

# **Entwicklung von multidimensionalen Hochdurchsatzmethoden zur Analyse von Partikel-basierten Peptidbibliotheken**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

*doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat.)

im Fach: Chemie

Spezialisierung: Angewandte Analytik und Umweltanalytik

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von M.Sc. Timm Schwaar

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. PD Dr. Michael G. Weller
2. Prof. Dr. Hans G. Börner
3. Prof. Dr. Heiko Möller

Tag der mündlichen Prüfung: 18.08.2020



Diese Arbeit ist vom Mai 2015 bis Januar 2020 unter der Betreuung von PD Dr. Michael G. Weller an der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) und am Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.



*Do or do not. There is no try.*

**Yoda, Grand Master of the Jedi Order**



## **Danksagung**

Mein Dank geht an erster Stelle an Herrn Dr. Michael G. Weller dafür, dass er mir die Chance gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Gruppe an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) anzufertigen. Die Zeit und Mühe, die er sich für meine Betreuung genommen hat, haben diese Arbeit und auch mich als Wissenschaftler maßgeblich geprägt. Des Weiteren möchte ich mich für das Vertrauen bedanken, dass er mir entgegen gebracht hat, um insgesamt sieben Praktika sowie Bachelor- und Masterarbeiten zu betreuen.

Außerdem möchte ich meinem Zweitgutachter, Herr Prof. Dr. Hans G. Börner, für die jahrelange konstruktive Kooperation danken. Gerne habe ich mit ihm und seiner Gruppe in vielen Forschungsprojekten zusammengearbeitet. Nicht zuletzt möchte ich mich bei ihm für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Heiko M. Möller für das Begutachten meiner Arbeit. Prof. Dr. Michael Linscheid möchte ich danken, dass er sich bereit erklärt hat Mitglied meiner Kommission zu sein. Für die Übernahme des Vorsitzes meiner Kommission danke ich Prof. Stefan Hecht Ph.D., der dafür den weiten Weg aus Aachen auf sich genommen hat.

Der Gruppe 1.5 Proteinanalytik an der BAM, in der ich für fünf Jahre arbeiten durfte, danke ich für viele Jahre der großartigen Zusammenarbeit und Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt dabei meinen beiden Bürokollegen Dr. Ioana Abbas und Jan Ole Kaufmann. Beide hatten immer ein offenes Ohr und eine helfende Hand für jedes wissenschaftliche und private Problem. Teodor Tchipilov danke ich für die anfängliche Unterstützung und Zusammenarbeit mit der SPR. Herrn Dr. Steffen Weidner von der BAM möchte ich für die Einführung und Hilfe bei jeglichem Problem mit dem MALDI-MS danken. Auch wenn mir Freitagabend ein MALDI-Target im Gerät steckengeblieben ist, konnte ich mich auf ihn verlassen. Frau Dr. Ines Feldmann (BAM) möchte ich für die Nutzung des Digitalmikroskops danken.

Danken möchte ich auch Fabian Müller, der mir die Grundlagen des programmieren beigebracht hat. Diese Arbeit wäre eine andere, hätte er sich nicht die Zeit genommen mich in das komplexe Thema Java einzuführen.

Mein Dank geht auch an meine zahlreichen Kooperationspartner. Hierbei muss an erster Stelle Dr. Dario Remmler genannt werden, mit dem ich über Jahre ausgesprochen produktiv und gerne zusammen gearbeitet habe. Ebenso die Kooperationen mit Dr. Steffanie Ickert und Dr. Fabian Eisenreich waren mir immer eine fachliche und persönliche Bereicherung.

Vielen Dank auch an die Studierenden, die ich über die Jahre betreuen durfte, namentlich: Peter Taube, Jan van den Berg, Maike Lettow, Michael Linke und Georg Tscheuschner. Mein besonderer Dank gilt hierbei Maike Lettow und Michael Linke, deren praktische Arbeiten zur Vervollständigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Für das Korrekturlesen danke ich ausdrücklich Dustin Schwarz, Jan Ole Kaufmann, Peter Carl, Maren Dietrich und Jana Winkler. Vielen Dank für die Zeit und Mühe die sie sich genommen haben jede inhaltliche und grammatikalische Ungenauigkeit aufzudecken.

Eine große Unterstützung in der gesamten Zeit waren meine Freunde und Familie. Hier gilt mein Dank, Alexander, Anna, Borai, Fabi, Jessi, Kosi, Marc-André, Maren, Meike, Nina, Sebi, Sophie, Svea, Tobi, Viki und natürlich alle anderen die ich an dieser Stelle vielleicht vergessen habe. Danke auch an mein Patenkind Charlotte, die mein Leben in den letzten zwei Jahren mit ihrem Lachen und ihrem kindlichen Blick so sehr bereichert hat. Nicht genug kann ich meinen Eltern danken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen wäre ich sicher nicht da, wo ich jetzt bin.

Abschließend gilt mein unendlicher Dank Dustin Schwarz. Seine Ruhe und Unterstützung haben mir auch in den stressigsten Phasen und Situationen so sehr geholfen. Auch danke dafür, dass er mir in der Zeit viele lästige Arbeiten des Alltags abgenommen hat.

## **Kurzzusammenfassung**

Gegenwärtig ist das Interesse und der Bedarf von Proteinbindern insbesondere in der Biotechnik und Pharmaforschung sehr groß. Kombinatorische, Partikel-basierte (One-Bead-One-Compound) Peptidbibliotheken sind dabei eine seit vielen Jahren etablierte Technik, um selektiv bindende Proteine zu identifizieren. Allerdings beinhaltet das Screening dieser Peptidbibliotheken aufwendige Schritte, wie die manuelle Separation, Sequenzierung und Charakterisierung von identifizierten Bindern. In dieser Arbeit wurde ein Chip-System entwickelt, auf dem alle Schritte eines Screenings durchgeführt werden können. Dafür wurde ein herkömmlicher Glasobjektträger mit einem magnetisch leitenden, doppelseitigen Klebeband versehen. Die Partikel der Bibliothek wurden durch ein Sieb aufgetragen. Dies führte zu einer geordneten Immobilisierung der Partikel auf dem Chip. Über 30.000 Partikel konnten so auf einem Chip immobilisiert werden.

Das Auftreten von falsch-positiven Treffern ist eine der stärksten Limitierungen von Partikel-basierten Peptidbibliotheken. Das entwickelte Chip-Format erlaubt die wiederholte Regeneration des Chips und eröffnet so die Möglichkeit von Kontrollscreenings. Bei diesen Kontrollscreenings können falsch-positive Partikel zuvor ausgeschlossen und nur bindende Peptide identifiziert werden.

Für die Identifizierung von selektiven Protein-bindenden Peptiden wird die immobilisierte Peptidbibliothek mit einem Fluorophor-markierten Protein inkubiert, bindende Partikel mittels Fluoreszenzscan identifiziert und die Peptidsequenz direkt auf dem Chip mittels Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-(MALDI)-Flugzeit-(TOF)-Massenspektroskopie (MS) bestimmt. Die Durchführung einer Abbruchsequenz-Methode erlaubt die eindeutige Bestimmung der Peptidsequenzen mit einer nahezu 100 % Genauigkeit. Für eine automatisierte Auswertung wurde eine Software entwickelt, die eine Übersetzung der Massenspektren in der entsprechenden Peptidsequenz zulässt.

Die entwickelte Technologie wurde in einem FLAG-Peptid-Modell validiert. Bei dem Screening wurden neue anti-FLAG-Antikörper-bindende Peptide identifiziert. Anschließend wurden in einem Screening von ca. 30.000 Partikeln IgG-bindende Peptide mit mittleren mikromolaren Dissoziationskonstanten identifiziert. Für die Identifizierung stärkerer Binder wurde eine magnetische Anreicherung entwickelt, die dem Chip-Screening vorgeschaltet werden kann. Hiermit wurden aus ca. 1 Million gescreenter Partikel, Peptide mit Dissoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Bereich identifiziert.

## **Abstract**

The screening of one-bead-one-compound (OBOC) libraries is a well-established technique for the identification of protein-binding ligands. The demand for binders with high affinity and specificity towards various targets has surged in the biomedical and pharmaceutical field in recent years. The combinatoric peptide screening traditionally involves tedious steps such as affinity selection, bead picking, sequencing and characterization. In this thesis, a high-throughput “all-on-one chip” system is presented to avoid slow and technically complex bead picking steps. Beads of a combinatorial peptide library are immobilized on a conventional glass slide equipped with an electrically conductive tape. The beads are applied by using a precision sieve, which allows the spatially ordered immobilization of more than 30,000 beads on one slide.

The occurrence of false-positive hits is one of the severest limitations of combinatorial libraries. The novel and robust chip format presented in this thesis allows for repeated regeneration of the chip surface by denaturation of bound proteins. This opens the possibility for multi-step incubations and control scans, highly reducing the number of false-positive hits.

For the target screening, the immobilized library is subsequently incubated with a fluorophore-labeled target protein. In a fluorescence scan followed by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-time of flight (TOF) mass spectrometry (MS), high-affinity binders are directly and unambiguously sequenced directly from the bead. The use of an optimized ladder sequencing approach improved the accuracy of the de-novo sequencing step to 100 %. To establish an unbiased and high-throughput method for the evaluation of peptide truncation spectra, a software tool was developed which allows for the automated processing of the spectra. This provides a convenient method for the decoding of the sequences from the MALDI-TOF MS.

This new technique was validated by employing a FLAG-based model system. In a first step, new peptide binders for the M2 anti-FLAG monoclonal antibody were identified. Finally, this system was utilized to screen for IgG-binding peptides. The screening of about 30.000 peptides on one chip led to the identification of peptide binders in the mid micromolar range. A magnetic enrichment technique was developed to increase the number of screened beads. By combining the magnetic enrichment strategy with the chip system, 1 million beads were screened and IgG-binders in the low micromolar range were identified.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	VII
Kurzzusammenfassung .....	IX
Abstract .....	X
Abkürzungen .....	XIV
1 Einleitung .....	1
2 Zielstellung .....	3
3 Theoretische Grundlagen .....	5
3.1 Peptide in der klinischen Forschung .....	5
3.2 Antikörperbindende Peptide .....	6
3.3 Phagen-Display .....	8
3.4 Synthetische Peptidbibliotheken .....	11
3.4.1 Multi-Pin-Technologie .....	11
3.4.2 Tea-Bag-Technologie .....	12
3.4.3 Photolithographie .....	12
3.4.4 SPOT-Synthese .....	13
3.5 <i>One-Bead-One-Compound</i> -Bibliotheken .....	16
3.5.1 <i>Split-and-Mix</i> -Synthese .....	16
3.5.2 Screening von OBOC-Bibliotheken .....	17
3.5.3 Separation positiver Treffer .....	18
3.5.4 Direkte Peptidsequenzidentifizierung .....	19
3.5.5 Indirekte Kodierungsmethoden .....	22
3.6 Hochdurchsatzmethoden für die Analyse von OBOC-Bibliotheken .....	25
3.6.1 Durchflusszytometrische Sortierung von OBOC-Bibliotheken .....	26
3.6.2 Chip-basiertes Screening .....	27
3.6.3 Magnetische Separation .....	27
3.7 Methoden zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten .....	29
3.7.1 ELISA .....	29
3.7.2 SPR .....	30
3.7.3 Weitere Methoden .....	34
4 Ergebnisse und Diskussion .....	37
4.1 Entwicklung des Hochdurchsatzverfahrens zur Analyse von OBOC-Bibliotheken .	37
4.1.1 Partikelimmobilisierung .....	37
4.1.2 Peptidsequenzidentifizierung positiver Treffer .....	42

4.1.3	On-Chip-Inkubation .....	52
4.2	Entwicklung der Software Spec2Seq zur Identifizierung von Peptidsequenzen .....	57
4.2.1	GUI für die Auswertung von MS/MS-Spektren .....	59
4.2.2	GUI für die Auswertung von Abbruchsequenzspektren.....	63
4.2.3	Exkurs: Weitere Anwendung von Spec2Seq.....	65
4.3	Methodenvalidierung.....	66
4.4	Peptidbibliothek zur Identifizierung von anti-FLAG-Ak-Bindern.....	69
4.4.1	Bindungsassay .....	69
4.4.2	Sequenzierung .....	72
4.4.3	Affinitätsbestimmung ausgewählter Peptide zum anti-FLAG-Ak.....	73
4.5	Peptidbibliotheken zur Identifizierung von IgG-Bindern .....	76
4.5.1	Screening der Peptidbibliothek 2 gegen Maus-IgG .....	77
4.5.2	Entwicklung einer magnetischen Anreicherung.....	82
4.5.3	Screening der Peptidbibliothek 3 gegen Maus-IgG .....	84
4.6	Methodenvergleich .....	90
5	Zusammenfassung .....	93
6	Experimental Teil .....	98
6.1	Reagenzien und Lösungsmittel .....	98
6.2	Puffer und Lösungen.....	100
6.3	Geräte.....	101
6.4	Verbrauchsmaterialien.....	102
6.5	Analytische Methoden.....	103
6.6	Peptidsynthese.....	105
6.6.1	Vorbereitung der Partikel .....	105
6.6.2	Peptidsynthese ohne Abbruchsequenzen.....	105
6.6.3	Peptidsynthese mit Abbruchsequenzen.....	106
6.6.4	Synthese Peptidbibliothek 1 .....	107
6.6.5	Synthese Peptidbibliothek 2 .....	108
6.6.6	Synthese Peptidbibliothek 3 .....	108
6.7	Immobilisierung der Partikel auf ITO-Slides.....	108
6.8	Chip Präparation .....	109
6.9	Bindungsassay.....	109
6.10	Peptidabspaltung und Matrixauftragung .....	110
6.11	Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS/MS .....	110

6.12	Dekodierung der Abbruchsequenzspektren mittels MALDI-TOF-MS.....	111
6.13	Magnetische Anreicherung .....	111
6.14	Screenings .....	112
6.14.1	Screening zur Methodvalidierung .....	112
6.14.2	Screening der Peptidbibliothek 1 .....	112
6.14.3	Screening der Peptidbibliothek 2 .....	113
6.14.4	Screening der Peptidbibliothek 3 .....	113
6.15	SPR-Messungen.....	114
6.15.1	SPR-Chip-Vorbereitung.....	114
6.15.2	SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 1.....	114
6.15.3	SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 2.....	115
6.15.4	SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 3.....	115
6.16	Software Spec2Seq .....	116
6.16.1	Auswertung von Fragmentspektren mittels Spec2Seq .....	116
6.16.2	Auswertung von Abbruchsequenzspektren mittels Spec2Seq .....	119
7	Literatur.....	123
8	Anhang.....	134
8.1	MALDI-TOF-MS-Messungen der Testpeptide .....	134
8.2	Auswertung von MS/MS-Spektren mittels Spec2Seq.....	138
8.3	Auswertung von Abbruchsequenzspektren-Spektren mittels Spec2Seq.....	139
8.4	Peptidsequenzen der des Screenings der Peptidbibliothek 1 .....	142
8.5	Affinitätsranking der anti-FLAG-Ak-bindenden Peptide .....	143
8.6	Affinitätsbestimmung ausgewählter Peptide zu Maus-IgG .....	146
8.7	Prescreenings der Peptidbibliothek 3 .....	150
	Publikationsliste .....	151
	Selbstständigkeitserklärung.....	153

## Abkürzungen

<b>2,5-DHAP</b>	2,5-Dihydroxyacetophenon
<b>2,5-DHB</b>	2,5-Dihydroxybenzoesäure
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>Äq.</b>	Äquivalent(e)
<b>AS</b>	Aminosäure(n)
<b>Boc</b>	tert-Butyloxycarbonyl
<b>CHCA</b>	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxizimtsäure ( <i><math>\alpha</math>-Cyano-4-hydroxycinnamic-acid</i> )
<b>CID</b>	Kollisionsinduzierte Dissoziation ( <i>Collision-induced Dissociation</i> )
<b>COPAS</b>	<i>Complex Object Parametric Analyzer and Sorter</i>
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>ECD</b>	<i>Electron-Capture Dissociation</i>
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>ESI</b>	Elektrosprayionisation
<b>ETD</b>	<i>Electron Transfer Dissociation</i>
<b>Fmoc</b>	Fluorenylmethoxycarbonyl
<b>FPIA</b>	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays
<b>GUI</b>	Graphische Oberfläche ( <i>Graphical User Interface</i> )
<b>HCD</b>	<i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
<b>HCTU</b>	2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium- hexafluorophosphat
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HMBA</b>	4-(Hydroxymethyl)benzoesäure ( <i>4-(Hydroxymethyl)benzoic acid</i> )
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>ITC</b>	Isotherme Titrationskalorimetrie ( <i>Isothermal Titration Calorimetry</i> )
<b>ITO</b>	Indiumzinnoxid ( <i>Indium Tin Oxide</i> )

<b>LNA</b>	<i>Locked Nucleic Acid</i>
<b>MALDI</b>	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> )
<b>MArS</b>	Microarray-Scanner
<b>MAS</b>	<i>Maskless Array Synthesizer</i>
<b>MS</b>	Massenspektrometrie
<b>MS/MS</b>	Tandem-Massenspektrometrie
<b>NHS</b>	<b>N</b> -Hydroxysuccinimid
<b>NMM</b>	4- <b>N</b> -Methylmorpholin
<b>NMP</b>	<b>N</b> -Methyl-2-pyrrolidon
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
<b>OBOC</b>	<i>One-Bead-One-Compound</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PMT</b>	Photomultiplerröhre ( <i>Photomultiplier Tube</i> )
<b>PS</b>	Polystyrol
<b>TIS</b>	Triisopropylsila

Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgte nach dem von der IUPAC empfohlenen Ein- und Dreibuchstaben-Code.<sup>[1]</sup>

## 1 Einleitung

Durch eine stetig wachsende Weltbevölkerung und eine immer älter werdende Gesellschaft, steht die Medizin vor immensen Herausforderungen. So müssen für immer komplexere Krankheitsbilder neue Lösungen gefunden werden. Ziel der Pharmaforschung ist dabei, selektiv in physiologische Prozesse eingreifen zu können. Traditionell wurden dazu kleine synthetische Moleküle benutzt, sogenannte *Small-Molecule Drugs*. Diese Medikamente sind in der Regel gut oral resorbierbar. Auf Grund ihrer relativ geringen Komplexität besitzen sie allerdings häufig eine begrenzte Selektivität, wodurch unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können. Eine Klasse von Molekülen, die sehr spezifische Interaktionen eingehen kann, sind monoklonale Antikörper. Diese sind komplexe Proteine und können gezielt für die Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden. Deshalb stehen Antikörper heutzutage im Fokus der Pharmaforschung. 2018 waren 8 der 15 umsatzstärksten Medikamente monoklonale Antikörper.<sup>[2]</sup> Der Antikörper Adalimumab, welcher unter dem Handelsnamen Humira vertrieben wird, erzielte dabei mit ca. 20 Mrd. USD den größten Umsatz aller Medikamente weltweit.<sup>[3]</sup> Dieser Antikörper wird hauptsächlich für die Behandlung von Gelenkskrankheiten, wie rheumatoide Arthritis eingesetzt.<sup>[4]</sup>

Für die Selektion von pharmakologischen, monoklonalen Antikörpern werden effiziente Hochdurchsatzmethoden zum Screenen einer immensen Anzahl unterschiedlicher Moleküle benötigt. So wurde z. B. Adalimumab mit Hilfe von Phagen-Display identifiziert.<sup>[5]</sup> Das von SMITH und WINTER entwickelte Phagen-Display,<sup>[6]</sup> ist ein Screeningverfahren, das 2018 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Beim Phagen-Display werden Viren verwendet, um in einem künstlichen Evolutionsprozess Antikörper zu finden, die spezifische Wechselwirkungen und Funktionen besitzen. Dies stellt einen Quantensprung in den Screeningverfahren dar, da auf elegantem Wege rund  $10^{10}$  unterschiedliche Moleküle hergestellt und auf ihre Interaktion zu einem Zielmolekül hin untersucht werden können. In der Pressemitteilung der Nobel Foundation stand, dass sich die Preisträger die „Macht der Evolution zu Nutze gemacht haben“.<sup>[7]</sup> Entscheidender Nachteil ist allerdings, dass es sich bei dem Phagen-Display um ein biologisches System handelt. So können z. B. bis auf wenige Ausnahmen nur natürliche L-Aminosäuren verwendet werden und die Phagen müssen in Bakterien vermehrt werden, was zu einem erheblichen Ampfikations-Bias führen kann.

Somit war der Wunsch groß, eine vergleichbare Technik zu entwickeln, die auf einem ausschließlich chemischen Prinzip beruht. Vollsynthetische Antikörper sind allerdings praktisch nicht herstellbar, da sie zu groß und komplex sind. Eine Alternative zu Antikörpern stellen

Peptide dar, die, wie Antikörper, aus einer Abfolge von Aminosäuren bestehen. Peptide sind dabei aber wesentlich kleiner, wodurch sie einfach vollsynthetisch herzustellen sind. Vor allem der Einsatz von nicht-proteinogenen Aminosäuren ist dabei ein entscheidender Vorteil gegenüber dem Phagen-Display. Der Einsatz von D-Aminosäuren ist besonders interessant für die Pharmaforschung, da diese nicht in Proteinen vorkommen. Dementsprechend werden Peptide mit D-Aminosäuren von körpereigenen Enzymen in der Regel nicht erkannt und nicht vorzeitig abgebaut, wodurch sie eine längere Halbwertszeit im Körper aufweisen.<sup>[8]</sup>

Es existieren viele Screeningverfahren, bei denen Peptide einzeln synthetisiert werden und auf eine Interaktion z. B. mit dem Protein hin untersucht werden. Der Anwender hat dabei die volle synthetische Kontrolle und die Bedingungen des Assays können genau eingestellt werden. Die Diversität der Peptide ist dabei allerdings meist sehr beschränkt und kann bei Weitem nicht mit der Komplexität eines Phagen-Displays mithalten.

Synthetische, kombinatorische Peptidbibliotheken sind hierbei die perfekte Möglichkeit, um zum einen die komplette Kontrolle über Synthese und Assaybedingungen zu haben und zum anderen eine Vielzahl an Molekülen herzustellen. Sie kann man als eine chemische Imitation des biologischen Phagen-Displays ansehen. Die Herstellung solcher kombinatorischer Bibliotheken erfolgt oft über die sogenannte *Split-and-Mix*-Synthese, welche 1991 von LAM et al. veröffentlicht wurde.<sup>[9]</sup> Die Peptide werden dabei auf Partikeln synthetisiert, wobei durch ein kombinatorisches Aufteilen und Vermischen während der Synthese Millionen bis Milliarden unterschiedliche Peptide hergestellt werden. Jedes Partikel trägt dabei Millionen Kopien des jeweiligen Peptids, weswegen diese Peptidbibliotheken *One-Bead-One-Compound*-(OBOC)-Bibliothek genannt werden. Die Sequenz der Peptide ist nach der Synthese allerdings unbekannt. Durch den Einsatz von OBOC-Bibliotheken in einem Screening können auf einfache Weise bindende Peptide identifiziert werden. Der Bindungsassay wird dafür direkt auf Polymerpartikeln durchgeführt, die auch zur Synthese verwendet werden. Größte Schwachstelle der Methode ist allerdings, dass im Screening identifizierte Partikel aufwendig manuell separiert werden müssen, um die Peptidsequenz bestimmen zu können. Eine Automatisierung des Screenings war bisher nicht möglich. Aus diesem Grund ist der Technik der OBOC-Bibliotheken nie den Sprung in die Pharmaforschung gelungen.<sup>[10]</sup>

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Hochdurchsatzmethode für das Screening von OBOC-Bibliotheken. Die Screening-Technik sollte auf die Identifikation von Peptid-basierten Proteinbindern spezialisiert sein. Proteine sind dabei Targets (Zielmoleküle), welche in der Pharmaforschung eine besonders wichtige Rolle spielen.

Bei OBOC-Bibliotheken stellt insbesondere die aufwendige, manuelle Separation von Partikeln die größte Limitierung dar. In dieser Arbeit soll eine Methode entwickelt werden, bei der diese Separation der Partikel vermieden wird. Den vielversprechendsten Ansatz bieten dazu Chip-basierte Systeme. Hierbei werden Polymerpartikel auf einem festen Träger immobilisiert und die Position von proteinbindenden Partikeln im Bindungsassay identifiziert. In der anschließenden Sequenzierung wird mit Hilfe orts aufgelöster Massenspektrometrie die Peptidsequenz direkt auf dem Chip bestimmt. Nachteil der existierenden Chip-Systeme ist, dass diese sehr aufwendig hergestellt werden müssen und nur eine limitierte Anzahl an Partikeln gleichzeitig gescreent werden kann. Daher sollte ein Chip entwickelt werden, der einfach herzustellen ist und auf dem eine große Anzahl an Partikeln gleichzeitig gescreent werden kann. Um eine Verknüpfung des Bindungsassays und der Peptidsequenzierung zu ermöglichen, muss sichergestellt werden, dass die Partikel dauerhaft fixiert sind. Nur so kann gewährleistet werden, dass die im Assay als bindend identifizierten Partikel im Massenspektrometer zweifelsfrei wiedergefunden werden können.

Die Sequenzierung sollte dabei mit einem Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-Flugzeit-(TOF)-Massenspektrometer (MS) erfolgen. Dies bietet die Möglichkeit, orts aufgelöst Massenspektren zu detektieren. Vor der MALDI-TOF-MS-Messung müssen die Peptide in der Regel von den Partikeln abgespalten werden. Die Herausforderung ist es, die Peptide rückstandsfrei abzuspalten, ohne dass sich dabei deren Position zu stark verändert. Eine Abspaltung in der flüssigen Phase kommt deshalb nicht in Frage.

Für die MALDI-TOF-MS-Messung muss zum einen eine geeignete MALDI-Matrix gefunden werden und zum anderen eine Matrix-Auftragung entwickelt werden. Gerade die Auftragung der Matrix ist entscheidend, da auch hierbei die Position der Peptide erhalten bleiben muss. Aus diesem Grund sind die üblichen Auftragungsmethoden mit flüssigen Reagenzlösungen ungeeignet.

Für die Peptidsequenzierung musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubt, Peptidsequenzen zuverlässig und eindeutig zu bestimmen. Dazu sollte zu Beginn die klassische Fragmentierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt werden. Für die

Fragmentierung standen allerdings nur sehr geringe Mengen an Peptid zur Verfügung, weshalb ungewiss war, ob die Anzahl detektierter Fragmente im MS/MS-Spektren ausreichte, um eine Sequenzbestimmung durchzuführen. Sollte dies nicht der Fall sein, müsste der Einsatz von Kodierungsmethoden untersucht werden.

Die Entwicklung der Hochdurchsatzmethode sollte an einem etablierten FLAG-Peptid-Modell geschehen. Dieses basiert auf der viel untersuchten Wechselwirkung zwischen dem FLAG-Peptid und dem anti-FLAG-Antikörper M2 und kann dabei exemplarisch als eine starke Peptid-Protein-Interaktion gesehen werden. Am Modellsystem sollte nachgewiesen werden, dass ein proteinbindendes Peptid zweifelsfrei aus einer OBOC-Bibliothek identifiziert werden kann. Konnte eine Hochdurchsatzmethode erfolgreich am Modellsystem getestet werden, sollte im nächsten Schritt eine Übertragung auf eine reale OBOC-Bibliothek erfolgen. Hierbei sollten Peptide identifiziert werden, die an Maus-IgG binden. Für die erhaltenen Peptide sollten Dissoziationskonstanten bestimmt werden. Dadurch kann gezeigt werden, ob erfolgreich affine Binder aus einer OBOC-Bibliothek gewonnen werden konnten.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Peptide in der klinischen Forschung

Die pharmazeutische Industrie begann mit der biotechnologischen Herstellung der ersten therapeutischen Proteine in den 1980er Jahren. Mittlerweile sind mehr als 200 therapeutische Proteine auf dem Markt zugelassen, wobei ca. 25 % monoklonale Antikörper sind. Im Jahr 2018 waren unter den 15 meistverkauften Medikamenten zehn Proteine (acht davon monoklonale Antikörper), mit einem steigenden Trend für die nächsten Jahre.<sup>[2]</sup> Proteine werden rekombinant hergestellt, wobei die kleineren aus Bakterien-Kulturen gewonnen werden.<sup>[11]</sup> Große Proteine, welche posttranslational vielfältig modifiziert werden müssen, werden fast ausschließlich mit Hilfe anspruchsvoller Säugetier-Zellkulturen hergestellt.<sup>[12]</sup> Die Technologie ist über die letzten Jahre jedoch soweit fortgeschritten, dass mittlerweile Batch-Größen von 50 - 100 kg hergestellt werden können.<sup>[13]</sup> Nichtsdestotrotz muss bei der Herstellung von Proteinen eine strenge Qualitätskontrolle vorgenommen werden, da biologische Systeme mitunter starken Schwankungen unterliegen.

Peptide stellen bei den biologischen Pharmazeutika eine einzigartige Klasse dar. Sie stehen zwischen den kleinen synthetischen Molekülen und (rekombinant) hergestellten Proteinen. Das erste therapeutische Peptid, Insulin, wurde bereits in den 1920ern zugelassen.<sup>[14]</sup> Die in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts als Therapeutika verwendeten Peptide wurden aus natürlichen Quellen gewonnen. So wurde Insulin aus dem Pankreasgewebe von Kälbern extrahiert. Während der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts wurde die Herstellung von Peptiden weiterentwickelt, wodurch vollsynthetische Peptide an Bedeutung gewannen. Hier ist vor allem die von MERRIFIELD 1963 veröffentlichte Festphasenpeptidsynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) zu nennen, welche eine entscheidende Weiterentwicklung in der Herstellung von Peptiden darstellt und mit einem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.<sup>[15]</sup>

Die Verwendung von Peptiden als Therapeutika hat im Vergleich zur Nutzung kleiner Moleküle allerdings auch entscheidende Nachteile. So ist die Halbwertszeit im Plasma relativ gering, da diverse Enzyme (sog. Peptidasen) zu einem schnellen Abbau der Peptide führen. Des Weiteren sind Peptide schwer bis nicht oral verfügbar. Präparate auf Peptid-Basis müssen somit als Injektion verabreicht werden. Aus diesem Grund wird versucht, kleine, synthetische Moleküle zu finden, welche alternativ an Peptidrezeptoren binden. Gerade mit modernen Hochdurchsatz-Screenings ist dies wesentlich einfacher geworden. Obwohl kleine Moleküle besser oral verfügbar sind und längere Halbwertszeiten im Blut besitzen, weisen sie mitunter

eine schwächere Interaktion mit den Rezeptoren auf und können unspezifisch wechselwirken.<sup>[16]</sup> Da die Wechselwirkung von Peptiden mit Proteinen oft sehr komplex ist, können diese mit kleinen Molekülen nur schwer nachgestellt werden.

Aus diesem Grund rücken Peptide heutzutage immer mehr in den Fokus der Medikamentenentwicklung. Neue Synthesestrategien erlauben eine spezifische Beeinflussung der pharmakokinetischen Eigenschaften und der Wirkungsspezifität. Hierbei können zum Beispiel das Peptidrückgrat modifiziert, unnatürliche Aminosäuren eingebaut oder Konjugationen vorgenommen werden. Dadurch werden die Halbwertszeit und Löslichkeit der Peptide wesentlich verbessert, wodurch die Häufigkeit an Injektionen verringert wird. So waren im Jahr 2018 60 Peptide in den USA, Europa und Japan als Medikamente zugelassen. Weitere 150 befinden sich zurzeit in der klinischen Entwicklung und 260 werden in klinischen Studien mit Menschen getestet.<sup>[16]</sup> Die meisten Peptid-basierten Wirkstoffe sind aus historischen Gründen gegen extrazelluläre Hormonrezeptoren gerichtet (da Peptide die natürlichen Binder dafür sind). Allerdings wurden ebenfalls Peptide als Medikamente zugelassen, die zum Beispiel Protein-Protein-Interaktionen unterbrechen<sup>[17]</sup>, Tyrosin-Kinasen adressieren<sup>[18]</sup> oder intrazelluläre Prozesse blockieren.<sup>[19]</sup> Ausschlaggebend für diese Entwicklung sind die großen Fortschritte bei den Peptidbibliotheketechniken in den letzten Jahren. Dabei hat vor allem das Phagen-Display zu der Entdeckung von neuen Peptid-basierten Wirkstoffen geführt. Phagen-Displays haben allerdings vielerlei Nachteile, da Viren verwendet werden, welche immer einen gewissen Grad an Unsicherheit mit sich bringen. Aus diesem Grund investieren Firmen wie *Roche* viel Geld und Zeit, um vollsynthetische Peptidbibliotheken zu entwickeln.<sup>[20]</sup>

### 3.2 Antikörperbindende Peptide

Proteine spielen eine zentrale Rolle in der modernen Pharmaforschung und -entwicklung. Therapeutische Proteine müssen rekombinant in Zellkulturen hergestellt werden. Da Zellen neben dem gewünschten Protein eine Vielzahl anderer Substanzen herstellen, müssen aufwendige Reinigungsstrategien angewendet werden, um ein reines Produkt zu erhalten. In der Regel muss für jedes Protein ein eigenes Verfahren entwickelt werden, da sie sich in Größe, Funktion und Eigenschaften stark unterscheiden.

Die Ausnahme bilden monoklonale Antikörper, da ihre grundlegende Struktur sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund können sie standardmäßig über eine Anreicherung mittels selektiv bindender Proteine oder Peptide gewonnen werden.

Die bekanntesten Proteine sind hierbei Protein A<sup>[21]</sup> und G<sup>[22]</sup>. Während Protein A vor allem an humanes Immunglobulin G (IgG) bindet, bindet Protein G sowohl an humanes IgG als auch an IgG aus der Maus.<sup>[23]</sup> Neben weiteren natürlichen IgG-bindenden Proteinen (z. B. Protein L) existieren einige künstliche Proteine. So zeigt z. B. die Z-Domäne (33 AS) des Proteins A vergleichbare Affinitäten zu humanem IgG.<sup>[24]</sup> Des Weiteren existieren verschiedene Fusionsproteine (Protein LG<sup>[25]</sup>, LA<sup>[26]</sup> und LG<sup>[23]</sup>) der natürlichen Formen.

Obwohl Protein A und G oft bei der Aufreinigung von Antikörpern zum Einsatz kommen, treten dabei unterschiedliche Probleme auf.<sup>[27]</sup> Da die Antikörper meist sauer eluiert werden, kann es zu einer Agglomeration oder partiellen Denaturierung der Antikörper kommen. Ein weiteres Problem ist, dass die Proteine (A oder G) bei der Elution „leaken“ können und so der (z. B. therapeutische) Antikörper kontaminiert wird. Zudem ist die rekombinante Herstellung von Proteinen nach wie vor vergleichsweise teuer.<sup>[28]</sup>

Aus diesen Gründen wurde in den vergangenen Jahren daran geforscht, Peptide zu identifizieren, die Antikörper selektiv binden. Dazu wurden unterschiedliche Herangehensweisen verwendet. Eine Strategie war z. B. das Peptid zu identifizieren, welches dem Bindungsmotiv des Protein A entspricht.<sup>[29]</sup> In einer Studie wurde dazu eine Peptidbibliothek mit insgesamt 2173 unterschiedlichen Peptiden erstellt. Beim Screening gegen humanes IgG wurde ein Peptid (FYCHWALE) mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 6  $\mu\text{M}$  gefunden. Diese Affinität zu IgG ist ungefähr um zwei Größenordnungen geringer als die von Protein A ( $K_D = 14 \text{ nM}$ <sup>[30]</sup>). KISH et al. haben für die Identifikation von IgG-Bindern eine kombinatorische OBOC-Bibliothek verwendet.<sup>[31]</sup> Nach einem dreistufigen Screening konnten sie ein Peptid (HWRGV) finden ( $K_D = 10 \mu\text{M}$ ), mit dem IgG aus einem Zellmedium erfolgreich extrahiert werden konnte. Allerdings zeigte das Peptid im Bindungsassay keine Konkurrenz mit Protein A oder G.<sup>[32]</sup>

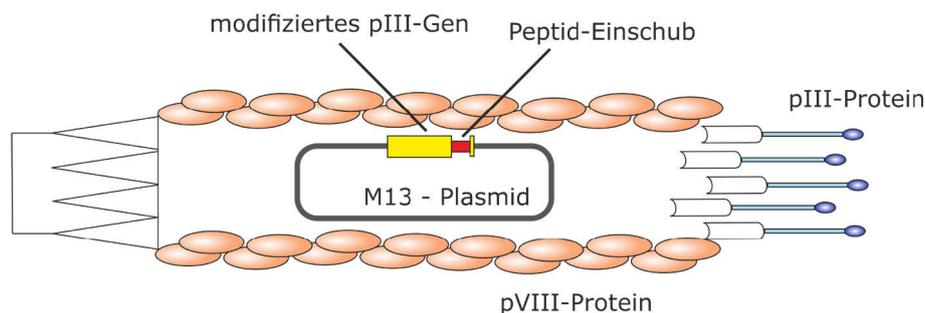
DELANO et al. haben für die Identifizierung eines IgG-Binders eine komplett randomisierte Peptidbibliothek (Phagen-Display) verwendet, die insgesamt  $4 \cdot 10^9$  Peptide enthielt.<sup>[33]</sup> In der Bibliothek wurden zyklische Peptide mit einer Länge von 13 Aminosäuren auf der Oberfläche der Phagen präsentiert. Beim Screening wurde das Peptid DCAWHLGELVWCT gefunden, welches in einem kompetitiven Assay mit Protein A eine Dissoziationskonstante von 25 nM aufwies. Diese Dissoziationskonstante ist nur um die Hälfte höher als die von Protein A und somit die niedrigste, die bisher für ein IgG-bindendes Peptid veröffentlicht wurde.<sup>[33]</sup>

Sehr hohe Bindungsaffinitäten sind bei der Affinitätschromatographie allerdings nicht notwendig. Wie bereits oben erwähnt, müssen Antikörper nach der Anreicherung wieder von der festen Phase eluiert werden. Um dies für den Antikörper so mild wie möglich zu gestalten, sind Peptide mit geringeren Affinitäten besser geeignet als diejenigen mit hohen Affinitäten.<sup>[28]</sup>

### 3.3 Phagen-Display

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Identifizierung von Peptid-basierten Proteinbindern ist das erstmals 1985 veröffentlichte Phagen-Display.<sup>[6]</sup> Dieses basiert darauf, dass Bakteriophagen (Bakterienviren) mehrere Kopien eines Peptides auf der Oberfläche tragen. Binden diese Peptide an ein Zielmolekül, wird der Phage isoliert und vervielfältigt. Abschließend wird die Peptidsequenz über die DNA des Phagen decodiert.

Dabei werden am häufigsten M13 Bakteriophagen (siehe Abbildung 1) verwendet. Außerdem werden T4 und T7 Phagen genutzt.<sup>[34]</sup> Vorteilhaft ist, dass der M13 Phage gute Reproduktions-eigenschaften hat und viel Fremd-DNA aufnehmen kann. Die Fremd-DNA wird in Form von modifizierten Plasmiden in die Phagen eingeschleust. Für das Phagen-Display werden hauptsächlich zwei Oberflächenproteine genutzt: pIII und pVIII. Von dem Protein pIII befinden sich drei bis fünf Kopien auf der Oberfläche, von pVIII insgesamt ca. 2700.<sup>[35]</sup> Somit ist es im Prinzip möglich, hochaffine Binder mit der niedrigeren Anzahl an pIII und überwiegend niedrigaffine Binder mit der relativ hohen Anzahl an pVIII zu identifizieren.



