erreichten Bibliotheksgröße von $1,15 \times 10^5$ bei der Bibliothek I äußerst gering. Erst die 6mer Bibliotheken III und IV enthielten mit $3,1 \times 10^7$ bzw. mit $1,18 \times 10^8$ rechnerisch genügend Varianten um die Selektion einer bekannten Varianten wahrscheinlicher zu machen (1 zu 0,5 bzw. 1 zu 1,84). Dennoch wurde auch im Falle der Bibliothek IV keine Variante doppelt aussortiert. Durch weitere Runden einer evolutiven Entwicklung könnte mithilfe der peptidischen Inhibitoren ein immer detaillierteres Pharmakophormodell entstehen und mit dessen Hilfe noch bessere nichtpeptidische Inhibitoren entwickelt werden. Nicht zuletzt stellen das Autodisplay und die evolutive Entwicklung von Peptidinhibitoren mithilfe des Autodisplay eine neue Technologieplattform dar, wie am Beispiel der Entwicklung neuer Inhibitoren für humanes Cathepsin G gezeigt worden ist und die flexibel einsetzbar ist.

Neben den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptidinhibitoren sind der Literatur eine Reihe nichtpeptidischer Inhibitoren beschrieben. Eine Übersicht über die bis jetzt in der Literatur beschriebenen nichtpeptidischen Inhibitoren von humanem Cathepsin G liefert **Tabelle 32**. Diese Inhibitoren sind deutlich potenter als die in dieser Arbeit beschriebenen Peptidinhibitoren. Das primäre Ziel dieser Arbeit war es allerdings nicht potentere Inhibitoren als die in (**Tabelle 32**) zu finden, sondern es lag vielmehr darin, eine Plattform zur universellen evolutiven Entwicklung von Enzyminhibitoren zu liefern. Dieses Ziel wurde erreicht.

Tabelle 32: Nichtpeptidische Inhibitoren von humanem Cathepsin G.

Struktur	Name	Hemmung	Literatur
	Cathepsin G Inhibitor I, Calbiochem, MERCK, Darmstadt	$IC_{50} = 53 \text{ nM}$ $K_i = 63 \text{ nM}$	(Greco <i>et al.</i> 2002; de Garavilla <i>et al.</i> 2005)
	6-((1'R,2'S,5'R)-menthyloxy-carbonyl)amino-2-[(ethylsulfonyl)oxy]-1H-isoindole-1,3-dione	$k(\text{obs})/[I] = 11000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Vagnoni <i>et al.</i> 2001)
%	RG1192	$K_i = 0,11 \text{ nM}$	(Ledoux <i>et al.</i> 2003)
%	Heparin S2	$K_i = 30 \text{ nM}$	(Sissi <i>et al.</i> 2006)

6 LITERATUR

- Abagyan R, Totrov M (2001) High-throughput docking for lead generation. *Curr Opin Chem Biol* 5:375-382
- Aina OH, Liu R, Sutcliffe JL, Marik J, Pan CX, Lam KS (2007) From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. *Mol Pharm* 4:631-651
- Asanuma H, Matsumoto-Takasaki A, Suzuki Y, Tamura S, Sata T, Kusada Y, Matsu-shita M, Fujita-Yamaguchi Y (2008) Influenza PR8 HA-specific Fab fragments produced by phage display methods. *Biochem Biophys Res Commun* 366:445-449
- Ballou SP, Kushner I (1992) C-reactive protein and the acute phase response. *Adv Intern Med* 37:313-336
- Banks WA (2008) Delivery of peptides to the brain: Emphasis on therapeutic development. *Peptide Science* 90:589 - 594
- Baumgartner C, Sonneck K, Krauth MT, Kneidinger M, Foßdinger M, Hauswirth AW, Mußllauer L, Valent P (2008) Immunohistochemical assessment of CD25 is equally sensitive and diagnostic in mastocytosis compared to flow cytometry. *European Journal of Clinical Investigation* 38:326
- Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Parsot C (1995) SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol Microbiol* 17:123-135
- Benz I, Schmidt MA (1992) AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* 6:1539-1546
- Bimboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523
- Brenner S, Lerner RA (1992) Encoded combinatorial chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5381-5383
- Buchta R, Pontet M, Fridkin M (1987) Binding of C-reactive protein to human neutrophils. *FEBS Lett* 211:165-168
- Bursulaya BD, Totrov M, Abagyan R, Brooks CL, 3rd (2003) Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *J Comput Aided Mol Des* 17:755-763
- Chao G, Lau WL, Hackel BJ, Sazinsky SL, Lippow SM, Wittrup KD (2006) Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc* 1:755-768
- Charles I, Fairweather N, Pickard D, Beesley J, Anderson R, Dougan G, Roberts M (1994) Expression of the *Bordetella pertussis* P.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology* 140:3301-3308