**Abbildung 1:** Darstellung eines M13 Phagen, bei dem das Gen für das Protein pIII modifiziert wurde.

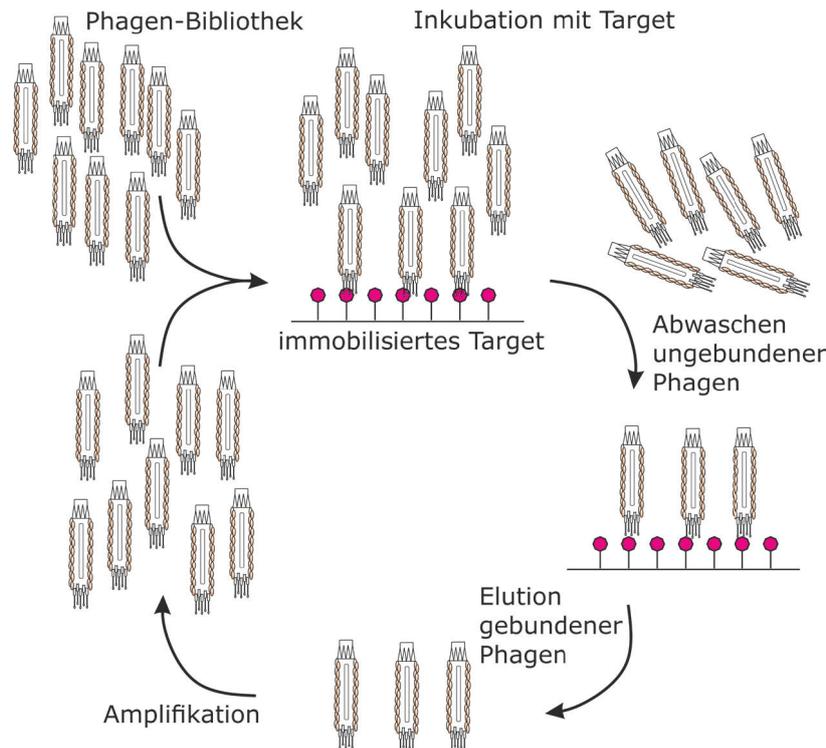
Für die Durchführung eines Phagen-Displays existieren zwei unterschiedliche Formate: Das *Ein-Gen-System* und das *Zwei-Gen-System*.<sup>[36]</sup> Beim *Ein-Gen-System* sind alle Kopien der Plasmid-DNA und des damit verbundenen Oberflächenproteins modifiziert. Dieses System ist zwar einfacher in der Durchführung, die Veränderung der Oberflächenproteine kann allerdings die natürlichen Eigenschaften des Phagen stark negativ beeinflussen.<sup>[37]</sup> Aus diesem Grund hat sich das *Zwei-Gen-System* als Alternative etabliert.<sup>[38]</sup> Hierbei werden entweder unmodifizierte Phagen als Helfer-Phagen eingesetzt oder Wildtyp-Plasmide mit modifizierten Plasmiden in einem Phagen kombiniert. Im ersten Fall unterstützen die natürlichen Phagen die Infektion der Bakterien. Im zweiten Fall ist die natürliche Form des Phagen weniger beeinflusst, da geringere Mengen an modifiziertem Protein exprimiert werden. Daraus folgt zusätzlich, dass im Falle

der Verwendung des Proteins pIII nur ein bis zwei veränderte Proteine exprimiert werden und nahezu monovalente Bindungssituationen auf der Oberfläche des Phagen entstehen.

Die DNA, welche die randomisierten Peptide für die Bibliothek codiert, wird mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert. Unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme wird diese DNA in die entsprechenden Gene des Phagenplasmids ligiert. Nach der Ligation wird die DNA über Elektroporation in geeignete Bakterienzellen (z. B. *E. coli*) geschleust. Nachdem die Bakterien gewachsen und die Phagen entstanden sind, muss die Komplexität jeder Bibliothek durch die Sequenzierung einzelner Phagen analysiert werden. Dabei sollten alle Aminosäuren in der Bibliothek vorhanden sein und deren Verteilung der Anzahl an möglichen DNA-Codons entsprechen.

Es ist prinzipiell möglich, neben linearen (relativ unstrukturierten) Peptiden auch zyklische (starre) Peptide auf der Oberfläche von Phagen zu präsentieren.<sup>[39]</sup> Diese zyklischen Peptidbibliotheken werden klassischerweise durch die Einführung zweier oder mehrerer Cysteine erstellt. Die im Peptid enthaltenen Cysteine werden bei der Bildung des Phagen spontan durch Oxidation zu Disulfidbrücken verbunden. Tendenziell weisen zyklische Bibliotheken auf Grund der starren Struktur der Peptide üblicherweise niedrigere Dissoziationskonstanten auf.<sup>[40]</sup> Dies kann durch den geringeren Verlust der Konformationsentropie erklärt werden. Zusätzlich weisen zyklische Peptide eine höhere Stabilität gegen Proteolyse und eine höhere biologische Aktivität im Vergleich zu linearen Peptiden auf.<sup>[41]</sup>

Die Identifikation von affinen Bindern erfolgt typischerweise in einem Screening, welches aus der iterativen Wiederholung von Selektion bindender Phagen und deren Amplifikation in Bakterien besteht. Dieser Prozess wird *Biopanning* genannt (siehe Abbildung 2) und imitiert in gewisser Weise die Funktion des Immunsystems. Für den Selektionsschritt wird das Target meist auf einer Oberfläche immobilisiert, sodass nichtbindende Phagen im ersten Schritt gewaschen und bindende Phagen im zweiten Schritt eluiert und anschließend amplifiziert werden. Der Prozess der Selektion und Amplifikation wird typischer 3-5 Mal wiederholt, um die Anreicherung hochaffiner Binder zu garantieren. Es ist ebenfalls möglich, direkt gegen Zellen (z. B. Krebszellen<sup>[42]</sup>) oder sogar *in vivo*<sup>[43]</sup>, also in einem lebenden Tier, zu screenen.



**Abbildung 2:** Ablauf der Identifikation eines hochaffinen Binders gegen ein immobilisiertes Target (*Biopanning*).

Das Phagen-Display ist die mit Abstand meistgenutzte biologische Peptidbibliothek. Zusätzlich existieren noch viele weitere, aber weniger verbreitete Technologien, wie zum Beispiel das Hefe-Display oder das Ribosomen-Display.

### *Hefe-Display*

Beim Hefe-Display wird, vergleichbar zum Phagen-Display, in die DNA der Hefezellen eine randomisierte Sequenz eingeschleust und die entsprechenden Peptide auf der Oberfläche der Hefezellen präsentiert.<sup>[44]</sup> Anschließend wird ein Target, welches mit Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde, zu den Hefezellen gegeben. Danach erfolgt die Identifizierung und Sortierung positiver Zellen in einem Durchflusszytometer (sog. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung, FACS). Vorteil hierbei ist die direkt gemessene Fluoreszenzintensität auf der Oberfläche der Zellen und die daraus resultierende quantitative Aussage über die Bindung des Peptids zum Target.

### *Ribosomen-Display*

Das Ribosomen-Display kann im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Methoden zellfrei durchgeführt werden.<sup>[45]</sup> Eine Bibliothek von mRNA-Molekülen wird von Ribosomen in Pep-

tide transkribiert, wobei der mRNA ein *Stop-Condon* fehlt. Dadurch wird der Translationskomplex nicht aufgelöst und es entsteht ein Komplex aus Peptid, mRNA und Ribosom (PRM-Komplex). Das Peptid befindet sich hierbei an der Außenseite des Ribosoms und kann gegen ein immobilisiertes Target gescreent werden. Bindende PRM-Komplexe werden isoliert und über die mRNA-Sequenz die Peptidsequenz identifiziert.

Biologische Bibliotheken ermöglichen es, eine bisher unübertroffene Menge an Peptiden zu screenen, wobei allerdings einige entscheidende Limitierungen existieren. So können mit den Standardverfahren nur Peptide gescreent werden, die aus L-Aminosäuren bestehen. Da diese Peptide von natürlich vorkommenden Proteasen im Körper schnell verdaut werden, sind die identifizierten Peptide als Medikament oft unbrauchbar. Das sogenannte *Mirror-image Phage Display* erlaubt zwar proteinbindende Peptide, bestehend aus D-Aminosäuren, zu identifizieren.<sup>[46]</sup> Allerdings muss hierzu das gespiegelte Protein aus D-Aminosäuren künstlich hergestellt werden. Die Herstellung von Proteinen aus D-Aminosäuren ist ausgesprochen teuer und aufwendig. Somit ist die Anwendung des *Mirror-Image Phage Displays* sehr exotisch und findet selten Anwendung. Des Weiteren werden beim Phagen Display Bakterien zum Vermehren der Phagen verwendet, weshalb nur proteinogene Aminosäuren eingesetzt werden und dadurch der chemische Raum relativ begrenzt ist. Eine weitere entscheidende Limitierung ist, dass beim Screening von Phagen-Displays häufig Binder gegen verwendete Kunststoffe und nicht gegen das Target identifiziert werden.<sup>[47]</sup> Aus diesen Gründen bieten rein synthetische Peptidbibliotheken eine geeignete Alternative, bei welcher der Anwender vollkommene synthesechemische Freiheit genießt.

### 3.4 Synthetische Peptidbibliotheken

#### 3.4.1 Multi-Pin-Technologie

Der Grundstein für synthetische Bibliotheken wurde Mitte der 1980er Jahren mit der *Multi-Pin-Technologie* (siehe Abbildung 3 A) gelegt.<sup>[48]</sup> Dabei werden die Peptide an der Spitze des sogenannten Pins synthetisiert. Die Pins können z. B. aus Polyethylen bestehen und die Peptide werden über einen Linker kovalent an die Oberfläche synthetisiert. Diese 96 Pins sind im Format einer Mikrotiterplatte angeordnet. Die Reagenzien für die Peptidsynthese können dementsprechend in Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt werden und die Pins für jeden Reakti-

onsschritt in diese Kavitäten eintauchen. In jeder Kavität kann eine andere Aminosäure gekoppelt werden, wodurch 96 Peptide parallel synthetisiert werden können. Das Screening findet anschließend mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) an der Oberfläche des Pins statt. Da bekannt ist, an welchem Pin welches Peptid synthetisiert wurde, ist die Identifizierung der bindenden Peptidsequenz eindeutig. Unter der Verwendung von spaltbaren Linkern können auch Assays in der Lösung durchgeführt werden.<sup>[49]</sup> Da durch diese Technologie nur eine geringe Anzahl an unterschiedlichen Peptiden hergestellt werden kann, wird sie vor allem beim *Epitop-Mapping* für T- und B-Zellen angewendet.<sup>[48]</sup>

### 3.4.2 Tea-Bag-Technologie

Eine weitere Methode zur Erstellung von Peptidbibliotheken, die ebenfalls seit den 80iger Jahren bekannt ist, ist die *Tea-Bag-Technologie* (siehe Abbildung 3 B).<sup>[50]</sup> Hierzu werden Beutel aus z. B. Polypropylen mit einem Polymerharz gefüllt. Die Beutel werden anschließend auf unterschiedliche Reaktionsgefäße aufgeteilt, in denen jeweils eine unterschiedliche Aminosäure gekoppelt wird. Danach werden die Beutel wieder vereint, gewaschen und die temporäre Schutzgruppe abgespalten. Dieser Vorgang wird wiederholt bis die gewünschte Länge der Peptide erreicht ist. Auf jedem Beutel wird während der Aminosäurekopplung die jeweilige Aminosäure kodiert (z. B. mittels Radio-Tag<sup>[51]</sup>). Die einzelnen Kopplungsschritte können dem jeweiligen Beutel zugeordnet werden, sodass bekannt ist in welchem Beutel, welches Peptid synthetisiert wurde. Somit lassen sich größere Mengen an Peptiden parallel herstellen. Diese Methode erlaubt es Peptide in einer vergleichsweise großen Menge herzustellen, um eine anschließende Aufreinigung und Charakterisierung durchzuführen. Da die Beutel allerdings vergleichsweise groß sind, ist die Menge der Peptide die gleichzeitig hergestellt werden können limitiert. So werden üblicherweise Bibliotheken mit bis zu 300 unterschiedlichen Peptiden hergestellt.<sup>[52]</sup>

### 3.4.3 Photolithographie

Anfang der 90iger Jahre wurden die ersten Microarray-basierten Peptidbibliotheken veröffentlicht. So gelang es FODOR et al. ein Peptid-Microarray (1024 Peptide) mit Hilfe von Photolithographie (siehe Abbildung 3 C) herzustellen.<sup>[53]</sup> Bei der Photolithographie werden die temporären Schutzgruppen der Aminosäuren mit Hilfe von Licht abgespalten. Um sicherzustellen,

dass die Schutzgruppen nur an bestimmten Stellen (Spot) abgespalten werden, kommen Masken zum Einsatz. Nach der Abspaltung werden die Aminosäuren nur an die Spots gekoppelt, an denen die temporäre Schutzgruppe abgespalten wurde. Durch den Einsatz unterschiedlicher Masken wird an jeder Position des Microarrays ein unterschiedliches Peptid hergestellt. Die Sequenz jeden Peptids ist dabei bekannt. So kann beim Screening über die Position das bindende Peptid identifiziert werden.

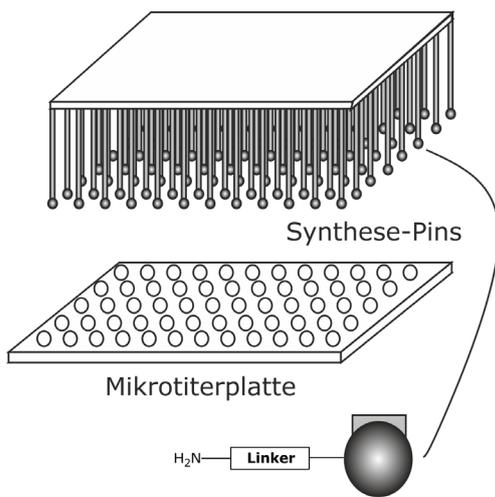
Diese Technologie hat sich über die letzten knapp 30 Jahre kontinuierlich stark verbessert. So werden mittlerweile kaum noch Masken eingesetzt, sondern komplexe Linsen- und Spiegelsysteme. Diese Technologie wurde ursprünglich für die parallele Synthese von Oligonukleotiden entwickelt,<sup>[54]</sup> findet aber mittlerweile auch in der Herstellung von Peptid-Microarrays Anwendung.<sup>[55]</sup> Der sogenannten *Maskless Array Synthesizer* (MAS) ermöglicht es, mehrere Millionen Peptide auf einem Array zu synthetisieren. So konnte gezeigt werden, dass mit dem MAS ein Microarray mit ca. 2,5 Millionen unterschiedlichen Peptiden hergestellt und auf die Wechselwirkung zu dem Protein Streptavidin hin untersucht werden kann.<sup>[20]</sup> Da diese Studie in Zusammenarbeit mit der Firma *Roche* durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass diese Technologie bereits Einsatz in der Pharmaforschung findet. Die Identifizierung der Peptide ist dabei sehr einfach, da diese ebenfalls über die Position auf dem Microarray erfolgt. Nachteil dieser Technologie ist allerdings die aufwendige und teure Herstellung dieser Arrays. Des Weiteren wird der Erfolg der Peptidsynthese der einzelnen Peptide nicht gesondert überprüft. So können Fehlkopplungen oder Abbruchsequenzen zu falschen Ergebnissen beim Screening führen.

### 3.4.4 SPOT-Synthese

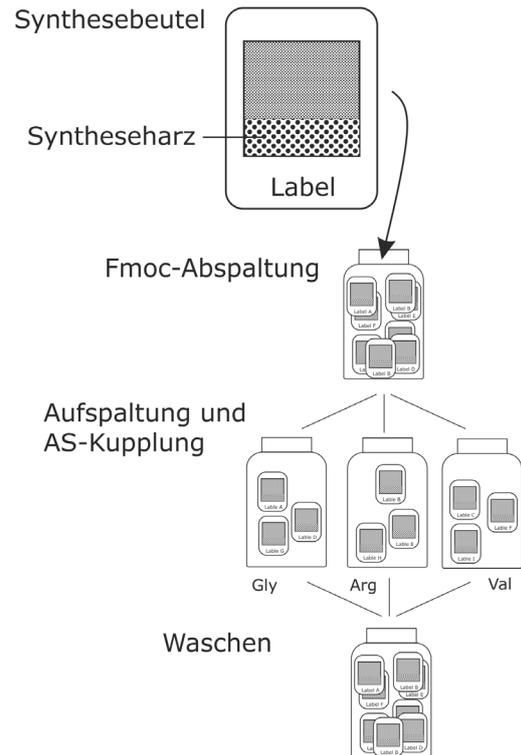
Eine weitere Methode zur Herstellung räumlich adressierbarer Peptidbibliotheken ist die *SPOT-Synthese*.<sup>[56]</sup> Die Peptidbibliothek wird dabei auf einer Cellulosemembran synthetisiert, welche mit einem Aminolinker funktionalisiert ist. Die Aminosäurelösungen mit den Koppelungsreagenzien werden in voneinander getrennten *Spots* auf die Membran gegeben und können dort mit dem Aminolinker reagieren. Zum Waschen und Entschützen wird die Cellulosemembran in die entsprechenden Lösungen getaucht. Durch Wiederholung dieser Schritte entstehen auf der Membran voneinander getrennte *Spots*, welche jeweils einem Peptid zugeordnet werden können. Das Screening kann entweder direkt auf der Membran oder, nach Abspaltung der Peptide, in flüssiger Phase stattfinden. Über die Jahre wurde die *SPOT-Synthese* auf Membranen aus unterschiedlichen Materialien durchgeführt<sup>[57-58]</sup>. Geräte für die automatische

SPOT-Synthese sind kommerziell erhältlich (z. B. der *Auto-SPOT Robot ASP222* von *Intavis Bioanalytical Instruments* aus Köln). Diese Methode bietet eine einfache und kostengünstige Methode für die Herstellung von Peptidbibliotheken. Nachteile hingegen sind einerseits die relativ geringe Dichte (ca. 25 Spots/cm<sup>2</sup>) an unterschiedlichen Peptiden (Spots) auf der Oberfläche der Membran und andererseits die daraus resultierende geringe Anzahl an unterschiedlichen Peptidsequenzen.

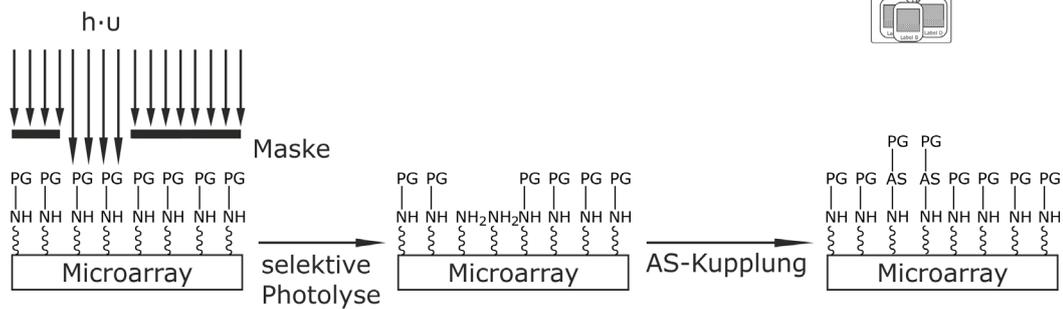
**A.) Multi-Pin-Technologie**



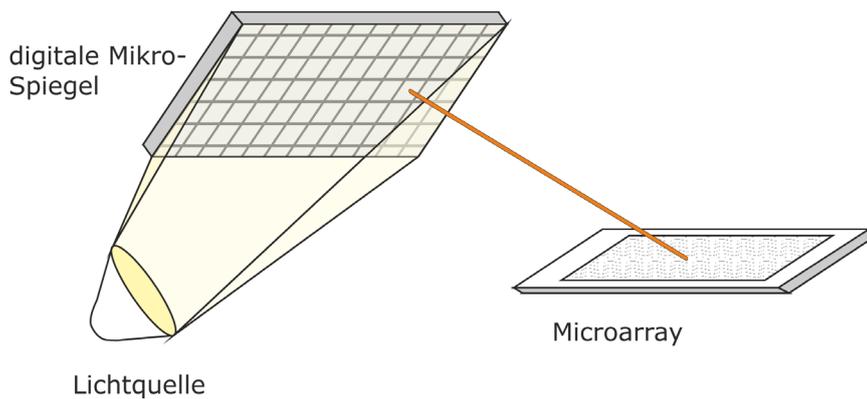
**B.) Tea-Bag-Technologie**



**C.) Photolithographie**



**Maskless Array Synthesizer**



**Abbildung 3:** Übersicht über Methoden zur parallelen Peptidsynthese A.) Multi-Pin-Technologie, B.) Tea-Bag-Technologie und C.) Photolithographie (gezeigt zum einen im klassischen Ansatz unter Verwendung einer Maske und zum anderen das Prinzip des *Maskless Array Synthesizer* (MAS)).

### 3.5 *One-Bead-One-Compound-Bibliotheken*

Bei *One-Bead-One-Compound* (OBOC)-Bibliotheken handelt es sich prinzipiell auch um synthetische Peptidbibliotheken. Diese werden mit Hilfe der SPPS über eine *Split-and-Mix-Synthese* auf Partikeln hergestellt. Dadurch ist es möglich, viele Millionen bis Milliarden unterschiedliche Peptide schnell und einfach zu synthetisieren, wobei auf jedem Partikel Millionen Kopien genau eines Peptids vorliegen. Das nachfolgende Screening gegen ein bestimmtes Target findet direkt auf den Partikeln statt. Die Peptidsequenz auf jedem Partikel ist jedoch unbekannt, wodurch eine anschließende Sequenzierung der positiven Peptide notwendig ist.

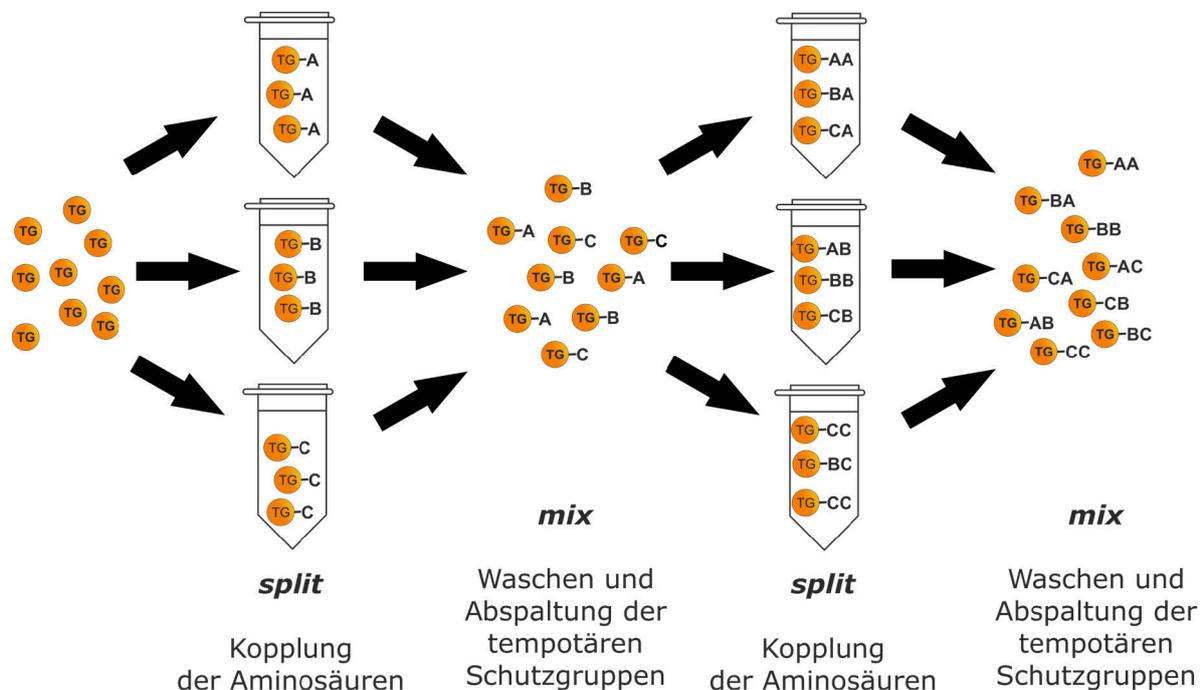
#### 3.5.1 *Split-and-Mix-Synthese*

1991 wurde von LAM et al. das erste Mal eine Festphasen-basierte OBOC-Bibliothek mit anschließendem Screening eingeführt.<sup>[9]</sup> Etwa zur gleichen Zeit (14 Tage nach LAM) hat FURKA et al. ebenfalls eine Synthese einer OBOC-Bibliothek mittels *Split-and-Mix-Synthese* veröffentlicht.<sup>[59]</sup> Da FURKA allerdings nur die Synthese ohne ein anschließendes Screening veröffentlicht hat, gilt LAM als Erfinder OBOC-Bibliotheken.

Bei der *Split-and-Mix-Synthese* wird eine sehr große Anzahl an kombinatorisch zusammengesetzten Peptiden erzeugt. Grundlegend basiert diese Technik auf zwei hintereinander ausgeführten Schritten: Aufteilen (*Split*), gefolgt vom Vermischen (*Mix*) der Ansätze. Als feste Phase dienen dabei meist Polymerpartikel.

Die Wahl der festen Phase spielt für OBOC-Bibliotheken eine entscheidende Rolle. So muss diese nicht nur den Anforderungen der Peptidsynthese genügen, sondern auch als Grundlage für das nachfolgende Screening dienen. Bei der Entwicklung von Peptidbibliotheken zur Identifizierung selektiver Proteinbinder können z. B. keine Polystyrolpartikel eingesetzt werden. Diese würden auf Grund der hydrophoben Oberfläche selbst mit dem Protein stark wechselwirken. Dadurch könnte eine selektive Wechselwirkung der partikelgebundenen Peptide mit dem Protein nur schwer detektiert werden. Aus diesem Grund werden oft Hybridpartikel aus Polystyrol und Polyethylenglycol (PEG) eingesetzt. TentaGel-Partikel sind z. B. solche Hybridpartikel, die, bedingt durch ihre PEG-Hülle, kaum mit Proteinen interagieren.<sup>[60]</sup> Als Alternative können auch Partikel eingesetzt werden, die vollkommen aus quervernetztem PEG bestehen und unter dem Namen ChemMatrix bekannt sind.<sup>[61]</sup>

Die Partikel werden im ersten Schritt auf verschiedene Reaktionskammern aufgeteilt (siehe Abbildung 4). Pro Reaktionskammer wird dabei eine Aminosäure gekoppelt. Nach der Kopplung werden die Partikel aus allen Reaktionskammern zusammengegeben und durchgemischt. Anschließend werden die temporären Schutzgruppen (z. B. Boc, Fmoc) von den Aminosäuren abgespalten und die Partikel ausgiebig gewaschen. Im nachfolgenden Schritt werden die Partikel erneut auf mehrere Reaktionskammern aufgeteilt und eine weitere Aminosäure gekoppelt. Durch die Wiederholung dieser Schritte wird somit eine Peptidbibliothek aufgebaut, die aus zufällig zusammengestellten Peptiden besteht. Die Anzahl der theoretisch generierten Peptide ist dabei zum einen von den eingesetzten Aminosäuren pro Kopplungsschritt und zum anderen von der Anzahl der hintereinander gekoppelten Aminosäuren abhängig. Als Beispiel ergibt sich für ein Heptapeptid, bei dem 20 Aminosäuren pro Kopplungsschritt eingesetzt wurden, eine theoretische Anzahl von  $20^7$  (1.280.000.000) möglichen Peptiden.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der *Split-and-Mix*-Technik.

### 3.5.2 Screening von OBOC-Bibliotheken

Eine sehr große Anzahl an unterschiedlichen festphasengebundenen Peptiden kann nach der Synthese auf das Bindungsvermögen zu einem Target hin untersucht werden. Dies findet in einem Bindungsassay direkt auf der Oberfläche der Partikel statt. So hat LAM in seiner ursprünglichen Veröffentlichung Peptid-basierte Liganden für Streptavidin und anti- $\beta$ -Endorphin-Antikörper in einem Screening identifiziert.<sup>[9]</sup> Die Bindung des Proteins an einen Partikel

wurde mittels einer Enzymmarkierung am Protein und der dadurch ausgelösten enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen.

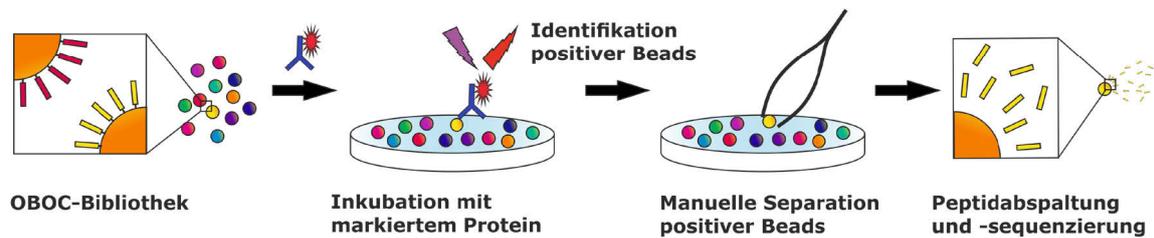
Als Markierung für Proteine können alternativ auch Radioisotope verwendet werden.<sup>[62]</sup> Diese Technik wird heutzutage allerdings auf Grund der einhergehenden Risiken kaum noch eingesetzt. Die mit Abstand verbreitetste Methode ist die Markierung des Proteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff.<sup>[63]</sup> Der Vorteil von Fluoreszenzfarbstoffen ist die einfache, schnelle und direkte Detektion. Des Weiteren sind viele Farbstoffe, angepasst an unterschiedliche Fragestellungen, kommerziell verfügbar und Proteine können leicht mit diesen modifiziert werden. Jede Art der Markierung hat allerdings den Nachteil, dass die Möglichkeit besteht, dass das Peptid mit der Markierung statt dem Protein wechselwirkt. Dies führt im Screening der Peptidbibliothek zu der Detektion von falsch-positiven Peptiden. Insbesondere Fluoreszenzfarbstoffe neigen zu stark hydrophoben und *charge-charge*-Wechselwirkungen mit Peptiden.<sup>[64]</sup> Um dieses Problem zu umgehen, können beispielsweise zwitterionische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.<sup>[65]</sup> Unspezifische Interaktionen können vermieden werden, indem Detergenzien, wie Triton X-100 oder Polysorbat 20 (Tween 20), verwendet werden.<sup>[66]</sup>

Die Identifizierung von falsch-positiven Peptiden beim Screening von Peptidbibliotheken ist ein gravierendes Problem, da die identifizierten Peptide nach dem Screening aufwendig charakterisiert werden müssen. Eine Lösung für das Problem ist z. B. die Verwendung von redundanten Peptidbibliotheken. Das heißt, nur wenn ein Peptid mehrfach in der Bibliothek als bindend identifiziert wird, gilt dieses als echt-positiv.<sup>[67]</sup>

### 3.5.3 Separation positiver Treffer

Im Gegensatz zu den parallel synthetisierten Peptidbibliotheken (siehe Kapitel 3.3), sind die Aminosäuresequenzen der Peptide auf den jeweiligen Polymerpartikeln bei OBOC-Bibliotheken unbekannt. Wird auf einem Partikel eine positive Interaktion zwischen Peptid und Protein detektiert, muss anschließend die Peptidsequenz ermittelt werden. Dafür müssen die als positiv identifizierten Partikel zunächst von der großen Masse der negativen Partikel getrennt werden. In der ursprünglichen Arbeit von LAM wurde dies manuell, unter Verwendung einer Pinzette, durchgeführt.<sup>[9]</sup> Obwohl dies sehr zeitaufwendig und fehleranfällig ist, wird die Separation von positiven Partikeln bis heute noch oft nach dieser Methode durchgeführt.<sup>[68]</sup> Dies ist allerdings für industrielle Anwendungen ungeeignet. Idealerweise muss die Separation einfach, schnell und zuverlässig sein, sodass in diesem Schritt das größte Potential für die Optimierung von

OBOC-Bibliotheken liegt. Bereits veröffentlichte Methoden, die versuchen dieses Problem zu umgehen, werden in Kapitel 3.6 besprochen.



**Abbildung 5:** Klassischer Ablauf des Screenings einer OBOC-Bibliothek.

Nachdem die positiven Partikel isoliert wurden, muss die Sequenz der entsprechenden Peptide bestimmt werden. Dies ist keine triviale Aufgabe, da zur Identifizierung nur die Menge an Peptiden zur Verfügung steht, die auf einem einzigen Partikel gebunden sind. Diese hängt dabei stark von den verwendeten Polymerpartikeln ab. So haben die relativ großen ChemMatrix-Partikel (200 bis 300  $\mu\text{m}$ ) eine hohe Kapazität von 300 bis 500 pmol/Partikel.<sup>[69]</sup> Die kleineren TentaGel-Partikel haben eine wesentlich geringere Kapazität von nur 3,5 pmol/Partikel (50  $\mu\text{m}$  Durchmesser) bis 30 pmol/Partikel (100  $\mu\text{m}$  Durchmesser).<sup>[70]</sup> Die Identifizierung der Peptidsequenz kann zum einen direkt über chemische oder massenspektroskopische Methoden erfolgen und zum anderen indirekt über Kodierung der Peptide.

### 3.5.4 Direkte Peptidsequenzidentifizierung

#### *Edman-Abbau*

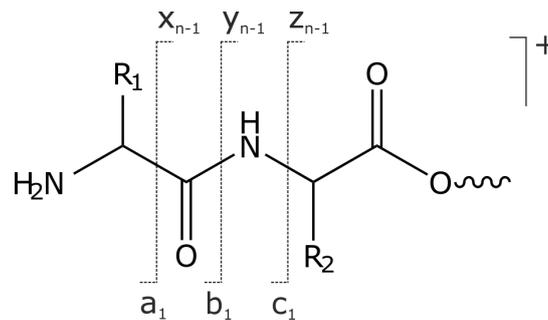
Die klassische Methode, die auch von LAM in der ersten Veröffentlichung benutzt wurde, ist der Edman-Abbau.<sup>[9]</sup> Dieser gilt bei der Bestimmung von Aminosäuresequenzen bis heute als Goldstandard. Beim Edman-Abbau handelt es sich um eine chemische Sequenzierung von Peptiden.<sup>[71]</sup> Unter Verwendung von Phenylisothiocyanat wird das Peptid schrittweise vom *N*-Terminus abgebaut. Dabei entstehen Phenylthiohydantoin-Derivate, die chromatographisch den jeweiligen Aminosäuren zugeordnet werden können. Somit kann jede Sequenz eindeutig identifiziert werden. Dabei entsteht nicht, wie in der Massenspektrometrie, das Problem, dass Strukturisomere (Leucin und Isoleucin) nicht voneinander unterschieden werden können. Für den Edman-Abbau werden nur geringe Mengen eines Peptids benötigt (1-50 pmol), so dass die Menge eines Partikels ausreichend ist. Eine Limitierung des Edman-Abbaus ist allerdings, dass der *N*-Terminus der Peptide ungeschützt sein muss und nur  $\alpha$ -Aminosäuren analysiert werden

können. Ein weiterer entscheidender Nachteil des Edman-Abbaus ist, dass er sehr zeitintensiv ist. So werden für die Analyse einer Aminosäure ca. 20 Minuten benötigt.<sup>[72]</sup>

### Peptidfragmentierung mittels MS/MS

Aus diesem Grund wurden diverse massenspektroskopische Methoden zur „Ein-Partikel“-Sequenzierung entwickelt.<sup>[73-74]</sup> Dafür werden die Partikel in der Regel ebenfalls separiert und die Peptide von den Partikeln abgespalten. Als Ionisationsarten werden dabei meist Elektrospray-Ionisation<sup>[73]</sup> oder Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation<sup>[75]</sup> verwendet. Für die Fragmentierung von Peptiden werden verschiedene Fragmentierungstechniken genutzt, wobei die häufigsten *Collision-induced Dissociation (CID)*, *Higher Energy Collisional Dissociation (HCD)*, *Electron-Capture Dissociation (ECD)* und *Electron Transfer Dissociation (ETD)* sind.<sup>[76]</sup> Bei CID und HCD wird das Peptid über die Kollision mit einem Gas in der Kollisionszelle fragmentiert. Die anderen beiden Techniken basieren auf der Fragmentierung mittels Elektronenübertragung auf positiv geladene Molekülionen.

Die Fragmentierung geschieht vorwiegend am Peptidrückgrat. Die Peptide werden dabei statistisch gespalten, wodurch sich ein Fragmentmuster, Serie genannt, ergibt. Die Serien der Fragmente zum N-Terminus werden a-, b-, c-Serie genannt und die zum C-Terminus werden als x-, y-, z-Serie bezeichnet (siehe Abbildung 6).<sup>[77]</sup>



**Abbildung 6:** Darstellung der unterschiedlichen Serien der Fragmentierung des Peptidrückgrats.

Die kollisionsinduzierten CID-Techniken spalten die Peptide bevorzugt an der Amidbindung (y- und b-Serie).<sup>[78]</sup> Das Tandem-Massenspektrometer besteht hierfür aus zwei Massenanalytoren und einer Kollisionszelle. Im ersten Massenanalysator wird das Molekülion identifi-

ziert und selektiert, anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert und die Fragmentenmassen mit dem zweiten Massenanalysator detektiert. Dabei wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) der Fragmenten detektiert und in einem Spektrum dargestellt.

Für die Interpretation dieser Spektren gibt es unterschiedliche Ansätze. Ursprünglich fand die Auswertung der Spektren und Identifizierung der Peptidsequenz über die manuelle Zuordnung der Abstände der Fragmentensignale zu den einzelnen Aminosäuren statt. Diese Vorgehensweise ist allerdings zeitaufwendig, fehleranfällig und ineffizient. So sind über die Jahre moderne, algorithmengestützte Methoden entwickelt worden, welche eine Auswertung ermöglichen. Die Identifikation von Peptidsequenzen aus Peptidbibliotheken stellt einen sehr speziellen Fall dar. Üblicherweise werden Tandem-Massenspektrometer für die Identifizierung von Proteinen verwendet (Proteomics). Die Proteine werden hierfür enzymatisch verdaut und die entstehenden Peptide mittels MS/MS fragmentiert. Die Fragmentenspektren werden mit Datenbanken verglichen und eine Peptidsequenzen den Spektren zugeordnet. Die Grundlage der Datenbanken sind die zuvor gewonnenen genetischen Informationen.

Beispiele für bekannte Datenbanken sind hierbei UniProtKB<sup>[79]</sup> und NCBI RefSeq<sup>[80]</sup>. Diese Datenbanken sind allerdings ungeeignet, um Peptide aus synthetischen Bibliotheken zu sequenzieren, da die Peptide randomisiert sind und keine genetischen Informationen zugrunde liegen. Eine Alternative sind Datenbanken, welche MS/MS-Spektren mit bekannten Peptidsequenzen enthalten.<sup>[81-82]</sup> Diese Methode funktioniert allerdings nicht mit randomisierten Peptiden, da davon ausgegangen werden kann, dass nicht alle Sequenzen einer Peptidbibliothek bereits gemessen wurden. Somit kommen nur sogenannte *De-Novo*-Algorithmen in Frage.

#### *De-Novo-Algorithmen zur Identifizierung von Peptidsequenzen*

*De-Novo*-Sequenzierung funktioniert ohne das zuvor ein Input von Daten (genetisch oder Massenspektren) vorgenommen werden muss. Die Sequenzerkennung basiert dabei allein auf den detektierten Fragment-Ionen im Spektrum. Die meisten modernen *De-Novo*-Algorithmen basieren auf der Graphen-Theorie (*graph theory*), bei welcher ein Spektrum-Graph (*spectrum graph*) erzeugt wird.<sup>[83]</sup> Ein Spektrum-Graph besteht aus Knoten und Kanten. Die Knoten repräsentieren dabei die Signale im MS/MS-Spektrum. Entspricht der Abstand zwischen zwei Knoten der Masse einer Aminosäure, wird eine Kante erzeugt. Werden z. B. Peaks bei  $m/z$  144,1 und 243,2 detektiert, kann eine Kante zwischen beiden Knoten erzeugt werden, welche der Aminosäure Valin zugeordnet werden kann. Mehrere verbundene Kanten ergeben die Peptidsequenz, wobei sowohl vom C-Terminus (x-, y-, z-Ionen) als auch vom N-Terminus (a-, b-

, c-Ionen) her die Sequenz ermittelt wird. Für ein aussagekräftiges Ergebnis werden die Informationen aus allen Ionen-Serien miteinander kombiniert. Eventuell fehlende Knoten einer Serie können somit zu einem gewissen Teil kompensiert werden. Beispiele für die Verwendung der Graphen-Theorie sind die kommerzielle Software PEAK<sup>[84]</sup> oder die freie Anwendung SeqMS<sup>[85]</sup>.

Alternativ zum Spektrum-Graph können Peptidsequenzen auch mit Hilfe einer *Brute-Force*-Methode ermittelt werden.<sup>[86]</sup> Dabei kommen Algorithmen zur Anwendung, die auch zum Entschlüsseln von Passwörtern genutzt werden. Der Algorithmus berechnet dabei die theoretischen MS/MS-Spektren aller Peptide, die dem  $m/z$  des Vorläuferions (*parent ion*) entsprechen. Die berechneten Spektren werden anschließend mit dem vorhandenen MS/MS-Spektrum verglichen. Anhand einer *Scoring*-Funktion, welche ein Maß für die Übereinstimmung zwischen gemessenem und theoretischem Spektrum ist, werden die wahrscheinlichsten Peptidsequenzen ermittelt. Vorteil ist, dass dieser Algorithmus vergleichsweise einfach ist. Eine maßgebliche Limitierung ist allerdings, dass mit steigender Länge des Peptids, die Anzahl an möglichen Kombinationen exponentiell größer wird. Somit kommt es bei langen Peptiden zu einem erheblichen Anstieg in der aufzubringenden Rechenleistung. Aus diesem Grund findet dieser Ansatz zur Ermittlung von Peptidsequenzen nur noch bedingt Anwendung.

Zusätzlich zu den beiden vorgestellten Algorithmen finden noch viele andere, wie z. B. Lineare Optimierung<sup>[87]</sup>, Dynamische Programmierung<sup>[88]</sup>, Maschinelles Lernen<sup>[89]</sup> oder *Deep Learning*<sup>[90]</sup>, Anwendung in der *De-Novo*-Sequenzierung. Diese werden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher besprochen.

### 3.5.5 Indirekte Kodierungsmethoden

Trotz moderner Methoden zur Berechnung von Peptidsequenzen aus MS/MS-Spektren ist eine zweifelsfreie Sequenzaufklärung bis zum heutigen Tag schwierig.<sup>[91]</sup> Das Hauptproblem ist die oft lückenhafte Fragmentierung der Peptide, was die Identifizierung sehr fehleranfällig oder sogar unmöglich macht. So hat die Gruppe um KARAS in einer Publikation die hundertprozentige Sequenzabdeckung als eine „moderne Form des Surrealismus“ („*modern form of surrealism*“) bezeichnet.<sup>[92]</sup> Vergleichende Studien konnten zeigen, dass nur ca. 60 % der Aminosäuren in der Peptidsequenz richtig identifiziert wurden.<sup>[93]</sup> Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Peptide in OBOC-Bibliotheken zu codieren. Diese Methoden sind nicht mehr von der Sequenzierung der Peptide mittels MS/MS oder Edman-Abbau abhängig.

*DNA-Kodierung*

Eine Methode der Codierung bietet die Einführung eines weiteren Moleküls, das anschließend identifiziert wird und eindeutig einer Peptidsequenz zugeordnet werden kann. So haben bereits 1992 BRENNER et al. eine Kodierung kombinatorischer Bibliotheken mittels DNA veröffentlicht.<sup>[94]</sup> Die kodierende DNA wird dabei entweder parallel mit dem jeweiligen Monomer synthetisiert<sup>[95]</sup> oder durch enzymatische Ligation der Oligonukleotide eingeführt<sup>[96]</sup>. DNA eignet sich dabei besonders gut, da die Auslesetechniken sehr leistungsfähig sind: Mit Hilfe der PCR-basierten Vervielfältigung und Hochdurchsatzsequenzierung können mehrere Millionen DNA-Sequenzen an nur einem Tag ausgelesen werden. Die Kodierung von Peptidbibliotheken mittels DNA hat allerdings vor über 20 Jahren bereits ihren Höhepunkt erreicht<sup>[62]</sup> und wird in jüngster Zeit nur noch selten benutzt. Für Peptidbibliotheken ist diese Art der Kodierung zu aufwendig, da eine Aminosäure von mehreren Nukleotiden kodiert werden muss.<sup>[97]</sup> So müssen zusätzliche Reaktionsschritte vorgenommen und zwei orthogonale Schutzgruppenstrategien parallel durchgeführt werden.

*Kodierung mittel fluoreszierender Kolloide*

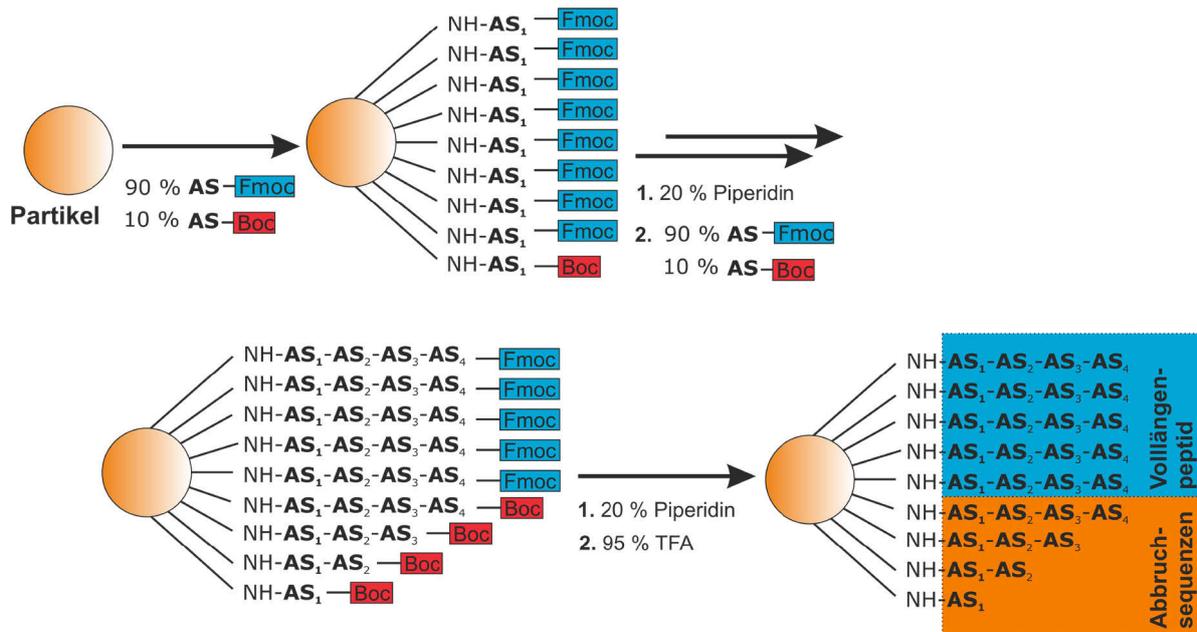
Die Identifizierung der Peptide auf den Partikeln kann zum Beispiel über eine zusätzliche Markierung im Partikel geschehen. So haben MARCON et al. Peptide durch die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen während der Bibliothekssynthese kodiert.<sup>[98]</sup> Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden hierbei über Siliziumdioxid -Kolloide in die Polymerkerne der Partikel eingeführt („*colloidal barcoding*“). Jedes Siliziumdioxid -Kolloid kann dabei mittels Konfokalmikroskop eindeutig identifiziert werden, wodurch eine eindeutige Aussage über die Peptidsequenz auf der Oberfläche der Partikel getroffen werden kann. Vorteil dieser Technologie ist, dass keine zusätzlichen Syntheseschritte vorgenommen werden müssen und mit vergleichsweise wenig Fluoreszenzfarbstoff eine große Anzahl an Peptiden kodiert werden kann. Allerdings gehört ein Konfokalmikroskop nicht zu der Standardausstattung eines Labors und eine Auswertung kann nicht automatisiert durchgeführt werden.

*Abbruchsequenzen*

Um eine aufwendige Durchführung und spezielles Equipment zu vermeiden, haben YOUNGQUIST et al. eine Methode entwickelt, die eine einfache Kodierung durch erzwungene Peptidabbruchsequenzen erlaubt.<sup>[99]</sup> Abbruchsequenzen sind bei der Peptidsynthese in der Regel

eine unerwünschte Nebenreaktion. Bei der Synthese von Peptidbibliotheken erlaubt ein gezieltes Einsetzen der Abbruchsequenzen allerdings eine einfachere Dekodierung der Peptidsequenz. Über die Auswertung der Abstände zwischen den Abbruchsequenzen kann Rückschluss auf die jeweilige Aminosäure gezogen werden. Somit ist es möglich, eine Sequenzidentifizierung mittels Massenspektroskopie durchzuführen. Aufwendige und fehleranfällige Fragmentierungen mittels MS/MS können komplett vermieden werden. In der ersten Veröffentlichung von 1995 wurden zur jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure 10 % acetyliertes Alanin hinzugegeben, um eine gezielte Abbruchsequenz zu erzeugen. Dies hat allerdings den Nachteil, dass auf Grund der chemischen Unterschiede zwischen Alanin und der jeweiligen Aminosäure die Reaktionskinetik variieren kann. Somit kann eine gleichmäßige Erzeugung von Abbruchsequenzen nicht gewährleistet werden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Methode von HILAIRE et al. modifiziert, indem zu der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure 10 % der entsprechenden Boc-geschützte Aminosäure hinzugegeben wurde.<sup>[100]</sup> Auch wenn beide Moleküle chemisch leicht unterschiedlich sind, kann davon ausgegangen werden, dass sie vergleichbare Reaktionskinetiken aufweisen. Zudem hat diese Art der Synthese den Vorteil, dass die Boc-Schutzgruppen am Ende der Synthese mit dem Seitenschutz der Aminosäuren abgespalten werden. Dadurch liegen die Abbruchpeptide unmodifiziert auf der Oberfläche der Partikel vor. Dies vereinfacht die anschließende Auswertung der Spektren. Die Sequenz des Volllängenpeptids und die Abbruchsequenzen liegen in einer Art Leiter vor, wobei die Abstände zwischen den Sequenzen genau der Masse der jeweiligen Aminosäure entsprechen.



**Abbildung 7:** Synthese von Peptiden mit Hilfe der Abbruchsequenzmethode nach HILAIRE et al.<sup>[100]</sup> Zur Erzeugung der Abbruchsequenzen werden 10 % Boc-Aminosäure gemischt mit 90 % Fmoc-Aminosäure benutzt. Nach der letzten Entschützung mit Piperidin und anschließend Trifluoressigsäure (TFA), liegen alle Peptide unmodifiziert auf der Partikeloberfläche vor.

Nachteil dieser Kodierungsmethode ist, dass sich nicht nur eine Spezies des Peptids auf der Oberfläche der Partikel befindet, sondern auch dessen entsprechende Abbruchsequenzen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass kürzere Peptide in der Regel schwächere Interaktionen mit Proteinen eingehen als die dazugehörigen Vollängenpeptide.<sup>[101]</sup> Dadurch haben die Abbruchsequenzen beim Screening der Bibliotheken einen zu vernachlässigen Einfluss. Alles in Allem bietet die Abbruchsequenzmethode eine gute Alternative, um Peptidsequenzen aus kombinatorischen Peptidbibliotheken zu dekodieren, da der synthetische und instrumentelle Aufwand gering ist. Allerdings muss die Auswertung der Spektren bisher per Hand durchgeführt werden. Eine Möglichkeit zur automatischen Auswertung dieser Abbruchsequenzen existiert noch nicht.

### 3.6 Hochdurchsatzmethoden für die Analyse von OBOC-Bibliotheken

Obwohl OBOC-Bibliotheken nunmehr seit fast 30 Jahren bekannt sind, wird die Technik kontinuierlich weiterentwickelt. Dabei wird vor allem versucht, die sehr zeitintensive manuelle Selektion der positiven Treffer durch automatisierte Methoden zu ersetzen. Der Mangel einer

effizienten Hochdurchsatzmethode verhindert zudem die breite Anwendung in der industriellen pharmazeutischen Forschung. Aus diesem Grund existieren unterschiedliche Konzepte, um diese Limitierung zu umgehen.

### 3.6.1 Durchflusszytometrische Sortierung von OBOC-Bibliotheken

Durchflusszytometer wurden ursprünglich dafür entwickelt, Zellen zu analysieren. Es ist allerdings auch prinzipiell möglich, eine große Anzahl an Partikeln zu analysieren und zu sortieren.<sup>[102]</sup> Für die Bindungsassays werden dazu fluoreszenzmarkierte Proteine eingesetzt, analog zum Hefe-Display (Kapitel 3.3). Die Partikel werden hierbei mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt, passieren einen Anregungslichtstrahl und von jedem Partikel wird die Größe (anhand der Streulichtintensität) und die Fluoreszenz auf der Oberfläche bestimmt. Anschließend werden die Partikel auf Grundlage dieser Informationen sortiert. Allerdings sind die Partikel, die üblicherweise bei OBOC-Bibliotheken eingesetzt werden (z. B. TentaGel-Partikel), zu groß für die meisten Durchflusszytometer. Hierfür existieren Spezialgeräte, wie der *Complex Object Parametric Analyzer and Sorter* (COPAS) der Firma Union Biometrica.<sup>[103]</sup> Mit diesem Gerät können Objekte von 40  $\mu\text{m}$  bis 1,5 mm analysiert und sortiert werden.<sup>[104]</sup>

CHO et al. haben z. B. einen COPAS verwendet, um aus einer OBOC-Bibliothek Peptid-basierte Binder zu identifizieren, welche an Krebszellen binden.<sup>[105]</sup> Dafür wurden 1.000 Partikel einer Bibliothek mit fluoreszierenden Krebszellen inkubiert. Die Partikel wurden anschließend im COPAS analysiert und diejenigen, welche an fluoreszierende Krebszellen gebunden haben, in eine 96-Kavitäten-Platte sortiert. Die Sequenzierung fand mit Hilfe von MALDI-TOF-MS/MS statt. Hierbei wurde allerdings nur eine fokussierte Bibliothek verwendet (441 theoretische Peptide), was die geringe Anzahl an gescreenten Partikeln erklärt. Diese Veröffentlichung zeigt das Potential des Screenings mittels COPAS auf, schöpft dies allerdings nicht zur Gänze aus. Die Limitierung dieser Technik ist, dass ein COPAS ein spezielles und vergleichsweise teures Gerät ist, wodurch es vielen Anwendern von OBOC-Bibliotheken nicht zur Verfügung steht.

ERHARUYI et al. haben für ihre Veröffentlichung ein herkömmliches Durchflusszytometer benutzt.<sup>[106]</sup> Dafür mussten allerdings sehr kleine TentaGel-Partikel mit einem Durchmesser von nur 10  $\mu\text{m}$  verwendet werden. Hierbei wurde jedoch nur ein Modellsystem getestet. Eine Analyse einer realen OBOC-Bibliothek fand dabei nicht statt. Es ist fraglich, ob eine Sequenzierung mittels MS/MS bei Partikeln mit nur 10  $\mu\text{m}$  noch möglich ist. Die Autoren der Veröffentlichung sind sich dieser Problematik bewusst und schlagen eine Kodierung der Peptidsequenz

über DNA vor. Wie bereits in Kapitel 3.5.5 beschrieben wurde, ist dies allerdings sehr aufwendig.

### 3.6.2 Chip-basiertes Screening

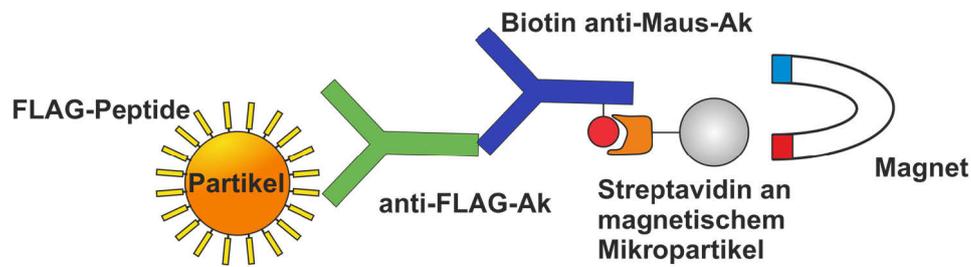
Bei der Verwendung von OBOC-Bibliotheken gibt es seit einigen Jahren das Bestreben, eine Plattform zu entwickeln, die das Screening nach positiven Treffern und die Durchführung der Sequenzierung der Peptide auf einem Target ermöglicht. So haben zum Beispiel WANG et al. einen Chip mit Mikrokavitäten (Durchmesser 200  $\mu\text{m}$ ) entwickelt.<sup>[107]</sup> Jede Mikrokavität bietet dabei Platz für genau einen Partikel der OBOC-Bibliothek. Die Inkubation mit dem Target-Protein findet in den einzelnen Kavitäten statt. Durch die Anfärbung der biotinylierten Target-Proteine mit fluoreszenzmarkierten Streptavidin können positive Treffer mit Hilfe eines Fluoreszenz-Scans identifiziert werden. Die Position jedes Partikels ist dabei unveränderbar, sodass im MALDI-TOF-MS/MS die Position gezielt angesteuert werden kann. Die Oberfläche des Chips besteht aus einer Silberschicht, somit ist die Oberfläche leitend und eine Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS/MS kann direkt auf dem Chip stattfinden. Diese Technologie wurde von WANG et al. weiterentwickelt und der Chip mit einer orts aufgelösten SPR (iSPR) gekoppelt. Somit ist es möglich, direkt die Affinitäten der bindenden Peptide zu bestimmen.<sup>[108]</sup>

Auch wenn die entwickelten Chip-basierten Techniken den enormen Vorteil haben, dass die manuelle Separation der positiven Treffer für die massenspektrometrische Sequenzierung entfällt, haben sie jedoch einige entscheidende Nachteile. Zum einen ist die Herstellung der Chips relativ aufwendig. Für die Produktion der Mikrokavitäten auf dem Silizium-Chip wird eine spezielle Maske zusammen mit einem induktiv gekoppelten Plasma benötigt. Um eine Leitfähigkeit des Chips zu garantieren, wird zusätzlich eine Silberschicht über Magnetronspattern auf den Chip aufgetragen. Dies sind sehr aufwendige und teure Techniken, die eine breite Anwendung dieser Methode weitgehend einschränken. Zum anderen ist die Anzahl der Partikel, die auf einem Chip gescreent werden können, gering. So konnten bisher maximal 800 Partikel auf einem Chip gescreent werden.<sup>[109]</sup>

### 3.6.3 Magnetische Separation

Eine weitere Möglichkeit positive Treffer aus OBOC-Bibliotheken einfach zu separieren, bietet die Verwendung magnetischer Partikel. Dazu wird das Target-Protein entweder direkt oder indirekt (z. B. über Streptavidin) an magnetische Partikel gebunden. Dieses Prinzip wurde von

ASTLE et al. in der Gruppe von KODADEK entwickelt<sup>[110]</sup> und von MENDES et al. optimiert.<sup>[111]</sup> Für die Entwicklung der magnetischen Separation wurde ein Modellsystem verwendet, welches auf der starken Interaktion zwischen FLAG-Peptiden und anti-FLAG-Antikörpern basiert. Das FLAG-Peptid diente hierbei als Positivkontrolle und wurde auf TentaGel-Partikeln synthetisiert. Als Target diente der anti-FLAG-Antikörper. Zusätzlich wurde ein sekundärer biotinylierter Antikörper verwendet, welcher den anti-FLAG-Antikörper bindet. Die magnetischen Mikropartikel sind mit Streptavidin modifiziert, wodurch diese an den sekundären Antikörper binden (siehe Abbildung 8). So findet indirekt eine Markierung des Target-Proteins mit den magnetischen Mikropartikeln statt. Wird anschließend ein Magnet an die Lösung gehalten, werden die FLAG-tragenden Partikel aus der Suspension gezogen. Nicht-bindende Partikel sinken zum Boden der Lösung und können entfernt werden.



**Abbildung 8:** Prinzip der magnetischen Separation am Beispiel des FLAG-Peptid-Modellsystems.

Um die Effizienz der Separation zu testen, wurden die magnetisch zurückgehaltenen Partikel mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Dies hat gezeigt, dass im Modell sehr gute Wiederfindungsraten zwischen 86 - 100 % erreicht werden konnten. Nach der Separation wurden allerdings auch Partikel identifiziert, die kein FLAG-Peptid auf der Oberfläche trugen. Ein nachfolgendes Screening der Partikel ist dementsprechend weiterhin nötig. Die Anzahl nicht-bindender Peptide kann mit Hilfe der magnetischen Separation jedoch stark reduziert werden. Somit kann diese Technik eher als Anreicherung, vor dem Screening, verstanden werden. Neben der manuellen magnetischen Separation, existieren auch Ansätze zur automatischen Separation auf mikrofluidischen Chips.<sup>[112]</sup>

Die magnetische Separation wurde bereits für das Screening von realen Targets eingesetzt.<sup>[113-114]</sup> Zudem wurde die magnetische Anreicherung mit den in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Chip-basierten Screenings kombiniert.<sup>[109]</sup> Somit kann die Limitierung der geringen Anzahl an messbaren Partikeln auf einem Chip umgangen werden.

### 3.7 Methoden zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Werden Peptide in OBOC-Bibliotheken als bindend identifiziert und deren Sequenz bestimmt, besteht die Herausforderung in der Charakterisierung der Affinitäten des Peptids zum Protein. Eine Kerngröße für die Affinität ist dabei die Dissoziationskonstante. Die Dissoziationskonstante beschreibt den Zustand eines Gleichgewichts und ist ein Maß für die Menge des Komplexes die im Gleichgewicht dissoziiert vorliegt. Niedrige Dissoziationskonstanten stehen dementsprechend für hohe Affinitäten, da nur geringe Mengen im dissoziierten Zustand vorliegen. Die Dissoziationskonstante kann aus dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 1) berechnet werden:

$$K_D = \frac{c(A) \cdot c(B)}{c(AB)} = \frac{k_d}{k_a} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit den Konzentrationen  $c(A)$  und  $c(B)$  der beiden Bindungspartner, der Konzentration  $c(AB)$  des gebildeten Komplexes und den Geschwindigkeitskonstanten  $k_a$  für die Assoziationsreaktion beziehungsweise  $k_d$  für die Dissoziationsreaktion.

Klassischerweise kann die Dissoziationskonstante in einem Bindungsassay bestimmt werden. So haben LAM et al. die Affinitäten ihrer identifizierten Peptide gegen einen monoklonalen anti- $\beta$ -Endorphin-Antikörper mittels Radiobindungsassay bestimmt.<sup>[9]</sup> Radiobindungsassays werden heutzutage auf Grund der Risiken nur noch sehr selten durchgeführt. Die Bestimmung der Affinität eines Peptids zu einem Protein, ist allerdings durch viele biophysikalische Methoden möglich und kann auch zu der Charakterisierung von Peptiden aus OBOC-Bibliotheken genutzt werden. Eine Auswahl wird im Folgenden vorgestellt.

#### 3.7.1 ELISA

Der ELISA ist der mit Abstand am häufigsten verwendete Immunoassay.<sup>[115]</sup> Es existieren unterschiedliche Formate des ELISAs. Die Gemeinsamkeit ist, dass ein Bindungspartner an einer festen Phase immobilisiert wird und die Bindung eines anderen Bindungspartners, mittels enzymatischer Markierung, detektiert wird. Als Enzymmarkierung wird meist Peroxidase verwendet, welche die Oxidation eines farblosen zu einem gefärbten Substrat katalysiert. Die Konzentration des Farbstoffs, die proportional zur Konzentration des Bindungspartners ist, kann

anschließend spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Dissoziationskonstante kann in unterschiedlichen Formaten bestimmt werden. Die Methoden wurden in der Regel für die Bestimmung der Affinität zwischen Antikörper und Antigen entwickelt.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Dissoziationskonstante mit Hilfe eines ELISAs haben FRIGUET et al. entwickelt.<sup>[116]</sup> Dabei werden der Antikörper und das Antigen miteinander inkubiert, bis das Gleichgewicht erreicht wird. Anschließend wird die Konzentration des freien Antikörpers mittels indirektem ELISA bestimmt. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wird die Konzentration des Antikörpers konstant gehalten, wohingegen die Konzentration an freiem Antigen variiert. Wichtig für die korrekte Bestimmung ist, dass die Konzentration des Antikörpers ähnlich oder geringer ist als die Dissoziationskonstante. Da diese vor der Bestimmung unbekannt ist, kann sich dies in der Praxis als schwierig erweisen.

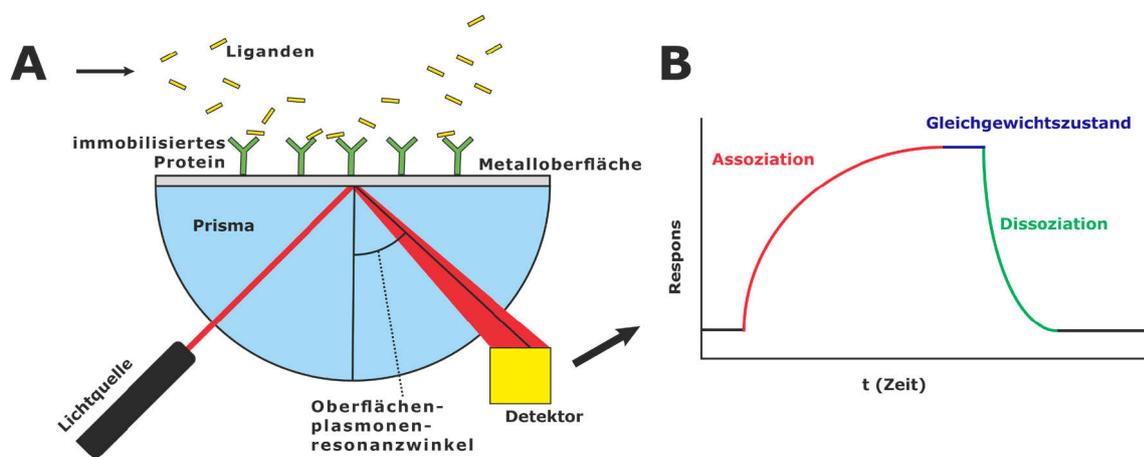
Eine weitere Methode zur Bestimmung der Bindungsaffinität wurde von BEATTY et al. entwickelt.<sup>[117]</sup> Hierbei wird die Dissoziationskonstante in einem nicht-kompetitiven ELISA bestimmt. Kern der Methode ist, dass das Antigen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf der Platte immobilisiert wird. Die genaue Konzentration des immobilisierten Antigens ist hierbei unbekannt. Zu den beiden Konzentrationen immobilisierter Antigene werden unterschiedliche Konzentrationen an markierten Antikörpern gegeben, wodurch zwei sigmoidale Kurven entstehen. Aus der Relation der Antikörperkonzentration am Wendepunkt der Kurven ( $IC_{50}$ ), kann die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) bestimmt werden.

Obwohl beide Methoden schon über 30 Jahre alt sind, wird sowohl die Methode von FRIGUET et al.<sup>[118]</sup> als auch die von BEATTY et al.<sup>[119]</sup> bis heute verwendet. Grund dafür ist, dass ELISA eine einfache, schnelle und günstige Methode bietet, um die Dissoziationskonstante zu bestimmen. Allerdings lässt es eher eine Abschätzung zu, als eine genaue Bestimmung. So haben vor allem nicht-kompetitive ELISA (wie die Methode von BEATTY et al.) das Problem, dass die Interaktion von Antigen und Antikörper in der Lösung vollkommen anders ist, als die gemessene Interaktion auf der festen Phase.<sup>[120]</sup> Bei kompetitiven ELISAs findet hingegen die Antigen-Antikörper-Reaktion in der Lösung statt. Problem hierbei sind die sehr niedrigen Konzentrationen an Antikörpern, die nachgewiesen werden müssen. Dies macht vor allem die Bestimmung von sehr kleinen Dissoziationskonstanten schwierig.<sup>[121]</sup>

### 3.7.2 SPR

Eine Möglichkeit die Peptid-Protein-Interaktion markierungsfrei zu messen, ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR). Das

physikalische Prinzip basiert auf Oberflächenplasmonen, einer oszillierenden, nicht-strahlenden, elektromagnetischen Welle in einer Metalloberfläche (meist Gold).<sup>[122]</sup> Diese befindet sich auf der Grenzfläche zwischen der Oberfläche und dem umgebenden Medium. Die Oszillation ist dabei stark von dem umgebenden Medium, wie der Absorption von Molekülen auf der Oberfläche, abhängig.<sup>[123]</sup> Totalreflektiertes Licht kann dabei mit den Oberflächenplasmonen wechselwirken und in Resonanz treten. Dadurch kommt es bei einem bestimmten Winkel zu einer Abnahme der Intensität des reflektierten Lichts. Dieser Winkel wird Oberflächenplasmonenresonanzwinkel genannt und kann von einem Detektor erfasst werden (siehe Abbildung 9 A).



**Abbildung 9:** A Schematische Darstellung der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. B Beispielhafte Darstellung eines SPR-Sensogram.

Bei der SPR-Messung liegt ein Bindungspartner auf der Goldoberfläche immobilisiert und der andere gelöst in der flüssigen Phase vor. Bei der Messung von Peptid-Protein-Interaktionen sollte das Protein immer immobilisiert vorliegen und das Peptid in die Lösung dazugegeben werden. So kann garantiert werden, dass monovalente Interaktionen gemessen und Aviditätseffekte ausgeschlossen werden.<sup>[124]</sup>

Zu Beginn der Messung werden die Peptide mit Hilfe eines mikrofluidischen Systems an der Goldoberfläche vorbeigeleitet. Kommt es zu einer Interaktion zwischen Protein und Peptid, steigt die lokale Konzentration des Peptids nahe der Oberfläche an und kann mittels SPR detektiert werden. Ein Anstieg des Signals kann beobachtet werden, solange die Assoziation der Peptide häufiger auftritt, als deren Dissoziation. Das Signal ist konstant, wenn der Gleichgewichtszustand erreicht ist, das heißt die Assoziation und Dissoziation der Peptide im gleichen Maße stattfindet. Wird die Zugabe an Peptid gestoppt, kommt es zu einem Abfall des Signals,

da die Peptide nur noch dissoziieren können. So kann eine aufgenommene SPR-Messung (Sensogram) in drei Phasen aufgeteilt werden: Assoziationsphase, Gleichgewichtszustand und Dissoziationsphase (siehe Abbildung 9 B).

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante kann durch die Auswertung des Sensograms erfolgen. Dafür werden die Dissoziationsphase und Assoziationsphase zuerst getrennt voneinander betrachtet. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziationsreaktion ( $k_d$ ) kann dabei direkt aus der Dissoziationskurve berechnet werden. Die Dissoziationskurve wird durch die Gleichung 2 beschrieben:

$$R(t) = R_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (\text{Gleichung 2})$$

2)

mit  $R$  als gemessenes Signal,  $R_0$  die Signalintensität ohne Liganden und  $t$  die Zeit. Der  $k_d$ -Wert ist unabhängig von der Konzentration des Liganden.

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziationsreaktion ( $k_a$ ) ist hingegen abhängig von der Peptidkonzentration ( $c$ ) und dem  $k_d$ -Wert. Die Assoziation kann mit Gleichung 3 beschrieben werden:

$$R(t) = R_{eq} \cdot (1 - e^{-(k_a \cdot c + k_d) \cdot t}) \quad (\text{Gleichung 3})$$

3)

wobei  $R$  wieder das gemessene Signal und  $R_{eq}$  die Signalintensität im Gleichgewichtszustand ist. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ergibt sich aus dem Verhältnis der Konstanten für die Assoziations- und Dissoziationsrate (Gleichung 1).

Im Prinzip kann so mit nur einer SPR-Messung die Dissoziationskonstante berechnet werden. In der Praxis werden jedoch mehrere Sensogramme bei verschiedenen Ligandkonzentrationen aufgenommen. Somit kann eine höhere statistische Sicherheit gewährleistet werden. Die kinetische Auswertung stößt allerdings an einigen Stellen an ihre Grenzen. So kann die Assoziation stark durch die Diffusion des Liganden, auch Massentransport genannt, limitiert sein.<sup>[125]</sup> Ob eine Massentransportlimitierung auftritt, kann durch Variation der Flussraten identifiziert werden. Ein Phänomen, was die Dissoziation beeinflusst, ist das sogenannte *Rebinding*. *Rebinding* beschreibt das Wiederanbinden der Liganden an die Proteine während der Dissoziation.<sup>[126]</sup> Beide Effekte treten häufig auf, wenn die Dichte an Protein auf der Oberfläche besonders hoch

ist. Dies ist besonders bei der Messung von Peptid-Protein-Interaktionen nötig, da das SPR-Signal direkt proportional zur Masse an gebundenen Liganden ist. Bei Liganden mit geringer Masse, wie es bei Peptiden der Fall ist, muss gewährleistet werden, dass möglichst viele Liganden an die Oberfläche binden. Dies kann nur durch eine hohe Dichte an Protein gewährleistet werden. Dadurch wird allerdings eine kinetische Auswertung der erhaltenen Sensogramme schwierig bis unmöglich. Eine Berechnung der Dissoziationskonstante kann allerdings auch über die Auswertung des Gleichgewichtszustandes erfolgen. Dies ist möglich, da der Gleichgewichtszustand unbeeinflusst vom Massentransport und *Rebinding* ist.<sup>[127]</sup>

Für die Berechnung der Dissoziationskonstante über den Gleichgewichtszustand werden SPR-Kurven bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen aufgenommen. Dabei muss sichergestellt sein, dass in allen Messungen die Gleichgewichtsphase erreicht wird. Für eine zuverlässige Auswertung müssen die verwendeten Ligandenkonzentrationen um den  $K_D$ -Wert liegen. Die Konzentrationen der Liganden werden gegen die Signalintensität im Gleichgewichtszustand aufgetragen. Der Zusammenhang zwischen Signal ( $R$ ) und Konzentration ( $c$ ) kann mit Hilfe der Langmuir-Absorptionsisotherme (Gleichung 4) beschrieben werden:<sup>[128]</sup>

$$R(c) = \frac{R_{max} \cdot c}{K_D + c} \quad \text{(Gleichung 4)}$$

4)

mit  $R_{max}$ , der Signalintensität, bei der alle Bindungsstellen vom Liganden besetzt sind und  $K_D$  den Wendepunkt, bei dem 50 % der Bindungsstellen belegt sind. Der  $K_D$ -Wert entspricht, der Dissoziationskonstante.

Die SPR wird sehr häufig zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten zwischen Proteinen und Peptiden benutzt. Ein Grund dafür ist, dass die Messung ohne Markierungen durchgeführt werden kann. Zudem ist die Methode sehr empfindlich<sup>[129]</sup>, wodurch die Mengen an Protein und Ligand, die für die Messungen benötigt werden, sehr gering sind. Mit Hilfe der SPR können Dissoziationskonstanten im pM- bis mM-Bereich bestimmt werden<sup>[130]</sup>, was die meisten Dissoziationskonstanten einschließt. Nachteil ist allerdings, dass das gemessene Signal proportional zu der Masse des Liganden ist. Gerade bei der Messung von kleinen Peptiden kann es dabei zu hohen Messunsicherheiten kommen.

Die Möglichkeit die Dissoziationskonstanten, einerseits über die Kinetik und andererseits über die Gleichgewichtszustände, zu ermitteln, bietet dem Anwender gewissen Freiraum in der Auswertung der Sensogramme. Dies ist gerade bei der Messung von Peptid-Protein-Interaktionen

von entscheidender Bedeutung, da eine Auswertung über die Kinetik oft nicht möglich ist. Somit gehören SPR-Instrumente mittlerweile zur Standardausstattung von vielen biochemischen Laboren.

### 3.7.3 Weitere Methoden

#### *Isotherme Titrationskalorimetrie*

Neben der SPR und ELISA existieren noch weitere Methoden zur Bestimmung der Dissoziationskonstante. So bietet z. B. die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) eine Möglichkeit, diese zu bestimmen.<sup>[131]</sup> Die Technik basiert auf der Temperaturänderung, die auftritt, wenn ein Ligand (Peptid) an ein Protein bindet. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wird der Ligand in unterschiedlichen Konzentrationen zum Protein gegeben (titriert), wohingegen die Konzentration des Proteins konstant gehalten wird. Die freiwerdende Wärme wird dabei kalorimetrisch erfasst und kann gegen die Konzentrationen des Liganden aufgetragen werden. Aus der erhaltenen Abhängigkeit kann die Dissoziationskonstante errechnet werden.

Vorteil dieser Methode ist, dass sie komplett in der Lösung stattfindet und markierungsfrei durchgeführt wird. Entscheidender Nachteil ist allerdings, dass die Methode relativ unempfindlich ist. So ist die ITC typischerweise auf einen Bereich von  $100 \mu\text{M} > K_D > 1 \text{ nM}$ .<sup>[132]</sup> limitiert. Eine weitere Limitierung ist, dass große Mengen Protein eingesetzt werden müssen, um eine ausreichende Temperaturänderung hervorzurufen. Da Proteine in der Regel nur begrenzt zur Verfügung stehen oder sehr teuer sind, schränkt dies die Anwendungsbereiche der ITC stark ein.

#### *NMR*

Prinzipiell kann die Dissoziationskonstante auch mittels Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) bestimmt werden. So kann z. B. über die Sättigungs-Transfer-Differenz (*saturation transfer difference*, STD) ein  $K_D$ -Wert bestimmt werden.<sup>[133]</sup> Dieses Experiment basiert auf dem Kern-Overhauser-Effekt. Bei der STD wird das Protein mittels magnetischer Polarisierung gesättigt und der Transfer der Sättigung auf den Liganden beobachtet. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante wird die Differenz zwischen gesättigtem und ungesättigtem Spektrum gegen die Konzentration des Liganden aufgetragen. Neben der STD stehen noch viele weitere NMR-Methoden zur Verfügung.<sup>[134]</sup> Nachteil der NMR ist, dass sie, wie die ITC, eher unempfindlich ist.<sup>[135]</sup> So müssen ebenfalls hohe Konzent-

rationen an Protein und Peptiden eingesetzt werden. Zudem sind die Anschaffungs- und Unterhaltskosten der NMR sehr teuer. Aus diesen Gründen wird die NMR zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten eher selten eingesetzt.

#### *Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay*

Bei Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA) handelt es sich um einen homogenen Immunoassay.<sup>[136]</sup> Dabei findet, im Gegensatz zum ELISA, die Reaktion zwischen Ligand und Protein in einer Phase statt. Das Messprinzip basiert darauf, dass ein kleiner Ligand (z. B. Peptid), gebunden an einem großen Molekül (z. B. Protein), weniger stark rotiert, als wenn er ungebunden vorliegt.<sup>[137]</sup> Ist der Ligand mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und wird er mit polarisiertem Licht bestrahlt, emittiert er depolarisiertes Licht, aufgrund der schnellen Eigenrotation des Liganden. Kann der Ligand auf Grund der Bindung zum Protein nicht mehr schnell rotieren, wird das emittierte Licht weniger stark depolarisiert abgestrahlt. Wird die gemessene Polarisation in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden gestellt, entsteht eine sigmoidale Kurve, bei welcher der  $IC_{50}$ -Wert direkt dem  $K_D$ -Wert entspricht.<sup>[138]</sup> Da es sich um einen homogenen Assay handelt, wird die Bindung zwischen Liganden und Protein nicht durch heterogene Effekte beeinflusst (vgl. Kapitel 3.7.1). Allerdings handelt es sich bei FPIA um keine markierungsfreie Methode. Die Liganden müssen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, was aufwendig sein kann. Zum anderen ist es möglich, dass durch den Fluoreszenzfarbstoff die Interaktion vom Liganden mit dem Protein beeinflusst wird. Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass die FPIA für die Bestimmung hochaffiner Binder nicht empfindlich genug ist.<sup>[138]</sup>

#### *Thermophorese*

Die optisch erzeugte Thermophorese (*Microscale Thermophoresis*) basiert auf der Bewegung von Molekülen innerhalb eines Temperaturgradienten.<sup>[139]</sup> Ein mikroskopischer Temperaturgradient wird von einem Infrarotlaser, in einer dünnen Glaskapillare, erzeugt. Die Moleküle in der Lösung bewegen sich innerhalb von Sekunden üblicherweise von höheren Temperaturen zu niedrigeren. Um die Bewegung z. B. eines Liganden zu beobachten, muss dieser mit einem Fluorophor markiert sein. Die Bewegung des markierten Liganden ist dabei z. B. abhängig von der Größe, welche sich bei einer Wechselwirkung mit einem Protein verändert.<sup>[140]</sup> Somit führt die Änderung der Konzentration des Liganden zu unterschiedlichen Thermophoresesignalen. Durch die Auftragung dieses Signals gegen die Konzentration kann die Dissoziationskonstante erhalten werden.<sup>[141]</sup>

Die Methode ist sehr empfindlich und es werden nur sehr geringe Mengen Protein und Ligand benötigt. Zudem ist der dynamische Bereich vergleichbar zur SPR (pM bis nM). Nachteil ist, dass die Liganden mit einem Fluorophor markiert werden müssen. Zudem kann keine kinetische Auswertung der Ergebnisse vorgenommen werden.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Entwicklung des Hochdurchsatzverfahrens zur Analyse von OBOC-Bibliotheken

Ziel der Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die sowohl das Screening als auch die massenspektrometrische Sequenzierung von Partikeln einer OBOC-Peptidbibliothek auf einem Chip erlaubte. Hierbei sollte das Format des Chips dem eines herkömmlichen Objektträgers entsprechen (2,5 · 7,5 cm). Dies hat den Vorteil, dass für die Detektion der Fluoreszenz ein hochauflösender Microarray-Scanners (z. B. MARs) verwendet werden kann. Das Objektträgerformat ist ebenfalls mit dem MALDI-Massenspektrometer kompatibel, wobei hier MALDI-Träger aus dem Feld des MALDI-Imaging verwendet werden können.