- Chartrain M, Salmon PM, Robinson DK, Buckland BC (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 11:209-214
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108
- Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ (1997) Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med* 186:739-747
- Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Locht C, Jacob-Dubuisson F (2001) Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *Embo J* 20:5040-5048
- Dane KY, Chan LA, Rice JJ, Daugherty PS (2006) Isolation of cell specific peptide ligands using fluorescent bacterial display libraries. *J Immunol Methods* 309:120-129
- Daugherty PS, Iverson BL, Georgiou G (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J Immunol Methods* 243:211-227
- de Garavilla L, Greco MN, Sukumar N, Chen ZW, Pineda AO, Mathews FS, Di Cera E, Giardino EC, Wells GI, Haertlein BJ, Kauffman JA, Corcoran TW, Derian CK, Eckardt AJ, Damiano BP, Andrade-Gordon P, Maryanoff BE (2005) A novel, potent dual inhibitor of the leukocyte proteases cathepsin G and chymase: molecular mechanisms and anti-inflammatory activity in vivo. *J Biol Chem* 280:18001-18007
- Dewald B, Rindler-Ludwig R, Bretz U, Baggiolini M (1975) Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 141:709-723
- Du Clos TW (2000) Function of C-reactive protein. *Ann Med* 32:274-278
- Dulon S, Cande C, Bunnett NW, Hollenberg MD, Chignard M, Pidard D (2003) Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:339-346
- Farizo KM, Huang T, Burns DL (2000) Importance of holotoxin assembly in Ptl-mediated secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68:4049-4054
- Feldhaus M, Siegel R (2004) Flow cytometric screening of yeast surface display libraries. *Methods Mol Biol* 263:311-332
- Fernandez RC, Weiss AA (1994) Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 62:4727-4738
- Ferrer-Lopez P, Renesto P, Schattner M, Bassot S, Laurent P, Chignard M (1990) Activation of human platelets by C5a-stimulated neutrophils: a role for cathepsin G. *Am J Physiol* 258:C1100-1107