Um Partikel im MALDI gezielt ansteuern zu können, muss die Position der zu untersuchenden Partikel über das komplette Screening fixiert sein. Somit galt es eine Immobilisierungsmethode zu entwickeln, die mit den Inkubationsexperimenten in wässrigen Puffern und der anschließenden Massenspektrometrie kompatibel ist. Dabei war es wichtig, dass die Partikel in einer Monolage geordnet immobilisiert werden. Dies sollte sicherstellen, dass die Partikel im Screening eindeutig voneinander getrennt analysiert werden können.

Wesentlicher Bestandteil eines Chip-basierten Screenings ist die massenspektrometrische Sequenzierung der Peptide auf dem Chip, direkt von den Partikeln. Da dies mit wesentlichen Herausforderungen einherging, sollte dies im ersten Schritt der Methodenentwicklung optimiert werden. Hierbei galt es, die Peptide rückstandsfrei abzuspalten, eine geeignete MALDI-Matrix und Matrix-Auftragung zu finden, sowie eine Methode zu entwickeln die eine eindeutige Sequenzzuordnung der Peptide erlaubt.

Konnte erfolgreich eine direkte Sequenzierung der Peptide sichergestellt werden, sollte der Bindungsassay optimiert werden. Die Durchführung eines Bindungsassays direkt auf TentaGel-Partikeln wurde in der Literatur bereits oft beschrieben (siehe Kapitel 3.5.2). Aus diesem Grund stellte diese Entwicklung einen weniger kritischen Schritt dar. Dabei sollte eine direkte Inkubation der immobilisierten Partikel auf dem Chip untersucht werden. An einem Modell-System sollte die Identifizierung von positiven proteinbindenden Peptiden optimiert werden.

#### 4.1.1 Partikelimmobilisierung

Für die Immobilisierung der Partikel wurden anfänglich Objektträger verwendet, die mit Indiumzinnoxid (*Indium Tin Oxide*, ITO) beschichtet sind. Diese werden vor allem beim MALDI-

Imaging verwendet, da sie transparent und elektrisch leitend sind. Somit können zum einen spektroskopische Untersuchungen, zum Beispiel mit einem Mikroskop oder Fluoreszenzscanner, und zum anderen massenspektrometrische Analysen mit einem MALDI-TOF-MS auf demselben Träger durchgeführt werden.

Zu Beginn wurde eine Strategie verfolgt, bei der die Partikel kovalent an die Oberfläche gebunden werden sollten. Dazu wurde die ITO-Oberfläche mit einem Epoxysilan modifiziert. Die Partikel trugen Peptide auf den Oberflächen, welche primäre Amine als Endgruppe besitzen. Diese können mit den Epoxidgruppen auf dem modifizierten Objektträger unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren und so die Partikel kovalent fixieren. Es hat sich gezeigt, dass TentaGel-Partikel mit einer Größe von 30  $\mu\text{m}$  gut immobilisiert werden können. Auch konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Proteininkubation als auch Messungen mit MALDI-TOF-MS möglich waren.<sup>[142]</sup> Allerdings ist die Menge an Peptid auf Partikeln, mit einem Durchmesser von 30  $\mu\text{m}$ , vergleichsweise gering. Zwar konnte mit dieser Methode ein Peptid detektiert werden, eine Fragmentierung und somit Sequenzidentifizierung war allerdings nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Partikel verwendet, die einen Durchmesser von 75  $\mu\text{m}$  haben und damit eine ungefähr 17fach höhere Kapazität an Peptid auf der Oberfläche besitzen (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Vergleich der Partikelgrößen, Menge an Partikeln pro Gramm, Masse eines Partikels, Beladung pro Gramm und pro Partikel zwischen TentaGel® HL-NH<sub>2</sub> und TentaGel® M-NH<sub>2</sub>-Partikel.

<b>Polymer-partikel</b>	<b>Partikelgröße in <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Partikel/g</b>	<b>Beladung in <math>\mu\text{mol/g}</math></b>	<b>Kapazität pro Partikel in pmol</b>
<b>TentaGel® HL-NH<sub>2</sub></b>	75	$4,09 \times 10^6$	470	12
<b>TentaGel® M-NH<sub>2</sub></b>	30	$6,60 \times 10^7$	230	0,7

Für die folgenden Experimente wurden TentaGel-Partikel verwendet, die unmodifiziert waren und nur primäre Amine auf der Oberfläche trugen. Dazu wurden TentaGel-Partikel mit 30  $\mu\text{m}$  und 75  $\mu\text{m}$  Durchmesser in basischem Puffer (pH = 8) suspendiert und auf die Epoxid-funktionalisierten ITO-Oberfläche gegeben. Die Partikel mit 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser konnten wie zuvor

beschrieben immobilisiert werden. Auch nach wiederholtem Waschen lösten sich diese nicht ab.

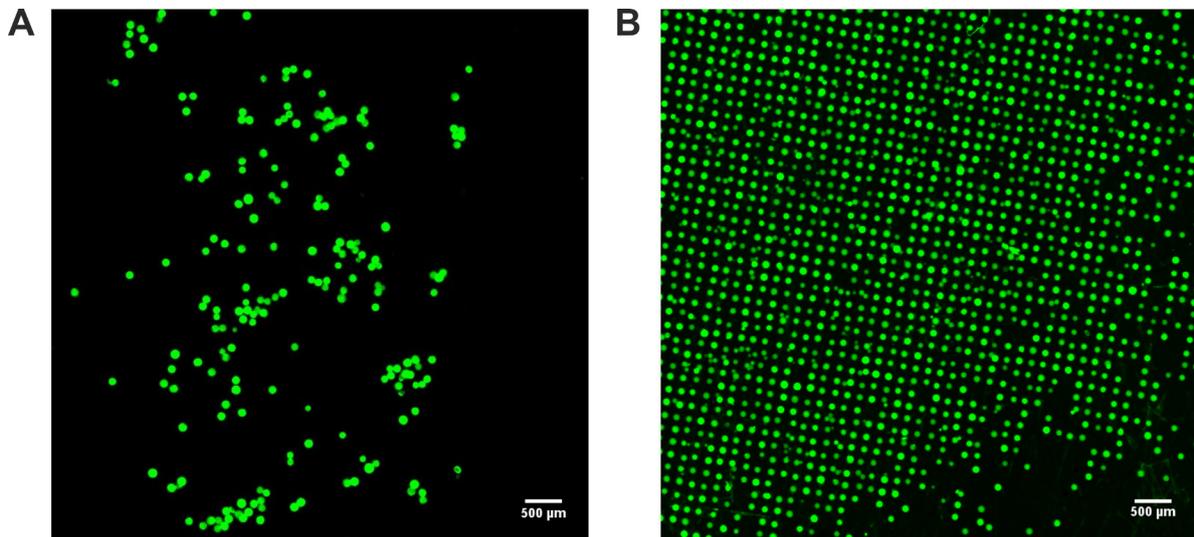
Die Immobilisierung der Partikel mit 75  $\mu\text{m}$  gelang nicht. Die Partikel wurden durch das Waschen mit wässrigen Puffern von der Oberfläche gespült. Dies ist damit zu erklären, dass die größeren Partikel einen höheren Strömungswiderstand besitzen als die Partikel mit nur 30  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Die Bindung zwischen den Epoxiden auf der Oberfläche und den Aminogruppen der Peptide war nicht ausreichend, um eine permanente Immobilisierung zu ermöglichen.

Alternativ zu der kovalenten Immobilisierung sollte die Verwendung von Klebstoffen und Klebefilmen zur permanenten Fixierung der Partikel getestet werden. Die Verwendung von Sekundenkleber auf der ITO-Oberfläche erwies sich hierbei als ungeeignet, da die Partikel teilweise vom Kleber umschlossen wurden. Dadurch waren die Partikel weder für den Bindungsassay noch eine massenspektrometrische Analyse zugänglich.

Mit Hilfe von doppelseitigen Klebebändern konnten die Partikel permanent fixiert werden. Nachteil bei herkömmlichen Klebebändern ist allerdings, dass es zu einer Isolierung der ITO-Oberfläche kommt und eine Verwendung im MALDI-TOF-MS nicht mehr möglich ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein elektrisch leitendes doppelseitiges Klebeband der Firma 3M<sup>TM</sup> verwendet. Das *3M<sup>TM</sup> XYZ-Axis Electrically Conductive Tape 9713* ist ein dünnes Klebeband (89  $\mu\text{m}$ ), welches aus vernickelten Karbon-Fasern besteht und in alle drei Raumrichtungen leitend ist. Somit ergab sich der Vorteil, dass keine ITO beschichteten Objektträger verwendet werden mussten, da die Leitfähigkeit direkt durch das Klebeband gewährleistet wurde. Dadurch war es möglich, einen herkömmlichen, kostengünstigen Objektträger zu verwenden.

Als Grundlage für das Chip-System wurde im Folgenden ein herkömmlicher Objektträger aus Glas mit dem elektrisch leitenden doppelseitigen Klebeband modifiziert. Im nächsten Schritt galt es die Partikel auf dem modifizierten Objektträger zu immobilisieren. Dazu wurden die Partikel im ersten Versuch auf einem blanken Glasobjektträger verrieben und vorsichtig auf das Chip-System übertragen. Die Partikel konnten immobilisiert werden und haben durch diverse Waschstufen ihre Position nicht verändert. Die Auftragung führte allerdings zu einer sehr unregelmäßigen Anordnung der Partikel auf dem Chip (siehe Abbildung 10 A). Dabei bilden die Partikel Cluster, was eine Differenzierung der einzelnen Partikel in einem Screening erschwert, bis schlichtweg unmöglich macht. Des Weiteren sind zwischen den Clustern große Freiräume zu erkennen, in denen keine Partikel immobilisiert wurden. Alles in Allem ist diese Auftragung ungeeignet, da keine zufriedenstellende Ausnutzung des Platzes stattfindet und starke Clusterbildung auftritt.

Um eine gleichmäßige Auftragung zu erreichen, wurde die Verwendung eines Siebes getestet. Dabei ist von Vorteil, dass Siebe mit unterschiedlich definierter Maschenweite kommerziell erhältlich sind. Für die 75  $\mu\text{m}$  großen TentaGel-Partikel wurde ein Sieb mit einer Maschenweite von 100  $\mu\text{m}$  verwendet. Somit konnte gewährleistet werden, dass ein einzelner Partikel auch im gequollenen Zustand in eine Masche passt. Für die ersten Versuche wurde der Chip mit der Klebeband-modifizierten Seite gegen das Sieb gedrückt und die Partikel auf der Oberfläche des Siebes verteilt. Manuell wurde leichter Druck auf die Partikel ausgeübt, um sie in die Maschen zu drücken. Anschließend wurde das Sieb entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich das Klebeband nicht vom Objektträger löst. Wie in Abbildung 10 B zu sehen ist, wurde eine wesentlich bessere Verteilung der Partikel erreicht als bei der Auftragung ohne Sieb.

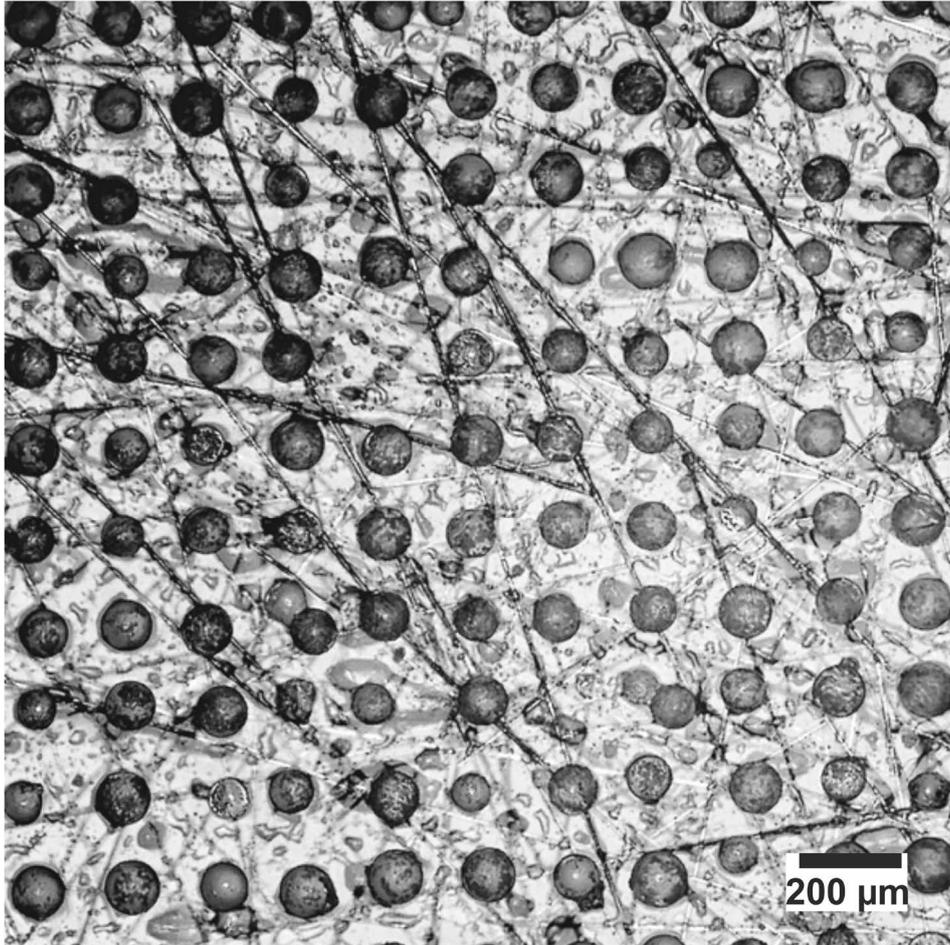


**Abbildung 10:** Fluoreszenzscan (Emission 532 nm, Extinktion: 570 nm, Auflösung: 10  $\mu\text{m}$  pro Pixel) von TentaGel-Partikeln (75  $\mu\text{m}$ ) auf einem Objektträger. Die Immobilisierung erfolgte mit Hilfe eines elektrisch leitenden, doppelseitigen Klebebandes. Aufgetragen A: ungeordnet, B: geordnet mit Hilfe eines Siebes mit einer Maschenweite von 100  $\mu\text{m}$ .

Die Kapazität, also die maximale Anzahl an Partikeln, die auf einen Chip passen, wurde bestimmt. Dazu wurde ein wie zuvor beschriebener Chip benutzt und an der Unterseite des Siebes positioniert. Die trockenen TentaGel-Partikel wurden gleichmäßig auf dem Sieb verteilt und auf den Chip gedrückt. Anschließend wurde das Sieb entfernt und der Chip im MARs vermessen. Dabei wurde eine Anregungswellenlänge von 532 nm benutzt, da sich gezeigt hat, dass TentaGel-Partikel dort eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen.<sup>[143]</sup>

Die Partikelanzahl wurde automatisch mit der Software ImageJ bestimmt. Als niedrigste Fluoreszenzintensität eines Partikels wurde dabei die zehnfache Intensität des Hintergrunds gewählt. Des Weiteren wurden eine Mindest- und Maximalgröße (in Pixeln) angegeben, die denen der Partikel entsprechen. Dies stellte sicher, dass Staubkörner und andere Verunreinigungen von der Analyse ausgeschlossen wurden. Bis zu 50.000 Partikel konnten insgesamt auf einem Chip identifiziert werden. Die Partikel wurden mit einer Dichte von 3.300 Partikel pro  $\text{cm}^2$  immobilisiert. So konnten die Partikel zum einen wesentlich dichter und zum anderen in einer größeren Anzahl auf dem Chip immobilisiert werden als in den bisher veröffentlichten Chip-basierten Screenings von OBOC-Bibliotheken (siehe Kapitel 3.6.2). Dabei wurde beobachtet, dass ca. 20 % der Partikel bei der Immobilisierung verloren gingen. Dieser Verlust an Partikeln ist damit zu erklären, dass Partikel am Sieb hängen bleiben oder sich in zweiter Lage befinden und somit keinen direkten Kontakt mit dem Klebeband haben, wodurch sie mit dem Sieb entfernt werden. Dies hat allerdings keinen Einfluss auf das nachfolgende Screening. Hierbei ist es nur wichtig, dass eine Monolage aus immobilisierten Partikeln auf dem Chip vorliegt.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Chip hergestellt werden kann, bei dem die Partikel geordnet in einer Monolage irreversibel immobilisiert vorliegen (siehe Abbildung 11). Das elektrisch leitende, doppelseitige Klebeband soll dabei nicht nur die für das Screening wichtige Immobilisierung sicherstellen, sondern auch die Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS ermöglichen. In den nächsten Kapiteln sollte getestet werden, ob die Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS tatsächlich direkt auf diesem Chip möglich ist.



**Abbildung 11:** Mikroskopische Aufnahme einer Monolage von TentaGel-Partikeln auf einem mit elektrisch leitendem, doppelseitigem Klebeband modifizierten Objektträger. Im Hintergrund sind die dünnen, vernickelten Karbon-Fasern des Klebebands zu erkennen.

#### 4.1.2 Peptidsequenzidentifizierung positiver Treffer

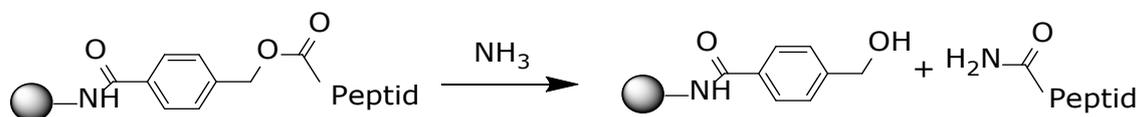
Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht eine Sequenzbestimmung mit MALDI-TOF-MS, direkt auf dem Chip, durchzuführen. MALDI-TOF-MS bietet den Vorteil, dass orts aufgelöste Massenspektren gemessen werden können. Damit können Partikel, die zuvor als positiv identifiziert wurden, gezielt angesteuert und Massenspektren direkt von einzelnen Partikeln gemessen werden. Dafür musste zunächst sichergestellt werden, dass die Peptide rückstandsfrei von den Partikeln abgespalten wurden. Dies ist mit Hilfe eines geeigneten spaltbaren Linkers zwischen Partikel und Peptid möglich.

#### *Linker-Auswahl*

Prinzipiell war es wichtig, dass die Spaltung des Linkers zwischen Partikel und Peptid ohne flüssige Reagenzien stattfinden sollte. Der Einsatz von flüssigen Reagenzien würde dazu führen, dass die Peptide von den Partikeloberflächen gespült und nicht mehr eindeutig einem bestimmten Partikel zugeordnet werden können. Dies ist entscheidend für die Entwicklung einer ortsaufgelösten *On-Bead*-Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass photolabile Linker für die direkte Messung von Peptiden von den Partikeln verwendet werden können.<sup>[144]</sup> Diese Linker können mittels UV-Licht vor der Sequenzierung mit MALDI-TOF-MS/MS gespalten werden und wurden bereits für die direkte Sequenzierung von Peptiden aus OBOC-Peptidbibliotheken eingesetzt.<sup>[145]</sup> Photolabile Linker haben jedoch den Nachteil, dass während der Synthese der Peptide auf den absoluten Ausschluss von Licht geachtet werden muss. Dies ist vor allem bei der mehrschrittigen *Split-and-Mix*-Synthese von OBOC-Peptidbibliotheken schwierig.

Aus diesem Grund wurde der Linker 4-(Hydroxymethyl)benzoesäure (HMBA) verwendet. Dieser kann mit gasförmigem Ammoniak gespalten werden (siehe Abbildung 12).<sup>[146]</sup> Die Peptide wurden hierbei direkt über den HMBA-Linker an die Partikel gekoppelt. Auf den Ausschluss von Licht musste während der Peptidsynthese nicht geachtet werden. Des Weiteren wurde eine dritte Orthogonalität eingeführt. Diese ermöglichte es, die temporäre Schutzgruppe Fmoc während der Peptidsynthese mit schwachen organischen Basen wie Piperidin abzuspalten. Die permanenten Schutzgruppen wurden nach der Synthese mit starken Säuren wie TFA entfernt. Die Peptide verblieben für den Bindungsassay auf den Partikeln. Die Peptide wurden abschließend mit gasförmigem Ammoniak als Amide rückstandsfrei abgespalten, wodurch flüssige Reagenzien vermieden wurden. Die Peptide verblieben auf oder in dem jeweiligen Partikel und eine ortsaufgelöste MALDI-TOF-MS/MS-Messung der Peptide von den Partikeln war möglich.



**Abbildung 12:** Abspaltung eines Peptids von einem mit HMBA-Linker modifizierten Partikel.

### *Spacer-Sequenz*

Zwischen dem Polymerharz und der eigentlichen Peptidsequenz wurde zusätzlich eine Spacer-Sequenz (GTERS GG) eingebaut. Diese sollte zum einen einen Abstand zwischen Partikel und

aktiver Peptidsequenz sicherstellen, damit die Peptide für den Bindungspartner sterisch besser zugänglich sind. Zum anderen sollte die Spacer-Sequenz die Ionisierbarkeit, beziehungsweise die Fragmentierbarkeit, der Peptide verbessern.<sup>[145]</sup> Dabei half Arginin die gesamte Ionisierbarkeit/Desorption der Peptide zu verbessern,<sup>[147]</sup> Glutaminsäure steigerte hingegen die Fragmentierbarkeit<sup>[148]</sup>. Des Weiteren war die Sequenz formal elektrisch-neutral geladen und enthält die Aminosäuren Serin und Threonin. Diese sind hydrophil und sollten die unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Spacer-Sequenz und dem Target-Protein verringern.

### *Synthese der Testpeptide*

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde ein Testpeptid synthetisiert. Dafür wurden TentaGel-Partikel verwendet, welche mit einem HMBA-Linker modifiziert wurden. Nach dem Linker wurde die Spacer-Sequenz GTERSSG gekoppelt. Das **Testpeptid** besitzt die Aminosäuresequenz DTHFPI (m/z (DTHFPI-GTERSSG) 1372,661). DTHFPI ist Teil des N-Terminus von Hecidin, ein Protein, welches für die Regulation der Eisenaufnahme in Säugtieren verantwortlich ist.<sup>[149]</sup> Dies spielt für die folgenden Experimente allerdings keine Rolle, sondern wurde nur als Modellsequenz für die Peptidsequenzierung genutzt werden.

### *MALDI-Matrixauftragung*

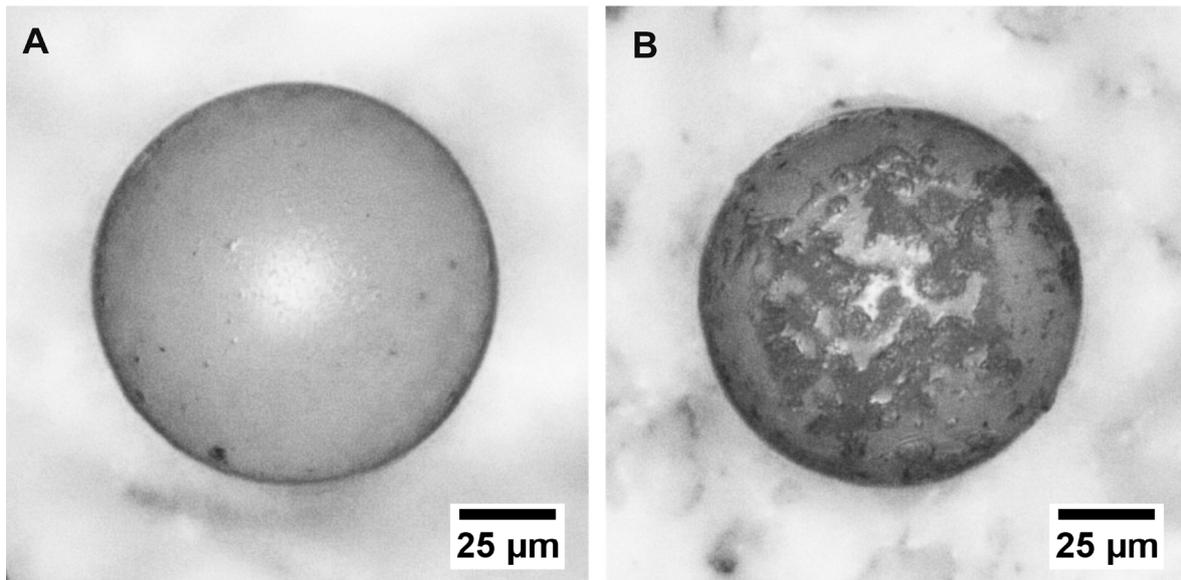
Die Herausforderung bei der Auftragung der MALDI-Matrix war es, einen dünnen Film an Matrix auf dem Chip gleichmäßig aufzutragen, ohne dabei die Peptide von den Partikeln zu waschen. Für die in dieser Arbeit entwickelte Methode wurde eine handelsübliche Airbrush benutzt. Dabei wird die Matrix pneumatisch zerstäubt und als Aerosol auf den Chip aufgetragen. Dies hat den Vorteil, dass die Matrix in kleinen Tröpfchen auf die Partikel gelangte und somit keine Peptide von den Partikeln gespült wurden.

Hierbei haben sich folgende Faktoren als wichtig herausgestellt: Der Abstand der Airbrush muss so gewählt werden, dass sich kein Flüssigkeitsfilm auf dem Chip bildet, sondern die Flüssigkeit aus der Matrix direkt verdampft. Als optimaler Abstand der Airbrush zum Chip wurden ca. 15 cm identifiziert. Ebenso musste der anliegende Druck der Druckluft so eingestellt werden, dass die Matrix in einem ausreichenden Strom die Airbrush verlässt. Allerdings durfte keine flüssige Matrix auf den Chip gelangen, da es ansonsten zu einer Vermischung der Peptide auf dem Chip kommt. Dabei hat sich herausgestellt, dass 2 bar ausreichend sind, um eine optimale Matrixauftragung zu garantieren.

Ein weiterer entscheidender Faktor war die Wahl der Matrix. Standardmäßig wird für die Messung der Peptide die Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHCA) benutzt.<sup>[150]</sup> Es ist allerdings bekannt, dass die verwendeten Matrix einen starken Einfluss auf die MALDI-Messung hat. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden Experimente mit vier unterschiedlichen Matrices durchgeführt: CHCA, 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB), super-DHB (Mischung aus 2,5-DHB und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure) und 2,5-Dihydroxyacetophenon (2,5-DHAP).

Für dieses Experiment wurden vier Chips vorbereitet, auf denen jeweils Partikel mit dem **Testpeptid** immobilisiert wurden. Für die Abspaltung der Peptide von den Partikeln wurde eine Glaskammer verwendet, die in ihrer eigentlichen Funktion für das Anfärben von Objektträgern benutzt wird. Diese Kammer bietet Platz für bis zu fünf Objektträger. Sie wurde mit einem Glasdeckel verschlossen und war dabei nicht luftdicht abgeschlossen. Am Boden der Kammer befanden sich ca. 2 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30 % in Wasser). Es wurde eine Halterung entwickelt, damit die Chips den Boden der Kammer nicht berührten und somit nicht in Kontakt mit der Lösung kamen.

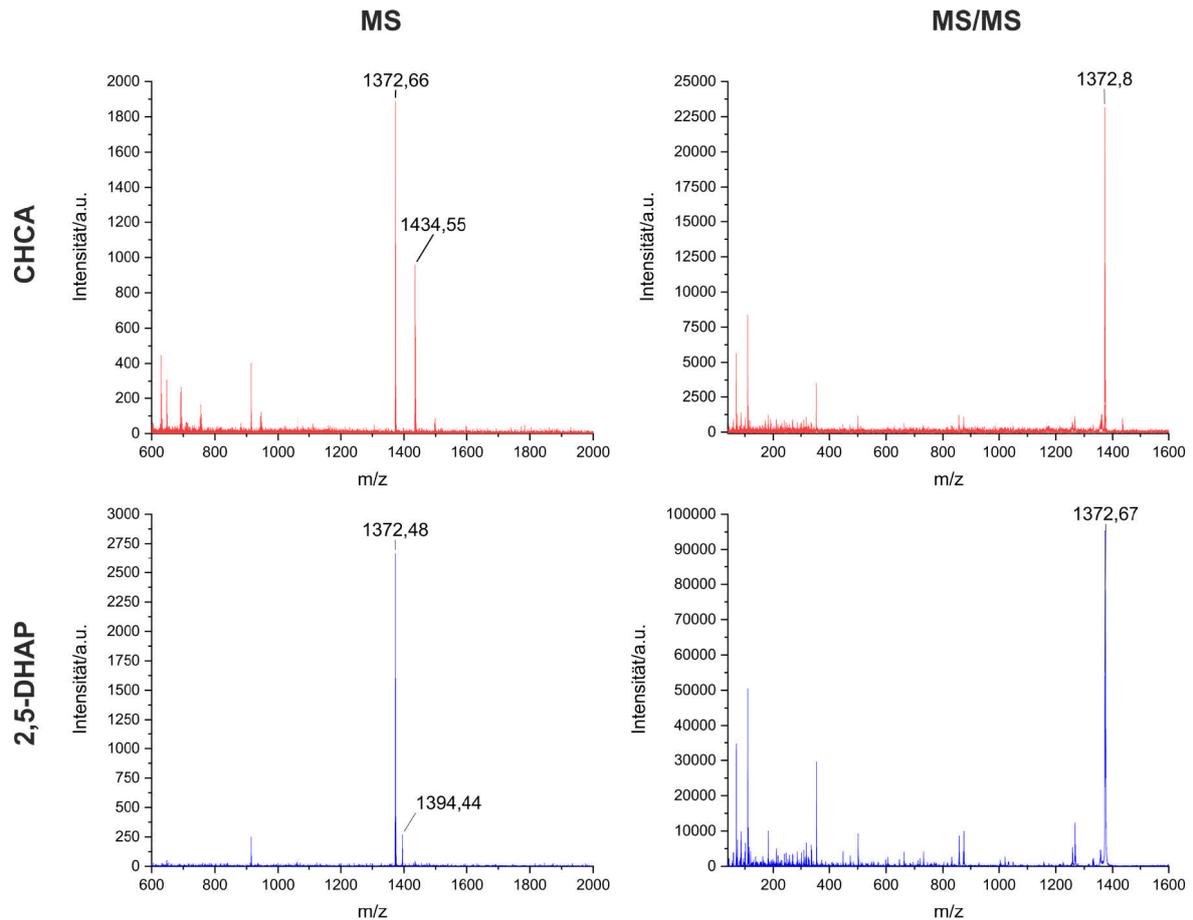
Der aus der  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lsg. freiwerdende gasförmige Ammoniak, führt zur Spaltung des HMBA-Linkers. So wurden die Peptide, wie bereits beschrieben (siehe Abbildung 12), von der Oberfläche der Partikel abgespalten. Die Chips wurden anschließend mit den vier Matrices besprüht. 2,5-DHB und super-DHB verfärbten sich nach der Auftragung der Matrix leicht braun. CHCA und 2,5-DHAP ergaben hingegen einen gleichmäßigen Matrix-Film auf der Oberfläche der Chips. Die Farbe der Matrix veränderte sich während der Auftragung nicht. Auflichtmikroskopische Aufnahmen konnten zeigen, dass CHCA und 2,5-DHAP (siehe Abbildung 13) feine Kristalle auf der Oberfläche der Partikel bildeten.



**Abbildung 13:** Immobilisierter TentaGel-Partikel A: vor der Matrixauftragung, B nach der Auftragung von 2,5-DHAP mittels Airbrush. Das Bild wurde aufgenommen mit einem Auflichtmikroskop.

Die vier Chips wurden in einen für Objektträger konzipierten MALDI-Träger (MTP Slide-Adapter) gespannt und in ein MALDI-TOF-MS (Bruker Autoflex II) eingeschleust. Die im Gerät integrierte Kamera erlaubte die Ansteuerung einzelner Partikel auf dem Chip. Von den Chips, die mit 2,5-DHB und super-DHB präpariert wurden, konnten keine Massenspektren erhalten werden. Hingegen konnten bei den Chips, die mit CHCA und 2,5-DHAP präpariert wurden, Peptide direkt von der Oberfläche der Partikel detektiert werden (siehe Abbildung 14). Die Signale mit der höchsten Intensität konnten dem protonierten Peptid zugeordnet werden. Unter Verwendung der CHCA-Matrix wurde zusätzlich ein Addukt signal detektiert, welches ca. 62 Da über dem der Peptidmasse liegt. Die Identität des Addukts konnte nicht geklärt werden. Da dieses Addukt nicht im Spektrum der Messung unter Verwendung von 2,5-DHAP auftrat, ist davon auszugehen, dass es über eine Verunreinigung in der CHCA Matrix entstanden ist. Unter Verwendung von 2,5-DHAP wurde in geringer Intensität das Natriumaddukt des Peptids detektiert, was bei der MALDI-MS-Messung von Peptiden nicht unüblich ist.

Die Messung mittels MALDI-MS sollten in einer späteren Anwendung dazu dienen, die Peptidsequenz von einem einzelnen Partikel zu bestimmen. Dazu mussten die Peptide mittels MS/MS fragmentiert werden. Hierbei zeigte 2,5-DHAP die besseren Eigenschaften. Zum einen wurde ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt, zum anderen wurden mehr Fragmente detektiert.



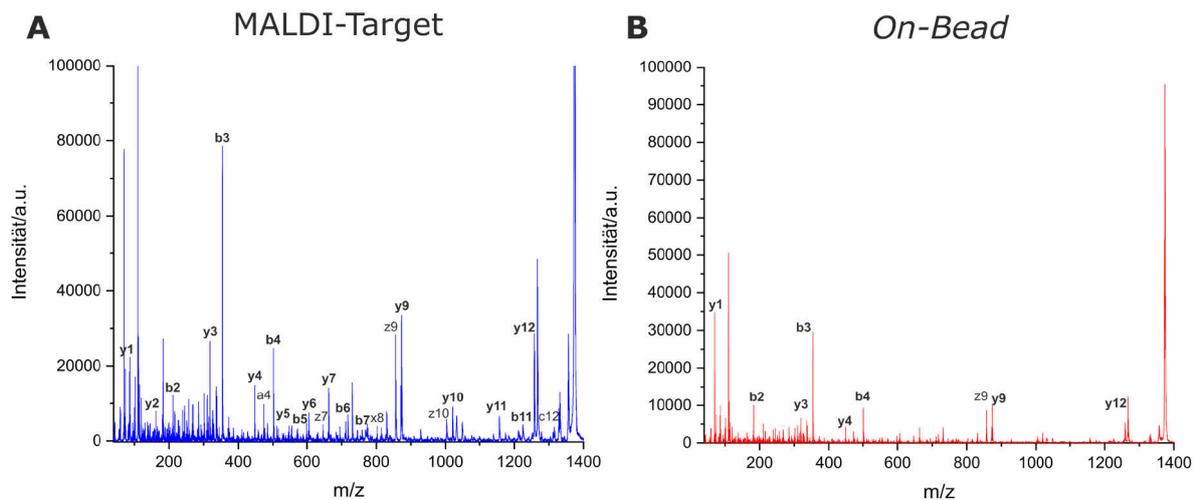
**Abbildung 14:** MALDI-MS-Spektren und MALDI-MS/MS (Vorläuferionenmasse =  $m/z$  1372) der direkten Messung des **Testpeptids** (theoretisch:  $m/z$  1372,66) auf der Oberfläche der Partikel unter Verwendung der MALDI-Matrix CHCA und 2,5-DHAP.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung einer kommerziellen Airbrush zur Auftragung der MALDI-Matrix geeignet ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Messung eines Peptids direkt von der Oberfläche der Partikel mittels MALDI-MS möglich ist. Die Qualität der Spektren hängt dabei maßgeblich von der verwendeten Matrix ab. Die Matrix 2,5-DHAB weist dabei die besten Eigenschaften auf. So konnte das Peptid in einem sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden und eine nachfolgende Fragmentierung war möglich.

### *Fragmentierung*

Die Sequenzierung der Peptide direkt vom Partikel stellt eine große Herausforderung dar. Im Allgemeinen ist die Fragmentierung von Peptiden mittels MS/MS fehlerbehaftet (siehe Kapitel 3.5.4). Erschwerend kommt hinzu, dass für die Fragmentierung der Peptide nur maximal 12 pmol zu Verfügung stehen. Zum Vergleich wurde das **Testpeptid** zum einen auf einem

MALDI-Target und zum anderen direkt auf dem Partikel (*On-Bead*) gemessen. Für die Messung auf dem MALDI-Target wurde das **Testpeptid** von den Partikeln abgespalten, gelöst, mit CHCA unter Verwendung der *Dried-Droplet-Methode*<sup>[151]</sup> aufgetragen und anschließend mit MALDI-MS/MS gemessen. Für die *On-Bead*-Messung wurden Partikel, beladen mit dem **Testpeptid**, auf einem Chip immobilisiert, abgespalten, mit 2,5-DHAP Matrix besprüht und die MALDI-MS/MS direkt auf der Partikeloberfläche durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.



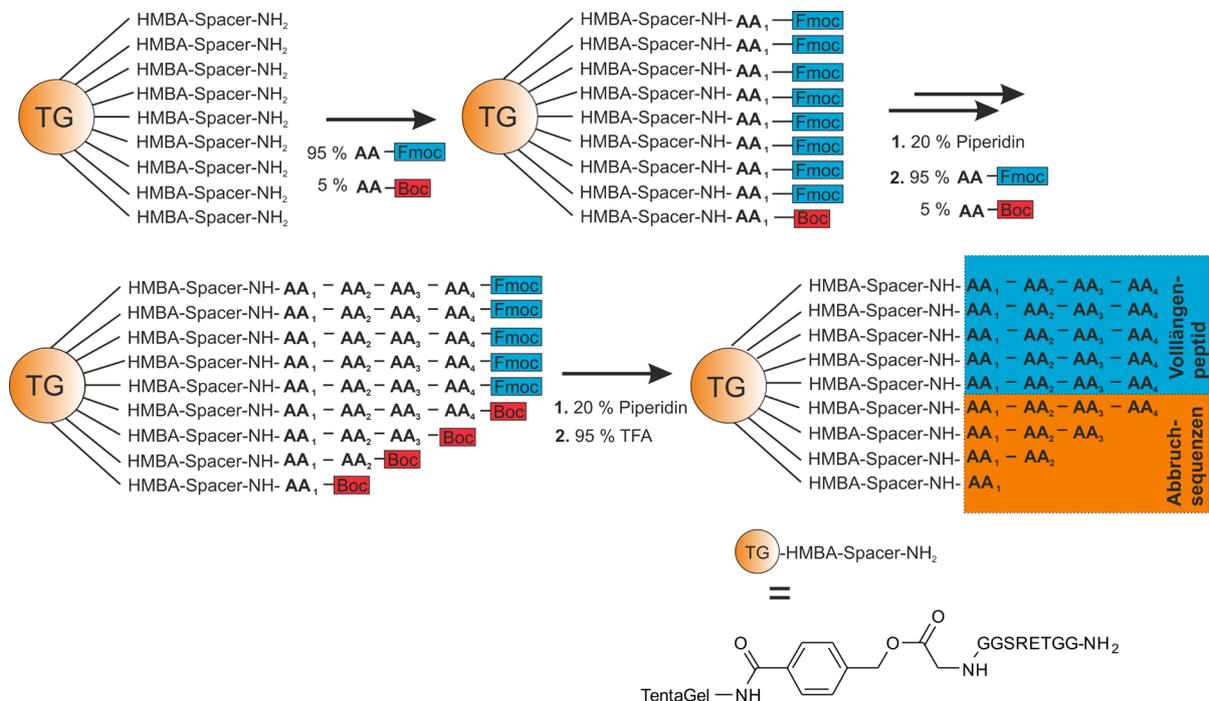
**Abbildung 15:** Vergleich der Fragmentierung des **Testpeptids** (theoretisch:  $m/z$  1372,66) **A:** auf dem MALDI-Target; **B:** direkt vom TentaGel-Partikel.

Der Messung des **Testpeptids** auf dem MALDI-Target ergab ein gutes Fragmentenspektrum, in dem viele Fragmente eindeutig zugeordnet werden konnten. Eine eindeutige Sequenzzuordnung war hierbei möglich. Im Gegensatz dazu ergab die Fragmentierung direkt auf dem Partikel vergleichsweise wenig Fragmente. Es fiel auf, dass vor allem Fragmente mit höheren Massen kaum detektiert werden konnten. So entstand eine Lücke zwischen den Fragmenten b4 bis z9 und zwischen y9 und y12. Eine eindeutige Identifizierung der Peptidsequenz anhand des MS/MS-Spektrum war hierbei nicht möglich. Somit schien die Menge an Peptid, die auf der Oberfläche der Partikel zur Verfügung stand, nicht ausreichend zu sein, um eine eindeutige Sequenzierung der Peptide vorzunehmen.

#### *Indirekte Kodierung der Peptidsequenz mit Hilfe von Abbruchsequenzen*

Wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben, existieren einige Methoden, um eine indirekte Identifizierung der Peptidsequenz zu ermöglichen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Peptide mit guter

Empfindlichkeit auf der Oberfläche der Partikel gemessen werden können, sollte eine Kodierung der Peptidsequenz über Abbruchsequenzen eine Alternative zur Fragmentierung darstellen. Hierzu wurde die Methode von HILAIRE et al.<sup>[100]</sup> leicht abgewandelt (siehe Abbildung 16). Es wurden nur 5 % Boc-geschützte Aminosäure verwendet, im Gegensatz zu 10 % in der ursprünglichen Anwendung. Dies hatte zur Folge, dass weniger Abbruchsequenzen im Vergleich zum Volllängenpeptid, auf der Oberfläche der Beads vorlagen. Werden 10 % Boc-AA während jeder Kopplung benutzt, stehen beispielsweise nach acht Kopplungsschritten nur noch 48 % Volllängenpeptide zur Verfügung. Bei 5 % Boc-AA sind es im Gegensatz dazu noch 70 %. Somit können längere Peptide hergestellt werden, ohne dabei einen massiven Verlust an Volllängenpeptid hinzunehmen. Zudem werden weniger Abbruchsequenzen erzeugt, was die Gefahr der Interaktion von kürzeren Peptiden mit dem Protein minimiert.



**Abbildung 16:** Synthese von Peptiden mit Hilfe der Abbruchsequenzmethode. Zur Erzeugung der Abbruchsequenzen werden 5 % Boc-Aminosäure gemischt mit 95 % Fmoc-Aminosäure benutzt.

Unter Verwendung der Abbruchsequenzmethode wurden vier Testpeptide synthetisiert (siehe Tabelle 2). Dabei enthielt das **FLAG-Peptid** den FLAG-Tag, wodurch dieses Peptid im FLAG-Modellsystem als Positivkontrolle verwendet werden konnte. **NK-Peptid1** enthielt wie das **Testpeptid** den N-Terminus von Hepcidin und **NK-Peptid2** den inversen N-Terminus von Hepcidin, wobei Isoleuzin durch ein Valin ausgetauscht wurde. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass auch Peptidsequenzen mit ähnlichen Aminosäurezusammensetzungen eindeutig

sequenziert und unterschieden werden konnten. Die Sequenz von **NK-Peptid3** wurde zufällig gewählt, wobei sie im Gegensatz zu den anderen Testpeptiden viele basische Aminosäuren enthielt. Somit sollte ein möglichst breites Spektrum an unterschiedlichen Peptiden untersucht werden.

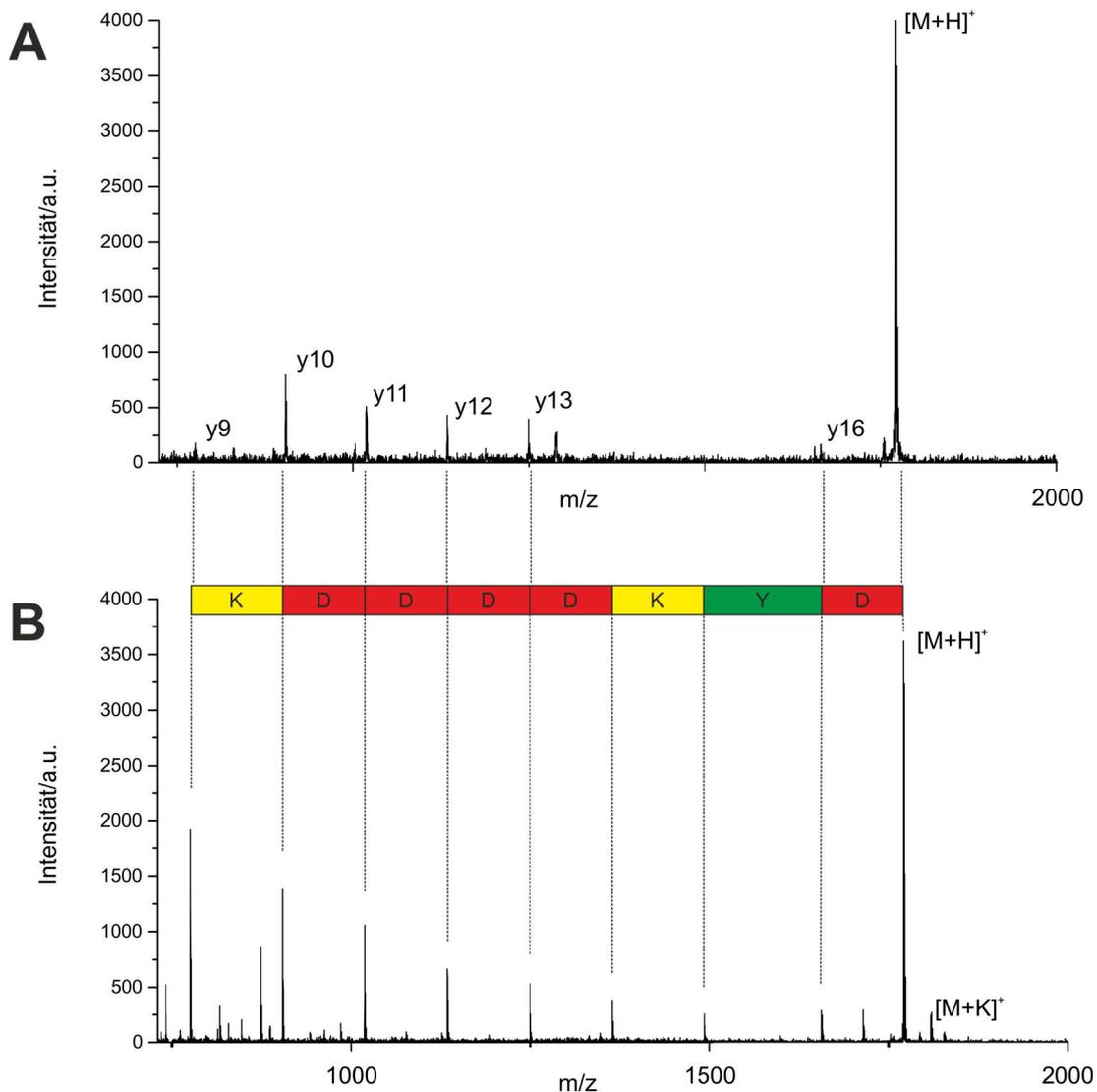
Als stationäre Phase wurden weiterhin TentaGel-Partikel (75  $\mu\text{m}$ ) und HMBA als Linker verwendet. Als Spacer-Sequenz wurde bei allen Peptiden GGGTERS GG verwendet. Die Spacer-Sequenz hat hierbei auch den Nutzen, dass alle Abbruchsequenzen eine Masse über 700 Da aufwiesen. Somit waren die Massen aller Abbruchsequenzen in dem für MALDI-MS günstigen Massenbereich. Masse-zu-Ladungsverhältnisse unter  $m/z$  700 sind mitunter schwer zu detektieren, da Matrixcluster in diesem Massenbereich auftreten können.<sup>[152]</sup> Zusätzlich beinhaltete die Spacer-Sequenz ein Arginin, was die Ionisierung im positiven Modus begünstigt. Die auf die Spacer-Sequenz folgende Peptidsequenz wurde mit der Abbruchsequenzmethode synthetisiert. Dabei wurden für jedes Peptid acht Kopplungsschritte mit 5 % Boc-AA und 95 % Fmoc-AA durchgeführt.

**Tabelle 2:** Sequenzen und theoretische  $m/z$  der hergestellten Testpeptide. Die Aminosäuresequenz nach der Spacer-Sequenz (GGGTERS GG) wurde mit Hilfe der Abbruchsequenzmethode hergestellt.

	<b>FLAG-Peptid</b>	<b>NK-Peptid1</b>	<b>NK-Peptid2</b>	<b>NK-Peptid3</b>
<b>Peptid- und Spacer-Sequenz</b>	DYKDDDDK - GGGTERS GG	DTHFPIGG – GGGTERS GG	VPFHTDGG - GGGTERS GG	KFVPFKKS - GGGTERS GG
<b><math>m/z</math> (theoretisch)</b>	1700,75	1600,76	1586,73	1737,94

Im Anschluss der Synthese sollte untersucht werden, inwiefern eine Sequenzidentifizierung mithilfe der Abbruchsequenzen möglich ist. Hierzu wurden die vier Partikelpopulationen miteinander vermischt und auf einem Chip wie zuvor beschrieben immobilisiert. Von den Partikeln wurden die Peptide mit gasförmigem Ammoniak abgespalten und mit der Matrix besprüht. Der Chip wurde anschließend ins MALDI-TOF-MS eingeschleust und ein Massenspektrum der Peptide wurde direkt mittels MALDI-TOF-MS von der Oberfläche gemessen. Für den Vergleich zwischen Fragmentierung und Dekodierung mithilfe der Abbruchsequenzen, wurde von dem Vollängenpeptid ein MS/MS-Spektrum aufgenommen. Von jeder Partikelpopulation wurden dabei drei Partikel gemessen, sodass bei vier unterschiedlichen Peptiden insgesamt 24

Messungen durchgeführt wurden. Exemplarisch ist ein Vergleich eines MS (Abbruchsequenzen) und eines MS/MS-Spektrum in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17:** Vergleich der Sequenzidentifizierung für das **FLAG-Peptid** mit Spacer-Sequenz (DYKDDDDK-GGTERS GG). A: Direkte Fragmentierung mittels MALDI-TOF-MS/MS. B: Abbruchsequenzen des Peptids, gemessen mittels MALDI-TOF-MS.

Um beide Methoden der Sequenzidentifizierung miteinander vergleichen zu können, wurden die erhaltenen Spektren mit der Software Spec2Seq (siehe Kapitel 4.2) automatisch ausgewertet. Der Treffer mit dem höchsten Score wurde mit der tatsächlichen Sequenz der Peptide verglichen. Ausgewertet wurde, wie viele Aminosäuren insgesamt im Peptid richtig erkannt wurden und zusätzlich wie viele dieser Aminosäuren sich an der richtigen Position im Peptid befinden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3:** Vergleich der Zuverlässigkeit von Fragmentierung mittels MS/MS und Dekodierung über Abbruchsequenzen anhand von vier bekannten Testpeptiden. Die Messungen wurden direkt vom einzelnen Partikel durchgeführt. Gezeigt wird der Anteil an richtig erkannten Aminosäuren (AS) in der Sequenz sowie der Anteil der Aminosäuren an der richtigen Position in der Sequenz.

Peptid	AS erkannt mittels MS/MS Fragmentierung		AS erkannt mittels Abbruchsequenzen	
	% richtige AS	% richtige Position	% richtige AS	% richtige Position
FLAG-Peptid	46	17	100	100
NK-Peptid1	63	20	100	100
NK-Peptid2	50	33	100	100
NK-Peptid3	62	16	100	100

Aus der Tabelle 3 ist eindeutig zu erkennen, dass die indirekte Sequenzidentifizierung mittels Abbruchsequenzen wesentlich bessere Ergebnisse liefert. Für alle gemessenen Peptide konnten 100 % der Aminosäuren an den richtigen Positionen identifiziert werden. Dabei konnten sowohl sehr ähnliche Peptidsequenzen (**NK-Peptid1** und **NK-Peptid2**) eindeutig voneinander unterschieden werden als auch chemisch sehr unterschiedliche Peptidsequenzen (**FLAG-Peptid** und **NK-Peptid3**) mit gleicher Zuverlässigkeit identifiziert werden.

Wie bereits in Kapitel 3.5.4 beschrieben, liefert die direkte Sequenzidentifizierung mittels MS/MS-Fragmentierung ungenügende Ergebnisse. Im Durchschnitt wurden nur 50 % der Aminosäuren erkannt und 30 % an der richtigen Position. Die Wiederfindung von 30 % ist dabei noch schlechter als die 60 %, die in der Literatur beschrieben werden.<sup>[93]</sup> Dies bestätigt die These, dass bei geringen Peptidkonzentrationen auf der Oberfläche der Partikel eine zuverlässige Fragmentierung nicht mehr möglich ist. Die Dekodierung über künstlich eingeführte Abbruchsequenzen liefert allerdings eine einfache und zuverlässige Methode, um Peptidsequenzen eindeutig zu identifizieren.

#### 4.1.3 On-Chip-Inkubation

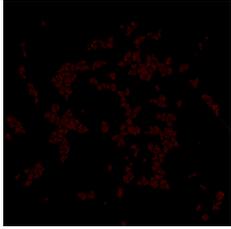
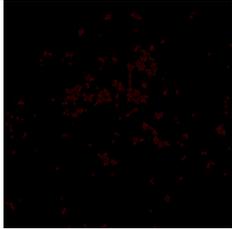
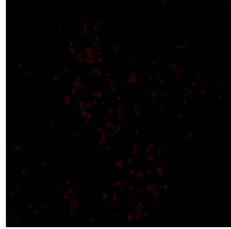
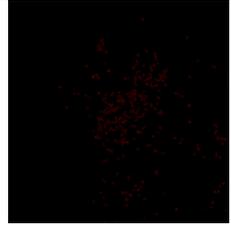
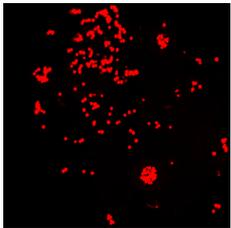
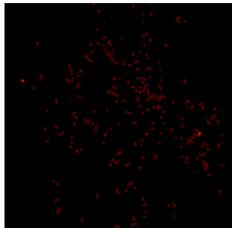
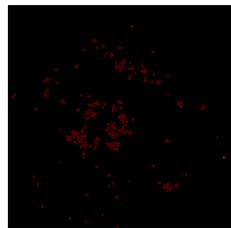
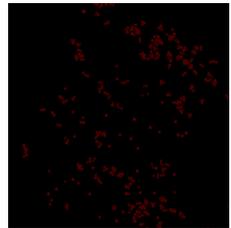
Um die OBOC-Bibliothek auf eine Interaktion mit einem Protein hin zu untersuchen, muss diese mit dem Zielmolekül (Protein) inkubiert werden, was als Target-Screening bezeichnet wird. Für das Modellsystem soll als Zielmolekül der anti-FLAG-Antikörper M2 verwendet und anschließend mit einem sekundären anti-Maus-Atto633-Antikörper angefärbt werden. Die FLAG-Sequenz besteht aus acht Aminosäuren (DYKDDDDK).<sup>[153]</sup> Dieses Peptid wurde ursprünglich als *Tag* (Markierung) bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen verwendet. Der monoklonale Mausantikörper anti-FLAG M2 wurde spezifisch gegen das FLAG-Peptid

entwickelt und die Interaktion zwischen Peptid und Antikörper ist in der Literatur umfassend beschrieben.<sup>[154-157]</sup> Somit stellt die Wechselwirkung zwischen FLAG-Peptid und dem anti-FLAG-Antikörper M2 ein ideales Modell dar, um die Interaktion von einem hoch affinen Peptid zu einem Protein zu untersuchen.

Die vier Testpeptide (**FLAG-Peptid**, **NK-Peptid1**, **NK-Peptid2**, **NK-Peptid3**, siehe Tabelle 2) wurden für das Modellsystem verwendet, wobei das **FLAG-Peptid** die FLAG-Sequenz enthält und im Folgenden als Positivkontrolle verwendet wird. Die drei weiteren Peptide enthalten zufällige Peptidsequenzen, für die keine Interaktion mit dem anti-FLAG-Antikörper bekannt ist. Diese Peptide wurden als Negativkontrolle verwendet.

Im ersten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern die hergestellten Peptide Interaktionen mit Antikörpern zeigen. Hierzu wurde ein Bindungsassay direkt auf der Oberfläche der Tenta-Gel-Partikel durchgeführt. Die vier partikelgebundenen Testpeptide wurden jeweils mit dem anti-FLAG-Antikörper in Suspension inkubiert und anschließend gewaschen. Um die Interaktion zwischen Peptid und anti-FLAG-Antikörper sichtbar zu machen, wurde im zweiten Schritt mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären anti-Maus-Atto633-Antikörper inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze gewaschen, die Partikel auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe eines Microarray-Scanners (MArS) in Hinblick auf ihre Fluoreszenz untersucht (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Fluoreszenz-Scans von Partikeln mit den vier Testpeptiden (**FLAG-Peptid**, **NK-Peptid1**, **NK-Peptid2**, **NK-Peptid3**) vor und nach der Inkubation mit anti-FLAG-Antikörper M2 und Anfärbung mit anti-Maus Atto633. Relative Fluoreszenzintensität normiert auf die absolute Fluoreszenzintensität auf das FLAG-Peptid.

	<b>FLAG-Peptid</b>	<b>NK-Peptid1</b>	<b>NK-Peptid2</b>	<b>NK-Peptid3</b>
<b>Fluoreszenz-Scan der Partikel vor der Inkubation</b>				
<b>Fluoreszenz-Scan der Partikel nach Inkubation mit dem anti-FLAG-AK</b>				
<b>Relative Fluoreszenzintensität</b>	100 %	3 %	- 5 %	6 %

Wie in Tabelle 4 zu erkennen ist, wies die Positivkontrolle ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal nach der Inkubation mit dem anti-FLAG-Antikörper M2 auf als vor der Inkubation. Somit kann auf eine Wechselwirkung des **FLAG-Peptids** mit dem anti-FLAG-Antikörper M2 geschlossen werden. Wohingegen bei den Partikeln mit Peptiden der Negativkontrollen nach der Inkubation mit dem Antikörper kein wesentlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten war. Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Wechselwirkung der Negativkontrollen mit dem anti-FLAG-Antikörper kam. Dies zeigte, dass die hergestellten Peptide ein geeignetes Modell waren, um die Interaktion eines Proteins (anti-FLAG-Antikörper M2) mit einer bindenden Peptidsequenz (**FLAG-Peptid**, Positivkontrolle) zu simulieren.

Die Inkubation der Partikel kann prinzipiell vor oder nach der Immobilisierung auf dem Chip geschehen. Allerdings hat sich gezeigt, dass vorinkubierte Partikel durch die Immobilisierung über das Sieb stark an Fluoreszenzintensität verlieren. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass es bei der Auftragung zum Abrieb der Proteine durch die Maschen kommt. Dabei wird wahrscheinlich die weiche PEG-Hülle der verwendeten TentaGel-Partikel mechanisch

beansprucht. Aus diesen Gründen wurde die Inkubation mit den Antikörpern im Folgenden direkt auf dem Chip vorgenommen. Dazu wurde der Chip in eine runde Glasschale (Petrischale) gelegt und auf einem Orbitalschüttler leicht bewegt. Die Rotation wurde dabei gering gewählt, damit während der Inkubation keine Partikel von der Oberfläche des Chips gelöst wurden. Es wurde beobachtet, dass die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-FLAG-Ak) für eine Stunde nicht ausreichend war. Aus diesem Grund wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper im Folgenden für ca. 16 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Anfärbung mit dem sekundären anti-Maus-Atto633-Antikörper war eine Stunde ausreichend.

Ein weiterer Vorteil der Inkubation auf dem Chip ist die Durchführung von zweistufigen Screenings. Die Identifikation von falsch-positiven Partikeln ist bei Partikel-basierten Peptidbibliotheken ein generelles Problem. Dies kann mehrere Gründe haben: Aufgrund von Produktionsfehlern kann es vorkommen, dass die PEG-Hülle der TentaGel-Partikel den Polystyrolkern nicht vollständig umschließt. Dies hat zur Folge, dass jegliche Art von Proteinen (z. B. der farbmarkierte sekundäre Antikörper) unspezifisch an die Partikel binden. Somit kommt es beim Screening zu einer Detektion dieser fehlerhaften Partikel als „positiv“. Zusätzlich ist es nicht ausgeschlossen, dass eine der Peptidsequenzen auf der Oberfläche der Partikel spezifisch mit dem sekundären Antikörper oder dem Fluoreszenzfarbstoff interagiert. Im Fluoreszenzscan kann dies allerdings nicht von einer spezifischen Interaktion des Zielproteins unterschieden werden. Des Weiteren ist bekannt, dass bei einigen TentaGel-Partikeln sporadisch eine hohe Eigenfluoreszenz auftreten kann.<sup>[158]</sup>

DING et al. haben aus diesem Grund vorgeschlagen, fehlerhafte oder unspezifisch-bindende Partikel vor der Verwendung im Screening zu identifizieren und manuell zu entfernen.<sup>[159]</sup> Die Möglichkeit eines zweistufigen Screenings bietet den entscheidenden Vorteil, dass die Identifikation von falsch-positiven Partikeln direkt auf dem Chip geschehen kann.

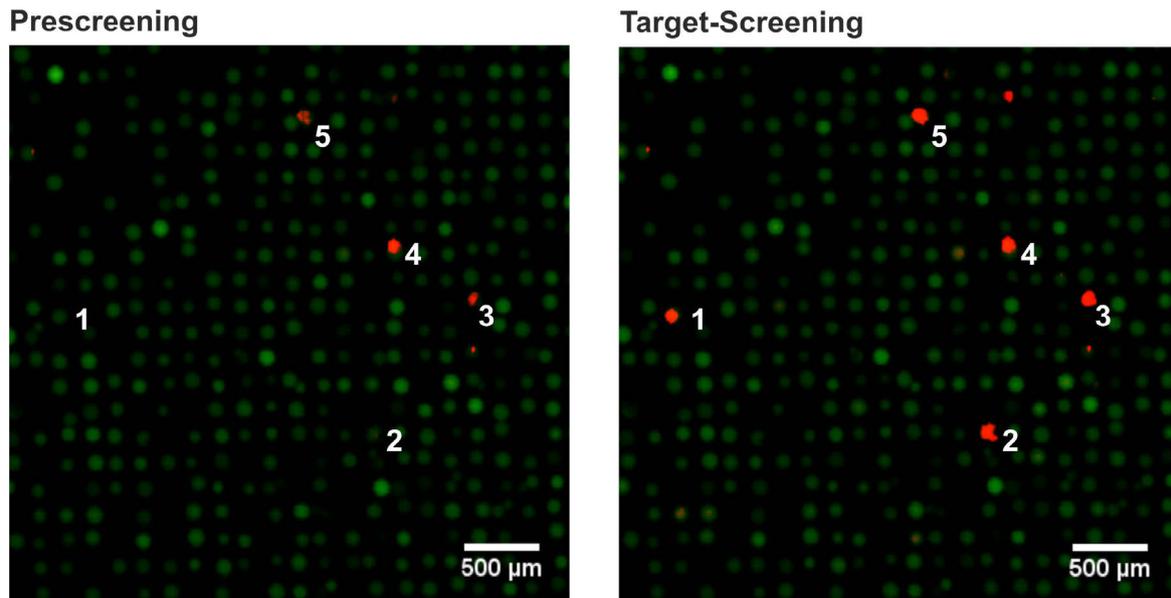
Um dies zu untersuchen, wurden Partikel mit Peptiden der Negativkontrolle (**NK-Peptid1**, **NK-Peptid2**, **NK-Peptid3**) zehn zu eins mit **FLAG-Peptid**-Partikeln gemischt. Diese Partikelmischung wurde auf einem Chip immobilisiert (siehe Kapitel 4.1.1). Zunächst wurde ein Prescreening der immobilisierten Partikel durchgeführt. Dazu wurde nur mit dem sekundären Antikörper und ohne das Zielmolekül inkubiert. Partikel, die hierbei eine hohe Fluoreszenz aufwiesen, wurden als falsch-positiv identifiziert und vermerkt. Dabei konnte nicht unterschieden werden, ob die detektierte Fluoreszenz durch die Bindung des sekundären Fluoreszenzmarkierten Antikörpers oder eine hohe Autofluoreszenz der Partikel ausgelöst wurde. Dies war allerdings auch nicht von Interesse, da nur entscheidend war, ob die detektierte Fluoreszenz im

Target-Screening durch das Zielprotein ausgelöst wurde. Sollte dies doch von Interesse sein, kann der Chip zusätzlich vor dem Prescreening per Fluoreszenz-Scan untersucht werden. Unter der Prämisse eine möglichst zeiteffektive Methode zu entwickeln, wurde auf diesen Schritt in den folgenden Experimenten verzichtet.

Um Proteine von der Oberfläche des Chips nach dem Prescreening vollständig zu entfernen, wurde dieser in einer Lösung von 6 M Guanidiniumhydrochlorid, regeneriert. Dazu wurde der Chip in eine Schale mit ca. 10 mL der Lösung gegeben und für mindestens 15 min leicht geschüttelt.

Nach der Regeneration, sowie ausgiebigem Waschen mit Wasser und PBS-Puffer, fand das eigentliche Target-Screening statt. Hierbei wurde zuerst mit dem anti-FLAG-Antikörper inkubiert, nicht gebundener Antikörper abgewaschen und mit einem sekundären Antikörper angefärbt. Nach der Inkubation und dem Waschen des Chips, wurde dieser in einem Fluoreszenzscanner analysiert. Die Auswertung fand anschließend mit der Software ImageJ<sup>[160]</sup> statt. Als positiv wurden nur solche Partikel bewertet, die im Target-Screening eine dreifach höhere Fluoreszenz im Vergleich zum Prescreening aufwiesen.

In Abbildung 18 ist aus Gründen der Übersichtlichkeit ein Ausschnitt gezeigt, bei dem im Prescreening drei Partikel eine erhöhte Fluoreszenz aufwiesen und somit als falsch-positiv markiert wurden. Im darauffolgenden Target-Screening wurden zwei weitere Partikel identifiziert. Diese Partikel wurden im Folgenden als positiv gewertet, da sie keine erhöhte Fluoreszenz im Prescreening zeigten.



**Abbildung 18:** Fluoreszenzscan (Auflösung 10 µm per Pixel) eines Chips. Überlagerung vom grünem (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und rotem (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenzkanal. Im grünen Fluoreszenzkanal wird die Eigenfluoreszenz der Tenta-Gel-Partikel detektiert und der rote Fluoreszenzkanal dient zur Identifikation positiv-gescreener Partikel. Links: Prescreening mit sekundärem Antikörper (mit rotem fluoreszenzierenden Farbstoff) zur Identifizierung von falsch-positiven Partikeln. Rechts: Target Screening nach der Inkubation mit dem Zielprotein gefolgt vom sekundären Antikörper. Die Partikel mit den Nummern 1 und 2 zeigen eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität im Target-Screening und werden als positiv identifiziert. Im Gegensatz dazu zeigen die Partikel mit den Nummer 3-5 vergleichbare Intensitäten in beiden Screenings und werden als falsch-positiv bewertet.

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine direkte Inkubation mit den Proteinen auf dem Chip möglich ist. Das regenerierbare Chip-System ermöglichte es, ein vorgeschaltetes Prescreening durchzuführen, mit dem potenziell falsch-positive Partikel vorab identifiziert werden können.

#### 4.2 Entwicklung der Software Spec2Seq zur Identifizierung von Peptidsequenzen

Wie in Kapitel 3.5.4 (*De-Novo-Algorithmen zur Identifizierung von Peptidsequenzen*) beschrieben, existieren zahlreiche Algorithmen zur Auswertung von MS/MS-Spektren. Diese wurden in der Regel für die Anwendung in der Proteomics entwickelt, können aber auch für die Auswertung synthetischer Peptide aus OBOC-Bibliotheken genutzt werden. Allerdings sind die existierenden Softwarelösungen nicht an die speziellen Randbedingungen einer synthetischen Peptidbibliothek anpassbar. Viele Voreinstellungen können bei OBOC-Bibliotheken jedoch zuvor getroffen werden, wie z. B. die Länge der zu identifizierenden Peptide. Des Weiteren wird bei Peptidbibliotheken oft nur eine Auswahl an Aminosäuren benutzt, sodass

nur eine gewisse Kombination an Peptiden möglich ist. Die Berücksichtigung von nur einigen Aminosäuren bei der Auswertung ist bei den meisten Programmen nicht ohne weiteres möglich. Ein entscheidender Nachteil ist zudem, dass oft unnatürliche Aminosäuren nicht in die Auswertung einbezogen werden können.

Außerdem existiert das Problem, dass zwar ein großes Angebot an Auswertungssoftware für MS/MS-Spektren von Peptiden existiert, es allerdings keine Software für die automatische Auswertung von Abbruchsequenzspektren gibt. Aus diesen Gründen sollte eine Software entwickelt werden, die es erlaubt, die Randbedingungen einer OBOC-Bibliothek vor der Auswertung einfach zu definieren und sowohl eine Auswertung der MS/MS-Spektren als auch von Abbruchsequenzspektren eines Peptids zulässt. Da die Software Spektren in Sequenzen übersetzen soll, wird sie im Folgenden Spec2Seq (hergeleitet von *spectrum to sequence*)<sup>1</sup> genannt. Für die Entwicklung der Software Spec2Seq wurde die Programmiersprache Java benutzt. Java ist eine objektorientierte Sprache, auf deren Basis Skripte und Programme entwickelt und unabhängig vom Betriebssystem des Benutzers ausgeführt werden können. Zudem lassen sich einfache graphische Oberflächen, GUIs (*Graphical User Interface*) genannt, programmieren, die auch eine Anwendung für Laien ermöglichen.

Als Grundlage für den Algorithmus von Spec2Seq sollte die *Brute-Force*-Methode dienen. Diese Methode findet auch bei der Entschlüsselung von Passwörtern Anwendung, indem alle möglichen Kombinationen erstellt und ausprobiert werden. Ähnlich funktioniert auch die Identifizierung der Peptide mit Hilfe von MS/MS-Spektren oder Abbruchsequenzspektren. Dabei werden die Spektren für alle möglichen Peptide simuliert und mit dem realen Spektrum verglichen. Mit steigender Anzahl der theoretisch möglichen Spektren steigt allerdings die benötigte Rechenleistung enorm. Aus diesem Grund findet die *Brute-Force*-Methode in den Proteomics nur noch selten Anwendung. Die Randbedingungen bei OBOC-Bibliotheken reduzieren allerdings wesentlich die Anzahl der theoretisch möglichen Peptide, wodurch diese Methode angewendet werden kann, ohne eine besonders hohe Rechenleistungen zu benötigen. Der zugrundeliegende Algorithmus für die Auswertung von MS/MS-Spektren unterscheidet sich dabei nicht von dem für die Abbruchsequenzspektren.

---

<sup>1</sup> Hier gilt mein Dank Dr. Dario Remmler, der die langen, (für ihn) willkürlichen Bezeichnungen meiner GUIs leid war und den Namen Spec2Seq erdacht hat.

#### 4.2.1 GUI für die Auswertung von MS/MS-Spektren

Ein Screenshot des GUIs von Spec2Seq für die Auswertung der MS/MS-Spektren ist in Abbildung 19 dargestellt. Ein MS/MS-Spektrum (ASCII-Format) wird in die Software geladen und die Signale aus dem Spektrum werden automatisch erfasst. Hierbei werden nur die monoisotopischen Massen der Fragmente berücksichtigt. Im GUI können unterschiedliche Randbedingungen für die Auswertung der Spektren definiert werden. In dem Feld *Variable Amino Acids* (siehe Abbildung 19) werden die in der Erstellung der Peptidbibliothek verwendeten Aminosäuren eingetragen. Nur diese werden bei der Simulation der Peptide berücksichtigt. Des Weiteren können Sequenzabschnitte (z. B. Spacer-Sequenzen) am C- oder N-Terminus definiert werden, die für alle simulierten Peptide konstant gehalten werden. Für die Simulation der MS/MS-Spektren kommen nur Peptide in Frage, die in einem vordefinierten Massenbereich (Abbildung 19, *Mass Tol. MS*) um die gemessene *Parent Ion Mass* liegen. Dieser Bereich wird maßgeblich von der Auflösung des verwendeten Massenspektrometers beeinflusst.

The screenshot shows the Spec2Seq GUI with the following parameters and results:

**Variable Amino Acids:** KDYTHPIGVFS  
**C-Terminal Modification:** -NH2  
**N-Terminal AA-Sequence:** (empty)  
**C-Terminal AA-Sequence:** GGTERSG

**Buttons:** Select MS/MS-Spectrum, Show Peaks

**Parameters:**  
 Length of Peptide: 6 AAs  
 Parent Ion Mass: 1372.623 Da  
 Mass Tol. MS: 0.25 Da  
 Mass Tol. MS/MS: 1 Da

**Results:**  Save Results

Sequence: H2N-DTHFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 166
Sequence: H2N-TDHFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 166
Sequence: H2N-HTDFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 158
Sequence: H2N-DTHFIPGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 156
Sequence: H2N-TDHFIPGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 156
Sequence: H2N-THDFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 154
Sequence: H2N-KKPFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.7701; Score: 148
Sequence: H2N-HDTFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 148
Sequence: H2N-HTDFIPGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.6609; Score: 148
Sequence: H2N-KPKFPIGGTERSG-CO-NH2 ; Mass: 1372.7701; Score: 146

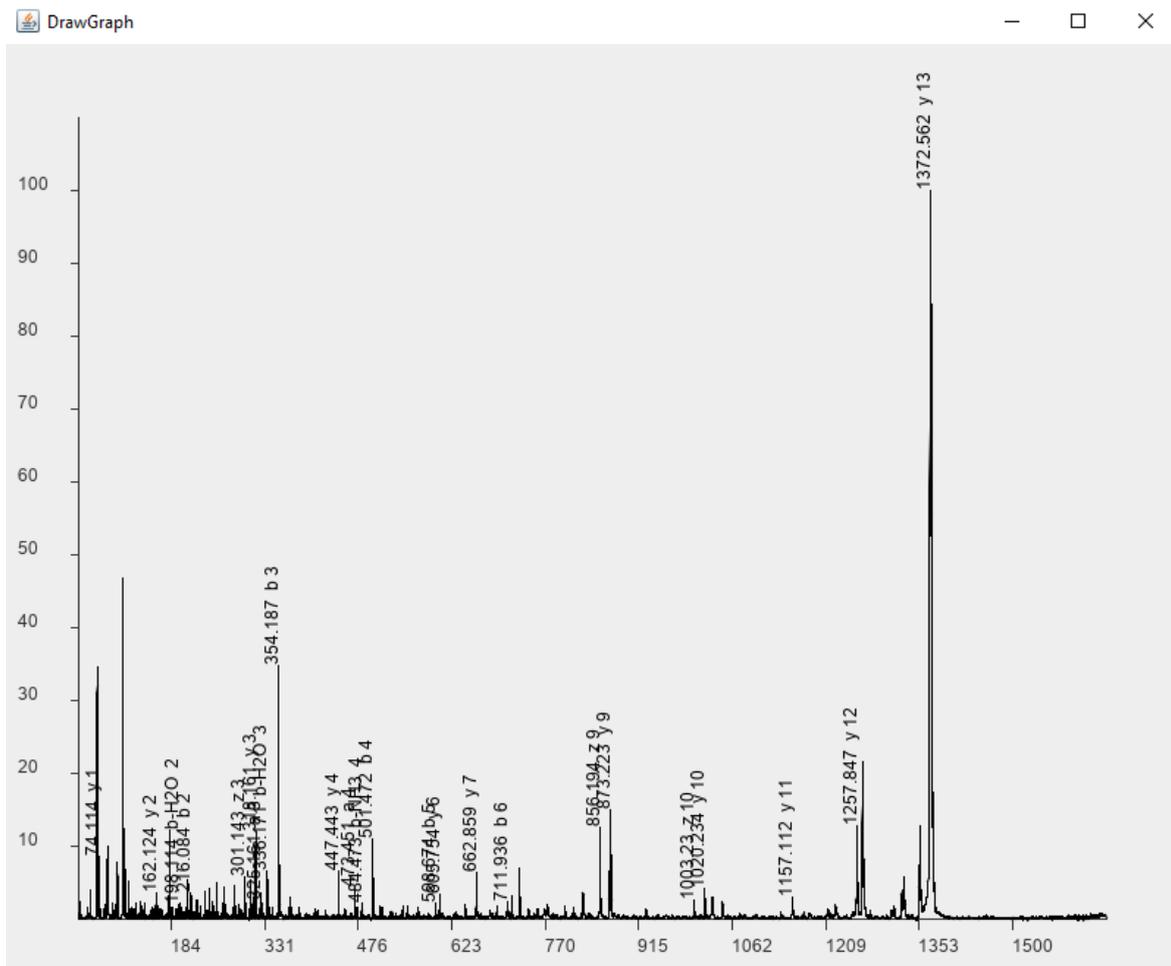
made by Timm Schwaar

**Abbildung 19:** Screenshot des GUI von Spec2Seq, was bei der Auswertung von MS/MS-Spektren zur Identifizierung von Peptidsequenzen genutzt wird.

Jedem simulierten Peptid wird ein Score (Kennzahl) zugeordnet, der ein Maß für die Übereinstimmung mit dem realen Spektrum darstellt. Die maximal erlaubte Abweichung zwischen simulierten Fragmenten und detektierten Signalen im Spektrum muss im Vorhinein definiert werden. (Abbildung 19, *Mass Tol MS/MS*). Diese ist in der Regel größer als die Abweichung, die bei der des Vorläuferions (*Parent Ion Mass*) zulässig ist.

Für die Fragmentierung der Peptide in dieser Arbeit wurde ein MALDI-TOF-MS/MS mit CID benutzt. Bei dieser MS/MS-Methode entstehen bevorzugt y- und b-Fragmente (siehe Kapitel 3.5.4 *Peptidfragmentierung mittels MS/MS*).<sup>[78]</sup> Somit kann eine identifizierte Übereinstimmung mit einem Fragment aus der y- und b-Serie höher bewertet werden als die der a-, c-, x-, z-Serien oder Neutralverlusten. Hierbei werden erkannte y- und b-Fragmente mit 10 bewertet.

Die selteneren a-, c-, x-, z-Fragmente sowie der Neutralverlust von H<sub>2</sub>O und NH<sub>3</sub> der y- und b-Fragmente wurden hingegen mit 2 bewertet. Diese Werte werden aufsummiert und ein Score für jede mögliche Peptidsequenz gebildet. Die Peptidsequenzen werden absteigend nach ihrem Score im GUI (Abbildung 19, *Results*) aufgelistet. Ein Klick auf die jeweilige Peptidsequenz erzeugt ein Fenster, in dem die erkannten Fragmente im Spektrum angezeigt werden (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Screenshot des Fragmentspektrums des Peptids DTHFPIGGTERSG mit der automatischen Zuordnung von Peptidfragmenten.

Um zu zeigen, dass die entwickelte Software vergleichbare Ergebnisse zu kommerzieller Software liefert, wurden MS/MS-Spektren zweier Peptide verglichen (siehe Tabelle 5). Als Referenz für eine kommerzielle Software wurde BioTools<sup>[161]</sup> der Firma Bruker verwendet. Diese Software erlaubt es ebenfalls einige Randbedingungen zu definieren. So können eine C-terminale Spacer-Sequenz definiert, die Länge der Peptide festgelegt und Aminosäuren ausgeschlossen werden, die nicht in der Sequenz vorkommen können. Allerdings ist es nicht möglich,

Aminosäuren, die in der Spacer-Sequenz vorkommen, auszuschließen. Die Einstellung von speziellen Randbedingungen wird bei der Auswertung für die Proteomics üblicherweise nicht vorgenommen. Somit ist die Einstellung von Randbedingungen möglich, allerdings nur in Untermenüs zu finden und somit nicht einfach vorzunehmen.

BioTools berechnet die Peptidsequenzen auf Basis der Graphen-Theorie und gibt jeder Peptidsequenz einen Score. Übereinstimmende Fragmente werden mit den gleichen Wertigkeiten wie in Spec2Seq (10 für y und b, 2 für alle restlichen Fragmente) bewertet. Die berechneten Peptidsequenzen werden von BioTools absteigend nach ihrem Score sortiert.

**Tabelle 5:** Berechnungen der Peptidsequenz auf Grundlage von MS/MS-Spektren mit Hilfe der Software Spec2Seq und BioTools. Gezeigt sind die beiden errechneten Sequenzen mit dem höchsten Score.