- Francisco JA, Campbell R, Iverson BL, Georgiou G (1993) Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10444-10448
- Francisco JA, Georgiou G (1994) The expression of recombinant proteins on the external surface of *Escherichia coli*. *Biotechnological applications. Ann N Y Acad Sci* 745:372-382
- Gentschev I, Dietrich G, Goebel W (2002) The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10:39-45
- Greco MN, Hawkins MJ, Powell ET, Almond HR, Jr., Corcoran TW, de Garavilla L, Kauffman JA, Recacha R, Chattopadhyay D, Andrade-Gordon P, Maryanoff BE (2002) Nonpeptide inhibitors of cathepsin G: optimization of a novel beta-ketophosphonic acid lead by structure-based drug design. *J Am Chem Soc* 124:3810-3811
- Groutas WC, Huang H, Epp JB, Venkataraman R, McClenahan JJ, Tagusagawa F (1994) Mechanism-based inhibition of human leukocyte elastase and cathepsin G by substituted dihydrouracils. *Biochim Biophys Acta* 1227:130-136
- Gutschow M, Kuerschner L, Pietsch M, Ambrozak A, Neumann U, Gunther R, Hofmann HJ (2002) Inhibition of cathepsin G by 2-amino-3,1-benzoxazin-4-ones: kinetic investigations and docking studies. *Arch Biochem Biophys* 402:180-191
- Gutschow M, Neumann U (1997) Inhibition of cathepsin G by 4H-3,1-benzoxazin-4-ones. *Bioorg Med Chem* 5:1935-1942
- Gutschow M, Neumann U, Sieler J, Eger K (1998) Studies on 2-benzyloxy-4H-3,1-benzoxazin-4-ones as serine protease inhibitors. *Pharm Acta Helv* 73:95-103
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
- Handel S (2003) Entwicklung eines Ganzzell-Biokatalysators durch Autodisplay von Sorbitol Dehydrogenase. Dissertation Universitäts- und Landesbibliothek der Universität des Saarlandes
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182:288-292
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews* 68:692-744
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* 6:370-378
- Herrmann SM, Funke-Kaiser H, Schmidt-Petersen K, Nicaud V, Gautier-Bertrand M, Evans A, Kee F, Arveiler D, Morrison C, Orzechowski HD, Elbaz A, Amarenco P, Cambien F, Paul M (2001) Characterization of polymorphic structure of cathepsin G gene: role in cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1538-1543
- Hoess RH (2001) Protein design and phage display. *Chem Rev* 101:3205-3218

- Hof P, Mayr I, Huber R, Korzus E, Potempa J, Travis J, Powers JC, Bode W (1996) The 1.8 Å crystal structure of human cathepsin G in complex with Suc-Val-Pro-PheP-(OPh)₂: a Janus-faced proteinase with two opposite specificities. *Embo J* 15:5481-5491
- Huth A, Dietrich U (2007) The emergence of peptides as therapeutic drugs for the inhibition of HIV-1. *AIDS Rev* 9:208-217
- Jose J (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:607-614
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2001) Functional display of active bovine adrenodoxin on the surface of *E. coli* by chemical incorporation of the [2Fe-2S] cluster. *Chembiochem* 2:695-701
- Jose J, Bernhardt R, Hannemann F (2002) Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol* 95:257-268
- Jose J, Betscheider D, Zangen D (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Anal Biochem* 346:258-267
- Jose J, Handel S (2003) Monitoring the cellular surface display of recombinant proteins by cysteine labeling and flow cytometry. *Chembiochem* 4:396-405
- Jose J, Jahnig F, Meyer TF (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* 18:378-380
- Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178:107-110
- Jose J, von Schwichow S (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *ChemBioChem* 5:491-499
- Jose J, Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-1226
- Karlsson M, Nilsson O, Thorn M, Winqvist O (2008) Detection of metastatic colon cancer cells in sentinel nodes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 334:122-133
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* 11:2327-2335
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1993) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays* 15:799-805
- Krier M, Araujo-Junior JX, Schmitt M, Duranton J, Justiano-Basaran H, Lugnier C, Bourguignon JJ, Rognan D (2005) Design of small-sized libraries by combinatorial assembly of linkers and functional groups to a given scaffold: application to the structure-based optimization of a phosphodiesterase 4 inhibitor. *J Med Chem* 48:3816-3822