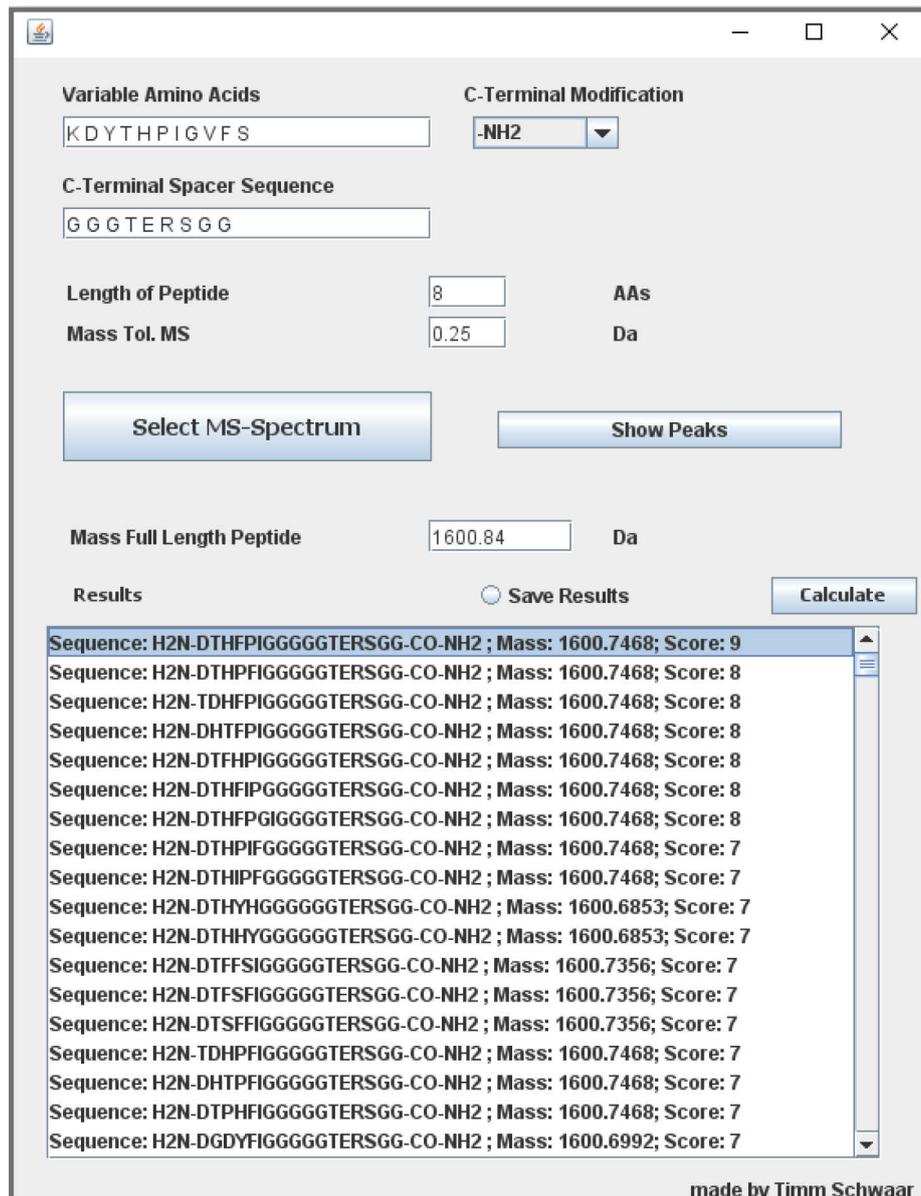
Peptidsequenz mit Spacer GGTERSG	<i>Spec2Seq</i> Peptidsequenz (Score)	<i>BioTools</i> Peptidsequenz (Score)
<b>DTHFPI</b>	DTHFPI – GGTERSG (166)	DTHFPI – GGTERSG (554)
	TDHFPI – GGTERSG (166)	DHTFPI – GGTERSG (204)
<b>VPFHTD</b>	VPFHTD – GGTERSG (156)	PVFHTD – GGTERSG (596)
	VPFHTD – GGTERSG (148)	VPFHTD – GGTERSG (259)

Wie in Tabelle 5 zu erkennen ist, konnte weder die kommerzielle Software BioTools noch Spec2Seq die Sequenzen zweifelsfrei bestimmen. Dies bestätigt, wie schwierig die Berechnung von Peptidsequenzen aus MS/MS-Spektren ist. Interessanterweise erkannte BioTools, im Gegensatz zu Spec2Seq, die Sequenz DTHFPIGGTERSG eindeutig richtig, wohingegen die Sequenz VPFHTDGGTERSG nur von Spec2Seq richtig erkannt wurde. Vermutlich sind die grundlegend unterschiedlichen Algorithmen, die zur Ermittlung der Peptidsequenzen benutzt werden, Ursache für die Abweichungen. Allerdings zeigte dieser Vergleich, dass es möglich ist, mit Spec2Seq richtig Peptidsequenzen zu identifizieren. Dabei ist die Anwenderfreundlichkeit von Spec2Seq für Peptidbibliotheken wesentlich größer als die von BioTools. Ein zusätzlich implementierter Batchprozess erlaubt es zudem, mit wenigen Einstellungen eine große Anzahl an MS/MS-Spektren automatisch auszuwerten. Wohingegen die Auswertung eines MS/MS-Spektrums bei BioTools selbst für geübte Benutzer mehrere Minuten einnimmt.

So wurde Spec2Seq in einem Kooperationsprojekt mit Dario Remmler, aus der Gruppe von Prof. Dr. Börner an der Humboldt-Universität zu Berlin, eingesetzt. Hierbei wurden Peptidsequenzen aus einer OBOC-Bibliothek identifizieren, die für die Löslichkeitsvermittlung des hydrophoben Wirkstoffs BB17 eingesetzt werden können.<sup>[145]</sup>

#### **4.2.2 GUI für die Auswertung von Abbruchsequenzspektren**

Prinzipiell basiert das GUI von Spec2Seq für die Auswertung von Abbruchsequenzspektren (Abbildung 21) auf dem im Kapitel zuvor beschriebenen *Brute-Force*-Algorithmus. Allerdings ist die Simulation und Bewertung der Spektren wesentlich einfacher. Hierbei werden für die theoretisch möglichen Peptide keine komplexen Fragmentspektren simuliert, sondern die Leiter der Abbruchsequenzen. Für die Auswertung werden nur die übereinstimmenden Abbruchsequenzen verglichen (Abbildung 21, *Score*).



**Abbildung 21:** Screenshot des GUI von Spec2Seq, was für die Auswertung von Abbruchsequenzspektren zur Identifizierung von Peptidsequenzen genutzt wird.

Wie bei dem GUI der MS/MS-Spektren können auch hier die Randbedingungen vom Benutzer einfach definiert werden. Andere Einstellungen, wie die Auflösung der Fragmentmassen, fallen dabei weg. Ein Vergleich mit kommerzieller Software war dabei nicht möglich, da keine Software zur Auswertung von Abbruchsequenzspektren angeboten wird. Allerdings hat die Anwendung auf die Testpeptide (siehe Tabelle 3) gezeigt, dass die Spec2Seq zuverlässig Abbruchsequenzspektren in die korrekte Peptidsequenzen übersetzen kann.

### 4.2.3 Exkurs: Weitere Anwendung von Spec2Seq

#### *GUI für Thiolacton-Präzisionspolymer-Bibliotheken*

Wie bereits beschrieben wurde, kann der grundlegende Algorithmus von Spec2Seq für weitere Anwendungen adaptiert werden. So wurde in einem Kooperationsprojekt mit Sensu Celasun aus der Gruppe von Prof. Dr. Börner an der Humboldt-Universität zu Berlin ein GUI programmiert, welches die Auswertung der Fragmentspektren von Thiolacton-Präzisionspolymere ermöglicht.<sup>[162]</sup> Diese Präzisionspolymere stellen eine Alternative zu Peptiden dar und können ebenfalls in OBOC-Bibliotheken verwendet werden. Für eine Dekodierung der Sequenz kann, wie bei Peptiden, MALDI-MS/MS eingesetzt werden, da Präzisionspolymere systematisch im Rückgrat fragmentieren. Allerdings war eine Auswertung bisher nur manuell möglich, da kommerzielle Software nur auf die Auswertung von Peptidspektren ausgelegt ist. Spec2Seq ist in der Lage, diese Spektren automatisch auszuwerten und in eine Polymersequenz zu übersetzen. So war es möglich, spezifische Wirkstoffbinder aus einer Polymerbibliothek mit Spec2Seq zu identifizieren.<sup>[162]</sup>

#### *GUI für die Simulation von DNA/LNA-Fragmentierungen*

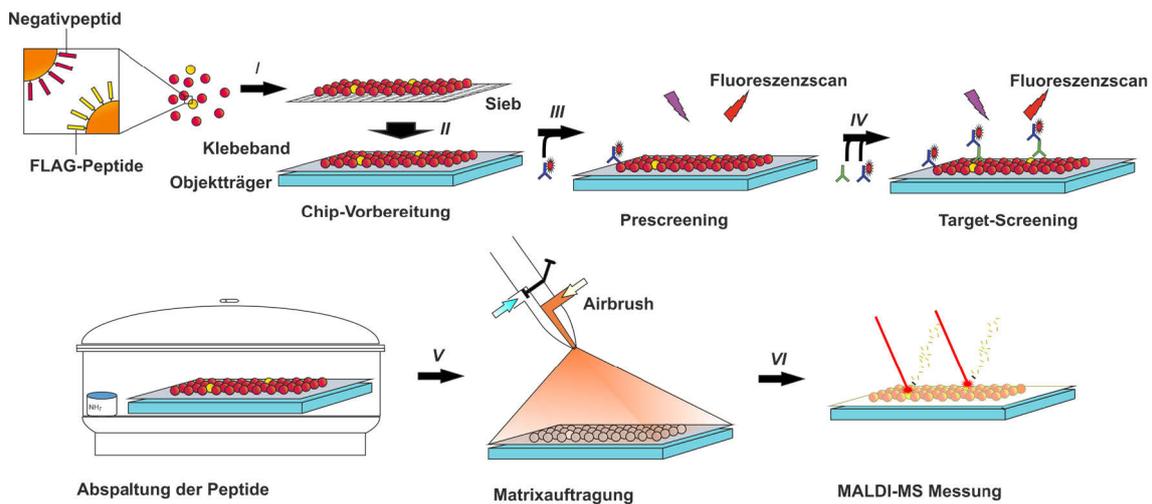
Im Zuge eines Kooperationsprojektes mit Steffanie Ickert aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Linscheid an der Humboldt-Universität zu Berlin wurde ein GUI entwickelt, welches die Zuordnung von Fragmenten aus MS/MS-Spektren von DNA und LNA (*Locked Nucleic Acid*) erlaubt.

Eine zentrale Funktion von Spec2Seq ist die Simulation von MS/MS-Spektren. Somit war es möglich, auch sehr komplexe MS/MS-Spektren, wie die von DNA, LNA und deren Duplexe (rein und gemischt), zu simulieren. Für diesen Zweck wurde ein GUI programmiert, das die Identifikation anhand bekannter Basensequenzen von Fragmenten in einem gegebenen MS/MS-Spektrum erlaubt.<sup>[163]</sup> Die Schwierigkeit bei der Auswertung von DNA und LNA MS/MS-Spektren liegt darin, dass im Gegensatz zu Peptid MS/MS-Spektren eine Vielzahl an unterschiedlichen Strangbrüchen entlang des Phosphat/Ribose-Rückgrats generiert wird. Zusätzlich können sowohl Fragmente des Einzel- als auch des Doppelstrangs auftreten. Zudem liegt oftmals eine hohe Ladungsdiversität vor (Spektren wurden mit ESI-MS/MS gemessen). Dadurch wurde in den Spektren eine große Anzahl an Ionensignalen detektiert, welche die Auswertung per Hand, auf Grund der hohen Komplexität, nahezu unmöglich machte. Unter Zuhilfenahme von Spec2Seq konnten alle Signale im Spektrum eindeutig zugeordnet und so-

mit neue Erkenntnisse über das Fragmentationsverhalten von DNA und LNA gewonnen werden. Dies eröffnet in Zukunft die Möglichkeit, DNA/LNA anhand von ESI-MS/MS zu sequenzieren.

### 4.3 Methodvalidierung

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es möglich ist, die Inkubation mit Protein und die MALDI-Messung auf einem Chip hintereinander durchzuführen. Die Zusammenfassung der entwickelten Methode ist in Abbildung 22 dargestellt. Bisher wurden allerdings alle Schritte einzeln durchgeführt, weshalb im nächsten Schritt eine Validierung stattfinden soll, welche ein reales Screening einer OBOC-Bibliothek simuliert. Dazu wurde das in Kapitel 4.1.3 beschriebene FLAG-Modell als Grundlage für die Validierung herangezogen.

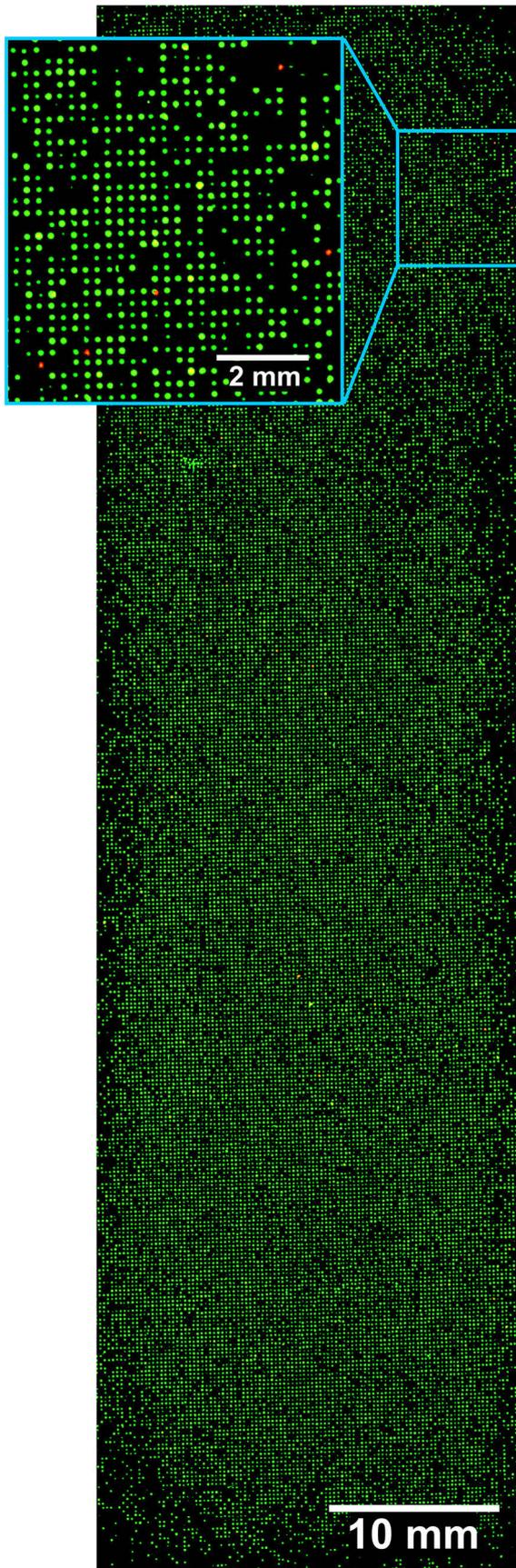


**Abbildung 22:** Schematische Darstellung des On-Chip-Screenings. Für ein Modellexperiment wurde ein Chip hergestellt, indem eine Mischung aus Partikeln mit FLAG-Peptiden und verschiedenen Peptiden als Negativkontrolle durch ein Sieb (I) auf einem mit elektrisch leitendem doppelseitigem Klebeband (II) modifizierten Objektträger immobilisiert wurde. Für das Prescreening wurde eine Inkubation mit dem sek. anti-Maus-Atto633-Ak durchgeführt (III), gefolgt von einem Fluoreszenzscan zur Identifizierung von falsch-positiven Partikeln. Der Chip wurde regeneriert und für das Target-Screening mit anti-FLAG-Ak inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit sek. Ak (IV). Zur Identifikation von positiven Partikeln wurde ein Fluoreszenzscan durchgeführt. Anschließend wurde der Chip regeneriert, um alle Proteine zu entfernen. Der Chip wurde zur Peptidspaltung in eine Kammer unter Ammoniakatmosphäre gegeben. Die MALDI-Matrix wurde mit einer Airbrush (V) aufgetragen und das Auslesen der Sequenzen der positiven Treffer erfolgte mit Hilfe von MALDI-TOF-MS (VI).

Für die Validierung wurden peptidbeladene Partikel aus Kapitel 4.1.2 verwendet (siehe Tabelle 2). Die Synthese der Peptide erfolgte unter Anwendung der Abbruchsequenzmethode, um die Peptidsequenz mittels MALDI-MS ermitteln zu können.

Drei dieser Peptide binden dabei den anti-FLAG-Antikörper nicht und dienen als Negativpeptide. Ein anderes Peptid enthält hingegen die FLAG-Sequenz und dient somit als Positivpeptid. Eine Mischung aus 50.000 Partikeln, beladen mit Negativpeptiden, wurde mit 50 Partikeln gemischt, die das FLAG-Peptid enthalten. Die Partikel mit dem FLAG-Peptid wurden unter einem Mikroskop ausgezählt und die Menge der Partikel der Negativkontrolle über das Gewicht bestimmt. Anschließend wurde diese Mischung durch ein Sieb auf die Oberfläche eines modifizierten Objektträgers aufgetragen. Es konnten insgesamt 33.000 Partikel auf dem Chip immobilisiert werden (siehe Abbildung 23). Der partielle Verlust an Partikeln wurde bereits beobachtet und in Kapitel 4.1.1 besprochen. Für ein Prescreening wurde der Chip zunächst nur für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Chip im Microarray-Scanner (MArS) analysiert.

Für den nächsten Schritt wurden die gebundenen Proteine zunächst entfernt. Das eigentliche Target-Screening wurde auf dem Chip über Nacht mit dem primären anti-FLAG-Antikörper inkubiert, gewaschen und für eine Stunde mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert. Hiervon wurde ebenfalls eine Messung im MArS vorgenommen (siehe Abbildung 23). Im Vergleich zwischen Prescreening und Target-Screening wurden zwei Partikel als falsch-positiv identifiziert. Insgesamt konnten 35 Partikel identifiziert werden, die eine signifikant höhere Fluoreszenz im Target-Screening gegenüber dem Prescreening zeigten.



**Abbildung 23:** Fluoreszenzscan (Auflösung 10  $\mu\text{m}$  per Pixel) eines Chips mit 33.000 Partikeln nach der Inkubation mit Anti-FLAG-Antikörper, gefolgt von der Anfärbung mit anti-Maus-Atto633-Antikörper. Überlagerung vom grünen (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und roten (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenzkanal. Im grünen Fluoreszenzkanal wird die Eigenfluoreszenz der TentaGel-Partikel detektiert und der rote Fluoreszenzkanal dient zur Identifikation positiv-gescreenter Partikel.

Anschließend sollte mittels MALDI-MS getestet werden, ob die im Screening als positiv identifizierten Partikel das FLAG-Peptid tragen. Dafür musste der Chip zunächst regeneriert werden, um die Proteine von den Partikeln zu entfernen. Danach wurde ausgiebig mit Wasser gewaschen, um für die MALDI-MS-Messung Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen des Chips wurden die Peptide in einer Kammer mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  (30 % in Wasser) von den Partikeln abgespalten. Anschließend wurde die MALDI-Matrix 2,5-DAHB mit einer Airbrush auf dem Chip aufgetragen.

Der Chip wurde ins MALDI eingeschleust und die zuvor im Fluoreszenzscan ermittelten Koordinaten gezielt angesteuert. Das verwendete MALDI-Massenspektrometer erlaubt dabei die Ansteuerung von Koordinaten, mit einer Positionierungsgenauigkeit von 5  $\mu\text{m}$ . Eine Umrechnung der Koordinaten vom Scan zum MALDI erfolgte mit Hilfe eines simplen Scripts, basierend auf linearer Regression.

Die Peptide wurden direkt von der Partikeloberfläche massenspektrometrisch vermessen (siehe Kapitel 4.1.2). Dabei wurden die Ab-

bruchsequenzspektren erhalten, welche automatisch von der Software Spec2Seq in Peptidsequenzen übersetzt wurden. Für alle 35 Partikel konnte erfolgreich die FLAG-Peptidsequenz (DYKDDDDK) identifiziert werden. Zusätzlich wurden die beiden falsch-positiven Partikel gemessen. Auf diesen konnte keine Peptidsequenz detektiert werden. Dies bestätigt die Annahme, dass defekte Partikel falsch-positive Ergebnisse liefern können. Somit konnte auch bestätigt werden, dass es mit der entwickelten Methode möglich ist, proteinbindende Peptide selektiv aus einer Vielzahl peptidbeladener Partikel zu identifizieren.

#### 4.4 Peptidbibliothek zur Identifizierung von anti-FLAG-Ak-Bindern

Im nächsten Schritt sollte die entwickelte Methode auf eine reale OBOC-Bibliothek übertragen werden. Als Target-Protein wurde, wie im Kapitel zuvor, der M2 anti-FLAG-Antikörper verwendet. Es ist bekannt, dass dieser Antikörper selektiv das Epitop DYKXXD bindet.<sup>[164]</sup> Im Gegensatz zu vielen anderen Antikörpern, muss dabei der C- oder N-Terminus des Peptids nicht frei sein, da der Antikörper *Side-On* bindet.

Für die Synthese der **Peptidbibliothek 1** wurden die fünf L-Aminosäuren: Threonin, Isoleucin, Asparaginsäure, Lysin, and Tyrosin verwendet.<sup>2</sup> Die Bibliothek wurde nach der üblichen *Split-and-Mix*-Methode synthetisiert. Die *Split-and-Mix*-Zyklen wurden acht Mal wiederholt, wodurch sich eine theoretische Größe von 390.625 unterschiedlichen Peptiden ergibt. Während jedes Zyklus wurden 5% Boc-geschützte Aminosäuren verwendet, um Abbruchsequenzen zu erzeugen. Zwischen dem Partikel und den randomisierten Sequenzen wurde eine, zum Modellsystem ähnliche, Spacer-Sequenz GGGTERSGG verwendet. Vier der fünf eingesetzten Aminosäuren kamen in der FLAG-Sequenz vor. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass Sequenzen entstehen, die das Epitop enthalten. Dementsprechend handelt es sich bei der **Peptidbibliothek 1** um eine gegen das Paratop des Antikörpers gerichtete Bibliothek.

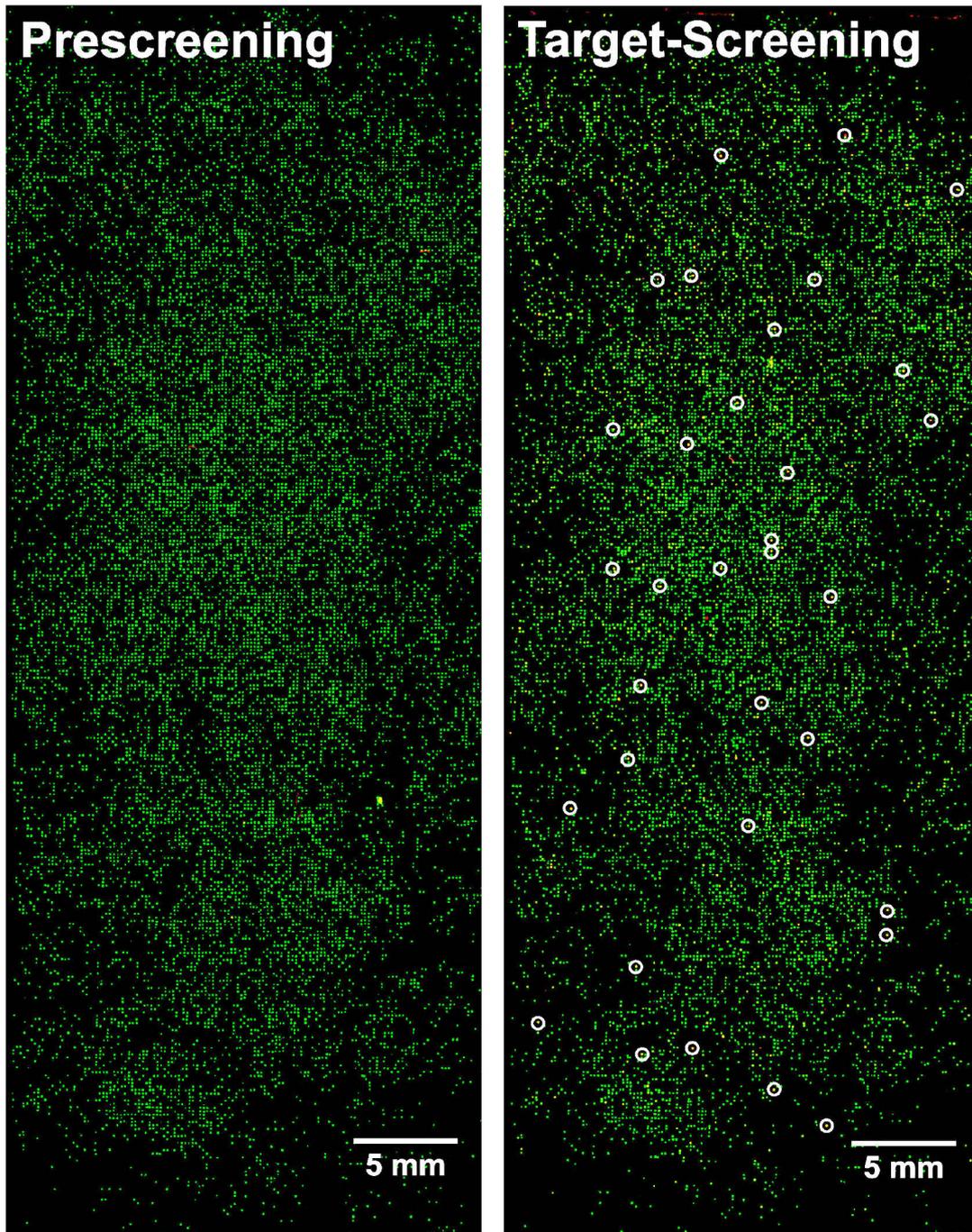
##### 4.4.1 Bindungsassay

Auf einem Chip wurden ca. 12.000 Partikel der **Peptidbibliothek 1** immobilisiert. Prescreening und Target-Screening wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 4.3 durchgeführt. Dabei wurden ungefähr 10 % der Partikel, die im Target-Screening ein hohes Fluoreszenzsignal aufweisen, durch das Prescreening als falsch-positiv identifiziert. Dieser Wert liegt über dem des Modellsystems aus Kapitel 4.3. Ursache hierfür ist, dass neben defekten Partikeln,

---

<sup>2</sup> Die Peptidbibliothek 1 wurde von Maike Lettow in einem Forschungspraktikum synthetisiert.

Sequenzen existieren, an denen der sekundäre anti-Maus-Antikörper unspezifisch bindet, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei komplexeren OBOC-Bibliotheken der Anteil an falsch-positiven Partikeln entsprechend höher ist. Hierbei wird noch einmal die Notwendigkeit eines Prescreenings deutlich. Hätten diese Partikel nicht zuvor ausgeschlossen werden können, wäre erst bei der aufwendigen Bestimmung der Affinitäten der Peptide aufgefallen, dass die Sequenzen nicht selektiv an das Target binden. Im Screening konnten insgesamt 33 Partikel als spezifisch an den anti-FLAG-Antikörper-bindend identifiziert werden.



**Abbildung 24:** Fluoreszenzscan (Auflösung 10  $\mu\text{m}$  per Pixel) eines Chips mit ca. 12.000 Partikeln der Peptidbibliothek 1 für die Identifizierung von anti-FLAG-Ak-Bindern. Überlagerung von grünem (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und rotem (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenzkanal. Im grünen Fluoreszenzkanal wird die Eigenfluoreszenz der Tenta-Gel-Partikel detektiert und der rote Fluoreszenzkanal dient zur Identifikation positiv-gescreener Partikel. Links: Prescreening mit sekundärem anti-Maus-Atto633-Ak zur Identifizierung von falsch-positiven Partikeln. Rechts: Target-Screening nach der Inkubation mit dem anti-FLAG-Ak gefolgt von anti-Maus-Atto633-Antikörpern.

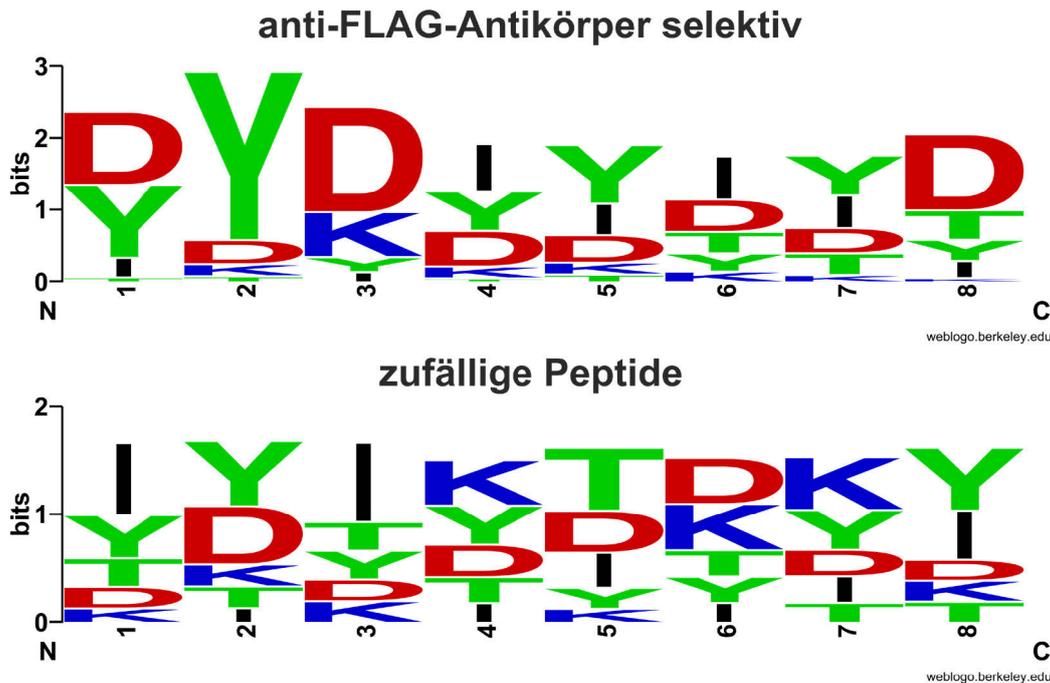
#### 4.4.2 Sequenzierung

Der Chip wurde nach dem Screening gewaschen, die Peptide abgespalten und die MALDI-Matrix aufgetragen. Die Positionen der im Screening als positiv identifizierten Partikel wurden im MALDI angesteuert. Die Peptide wurden direkt auf der Oberfläche der Partikel gemessen. Zusätzlich zu den positiven, wurden 16 Peptide von Partikeln im MALDI gemessen, die keine Wechselwirkung mit dem Antikörper aufwiesen. Die erhaltenen Abbruchsequenzspektren wurden mittels Spec2Seq automatisch ausgewertet. Die Sequenzen sind im Anhang 8.4 in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgelistet.

Statistisch kann jede Aminosäure in der **Peptidbibliothek 1** zu 20 % auftreten. Dies ist auch annähernd der Fall für die Sequenzen der zufällig ausgewählten 16 negativen Peptide (zwischen 17 und 24 %). Somit konnte gezeigt werden, dass in der Bibliothek vorkommende Aminosäure statistisch verteilt sind. In Abbildung 25 ist die relative Häufigkeit der Aminosäuren an jeder Position der Sequenz dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass an jeder Position der Sequenz die Verteilung der Aminosäuren ausgeglichen ist.

Die Sequenzen der anti-FLAG-Antikörper-bindenden Peptide wiesen hingegen keine statistische Verteilung auf. Asparaginsäure und Tyrosin kamen mit jeweils einem Drittel relativer Häufigkeit am meisten in den Sequenzen vor. Im Gegensatz dazu wurden Lysin und Threonin in nur knapp 10 % der Sequenzen identifiziert. Somit kann allgemein geschlossen werden, dass eher saure Sequenzen vom Antikörper erkannt werden. Dies ergibt Sinn, da die FLAG-Sequenz mit insgesamt fünf Asparaginsäuren und nur einem Lysin einen negativen isoelektrischen Punkt hat.

Die Häufigkeiten der Aminosäuren sind innerhalb der Sequenzen der anti-FLAG-Antikörper-bindenden Peptide nicht statistisch verteilt. Asparaginsäure kam vor allem am N-Terminus, Position zwei und acht der Peptide, vor. Wie zu erkennen ist, scheint das Tyrosin an Position zwei eine entscheidende Rolle für die Bindung zu spielen, da es in 80 % der Sequenzen an dieser Position vorkam. Zwischen Position vier und sieben waren die Aminosäuren gleichmäßiger verteilt, wobei hydrophobe Aminosäuren anscheinend bevorzugt werden.



**Abbildung 25:** Sequenz-Logos erstellt mit dem Online-Tool WebLogo<sup>[165]</sup> aus 33 anti-FLAG-Ak-bindenden Peptiden und 16 zufällig ausgewählten Peptiden. Die Größe der Buchstaben entspricht dabei der relativen Häufigkeit der korrespondierenden Aminosäure in den Sequenzen.

In 10 der 33 Sequenzen wurde das literaturbekannte Epitop DYKXXD gefunden. Vierzehn weitere Sequenzen wiesen das Epitop zum größten Teil (vier von fünf AS) auf. In acht Sequenzen kam das Epitop hingegen nicht vor. Bei diesen Sequenzen wird davon ausgegangen, dass es sich um sogenannte Mimotope handelt. Dies sind Peptidstrukturen, die die Erkennungsmerkmale eines Epitops nachahmen.<sup>[166]</sup> Bei den negativen Peptiden konnte das Epitop nicht nachgewiesen werden.

#### 4.4.3 Affinitätsbestimmung ausgewählter Peptide zum anti-FLAG-Ak

Um abschätzen zu können, inwiefern die Hochdurchsatzmethode in der Lage ist, bindende Peptide zu identifizieren, wurden drei Peptide in Hinblick auf die Bindungsaffinität zum anti-FLAG-Antikörper untersucht. Peptid 1 (DYKDYDKD) wurde als bindend identifiziert und die Sequenz beinhaltet das literaturbekannte Epitop. Peptid 2 (DYIDYDYK) wurde ebenfalls als bindend identifiziert, beinhaltet das Epitop allerdings nicht. Die Sequenz DYDIYIYD wurde für das Peptid 3 ausgewählt und stellt eine Konsens-Sequenz aller 33 bindenden Peptide dar. Diese hat an jeder Position die Aminosäure mit der höchsten relativen Häufigkeit (siehe Abbildung 25).

*Fluoreszenzassay*

Diese Sequenzen wurden auf TentaGel-Partikeln direkt mit SPPS synthetisiert. Zusätzlich wurde das FLAG-Peptid als Positivkontrolle und ein weiteres Peptid (DTHFPIGG) als Negativkontrolle verwendet. Für eine Abschätzung der Bindungsaffinitäten wurde mit den festphasengebundenen Peptiden direkt ein Assay durchgeführt. Hierzu wurden die Partikel mit dem anti-FLAG-Antikörper und anschließend mit dem anti-Maus-Atto633-Antikörper inkubiert. Die Partikel wurden auf einem Objektträger aufgebracht und ein Fluoreszenzscan im MArS durchgeführt. Der Scan ist im Anhang 8.5 (Abbildung 42) zu sehen und die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgelistet.

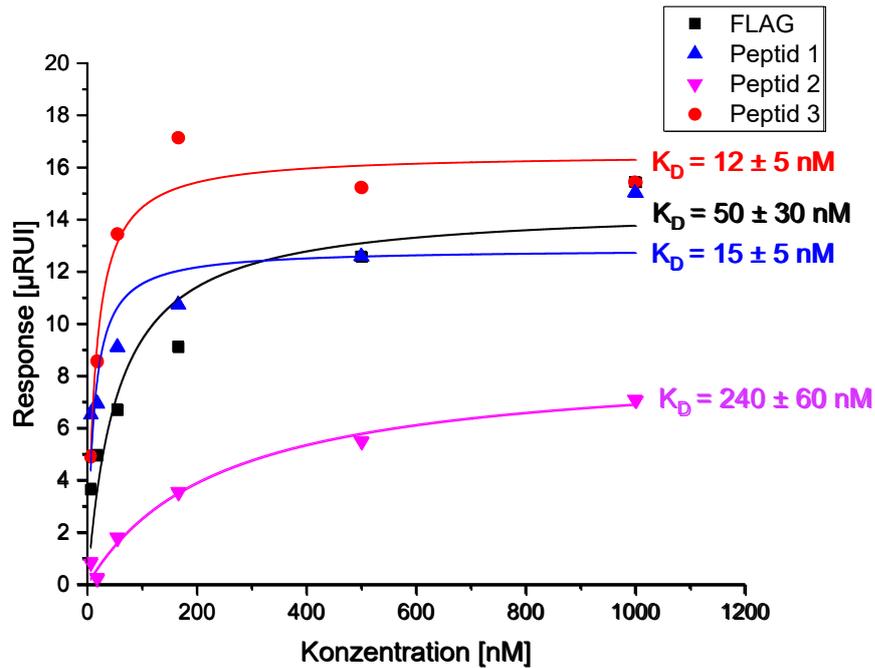
**Tabelle 6:** Sequenzen des FLAG-Peptids der drei positiven Peptide und deren relative Fluoreszenzintensität aus dem Fluoreszenzassay, gemessen direkt auf TentaGel-Partikeln. Die Fluoreszenzintensität der FLAG-peptidtragenden Partikel wurde auf 100 % gesetzt und die der Negativkontrolle auf 0 %.

<b>Peptide</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Relative Fluoreszenzintensität</b>
<b>FLAG</b>	DYKDDDDK	100%
<b>Peptid 1</b>	DYKDYDKD	97%
<b>Peptid 2</b>	DYIDYDYK	37%
<b>Peptid 3</b>	DYDIYIYD	73%

Das Peptid 1 zeigte hierbei vergleichbare Fluoreszenzintensitäten zu dem FLAG-Peptid. Auch das Konsens-Peptid war mit 73 % relativer Fluoreszenzintensität vergleichbar mit dem FLAG-Peptid. Eindeutig weniger Intensität (37 %) konnte beim Peptid 2 detektiert werden. Zwar schien der Antikörper das Peptid noch zu erkennen, allerdings wesentlich schwächer als alle anderen Peptide.

#### *Surface Plasmon Resonance (SPR)*

Da der Fluoreszenzassay nur eine semi-quantitative Aussage über die Bindungsaffinität zulässt, sollte im nächsten Schritt die Affinität mittel SPR bestimmt werden. Hierzu wurde der anti-FLAG-Antikörper auf einem SPR-Chip (HC200) immobilisiert. Für die Peptide wurden Verdünnungsreihen von 6 nM bis 1 µM verwendet. Die Ergebnisse der SPR-Messungen sind in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26:** Auswertung der SPR-Messungen für das FLAG-Peptid (DYKDDDDK), das Peptid 1 (DYKDYDKD und Peptid 2 (DYIDYDYK), welche im Screening als positiv identifiziert wurden und dem Konsens-Peptid 3 (DYDIYIYD). Für die Messungen wurde der anti-FLAG-Antikörper auf einem SPR-Chip (HC200) immobilisiert und die Peptidlösungen wurden in Konzentrationen zwischen 6 nM bis 1 µM direkt injiziert. Die Signalintensität im Gleichgewicht ist gegen die Konzentration aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ergibt sich aus dem Wendepunkt der gefitteten Funktion. Die angegebenen Unsicherheiten ergeben sich aus dem Standardfehler des Fits.

Die Datenpunkte wurden mit Hilfe von Gleichung 4 gefittet und somit die Dissoziationskonstanten ermittelt. Auffällig ist, dass die  $R_{\max}$ -Werte der gefitteten Kurven unterschiedlich sind. Für das FLAG-Peptid, Peptid 1 und 3 sind die  $R_{\max}$ -Werte gleich, allerdings ist der  $R_{\max}$ -Werte des Peptids 2 nur halb so hoch wie der der anderen Peptide. Zu erwarten wäre, dass diese Werte für alle Peptide ähnlich sind, da für alle Experimente der gleiche SPR-Chip verwendet wurde und die Massen der Peptide vergleichbar sind. Zu erklären ist dies dadurch, dass das Peptid 2 nach den anderen Peptiden gemessen wurde. Wahrscheinlich kam es mit vorschreitender Messung zu einer teilweisen Denaturierung der Antikörper auf der Goldoberfläche des SPR-Chips. Dadurch konnten weniger Peptide an die Antikörper binden als bei den Messungen zuvor, was eine Verringerung des  $R_{\max}$ -Werte zur Folge hatte.

Die berechnete Dissoziationskonstanten des FLAG-Peptids zum anti-FLAG-Antikörper ( $K_D = 50 \pm 30$  nM) stimmt ausreichend gut mit der Literatur ( $K_D = 31$  nM <sup>[155]</sup>) überein. Für das Epitop-beinhaltende Peptid 1 und das Konsens-Peptid 3 konnten sogar etwas niedrigere Dissoziationskonstanten berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Unsicherheiten, ist der

Unterschied zwischen den Peptiden vermutlich vernachlässigbar. Für Peptid 2 konnte hingegen eine zehnfach höhere Dissoziationskonstante im Vergleich zum FLAG-Peptid bestimmt werden.

Insgesamt sind die Ergebnisse der SPR-Messungen mit denen des Fluoreszenzassays vergleichbar. Nur für Peptid 2 konnte eine wesentlich höhere Dissoziationskonstante nachgewiesen werden. Grund hierfür ist das unterschiedliche Format beider Methoden. Beim Fluoreszenzassay sind die Peptide dicht auf der Oberfläche der Partikel und wechselwirken dort mit dem Antikörper. Dadurch können Aviditätseffekte auftreten, die eine Bindung zum Protein (Antikörper) verstärken.<sup>[167]</sup> Bei der SPR hingegen ist der Antikörper immobilisiert und interagiert mit den Peptiden in der Lösung. Hierbei kann von einer monovalenten Bindung ausgegangen werden und Aviditätseffekte haben keinen Einfluss auf die Affinität. Der Effekt der multivalenten Bindung von Proteinen tritt auch beim Screenen von OBOC-Bibliotheken auf, weshalb auch schwächere Binder wie Peptid 2 identifiziert werden. Die hohe Affinität des Konsens-Peptids 3 zeigt allerdings, dass diese Effekte das Screening von OBOC-Bibliotheken nicht dominieren.

Um multivalente Effekte zu minimieren, müsste die Oberflächenbeladung an Peptiden auf den Partikeln reduziert werden. Allerdings muss dabei wiederum die Menge an Peptid für eine massenspektrometrische Identifizierung der Peptidsequenz ausreichend sein. TentaGel-Partikel wurden grundsätzlich für die Peptidsynthese entwickelt. Dadurch ist die Dichte der Peptide sowohl im Kern als auch auf der Oberfläche, hoch. Um ein optimales Screening von OBOC-Bibliotheken zu ermöglichen, sollten Partikel entwickelt werden, bei denen die Dichte der Peptide niedrig eingestellt werden kann, die Beladung im Kern hingegen hoch ist.

#### 4.5 Peptidbibliotheken zur Identifizierung von IgG-Bindern

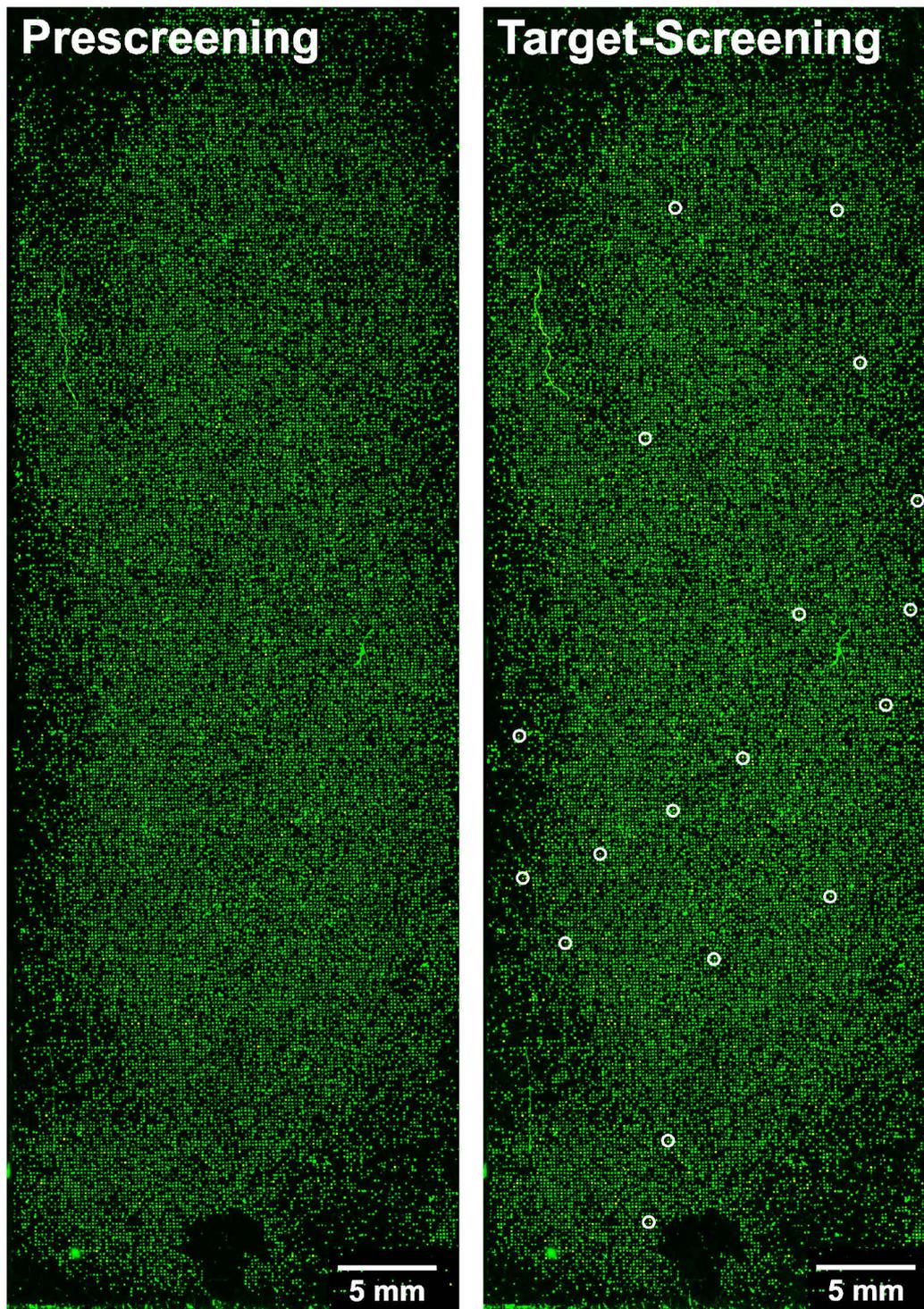
Wie in Kapitel 3.2 beschrieben wurde, sind antikörperbindende Proteine und Peptide für die pharmazeutische Forschung von großem Interesse.<sup>[168]</sup> Sowohl in der *in-vitro*-Diagnostik als auch in dem stark an Popularität gewinnenden Forschungsfeld der therapeutischen Antikörper besteht ein großer Bedarf an selektiven IgG-Bindern. Die Separation von Antikörpern aus Blutplasma oder Zellkulturüberständen erfolgt meist unter Verwendung von Protein-A-Affinitätsäulen. Der Vorteil von Peptiden gegenüber den Protein-basierten Säulen ist, dass die Peptide vollsynthetisch hergestellt werden können und somit keine mikrobiellen Kontaminationen enthalten. Des Weiteren sind Peptide kleiner und robuster als Proteine, weshalb die Affinitätsäu-

len höher beladen und länger benutzt werden können. So wurden bereits mehrere Peptide identifiziert, die selektiv an humane Antikörper binden. In der *in-vitro*-Diagnostik werden häufig Antikörper benutzt, die ursprünglich aus der Maus stammen. Peptide, die selektiv Mausantikörper binden, sind hingegen nicht bekannt. Eine Aufreinigung von Maus-IgG auf Basis von Peptiden ist somit noch nicht möglich.

#### 4.5.1 Screening der Peptidbibliothek 2 gegen Maus-IgG

Um selektive Maus IgG-bindende Peptide zu identifizieren, wurde die **Peptidbibliothek 2** hergestellt, gescreent und die identifizierten Peptide charakterisiert. Für die Synthese der **Peptidbibliothek 2** wurden acht L-Aminosäuren verwendet: Serin, Isoleuzin, Glyzin, Glutaminsäure, Arginin, Phenylalanin, Prolin und Histidin. Die Länge aller Peptide betrug dabei sieben Aminosäuren, woraus sich eine theoretische Größe von 2.091.152 Peptiden ergibt. Während jeden Zyklus wurden 5 % Boc-geschützter Aminosäuren verwendet, um Abbruchsequenzen zu erzeugen. Wie bei **Peptidbibliothek 1** wurde eine Spacer-Sequenz (GGGTERS GG) zwischen dem Partikel und den randomisierten Sequenzen gekoppelt.

31.000 Partikel der hergestellten **Peptidbibliothek 2** wurden auf einem Chip immobilisiert. Für das Screening wurde polyklonales Maus-IgG verwendet. Die Anfärbung erfolgte mit dem sekundären Ziege-anti-Maus-Atto633-Antikörper. Mit diesem wurde wieder vorab ein Prescreening durchgeführt, gefolgt von dem Target-Screening mit der 16 stündigen Maus IgG Inkubation und anschließender Anfärbung mit dem anti-Maus-Atto633-Antikörper. Die Fluoreszenz-Scans des Prescreenings und des Target-Screenings sind in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27:** Fluoreszenzscan (Auflösung 10  $\mu\text{m}$  per Pixel) eines Chips mit ca. 31.000 Partikeln der **Peptidbibliothek 2** für die Identifizierung von IgG-Bindern. Überlagerung von grünem (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und rotem (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenzkanal. Im grünen Fluoreszenzkanal wird die Eigenfluoreszenz der TentaGel-Partikel detektiert und der rote Fluoreszenzkanal dient zur Identifikation positiv-gescreener Partikel. Beim **Prescreening** wurde mit einem anti-Maus-Atto633-Antikörper und beim **Target-Screening** mit einem polyklonalen Maus-IgG, gefolgt von einem anti-Maus-Atto633-Antikörper, inkubiert.

Beim Prescreening wurden ca. 50 % der Partikel mit hoher Fluoreszenzintensität als falsch-positiv detektiert, was wesentlich mehr ist als bei den Chips aus Kapitel 4.3 und 4.4 (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Dies ist damit zu erklären, dass der sekundäre Antikörper ebenfalls aus einem Säugetier (Ziege) stammt. Vor allem der konstante Teil der Antikörper (F<sub>c</sub>-Teil) ist konserviert in Säugetieren.<sup>[169]</sup> Diese weisen ähnliche Strukturen auf, die mit den Peptiden ähnliche Wechselwirkungen eingehen können. Somit ist es denkbar das einige Peptide aus der der Peptidbibliothek 2 sowohl Mausantikörper als auch den Ziegenantikörper gebunden haben. Insgesamt konnten im Target-Screening 18 Partikel identifiziert werden, die im Prescreening keine Wechselwirkungen mit dem sekundären Antikörper aufwiesen.

### Sequenzierung

Die Peptide der 18 als positiv identifizierten Partikel wurden über die Abbruchsequenzen mittels MALDI-TOF-MS gemessen. Die MALDI-Messungen fanden dabei direkt auf der Oberfläche der Partikel statt. Die mittels Spec2Seq decodierten Sequenzen sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7:** Sequenzen der Peptide, die im Screening eine Affinität zu polyklonalem Maus-IgG aufzeigten.

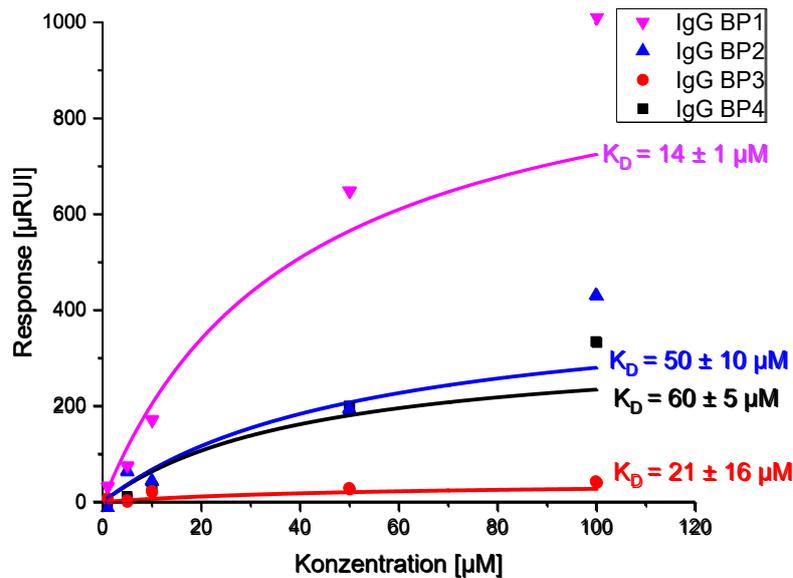
Sequenz	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7
1	G	R	I	H	G	P	R
2	G	I	H	P	F	G	R
3	I	I	I	F	H	G	R
5	F	G	S	I	I	G	F
6	I	F	F	P	P	H	R
8	F	F	S	P	S	P	R
9	F	R	H	F	S	F	R
10	I	E	E	E	P	G	I
11	G	I	R	F	H	F	F
12	R	H	R	H	R	F	F
13	H	I	G	R	G	R	R
14	G	E	P	F	S	I	P
15	E	H	G	E	P	I	P
18	S	H	S	G	I	F	R

Farbkodierung: Blau = basische AS, rot = saure AS, gelb = hydrophobe AS, orange = aromatische AS, grün = polare AS.

Bei acht eingesetzten Aminosäuren würde bei einer statistischen Normalverteilung jede Aminosäure zu 12,5 % vorkommen. Dies wurde bei den sequenzierten positiven Peptiden nicht beobachtet. Besonders häufig kamen die aromatische Aminosäure Phenylalanin (18 %), die basische Aminosäure Arginin (16 %) und die hydrophobe Aminosäure Isoleucin (15 %) vor. Mit geringer relativer Häufigkeit konnten die saure Aminosäure Glutaminsäure (6 %) und die polare Aminosäure Serin (7 %) in den Sequenzen nachgewiesen werden. Glutaminsäure kam nur in insgesamt drei Sequenzen vor, wobei in Sequenz 10 drei Glutaminsäuren hintereinander nachgewiesen wurden. Insgesamt konnten, im Gegensatz zu der Bibliothek aus Kapitel 4.4, keine Tendenzen von Aminosäuren an bestimmten Positionen in der Sequenz beobachtet werden. Nur an Position 7 trat Arginin in knapp 50 % der Sequenzen auf.

Die identifizierten Sequenzen weisen keine Ähnlichkeiten zu bereits veröffentlichten IgG-Bindern auf. Außerdem ergab die Suche in Peptiddatenbanken keinerlei Treffer, sodass davon auszugehen ist, dass es sich bei den identifizierten Sequenzen um bisher unbekannte Maus-IgG-Binder handelt. Um die Affinität zu bestätigen, wurden vier Sequenzen ausgewählt, resynthetisiert und mittels SPR charakterisiert.

Die Peptide **IgG BP1** (GRIHGPR), **IgG BP2** (GIHPFGR), **IgG BP3** (GEPFSIP) und **IgG BP4** (SHSGIFR) wurden für die Affinitätsbestimmung ausgewählt. Diese wurden per SPPS synthetisiert und Verdünnungen zwischen 1 bis 100  $\mu\text{M}$  hergestellt. Das polyklonale Maus-IgG wurde auf einem SPR-Chip (HC1500) immobilisiert und von jeder Peptidlösung ein SPR-Sensogramm aufgenommen. Die Messungen sind im Anhang 8.6 dargestellt. Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde die Signalintensität (Response) im Gleichgewichtszustand gegen die Konzentration an Peptid aufgetragen (siehe Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Auswertung der SPR-Messungen für die Peptide IgG BP1 (GRIHGPR), IgG BP2 (GIHPFGR), IgG BP3 (GEPFSIP) und IgG BP4 (SHSGIFR). Für die Messungen wurde polyklonales Maus-IgG auf einem SPR-Chip (HC1000) immobilisiert und die Peptidlösungen in Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  direkt injiziert. Die Signalintensität im Gleichgewicht ist gegen die Konzentration aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ergibt sich aus dem Wendepunkt der gefitteten Funktion (Gleichung 4). Die angegebenen Unsicherheiten ergeben sich aus der Standardfehler des Fits.

Die Datenpunkte wurden wie in Abbildung 26 mit Hilfe von Gleichung 4 gefittet. Auch hier fällt auf, dass die  $R_{\text{max}}$ -Werte variieren. Insbesondere zwischen IgGBP1 und IgGBP3 ist die Differenz zwischen den  $R_{\text{max}}$ -Werten, mit über einer Größenordnung, sehr groß. Diese Unterschiede können nicht mit einer zeitbedingten Denaturierung der Antikörper auf der Oberfläche des SPR-Chips erklärt werden. Grund für die hohen Abweichungen bei diesen Messungen ist wahrscheinlich, dass polyklonales Maus-IgG für die Herstellung des SPR-Chips verwendet wurde. Somit wurde eine heterogene Mischung aus unterschiedlichen Antikörpern immobilisiert. Die Peptide binden hierbei wahrscheinlich unterschiedliche Antikörper, wodurch die maximale Anzahl an Bindungspartnern, für die jedes Peptid stark variabel ist.

Die ermittelten  $K_D$ -Werte der gemessenen Peptide sind hingegen untereinander vergleichbar und liegen zwischen 14 – 60  $\mu\text{M}$ . Insgesamt sind die resultierenden  $K_D$ -Werte drei Größenordnungen größer als die der Peptidbinder, die beim Screening der **Peptidbibliothek 1** identifiziert wurden (siehe Kapitel 4.4.3). Da es sich bei der **Peptidbibliothek 1** um eine, gegen ein Paratop eines spezifischen Antikörpers gerichtete Bibliothek handelt, sind die Ergebnisse nicht ver-

gleichbar. Allerdings sind die erhaltenen Affinitäten auch geringer als die vieler literaturbekannter Peptide (siehe Kapitel 3.2). Grund für die vergleichsweise geringen Affinitäten kann sein, dass die Anzahl der gescreenten Peptide zu gering war. So wurde von LANCET et al. berechnet, dass bei einer größeren Menge gescreenter Liganden (Peptide) die Affinität der besten Binder, die identifiziert werden können, erhöht wird.<sup>[170]</sup> Zudem ist die Auswahl der verwendeten Aminosäuren sehr begrenzt. Z. B. wurde nur zwei aromatische Aminosäuren verwendet. Aromatische Aminosäuren spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Peptid und Protein, da die Bindung über sog.  $\pi$ - $\pi$ -Stacking vermittelt wird. Es ist bekannt, dass gerade  $\pi$ - $\pi$ -Stacking bei vielen Protein-Protein- und Protein-Peptid-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielt.<sup>[171-172]</sup> Eine Erweiterung der Aminosäureauswahl hätte allerdings zur Folge, dass die Bibliotheksgröße stark ansteigen würde. Es wäre dementsprechend nicht mehr ausreichend, nur einen Chip mit maximal 50.000 Partikeln zu screenen. Um eine redundante Anzahl an Partikeln zu screenen, müssten mehrere Chips parallel gescreent werden. Dies wäre mit einer starken Erhöhung des Arbeitsaufwandes verbunden. Eine Lösung des Problems ist, einen Anreicherungs-schritt vor dem Chip-Screening zu schalten, der es ermöglicht, die Anzahl an Partikeln mit nicht bindenden Peptiden stark zu reduzieren.

#### 4.5.2 Entwicklung einer magnetischen Anreicherung

Im Folgenden galt es eine Methode zu entwickeln, um die Anzahl der Partikel, die in einer OBOC-Bibliothek untersucht werden können, zu erhöhen. Hierbei sollte mit Hilfe einer magnetischen Anreicherung die Anzahl an nicht-bindenden Partikeln reduziert werden. Die Gruppe von KODADEK konnte bereits zeigen, dass es möglich ist, selektive Binder mittels Magnettrennung zu identifizieren.<sup>[111]</sup> Das Konzept ist in Kapitel 3.6 beschrieben (siehe Abbildung 8). Diese Veröffentlichung wurde als Grundlage für die Entwicklung einer Methode verwendet. Somit sollte das Screenen von 1.000.000 Partikeln einer OBOC-Bibliothek in kurzer Zeit möglich sein.

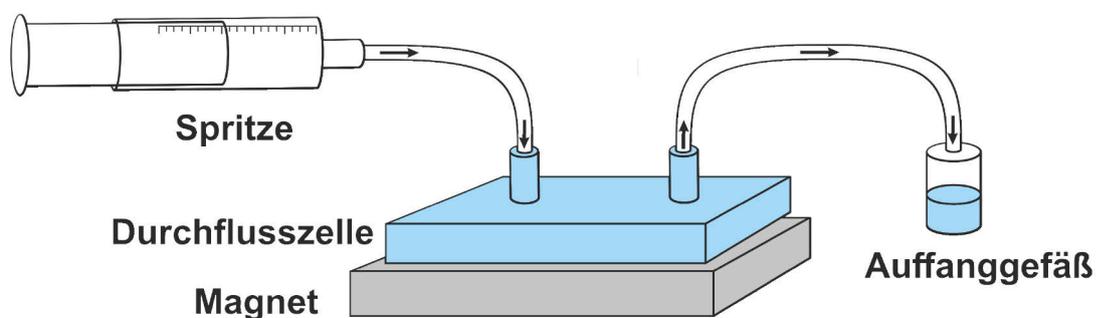
Für die Entwicklung der Methode wurde das Modellsystem auf Basis des FLAG-Peptids verwendet.<sup>3</sup> Hierbei wurden das FLAG-Peptid als Positivkontrolle und das Peptid DTHFPIGG als Negativkontrolle eingesetzt. Die Peptide wurden auf TentaGel-Partikeln synthetisiert und alle Inkubationsexperimente direkt auf den Partikeln durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde

---

<sup>3</sup> Die magnetische Anreicherung wurde in Zusammenarbeit mit Michael Linke entwickelt. Die ausführliche Beschreibung der Methodenentwicklung ist in der Masterarbeit „Entwicklung einer magnetischen Anreicherungs-methode für Peptidbibliotheken zur Identifizierung von Proteinbindern“ beschrieben.

der M2 anti-FLAG-Antikörper verwendet und als sekundärer Antikörper ein Biotin-markierter anti-Maus-Antikörper. Die verwendeten magnetischen Mikropartikel bestanden aus einem Eisen-(III)-oxid-Kern, ummantelt von Polystyrol. Auf der Oberfläche der Partikel ist Streptavidin adsorbiert. Das Streptavidin kann eine Wechselwirkung mit dem Biotin am sekundären Antikörper eingehen. Die Streptavidin-Biotin-Bindung ist die stärkste, bisher in der Natur beobachtete nicht-kovalente Bindung.<sup>[173]</sup> Bindet der primäre Antikörper an die Partikel, können, wie in Abbildung 8 dargestellt, Partikel mit FLAG-Peptid auf der Oberfläche mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung gezogen werden.

Die Separation der Partikel sollte in einer Durchflusszelle stattfinden (siehe Abbildung 29). Hierbei wird die Suspension mit Hilfe einer Spritze durch die Zelle gedrückt. Die Spritze ist dazu mit einem kurzen Schlauchstück mit der Durchflusszelle verbunden. Um einen konstanten Fluss zu garantieren wurde die Spritze in eine automatische Spritzenpumpe gespannt. Unterhalb der Durchflusszelle befindet sich ein Permanentmagnet. Binden die magnetischen Mikropartikel über die Antikörper an die Partikel, werden die Partikel in der Durchflusszelle zurückgehalten. Die restlichen Partikel werden mit dem Laufpuffer weggespült. Wird der Magnet anschließend von der Durchflusszelle entfernt, können die zurückgehaltenen Partikel in einem Auffanggefäß gesammelt werden.



**Abbildung 29:** Aufbau der magnetischen Anreicherung. Die Partikelsuspension wurde mit Hilfe einer Spritze durch eine Durchflusszelle gedrückt. Partikel, an denen magnetische Mikropartikel gebunden haben, wurden von einem Permanentmagneten unter der Durchflusszelle zurückgehalten. Die restlichen Partikel wurden weggespült. Durch die Entfernung des Magneten, konnten die angereicherten Partikel in einem Auffanggefäß gesammelt werden.

Um die Funktionsweise der magnetischen Anreicherung zu testen, wurden 50 Partikel mit dem FLAG-Peptid mit ca. 1.000.000 Partikeln der Negativkontrolle gemischt. Die Partikel mit dem FLAG-Peptid wurden unter einem Mikroskop ausgezählt, die Menge der Partikel der Negativkontrolle wurde über das Gewicht bestimmt. Das Partikelgemisch wurde zunächst mit dem

primären anti-FLAG-Antikörper inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären biotinylierten anti-Maus-Antikörper. Für eine direkte Anfärbung wurde im Anschluss zusätzlich mit dem sekundären anti-Maus-Atto633-Antikörper inkubiert. Abschließend wurden die Streptavidin-modifizierten, magnetischen Mikropartikel zu der Partikelsuspension gegeben.

Die Durchflusszelle wurde zunächst komplett mit einem Laufpuffer gespült. Hierbei galt es drauf zu achten, dass keine Luftblasen im System sind. Die Partikelsuspension wurde direkt nach der Inkubation in das Schlauchstück vor der Durchflusszelle transferiert. Anschließend wurde die Spritze an dieses Schlauchstück angeschlossen. Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurden 20 mL Laufpuffer mit einer gleichmäßigen Flussgeschwindigkeit in das System gegeben. Dabei hat sich eine Flussrate von 5 mL/min als optimal herausgestellt. Die Partikel, die nicht vom Magneten zurückgehalten wurden, wurden mit dem Laufpuffer aus der Durchflusszelle gespült. Der Magnet wurde anschließend entfernt und die zurückgehaltenen Partikel im Auffanggefäß gesammelt. Ungefähr 1.000 Partikel wurden dabei erhalten.

Da die Partikel vor der Anreicherung mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper angefärbt wurden, können die FLAG-peptidtragenden Partikel einfach mit einem Fluoreszenzscan identifiziert werden. Die magnetischen Mikropartikel hatten dabei keinen Einfluss auf den Fluoreszenzscan. Es konnte bei 41 Partikeln eine hohe Fluoreszenz nachgewiesen werden, was einer Wiederfindungsrate von 82 % entspricht.

So konnte mit Hilfe eines Magneten eine Anreicherung um das ca. 800fache erreicht werden. Dieses Experiment hat gezeigt, dass mit einer vorgeschalteten Anreicherung ein Chip ausreichend wäre, um 1.000.000 Partikel zu analysieren. Ohne magnetische Anreicherung, wären 34 Chips für die gleiche Anzahl an Partikeln nötig.

#### 4.5.3 Screening der Peptidbibliothek 3 gegen Maus-IgG

Die **Peptidbibliothek 3** wurde unter Verwendung der *Split-and-Mix*-Methode hergestellt.<sup>4</sup> Während jedes Zyklus wurden 5 % Boc-geschützter Aminosäuren verwendet, um Abbruchsequenzen zu erzeugen. Insgesamt wurden elf unterschiedliche L-Aminosäuren verwendet, bei einer Länge von acht Aminosäuren je Peptid. Dadurch ergibt sich eine theoretische Anzahl von 214.358.881 (ca. 200 Mio.) unterschiedlichen Peptiden in der Bibliothek. Als Aminosäuren wurden Glycin, Serin, Prolin, Glutamin, Isoleucin, Glutaminsäure, Arginin und die aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Phenylalanin verwendet. Von dieser

---

<sup>4</sup> Die Peptidbibliothek 3 wurde von Michael Linke in seiner Masterarbeit „Entwicklung einer magnetischen Anreicherungs-methode für Peptidbibliotheken zur Identifizierung von Proteinbindern“ synthetisiert.

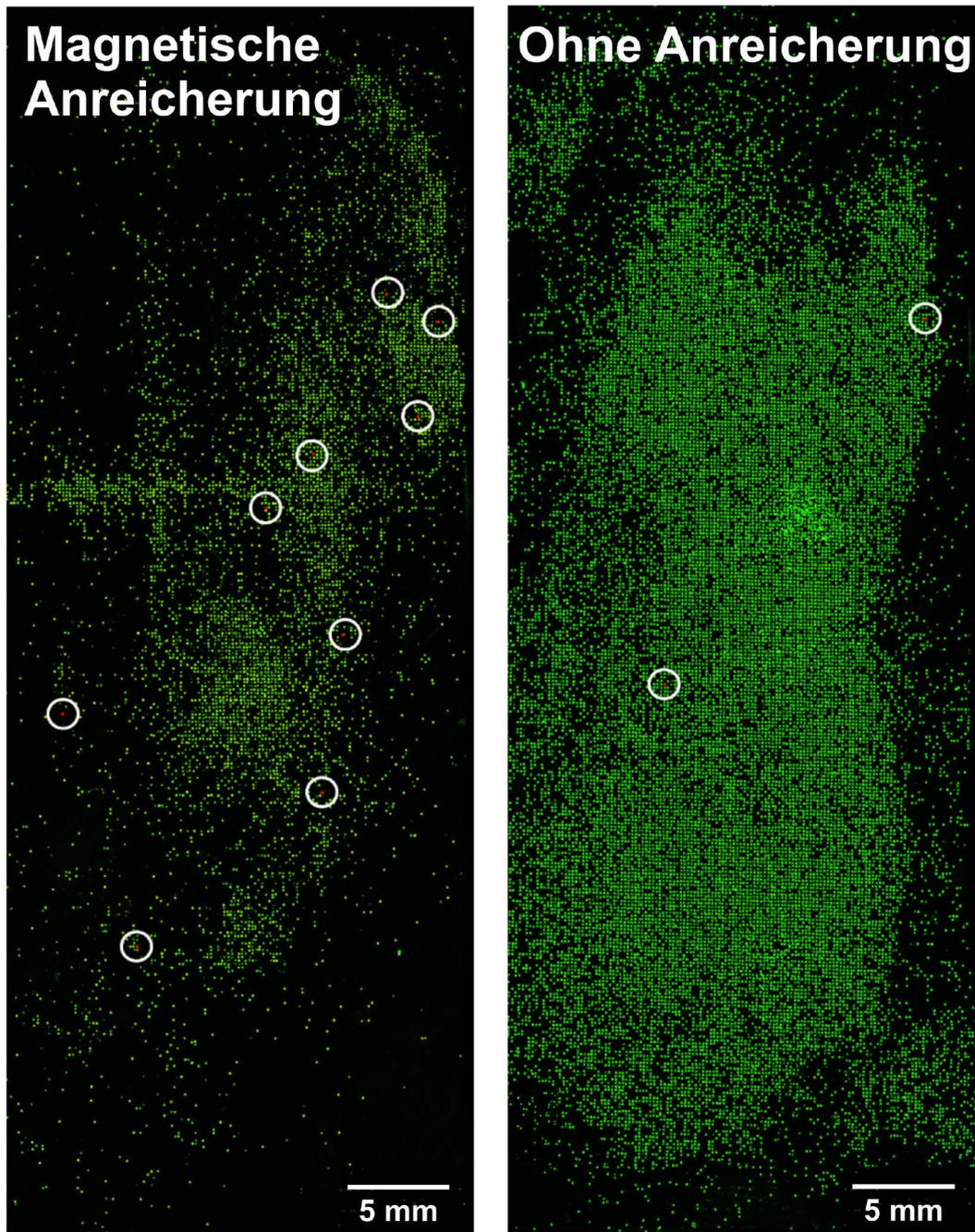
Bibliothek sollten 1.000.000 Partikel über eine magnetische Anreicherung auf ihre Wechselwirkung mit Maus-IgG untersucht werden. Des Weiteren wurde zum Vergleich ein Chip hergestellt werden, bei dem nicht-angereicherte Partikel gescreent wurden.

#### *Magnetische Anreicherung*

Aus ca. 1.000.000 Partikeln dieser **Peptidbibliothek 3** sollten, wie in Kapitel 6.13 beschrieben, positive Beads magnetisch angereichert werden. Im Gegensatz zu den Experimenten aus Kapitel 4.5 wurde kein polyklonales Maus-IgG verwendet, sondern ein monoklonaler Mausantikörper (BAM-mab 01 (CBZ), IgG<sub>1</sub>). Mit diesem wurden die Partikel inkubiert, gewaschen und mit dem sekundären biotinylierten anti-Maus-Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Mikropartikel zugegeben. Die Partikel wurden in die Durchflusszelle unter der sich ein Magnet befand (siehe Kapitel 4.5.2) gegeben und mit 20 mL Laufpuffer gespült. Die zurückgehaltenen Partikel wurden im Auffanggefäß gesammelt. Nach der Anreicherung wurden ca. 6.000 Partikel erhalten.

#### *Bindungsassays*

Für das Screening wurden zwei Chips hergestellt. Auf **Chip 1** wurden die 6.000 Partikel immobilisiert, die nach der magnetischen Anreicherung erhalten wurden. Auf **Chip 2** wurden ca. 23.000 Partikel der **Peptidbibliothek 3** (ohne Anreicherung) immobilisiert. Für das Chip-Screening wurden die beiden Chips gleich behandelt. Als primärer Antikörper wurde der BAM-mab 01 (CBZ) und als sekundärer Antikörper der anti-Maus-Atto633-Antikörper verwendet. Es wurden jeweils ein Prescreening und ein Target-Screening durchgeführt. Die Target-Screenings sind in Abbildung 30 und die Prescreenings im Anhang 8.7 (Abbildung 55) dargestellt.



**Abbildung 30:** Fluoreszenz-Scans (Auflösung 10  $\mu\text{m}$  per Pixel) zweier Chips mit Überlagerung von grüner (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und roter (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenz. Die grüne Fluoreszenz detektiert die Eigenfluoreszenz der Tenta-Gel-Partikel und die rote Fluoreszenz indiziert die Bindung des anti-Maus-Atto633-Antikörpers. Links: Chip mit Partikeln, die nach einer magnetischen Anreicherung gewonnen wurden. Rechts: Partikel aus der Bibliothek ohne Anreicherung. Target-Screening: Beide Chips wurden inkubiert mit dem Antikörper BAM-mab 01 (CBZ), gefolgt von der Anfärbung mit anti-Maus-Atto633-Antikörper.

### *Sequenzierung*

Die Peptide wurden anschließend von den Partikeln abgespalten, die Chips mit einer MALDI-Matrix besprüht und die Peptid-Abbruchsequenzspektren direkt auf der Oberfläche der Partikel

mit MALDI-MS gemessen. Die Übersetzung der Abbruchsequenzspektren fand mit Hilfe von Spec2Seq statt. Bei **Chip 1** konnte die Sequenzen von allen neun Partikeln eindeutig bestimmt werden. Die Sequenzierung auf **Chip 2** gelang nur bei einem von zwei Partikeln. Die identifizierten Sequenzen von **Chip 1** und **Chip 2** sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Sequenzen der Peptide, die im Screening eine Affinität zum monoklonalen Antikörper BAM-mab 01 (CBZ) zeigten. Auf Chip 1 wurden Partikel immobilisiert, die zuerst mittels Magneten angereichert wurden. Auf Chip 2 wurden ca. 23.000 Partikel der OBOC-Bibliothek ohne Anreicherung immobilisiert.

Chip	Sequenz	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Pos 8
1	1	H	W	E	Q	Y	F	W	E
1	2	G	H	W	S	E	H	Y	W
1	3	W	I	E	E	S	W	E	F
1	4	F	Y	W	Y	S	E	H	E
1	5	Y	F	E	Y	E	G	E	E
1	6	F	E	S	F	W	E	W	Q
1	7	W	H	E	E	R	G	Y	W
1	8	S	P	I	H	Q	I	S	Q
1	9	H	S	Y	E	W	Y	E	R
2	1	E	W	F	W	H	F	P	R

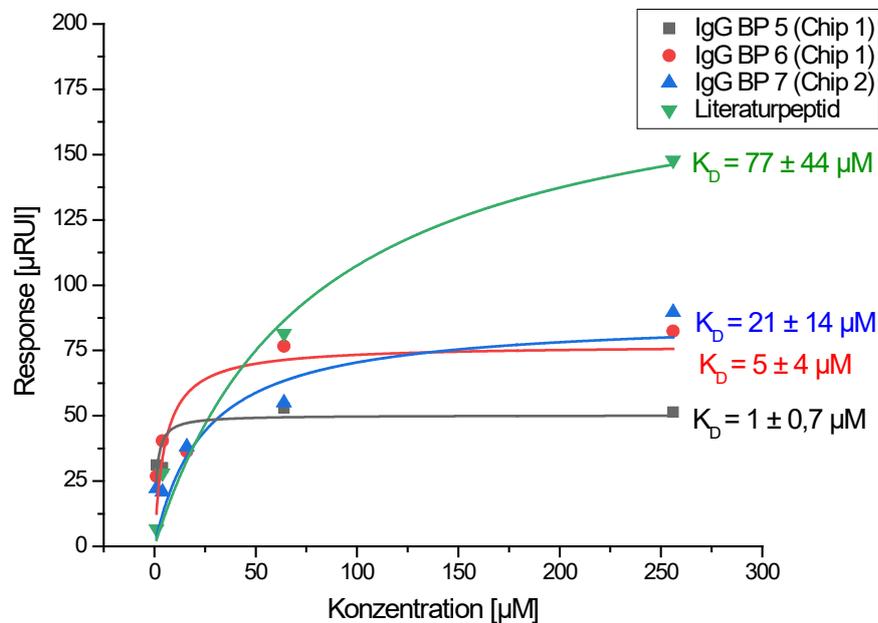
Allgemein ist bei den identifizierten Sequenzen zu erkennen, dass aromatische Aminosäuren mit einer hohen relativen Häufigkeit auftraten. Zudem kam Glutaminsäure sehr häufig vor, Arginin hingegen nur sehr selten. Somit sind die meisten, als bindend identifizierten Sequenzen, sauer. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den erhaltenen Sequenzen aus Kapitel 4.4 (siehe Tabelle 7). Die Unterschiede können damit erklärt werden, dass bei den Experimenten in Kapitel 4.4 polyklonales Maus-IgG benutzt wurde. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus vielen unterschiedlichen Mausantikörpern unterschiedlicher Subklassen. Im Gegensatz dazu ist der monoklonale Antikörper BAM-mab 01 (CBZ) ein definiertes Protein der Subklasse IgG<sub>1</sub>.<sup>[174]</sup>

Allerdings ist die Anzahl der Sequenzen insgesamt zu klein, um klare statistische Aussagen treffen zu können. Der hohe Anteil an aromatischen Aminosäuren in den Sequenzen scheint allerdings zu bestätigen, dass  $\pi$ - $\pi$ -Stacking einen großen Einfluss auf die Peptid-Protein-Bindung hat.

*Affinitätsbestimmung mittels SPR*

Im nächsten Schritt sollten die Affinitäten ausgewählter Peptide bestimmt werden. Dazu wurden zwei Sequenzen ausgewählt, die mit Hilfe der Anreicherung identifiziert wurden (**Chip 1**). Des Weiteren wurde die Sequenz, die im direkten Screening (**Chip 2**) identifiziert wurde, resynthetisiert. Von **Chip 1** wurden Peptid IgG BP5 (WIEESWEF) und Peptid IgG BP 6 (WHEERGYW) resynthetisiert. Peptid IgG BP5 hat auf Grund des hohen Glutaminsäure-Anteils einen niedrigen isoelektrischen Punkt. Peptid IgG BP 6 ist mit zwei Glutaminsäuren und einem Arginin nur leicht sauer. Zum Vergleich wurde das Peptid IgG BP 7 (EWFWHFPR) von **Chip 2** resynthetisiert. Diese Sequenz enthält eine Glutaminsäure und ein Arginin, wodurch das Peptid annähernd neutral ist. Zusätzlich wurde ein literaturbekanntes Peptid (HFRRHL) mit einer Dissoziationskonstante von 26  $\mu\text{M}$  gegen humanes IgG synthetisiert.<sup>[175]</sup>

Die Dissoziationskonstanten sollten, wie in den Kapiteln zuvor, mittels SPR bestimmt werden. Hierzu wurde auf einem SPR-Chip (HC1500) der monoklonale Antikörper BAM-mab 01 (CBZ) immobilisiert. Die Peptide wurden in Verdünnungen zwischen 1 bis 250  $\mu\text{M}$  gemessen. Die Intensität der Signale im Gleichgewicht ist gegen die Konzentration an Peptid aufgetragen und in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31:** Auswertung der SPR-Messungen für die Peptide IgG BP5 (WIEESWEF) und IgG BP 6 (WHEERGYW) identifiziert auf **Chip 1** (magnetische Anreicherung), IgG BP 7 (EWFWHFPR) identifiziert auf **Chip 2** (ohne Anreicherung) und das Literaturpeptid (HFRRHL). Für die Messungen wurde der monoklonale Antikörper BAM-mab 01 (CBZ) auf

einem SPR-Chip (HC1500) immobilisiert und die Peptidlösungen in Konzentrationen zwischen 1 bis 250  $\mu\text{M}$  direkt injiziert. Die Signalintensität im Gleichgewicht ist gegen die Konzentration an Peptid aufgetragen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ergibt sich aus dem Wendepunkt der gefitteten Funktion. Die angegebenen Unsicherheiten ergeben sich aus dem Standardfehler des Fits.