- Krovat EM, Fruhwirth KH, Langer T (2005) Pharmacophore identification, in silico screening, and virtual library design for inhibitors of the human factor Xa. *J Chem Inf Model* 45:146-159
- Ladant D, Ullmann A (1999) Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 7:172-176
- Lanzillotti R, Coetzer TL (2008) Phage display: a useful tool for malaria research? *Trends Parasitol* 24:18-23
- Ledoux D, Merciris D, Barritault D, Caruelle JP (2003) Heparin-like dextran derivatives as well as glycosaminoglycans inhibit the enzymatic activity of human cathepsin G. *FEBS Lett* 537:23-29
- Lee CY, Burnett JC, Jr. (2007) Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart Fail Rev* 12:131-142
- Legedz L, Randon J, Sessa C, Baguet JP, Feugier P, Cerutti C, McGregor J, Bricca G (2004) Cathepsin G is associated with atheroma formation in human carotid artery. *J Hypertens* 22:157-166
- Lipinski CA (2003) Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five. *Drug Discov Today* 8:12-16
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ (1996) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46:3-26
- Maierov V, Sheridan RP (2005) Enhanced virtual screening by combined use of two docking methods: getting the most on a limited budget. *J Chem Inf Model* 45:1017-1023
- Matteucci E, Giampietro O (2008) Flow cytometry study of leukocyte function: analytical comparison of methods and their applicability to clinical research. *Curr Med Chem* 15:596-603
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1997) Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. *J Bacteriol* 179:794-804
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* 181:7014-7020
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307:178-180
- Meng G, Surana NK, St Geme JW, 3rd, Waksman G (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the Haemophilus influenzae Hia trimeric autotransporter. *Embo J* 25:2297-2304
- Messeguer A, Cortes N (2007) Combinatorial chemistry in cancer research. *Clin Transl Oncol* 9:83-92
- Meyer TF, Halter R, Pohlner J (1987) Mechanism of extracellular secretion of an IgA protease by gram-negative host cells. *Adv Exp Med Biol* 216B:1271-1281

- Michiels T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM, Cornelis G (1990) Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun* 58:2840-2849
- Miyata J, Tani K, Sato K, Otsuka S, Urata T, Lkhagvaa B, Furukawa C, Sano N, Sone S (2007) Cathepsin G: the significance in rheumatoid arthritis as a monocyte chemoattractant. *Rheumatol Int* 27:375-382
- Morimoto K, Chono S, Kosai T, Seki T, Tabata Y (2008) Design of cationic microspheres based on aminated gelatin for controlled release of peptide and protein drugs. *Drug Deliv* 15:113-117
- Mugnaini C, Petricci E, Corelli F, Botta M (2005) Combinatorial chemistry as a tool for targeting different stages of the replicative HIV-1 cycle. *Comb Chem High Throughput Screen* 8:387-401
- Nakajima K, Powers JC, Ashe BM, Zimmerman M (1979) Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem* 254:4027-4032
- Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC (2002) Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 84:337-356
- Navarre WW, Schneewind O (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:174-229
- Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje EY, Traisnel J, Krier F, Mary P, Kouach M, Briand G, Guillochon D (2008) Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. *Peptides* 29:969-977
- Nilsson M, Wasylik S, Morgelin M, Olin AI, Meijers JC, Derksen RH, de Groot PG, Herwald H (2008) The antibacterial activity of peptides derived from human beta-2 glycoprotein I is inhibited by protein H and M1 protein from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 67:482-492
- Noren KA, Noren CJ (2001) Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23:169-178
- Ogata K (2008) Diagnostic flow cytometry for low-grade myelodysplastic syndromes. *Hematol Oncol Online* veröffentlicht, DOI:10.1002/hon.857
- Oomen CJ, van Ulsen P, van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* 23:1257-1266
- Orry AJ, Abagyan RA, Cavasotto CN (2006) Structure-based development of target-specific compound libraries. *Drug Discov Today* 11:261-266
- Pettersson S, Clotet-Codina I, Este JA, Borrell JI, Teixido J (2006) Recent advances in combinatorial chemistry applied to development of anti-HIV drugs. *Mini Rev Med Chem* 6:91-108
- Phoebe Chen YP, Chen F (2008) Identifying targets for drug discovery using bioinformatics. *Expert Opin Ther Targets* 12:383-389

- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* 325:458-462
- Pugsley AP, Possot O (1993) The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocalization or assembly of pilin-like PulG protein into a multi-protein complex. *Mol Microbiol* 10:665-674
- Rafiq K, Hanscom M, Valerie K, Steinberg SF, Sabri A (2008) Novel mode for neutrophil protease cathepsin G-mediated signaling: membrane shedding of epidermal growth factor is required for cardiomyocyte anoikis. *Circ Res* 102:32-41
- Ramachandran R, Sadofsky LR, Xiao Y, Botham A, Cowen M, Morice AH, Compton SJ (2007) Inflammatory mediators modulate thrombin and cathepsin-G signaling in human bronchial fibroblasts by inducing expression of proteinase-activated receptor-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L788-798
- Rice JJ, Schohn A, Bessette PH, Boulware KT, Daugherty PS (2006) Bacterial display using circularly permuted outer membrane protein OmpX yields high affinity peptide ligands. *Protein Sci* 15:825-836
- Rosalki SB (2001) C-reactive protein. *Int J Clin Pract* 55:269-270
- Rutherford N, Mourez M (2006) Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microb Cell Fact* 5:22
- Rykl J, Thiemann J, Kurzwaski S, Pohl T, Gobom J, Zidek W, Schluter H (2006) Renal cathepsin G and angiotensin II generation. *J Hypertens* 24:1797-1807
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Third Edition edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sandkvist M (2001a) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40:271-283
- Sandkvist M (2001b) Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* 69:3523-3535
- Schechter NM, Gutschow M (2001) Inhibition of human chymase by 2-amino-3,1-benzoxazin-4-ones. *Bioorg Med Chem* 9:947-954
- Schiemann F, Grimm TA, Hoch J, Gross R, Lindner B, Petersen F, Bulfone-Paus S, Brandt E (2006) Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. *Blood* 107:2234-2242
- Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenbusch JP (1995) Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267:512-514
- Schultheiss E (2003) *Autodisplay aktiver Esterasen und Konstruktion von Enzymbibliotheken*. Dissertation Universitäts- und Landesbibliothek der Universität des Saarlandes
- Schultheiss E, Paar C, Schwab H, Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic* 18:89-97
- Selak MA, Chignard M, Smith JB (1988) Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J* 251:293-299

- Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer AC, Greenhough TJ (1996) Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat Struct Biol* 3:346-354
- Sissi C, Lucatello L, Naggi A, Torri G, Palumbo M (2006) Interactions of low-molecular-weight semi-synthetic sulfated heparins with human leukocyte elastase and human Cathepsin G. *Biochem Pharmacol* 71:287-293
- Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317
- Sneeden JL, Loeb LA, edited by Arnold FH, Georgiou G (2003) *Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols*, First edn. Humana Press
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, Baumeister D, Steinbüchel A (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* 171:73-80
- Starkey PM, Barrett AJ (1976) Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties. *Biochem J* 155:273-278
- Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC (1977) The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim Biophys Acta* 483:386-397
- Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW (2002) A review of protein-small molecule docking methods. *J Comput Aided Mol Des* 16:151-166
- Tong FK, Chow S, Hedley D (2006) Pharmacodynamic monitoring of BAY 43-9006 (Sorafenib) in phase I clinical trials involving solid tumor and AML/MDS patients, using flow cytometry to monitor activation of the ERK pathway in peripheral blood cells. *Cytometry B Clin Cytom* 70:107-114
- Travis J, Giles PJ, Porcelli L, Reilly CF, Baugh R, Powers J (1979) Human leucocyte elastase and cathepsin G: structural and functional characteristics. *Ciba Found Symp*:51-68
- Vachino G, Heck LW, Gelfand JA, Kaplan MM, Burke JF, Berninger RW, McAdam KP (1988) Inhibition of human neutrophil and *Pseudomonas* elastases by the amyloid P-component: a constituent of elastic fibers and amyloid deposits. *J Leukoc Biol* 44:529-534
- Vadivelan S, Sinha BN, Rambabu G, Boppana K, Jagarlapudi SA (2008) Pharmacophore modeling and virtual screening studies to design some potential histone deacetylase inhibitors as new leads. *J Mol Graph Model* 26:935-946
- Vagnoni LM, Gronostaj M, Kerrigan JE (2001) 6-Acylamino-2-(ethylsulfonyl)oxy]-1H-isoindole-1,3-diones mechanism-based inhibitors of human leukocyte elastase and cathepsin G: effect of chirality in the 6-acylamino substituent on inhibitory potency and selectivity. *Bioorg Med Chem* 9:637-645
- van Ulsen P, van Alphen L, ten Hove J, Fransen F, van der Ley P, Tommassen J (2003) A Neisserial autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* 50:1017-1030

- Villar HO (2007) Computational medicinal chemistry. *Curr Top Med Chem* 7:1489-1490
- Volanakis JE (2001) Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 38:189-197
- Watorek W, Farley D, Salvesen G, Travis J (1988) Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function, and biological control. *Adv Exp Med Biol* 240:23-31
- Wentzel A, Christmann A, Kratzner R, Kolmar H (1999) Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the Ecballium elaterium trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J Biol Chem* 274:21037-21043
- Yavin EJ, Fridkin M (1998) Peptides derived from human C-reactive protein inhibit the enzymatic activities of human leukocyte elastase and cathepsin G: use of overlapping peptide sequences to identify a unique inhibitor. *J Pept Res* 51:282-289
- Yavin EJ, Yan L, Desiderio DM, Fridkin M (1996) Synthetic peptides derived from the sequence of human C-reactive protein inhibit the enzymatic activities of human leukocyte elastase and human leukocyte cathepsin G. *Int J Pept Protein Res* 48:465-476
- Yoshio Nakano YY, Yoshihisa Yamashita and Toshihiko Koga (1995) Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. *Gene* Volume 162:157-158
- Zangen D (2002) Autodisplay von Enzyminhibitoren. Dissertation Universitäts- und Landesbibliothek der Universität des Saarlandes
- Zhang YW, Xu H (2007) Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer's disease: understanding APP metabolism. *Curr Mol Med* 7:687-696

7 ANHANG

7.1 PUBLIKATIONEN

Jose J und Betscheider D (2008) Staining *Escherichia coli* cells with Nile Blue A for flow cytometry. Anal Biochem submitted

Jose J, Betscheider D und Zangen, D (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. Anal Biochem 346(2): 258-67

7.2 TAGUNGSBEITRÄGE

Betscheider D, Ray S, Lengauer T und Jose J (2005) Darstellung von Peptidbibliotheken an der Oberfläche von *E. coli* und Protein-Peptid Docking zur Entwicklung neuer Inhibitoren von Cathepsin G. P10-2, 24 Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betscheider D, Ray S, Lengauer T und Jose J (2004) Surface Display Library Screening und Protein-Peptid Docking zur Entwicklung neuer Inhibitoren von Cathepsin G. Nr. 50 Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft

Betscheider D, Ray S, Lengauer T und Jose J (2003) Structure-Activity-Relationship of peptidic human Cathepsin G inhibitors obtained by surface display library screening. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Würzburg

Jose J, Betscheider D, Ray S, Lengauer T, Zangen D (2003) New inhibitors of human Cathepsin G identified by surface display library screening and peptide-protein docking. Proceedings 46-49 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara

Betscheider D, Ray S, Zangen D, Schultheiss E, Lengauer T und Jose J (2002) A new model for an inhibitor of human cathepsin G by bacterial surface display library screening and protein-peptide docking. P13 European Conference on Computational Biology, Saarbrücken

7.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
% (v/v)	Volumenanteil in %
% (w/v)	Gewichtsanteil in %
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleosid
DTT	Dithithreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GFP	Green Fluorescent Protein
IC ₅₀ -Wert	Konzentration eines Hemmstoffes, die zu einer Hemmung des Enzyms von 50 % führt
Inh.	Inhibition, Hemmung
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K _i (-Wert)	Inhibitorkonstante
LB	Luria Bertani
MALDI	matrix assisted laser desorbtion ionisation

Abkürzung	Bedeutung
mF	mittlere Fluoreszenz
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
OD	Optische Dichte
RT	Raumtemperatur
SSC	Side Scatter
TAE	Trisacetat/EDTA Elektrophoresepuffer
TE	Trisacetat/EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin
TOF	Time of Flight
Tris	2-Amino-2Hydoxymethyl-1.3-Propandiol
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
λ	Wellenlänge

7.4 PLASMIDKARTEN DER VERWENDETEN PLASMIDE