Die Signalintensität im Gleichgewicht wurde mit Hilfe von Gleichung 4 gefittet. Die  $R_{\text{max}}$ -Werte der einzelnen Fit variieren dabei wesentlich weniger als in Abbildung 28. Bei der Herstellung des SPR-Chips wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Somit kann es nicht zu einem heterogenen Bindungsverhalten kommen, wie bei SPR-Messungen aus Abbildung 28 beobachtet wurde. Die Werte der von IgG BP5 bis 7 sind annähernd vergleichbar. Der  $R_{\text{max}}$ -Werte des Literaturpeptids ist hingegen doppelt so hoch. Im Allgemeinen ist der  $R_{\text{max}}$ -Werte abhängig von der Masse der bindenden Peptide und deren Brechungsindex. Da der Brechungsindex eines Peptids von den enthaltenen Aminosäuren abhängt<sup>[176]</sup> und die Sequenz sehr unterschiedliche zu den anderen Sequenzen ist, kann dies der Grund für die höheren  $R_{\text{max}}$ -Werte des Literaturpeptids sein.

Die großen Unsicherheiten erlaubten nur eine ungefähre Abschätzung der Dissoziationskonstanten. Für das Literaturpeptid konnte ein  $K_D$ -Wert von  $77 \pm 44 \mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Dieser ist damit mehr als doppelt so hoch wie der Literaturwert ( $26 \mu\text{M}$ <sup>[175]</sup>). Ein Grund für eine Abweichung könnte sein, dass sich der Literaturwert auf humanes IgG und nicht auf Maus-IgG bezieht.

Die Dissoziationskonstanten des Peptids IgG BP 7, welches ohne Anreicherung identifiziert wurde, sind vergleichbar mit den erhaltenen  $K_D$ -Werten Kapitel 4.5 (Abbildung 28). Zudem weist das Peptid IgG BP 7 zum Literaturpeptid vergleichbare Affinitäten auf.

Bei den Peptiden IgG BP 5 und IgG BP 6 konnten Dissoziationskonstanten bestimmt werden, die ca. 10fach niedriger sind als alle anderen IgG-Binder. Das Peptid IgG BP 5 weist mit einem  $K_D$ -Wert von 1  $\mu\text{M}$  den niedrigsten Wert auf, der in dieser Arbeit für ein IgG-bindendes Peptid bestimmt werden konnte.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit größeren OBOC-Bibliotheken affinere Binder identifiziert werden können. Dabei ist es allerdings wichtig, eine möglichst große Partikelanzahl zu screenen. Dies kann erreicht werden, indem ein vorgelagerter Anreicherungsschritt durchgeführt wird. So können mit Hilfe eines magnetischen Anreicherungsschritts zum einen mehr bindende Peptide und zum anderen stärker bindende Peptide identifiziert werden.

#### 4.6 Methodenvergleich

Die Chip-basierte Analyse von OBOC-Bibliotheken mit einer vorgeschalteten Anreicherung stellt eine geeignete Hochdurchsatzmethode dar, um Peptid-basierte Proteinbinder zu identifizieren. Der Zeit-, Material- und Geräteaufwand ist dabei vergleichsweise gering. Der verwendete Chip wird aus einem herkömmlichen Glasobjektträger und einem elektrisch leitenden, doppelseitigen Klebeband hergestellt. Beides sind Standardmaterialien, wodurch die Materialkosten für die Herstellung eines solchen Chips weniger als einen Euro betragen. Die Auftragung der Partikel durch ein Sieb ist ebenfalls sehr einfach, wodurch die Herstellungszeit des Chips, für den geübten Anwender, nicht länger als 20 min in Anspruch nimmt. Dies ist ein enormer Vorteil gegenüber bereits veröffentlichten Arbeiten, wie der von WANG et al., dessen Chips mittels Halbleitertechnologie sehr aufwendig hergestellt werden müssen (siehe Kapitel 3.6.2).<sup>[107]</sup> Zudem bieten die Chips von WANG et al. maximal Raum für 800 Partikel,<sup>[109]</sup> wohingegen auf den in dieser Arbeit entwickelten Chips bis zu 50.000 Partikel immobilisiert werden können.

Um die Menge an gescreenten Partikeln weiter zu vergrößern, wurde eine magnetische Anreicherung durchgeführt. Im Gegensatz zu MENDES et al.<sup>[111]</sup> (siehe Kapitel 3.6.3) wurde eine Durchflusszelle verwendet, die die reproduzierbare Anreicherung einer Million Partikel erlaubt. Bei der Durchflusszelle handelt es sich um eine Standardzelle für die Messung der Absorption. Somit musste kein spezielles mikrofluidisches System entwickelt werden.<sup>[112]</sup> Die Durchführung der Anreicherung nahm, inklusive aller Inkubationsschritte, insgesamt drei Stunden in Anspruch. Die ca. 6000 angereicherten Partikel aus **Peptidbibliothek 3** konnten auf einen Chip immobilisiert werden. Da theoretisch die sechsfache Menge an Partikeln auf einen Chip passt, wäre denkbar, über 6.000.000 Partikel unter Verwendung der magnetischen Anreicherung zu screenen. Dazu können entweder sechs Anreicherungen hintereinander durchgeführt oder die Anreicherung weiterentwickelt werden. Die Vorinkubation mit dem Target-Protein sollte dabei auch problemlos mit sechs Millionen Partikeln gleichzeitig funktionieren. Da die Inkubationszeit der Partikel der zeitaufwendigste Schritt ist, würde die Durchführung von sechs Anreicherungen die Gesamtzeit nicht wesentlich verlängern.

Für die Identifizierung falsch-positiver Partikel wurde ein Prescreening (Vorscreening) durchgeführt. Gerade in dem Screening der großen **Peptidbibliotheken 2** und **3** hat sich gezeigt, dass der Anteil an falsch-positiven Partikeln sehr groß war. Dies bestätigt die Ergebnisse einiger Veröffentlichungen, dass TentaGel-Partikel teilweise eine hohe Autofluoreszenz aufweisen

und zuvor identifiziert werden müssen.<sup>[158]</sup> Des Weiteres werden Peptide identifiziert, die selektiv den sekundären Antikörper binden und nicht das Target-Protein. Das Prescreening verhindert somit, dass nichtbindende Peptide identifiziert, umsonst synthetisiert und aufwendig charakterisiert werden. Die Durchführung des Prescreenings nimmt dabei insgesamt zwei Stunden in Anspruch, was gering ist im Vergleich zum Aufwand und der Zeit, die eine Synthese und Charakterisierung nichtbindender Peptide einnehmen würde.

Für das Target-Screening zur Identifizierung der selektiv bindenden Peptide muss zunächst der primäre Antikörper für 16 Stunden inkubiert werden. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper benötigt eine Stunde. Inklusive Waschschritten und Durchführung des Fluoreszenz-Scans dauert das Target-Screening ca. 19 Stunden, wobei die Inkubation mit dem Target-Protein über Nacht stattfinden kann. Für die Messung der Fluoreszenz-Scans wird ein herkömmlicher Microarray-Scanner (z. B. MArS) verwendet. Diese Geräte werden in vielen Analytiklaboren genutzt und sind relativ günstig in der Anschaffung. Dies ist vor allem ein Vorteil gegenüber den sehr teuren COPAS-Geräten (siehe Kapitel 3.6.1), wie die von CHO et al. für die Hochdurchsatzanalyse von OBOC-Bibliotheken verwendeten.<sup>[105]</sup>

Die Abspaltung der Peptide und das Aufbringen der MALDI-Matrix dauert insgesamt drei Stunden. Hierfür wird eine handelsübliche Airbrush benutzt, welche günstig in der Anschaffung und einfach in der Handhabung ist. Auf aufwendige Matrixauftragungsmethoden, z. B. mittels Elektrospray,<sup>[177]</sup> wurde verzichtet.

Die anschließende Sequenzierung erfolgt direkt auf dem Chip, wodurch keine Zeit zur Separation der Partikel benötigt wird. Dies ist in den meisten Screeningverfahren von OBOC-Bibliotheken einer der zeitintensivsten Schritte. Die Koordinaten der positiven Partikel im Fluoreszenzscan werden automatisch in MALDI-Koordinaten umgerechnet, wodurch die Positionen im MALDI gezielt angesteuert werden können. An diesen Positionen werden die jeweiligen Massenspektren direkt aufgenommen. Dies wurde in der Arbeit manuell durchgeführt. Da allerdings nur eine Liste von Koordinaten abgearbeitet werden muss, ist eine Automatisierung dieses Vorgangs ohne Weiteres denkbar. Die Zeit für die Messung der MS-Spektren betrug im Schnitt eine Stunde. Die anschließende Auswertung der Spektren kann voll automatisch mit der Software Spec2Seq geschehen. Die Rechenzeit der Software hängt dabei stark von der verwendeten Hardware und der theoretischen Größe der Bibliothek ab. So dauerte die Auswertung der 18 Spektren, die beim Screening der **Peptidbibliothek 2** gemessen wurden, ca. eine Minute.<sup>5</sup>

---

<sup>5</sup> Gerechnet auf einem Windows 10 System (CPU: Intel® Core™ i7, RAM: 16 GB).

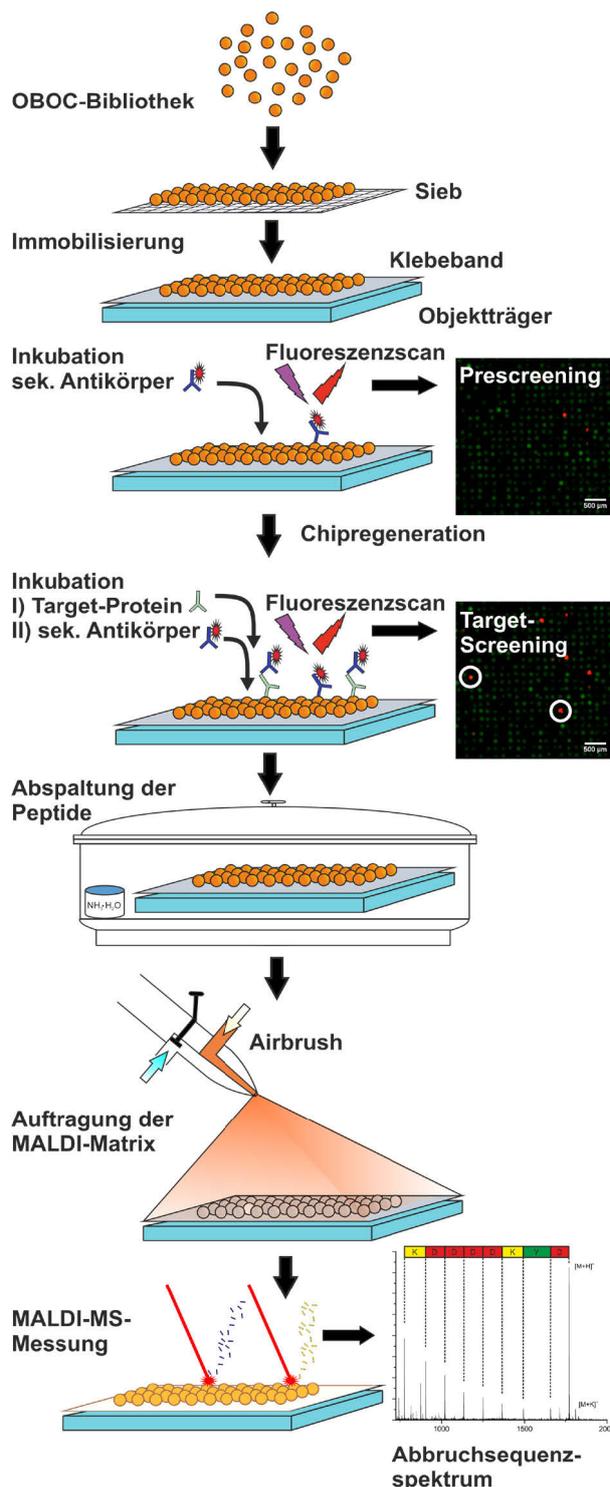
Alles in Allem dauert die gesamte Durchführung, vom ersten Schritt der Anreicherung bis zum Sequenzieren der Peptide, knapp zwei Tage. Dies ist ungefähr doppelt so schnell wie die Durchführung eines üblichen Phagen-Displays, welcher in der Regel vier Tage benötigt. Die Anzahl der Peptide ( $10^6$ ) ist dabei geringer als im Phagen-Display, mit dem bis zu  $10^{10}$  Peptide gescreent werden können.<sup>[178]</sup> Allerdings ist die präsentierte Hochdurchsatztechnik zur Analyse von OBOC-Bibliotheken eine chemische, vollsynthetische Alternative zu den biologischen Phagen-Displays. Somit kann die entscheidendste Limitierung des Phagen-Displays umgangen und z. B. D-Aminosäuren oder unnatürlichen Aminosäuren bei der Erstellung der Bibliotheken eingesetzt werden. Diese Möglichkeit, in Verbindung mit der in dieser Arbeit vorgestellten Hochdurchsatzmethode, eröffnet den potenziellen Einsatz in der Pharmaforschung, da fast alle Schritte des Screenings leicht automatisiert werden können.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich eine Hochdurchsatzmethode entwickelt werden, mit der schnell und einfach Peptid-basierte Binder für Proteine identifiziert werden können. Grundlage der Hochdurchsatzmethode ist ein Chip, auf dem ein Bindungsassay und die massenspektrometrische Peptidsequenzierung hintereinander ausgeführt werden können (siehe Abbildung 32). Ein aufwendiger, manueller Separationsschritt der Partikel entfällt somit.

Der Chip basiert auf einem herkömmlichen Objektträger, der mit einem elektrisch leitenden doppelseitigen Klebeband modifiziert wurde. Durch das Format eines herkömmlichen Objektträgers, kann der Chip in vielen Geräten eingesetzt werden. Das Klebeband garantiert dabei eine permanente Fixierung der Partikel auf der Oberfläche des Chips. Die Auftragung der Partikel erfolgt durch ein Sieb. Dies garantiert die gleichmäßige Anordnung der immobilisierten Partikel. Es konnte gezeigt werden, dass dabei die Position der Partikel über das gesamte Screening hinweg konstant ist. Ein Bindungsassay konnte direkt auf dem Chip durchgeführt werden. Dadurch, dass die Partikel irreversibel auf dem Chip fixiert sind, können mehrere Screenings hintereinander durchgeführt werden. Da bekannt ist, dass die verwendeten TentaGel-Partikel oft eine hohe Eigenfluoreszenz aufweisen, ist es wichtig, diese vor dem Screening zu identifizieren. So konnten in einem Prescreening diese Partikel identifiziert und bei der späteren Auswertung der Bindungsassays ausgeschlossen werden. Dies verhindert die Identifizierung von falsch-positiven Peptiden, was beim Screening von OBOC-Bibliotheken ansonsten ein gravierendes Problem darstellt.

Die Leitfähigkeit des Klebebandes ermöglicht neben der Immobilisierung der Partikel die MALDI-TOF-MS-Messungen direkt auf dem Chip. Für die rückstands- und flüssigkeitsfreie Abspaltung der Peptide von den Partikeln mit gasförmigem Ammoniak, wurde der HMBA-Linker verwendet. Für die Auftragung der MALDI-Matrix wurde eine herkömmliche Airbrush verwendet. Die MALDI-Matrix 2,5-DHAP zeigte dabei die besten Eigenschaften.



**Abbildung 32:** Schematische Darstellung der entwickelten Hochdurchsatzmethode für die Identifizierung von Peptid-basierten Proteinbindern aus OBOC-Bibliotheken.

Bei den MALDI-MS-Messungen konnten die  $m/z$  der Peptide eindeutig detektiert werden. Allerdings gestaltete sich die Messung von MS/MS-Spektren als schwierig. Dabei wurden nur ca. 30 % der Aminosäuren in den Testpeptiden richtig erkannt. Ursache hierfür waren die geringen Mengen an Peptid auf der Oberfläche der Partikel.

Aus diesem Grund musste eine Methode gefunden werden, die es erlaubte, die Peptidsequenz unter den gegebenen Bedingungen zu bestimmen. Als geeignet stellte sich die Kodierung der Peptidsequenz mittels Abbruchsequenz heraus. Hierfür wurden bei der Peptidsynthese mittels Fmoc-Strategie 5 % Boc-Aminosäure eingesetzt. Somit entstanden kürzere Peptide, Abbruchsequenzen genannt. Die Abbruchsequenzen konnten mittels MALDI-TOF-MS detektiert und die Sequenzen eindeutig bestimmt werden.

Für die Auswertung der Massenspektren wurde die Software Spec2Seq entwickelt. Diese ermöglicht es, Massenspektren von Peptiden aus OBOC-Bibliotheken gezielt auszuwerten. Es konnte gezeigt werden, dass Spec2Seq vergleichbare Ergebnisse zu kommerzieller Software liefert, bei zugleich wesentlich einfacherer Handhabung. Zudem erlaubt Spec2Seq die Auswertung von Abbruchsequenzspektren,

wofür bisher noch keine Softwarelösung existierte. Da der grundlegende Algorithmus von

Spec2Seq gut adaptierbar ist, konnten auch MS/MS-Spektren von Thiolacton-Präzisionspolymeren und DNA/LNA ausgewertet werden. So wurde die Software bereits in mehreren Veröffentlichungen verwendet.<sup>[145, 162-163]</sup>

Die entwickelte Hochdurchsatzmethode (siehe Abbildung 32) wurde im Anschluss an realen OBOC-Bibliotheken angewendet. Die **Peptidbibliothek 1** wurde auf Binder gegen den anti-FLAG-Antikörper gescreent. Bei der Synthese der Bibliothek wurden gezielt Aminosäuren verwendet, die im Epitop gegen den anti-FLAG-Antikörper vorkommen. Somit handelt es sich um eine gezielt gegen das Paratop des Antikörpers gerichtete Peptidbibliothek. Die Bibliothek umfasste dabei ca. 400.000 unterschiedliche Peptide. 12.000 Partikel der Bibliothek wurden gescreent, wobei 33 Peptide als bindend identifiziert wurden. Anschließend wurde die Sequenz der Peptide bestimmt. In 24 der 33 identifizierten Peptidsequenzen konnte das Epitop des anti-FLAG-Antikörpers komplett oder partiell nachgewiesen werden. Bei den neun anderen Sequenzen handelt es sich wahrscheinlich um Mimotope, also Sequenzen, die die Erkennungsmerkmale des Epitops nachahmen. Für die Charakterisierung der erhaltenen Peptide wurden zwei Peptide resynthetisiert, wobei eins das bekannte Epitop aufwies und das andere nicht. Zusätzlich wurde ein Konsensus-Peptid synthetisiert, welches eine Art Mittelwert über alle identifizierten Peptide darstellt. Mittels SPR wurden die Dissoziationskonstanten aller Peptide ermittelt. Das gefundene Peptid, welches das Epitop enthielt, und das Konsensus-Peptid wiesen dabei vergleichbare Dissoziationskonstanten zu dem FLAG-Peptid auf (ca. 10-50 nM). Das Peptid, welches nicht das Epitop in der Sequenz aufwies, wies eine ungefähr 10fach höhere Dissoziationskonstante auf. Allerdings zeigt die hohe Affinität des Konsensus-Peptids, dass bevorzugt starke Binder identifiziert werden konnten. Die Identifizierung eines Binders für den anti-FLAG-Antikörper hatte dabei nur bedingt eine reale Anwendung und diente eher als eine Validierung der Hochdurchsatzmethode.

Im nächsten Schritt wurde eine nicht-gerichtete OBOC-Bibliothek hergestellt und gegen Maus-IgG gescreent. Diese **Peptidbibliothek 2** bestand aus über 2 Mio. unterschiedlichen Peptiden und war somit wesentlich größer als **Peptidbibliothek 1**. Es wurden rund 31.000 Partikel auf einem Chip immobilisiert und gegen Maus-IgG gescreent. Dabei wurden 18 Peptidsequenzen als IgG-bindend identifiziert. Vier dieser Peptide wurden resynthetisiert und deren Dissoziationskonstanten mittels SPR bestimmt. Dabei konnten  $K_D$ -Werte zwischen 20 - 60  $\mu$ M nachgewiesen werden. Diese Werte sind vergleichbar zu literaturbekannten, linearen, IgG-bindenden Peptiden ähnlicher Länge.

Im Anschluss sollte getestet werden, ob es möglich ist, mit einer größeren OBOC-Bibliothek affinere Binder zu identifizieren. Dazu wurde die Peptidbibliothek 3 hergestellt, die insgesamt

über 200 Mio. unterschiedliche Peptide enthielt. Da diese Bibliothek noch einmal wesentlich größer war, wurde eine magnetische Anreicherung vorgeschaltet. Somit konnten aus 1 Mio. Partikeln ca. 6.000 Partikel angereichert werden. Die angereicherten Partikel wurden anschließend auf einem Chip gescreent. Dabei wurden elf Peptide als bindend identifiziert. Zwei der identifizierten Peptide wurden resynthetisiert und die Dissoziationskonstanten mittels SPR bestimmt. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte von 1 und 5  $\mu\text{M}$  waren ungefähr eine Größenordnung kleiner als die der nichtangereicherten Bibliothek. Somit könnte z. B. das Peptid WIEESWEF in einer Affinitätschromatographie eingesetzt werden, um Antikörper aus Mausserum oder Zellkulturüberständen zu gewinnen. Protein A weist eine wesentlich niedrigere Dissoziationskonstante ( $K_D = 14 \text{ nM}$ ) auf, die aber Probleme mit der schonenden Elution der Antikörper verursacht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Peptide mit vergleichbaren Dissoziationskonstanten, wie die in dieser Arbeit ermittelten, IgG aus Zellkulturüberständen extrahieren können.<sup>[29]</sup>

Beim Screening von unterschiedlichen, realen OBOC-Bibliotheken konnten Peptidbinder mit Affinitätskonstanten im nano- und mikromolaren Bereich identifiziert werden. So konnte auch die praktische Anwendung der entwickelten Hochdurchsatzmethode eindrucksvoll bewiesen werden. Die Ergebnisse der Screenings der drei Peptidbibliotheken sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten Peptidbibliotheken.

	<b>Peptidbibliothek 1</b>	<b>Peptidbibliothek 2</b>	<b>Peptidbibliothek 3</b>
<b>Theoretische Größe</b>	390.625	2.091.152	214.358.881
<b>Target</b>	Anti-FLAG-Antikörper M2	Polyklonales Maus-IgG	Monoklonales Maus-IgG <sub>1</sub>
<b>Gescreente Partikel</b>	12.000	31.000	1.000.000
<b>Bester Binder</b>	DYDIYIYD	GRIHGPR	WIEESWEF
<b><math>K_D</math>-Wert</b>	12 nM	14 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$

### *Ausblick*

Beim Screening der **Peptidbibliotheken 2** und **3** konnten mikromolare Peptidbinder identifiziert werden. Diese Affinitäten sind geeignet für einen Einsatz in der Affinitätschromatographie. Für eine Verwendung von Peptiden als Wirkstoff werden hingegen wesentlich höhere Affinitäten im nano- bis pikomolaren Bereich benötigt. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung zyklischer Peptide. Es ist bekannt, dass diese auf Grund ihrer starrer Form stärkere

Bindungen zu Proteinen ermöglichen.<sup>[40]</sup> Hierfür müssten geeignete Synthesewege gefunden werden, die eine Kodierung mittels Abbruchsequenzen zulassen.

Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, die Menge an gescreenten Partikeln zu erhöhen. Beim Screening der Peptidbibliotheken in dieser Arbeit wurden maximal 1 Mio. Partikel verwendet. Ziel sollte allerdings sein, alle Peptide einer OBOC-Bibliothek zu screenen. Somit kann sichergestellt werden, dass die Binder mit den höchsten Affinitäten identifiziert werden.

Das Hauptproblem beim Screening einer großen Anzahl an Partikeln ist die stark zunehmende Gesamtmasse. Beim Screening von 200 Mio. Partikeln mit einem Durchmesser von 75  $\mu\text{M}$  wären z. B. 40 g nötig, eine praktisch schwer handhabbare Masse. Durch den Einsatz von kleineren Partikeln könnte dieses Problem umgangen werden. So wiegen z. B. 200 Mio. Partikel mit einem Durchmesser von 30  $\mu\text{m}$  nur 3 g. Allerdings entstehen dadurch gravierende Probleme, wie die 10fach geringe Menge an Peptid pro Partikel. Es ist unklar, ob eine Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS mit diesen Partikeln noch möglich ist.

Das Screening der **Peptidbibliothek 1** hat ein inhärentes Problem der Peptidbibliotheken gezeigt. So wurde neben hochaffinen Bindern auch ein Peptid identifiziert, welches wesentlich schwächer an das Protein bindet. Ursache dafür ist, dass es auf Grund der hohen Dichte der Peptide auf der Oberfläche der Partikel zu Aviditätseffekten kommt. Eine Lösung wäre die Entwicklung von maßgeschneiderten Kern-Schale-Partikeln. Hierbei wäre die Dichte der Peptide auf der Schale gering genug, um starke monovalente Binder zu identifizieren. Der Kern weist hingegen eine sehr hohe Anzahl an Peptiden auf, wodurch eine Sequenzbestimmung mittel MS gewährleistet werden könnte. Solche Konzepte befinden sich bereits in der Entwicklung, allerdings sind die benötigten Partikel nicht kommerziell erhältlich.

Es konnte in dieser Arbeit das Screening von OBOC-Bibliotheken optimiert werden. Für eine effizientere Identifikation von noch affineren Bindern, müssen im nächsten Schritt neue (Kern-Schale-) Partikel entwickelt werden, um die TentaGel-Partikel, die heutzutage im überwiegenden Teil der Literatur verwendet werden, abzulösen.

## 6 Experimental Teil

### 6.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen kommerziell erworben:

Reagenz	Firma (Bestellnummer)
(3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan ( $\geq 98\%$ )	Sigma-Aldrich, 440167
2,5-DHAP	Sigma-Aldrich, A12185
2,5-DHB	Bruker, 201346
Acetonitril ( $\geq 99,9\%$ )	Fisher Chemical, 10799704
Ammoniumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, A1645
BAM-mab1 (CBZ) (1 mg/mL)	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Anti-FLAG-Ak M2 (1 mg/mL)	Sigma -Aldrich, F1804-50UG
Anti-Maus-Atto633-Ak (1 mg/mL)	AttoTec, 78102-1ML-F
Anti-Maus-Biotin-Ak (1 mg/mL)	Sigma-Aldrich, B7264
Boc-Arg-OH	J&K Chemicals
Boc-Gln-OH	J&K Chemicals
Boc-Glu(OtBu)-OH	Alfa Aesar
Boc-Gly-OH	Iris Biotech
Boc-His(Tos)-OH	Iris Biotech
Boc-Ile-OH	Iris Biotech
Boc-Lys(Boc)-OH	Iris Biotech
Boc-Phe-OH	Sigma-Aldrich
Boc-Pro-OH	Sigma-Aldrich
Boc-Ser-OH	J&K Chemicals
Boc-Trp-OH	Sigma-Aldrich
Boc-Tyr-OH	Sigma-Aldrich
Dichlormethan (DCM) ( $\geq 98\%$ )	Th. Geyer GmbH & Co. KG, 2356
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\geq 99\%$ , Dihydrat)	Sigma, 71643
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, E1769

Ethanol ( $\geq 99,8\%$ )	Sigma-Aldrich, 493511
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Bachem
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Gln-OH	J&K Chemicals
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Gly-OH	Bachem
Fmoc-His(Trt)-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Ile-OH	Carl Roth
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Iris Biotech
Fmoc-Phe-OH	Bachem
Fmoc-Pro-OH	Bachem
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Bachem
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Bachem
Fmoc-Trp-OH	Sigma-Aldrich
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Sigma-Aldrich
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, G3272-25G
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\geq 99,5\%$ )	Sigma-Aldrich, 60218
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, 4256.2
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF) ( $\geq 99,8\%$ )	Merck, 1.00387
NaCl ( $\geq 99,5\%$ )	Sigma-Aldrich, 7647-14-5
Natriumdihydrogenphosphat ( $\geq 99\%$ , Dihydrat)	Fluka, 71502/AppliChem, A3902
N-Hydroxysuccinimid (NHS) (98%)	Sigma-Aldrich, 130672
O-(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat (HCTU) ( $\geq 98\%$ )	Novabiochem, 8510120025
Peptide Calibration Standard II	Bruker, 222570
Piperidin ( $\geq 98,5\%$ )	Sigma-Aldrich, 104094
Polysorbate 20	Sigma-Aldrich, P7949
PS-MAG-SA (10 mg/mL Suspension) Durchmesser: 1,43 $\mu\text{m}$	microParticles GmbH, S2472

Eisenoxidgehalt (Gew.-%): > 30 %	
TentaGel® HL NH <sub>2</sub> Durchmesser: 75 µm Kapazität: 0,47 mmol/g	Rapp Polymere, HL12902
TentaGel® M NH <sub>2</sub> Durchmesser: 30 µm Kapazität: 0,23 mmol/g	Rapp Polymere, M30352
Toluol (getrocknet)	AppliChem, A0527
Trifluoressigsäure (99 %)	Sigma-Aldrich, T6508
Triisopropylsilan (TIS) (98%)	Sigma-Aldrich, 233781
TWEEN 20	Sigma Aldrich, P7949
α-Cyano-4-hydroxymethylsäure	Bruker, 201344
Polyklonales Maus-IgG (1 mg/mL, Protein A gereinigt)	Sigma Aldrich, PP54
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich, H4034-100G
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, 131669

Es wurden ausschließlich L-Aminosäuren verwendet.

Milli-Q-Wasser wurde mit einem Milli-Q Synthesis/A10 Reinstwassersystem der Firma Millipore (Merck) aufbereitet. Der spezifische Widerstand betrug dabei > 18,2 Ω und der gesamte organische Kohlenstoff < 5 ppb.

## 6.2 Puffer und Lösungen

Der pH-Wert der hergestellten Lösungen wurde mittels pH-Meter überprüft. Die folgenden Puffer und Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
PBS-Puffer, pH 7,4	0,005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	0,1 M NaCl
PBS-Puffer, pH 8	0,005 M NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,095 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
BSA-T-PBS-Puffer, pH 7,4	0,005 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 mol/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 mol/L NaCl 10 g/L BSA 1 mL/L Tween20
MALDI-Matrix	CHCA: 10 mg in ACN/TFA (0,1 Vol.-% in Milli-Q-Wasser, 2/1 (v/v)) 2,5-DHB: 10 mg/mL 2,5-DHB-Lösung (ACN/ TFA (0,1 Vol.-% in Milli-Q-Wasser, 1/1 (v/v)) Super DHB: 10 mg/mL Super-DHB-Lösung (ACN/ TFA (0,1 Vol.-% in Milli-Q-Wasser, 1/1 (v/v)) 2,5-DHAP: 20 mg in Ethanol/ Ammoniumcitrat (18 mg/ml in MilliQ-Wasser) (3: 1 v / v)
<i>Peptide Calibration Standard II</i> - Stammlösung	80 pmol/μl in TFA (0,1 Vol.-% in Wasser)
Kaisertest	Lösung A: 0,28 mol/L Ninhydrin in Ethanol (95%) Lösung B: 42,5 mol/L Phenol in Ethanol (95%) Lösung C: 0,001 mol/L KCN in Pyridin

### 6.3 Geräte

Geräte, Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage: Mettler Toledo XS105DU mit Drucker: Mettler Toledo RS-P42	Mettler-Toledo GmbH
MALDI-Targets: Steel™ 600/384	Bruker Daltonik GmbH
MTP Slide-Adapter II	Bruker Daltonik GmbH
pH-Elektrode, InLab® Micro	Mettler-Toledo GmbH
pH-Meter, pH 211 Microprocessor pH-Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH

Pipetten: Eppendorf Research® (variabel), Transferpette® (variabel)	Eppendorf AG, BRAND
Trockenschrank, Modell 5002	Memmert GmbH & Co. KG
Vortexmischer, Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
High Precision Durchflusszelle, 137-1-40 Größe: 50 x 10 x 1 [mm]	Hellma Analytics
Magnet: Material: NdFeB, Haftkraft: 302 N Größe: 50 x 25 x 12.5 [mm], Pole parallel zur Kante	Magnetkontor
Minizentrifuge: neo-Lab-Minizentrifuge D-6015	neoLab
Analysesieb Ø 100 mm / Maschenweite 100 µm, 551.045.222-027	Linker Industrie-Technik
Spritzenpumpe Pump 11 Elite	Harvard Apparatus
Thermomixer, kompakt, Model: 5350-23169	Eppendorf AG
Vacuum Drying Oven, VDL 23, E2.1	Binder GmbH
Airbrush Pistole Kit AT-AK-01	Agora-Tec

#### 6.4 Verbrauchsmaterialien

Material, Bezeichnung	Firma
Einmalspritzen mit –kanülen, HSW NORM-JECT® (2-teilig, 1 mL, 5 mL)	Henke-Sass, Wolf GmbH
PP-Reaktor 2ml mit PE Fritte und Stempel	Multisyntech
Glass Slides for MALDI Imaging (ITO-Slides)	Bruker Daltonik GmbH
UV-Küvette mikro (70 µL, z = 8,5)	Brand GmbH & Co. KG
Glasobjektträger, Model 7525M, Größe: 75 x 25 [mm]	J. Melvin Freed Brand

HC-1500-SPR-Sensorchip	XanTec
HC-200-SPR-Sensorchip	XanTec
Einmal-Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co. KG
Low retention Tips mit Filter	Brand GmbH & Co. KG
Eppendorf microcentrifuge tube 0,5 mL, 1.5 mL, 2 mL und 5 mL	Eppendorf AG
Eppendorf loBind microcentrifuge tube 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf AG
XYZ-Axis Electrically Conductive Double-Sided Adhesive Tape (9713)	3M™

## 6.5 Analytische Methoden

### MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Gerät	Autoflex III Smartbeam
Firma	Bruker Daltonik GmbH
Ionenquelle	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
Laser	Smartbeam Laser (355 nm), 200 Hz
Analysator	Flugzeitanalysator (TOF)
Spannung	24 kV
Mode	Reflektor, Linear
Software	FlexControl 1.3 (Steuerung), FlexAnalysis 1.0 (Auswertung), BioTools 3.2 (Sequenzierung), Spec2Seq

### UV/Vis-Spektroskopie

Gerät	Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer
Firma	Thermo Fisher Scientific GmbH
Optik	Zweistrahlphotometer, Czerny-Turner-Monochromator
Lichtquelle	Xenon Blitzlampe
Spektrale Bandbreite	Variabel 1 nm, 2 nm
Wellenlängenbereich	190-1100 nm
Detektor	Zwei Silizium-Photodioden

Software Insight 1.4.40 (Steuerung, Auswertung)

### **Microarray-Scanner**

Gerät MArS *microarray scanner*  
 Firma DITABIS AG  
 Laser Solid State Laser: 532 nm; 635 nm  
 Emissionsfilter Grüne Emission (570 nm), Rote Emission (670 nm)  
 Detektor Photomultiplerröhre (PMT)  
 Software SpotScout Pro 1.0

### **SPR**

Gerät R7500DC Dual Channel System  
 Firma Reichert Technologies  
 Autosampler SR8100  
 Pumpe SR8500  
 Flusszelle Zweikanalflusszelle  
 Software SPR Autolink

### **Digitalmikroskop**

Gerät Digital Microscope VHX-600  
 Firma Keyence  
 Detektor 1/1.8-inch CMOS image sensor Virtual pixels: 1600 (H) × 1200 (V)  
 Software Keyence

## 6.6 Peptidsynthese

### 6.6.1 Vorbereitung der Partikel

Die TentaGel HL NH<sub>2</sub> Partikel wurden in DMF vorgequollen und mit DMF gewaschen. HMBA (0.1 mol/L, 4 Äq.), HCTU (7.2 Äq.) und NMM (16 Äq.) wurden in DMF gelöst und für eine Stunde zu den Partikeln gegeben. Die Kopplung wurde wiederholt, gewaschen und die Vollständigkeit der Reaktion mit dem Kaisertest überprüft. Für die Kopplung der ersten Aminosäure wurde Gly-Fmoc und (3 mol/L, 10 Äq.) DIC (5 Äq.) in DCM gelöst und für 20 min bei 2 °C gerührt. Diese Lösung wurde zu den Partikeln gegeben, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von DMAP (0.1 Äq, 50 mmol/l in DMF). Nach 10 h wurden die Partikel mit DMF und DCM gewaschen. Die Reaktion wurde wiederholt (16 h). Im nächsten Schritt wurden die Partikel mit einer Abspalllösung aus DMF/Piperidin (4/1, v/v) für 15 min behandelt und anschließend gewaschen (5x 1 mL DMF, 5x 1 mL DCM, 5x 1 mL DMF). Die Menge abgespaltenen Fmoc-Derivats wurde mittels UV-Spektroskopie quantifiziert. Dafür wurde die Abspalllösung in DMF/Piperidin (4/1, v/v) geeignet verdünnt und in Mikro-Küvetten überführt. Die Absorptionsspektren wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm mit dem UV/VIS-Spektrometer aufgenommen.

### 6.6.2 Peptidsynthese ohne Abbruchsequenzen

Die gesamte Peptidsynthese wurde in einem 2 mL Spritzenreaktor mit Polyethylen-Fritte durchgeführt. Die TentaGel HL NH<sub>2</sub> wurde wie in Kapitel 6.6.1 beschrieben vorbereitet und in einem Spritzenreaktor vorgelegt. Die Aminosäuren wurden, bezogen auf die Beladung der TentaGel-Partikel (8 Äq., 0,1 M) in DMF mit NMM (16 Äq.) als Base und HCTU (7,2 Äq.) als Aktivierungsreagenz, für 1 h gekoppelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5x 1 mL DMF). Nachfolgend wurden die Partikel mit 500 µl Capping-Lösung aus Essigsäureanhydrid/ 2,6-Lutidin/DMF (5/6/89, v/v/v) für 15 min behandelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5 · 1 mL DMF). Im nächsten Schritt wurden die Partikel mit einer Abspalllösung aus DMF/Piperidin (4/1, v/v) für 15 min behandelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5 · 1 mL DMF). Die Menge abgespaltenen Fmoc-Derivats wurde mittels UV-Spektroskopie quantifiziert. Dafür wurde die Abspalllösung in DMF/Piperidin (4/1, v/v) geeignet verdünnt und in Mikro-Küvetten überführt. Die Absorptionsspektren wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm mit dem UV/VIS-Spektrometer aufgenommen.

Die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % Milli-Q-Wasser. Abschließend wurden die Partikel intensiv mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

#### *Synthese des Testpeptids*

Das Testpeptid wurde, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, nach der Fmoc-Peptidsynthesemethode synthetisiert. Dabei wurde die Peptidsequenz DTHFPIGTERSGG unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese hergestellt.

Für die MALDI-TOF-MS-Messung wurde ein Gefäß mit einer Spatelspitze der Partikel in eine Kammer mit 2 mL wässriger Ammoniaklösung (30 % in Wasser) am Boden gestellt. Der HMBA-Linker wurde innerhalb von 2 h gespalten. Die Partikel wurden aus der Kammer genommen und 200 µl einer Lösung von Essigsäure/Milli-Q-Wasser/Acetonitril (3/3/4, v/v/v) wurde zu den Partikeln gegeben. Die Partikel wurden suspendiert und anschließend zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde mit 1 µl CHCA-MALDI-Matrix gemischt und MALDI-TOF-MS gemessen. Der Erfolg der Synthese wurde mittels MALDI-TOF-MS/MS bestätigt (siehe Abbildung 14).

### 6.6.3 Peptidsynthese mit Abbruchsequenzen

Die Fmoc-Aminosäuren wurden bezogen auf die Beladung der TentaGel-Partikel (8 Äq., 0,1 M) und 0,4 Äq. der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäure in DMF mit NMM (16 Äq.) als Base und HCTU (7,2 Äq.) als Aktivierungsreagenz für 1 h gekoppelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5x 1 mL DMF). Nachfolgend wurden die Partikel mit 500 µl Capping-Lösung aus Essigsäureanhydrid/ 2,6-Lutidin/DMF (5/6/89, v/v/v) für 15 min behandelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5 · 1 mL DMF). Im nächsten Schritt wurden die Partikel mit einer Abspalllösung aus DMF/Piperidin (4/1, v/v) für 15 min behandelt und anschließend gewaschen (5 · 1 mL DMF, 5 · 1 mL DCM, 5 · 1 mL DMF). Die Menge abgespaltenen Fmoc-Derivats wurde mittels UV-Spektroskopie quantifiziert. Dafür wurde die Abspalllösung in DMF/Piperidin (4/1, v/v) geeignet verdünnt und in Mikro-Küvetten überführt. Die Absorptionsspektren wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm mit dem UV/VIS-Spektrometer aufgenommen.

Die Abspaltung der permanenten Schutzgruppen erfolgte mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % Milli-Q-Wasser. Abschließend wurden die Partikel intensiv mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

### *Synthese der Testpeptide*

Die Herstellung der Testpeptide (siehe Tabelle 2) wurde in einem 2 mL Spritzenreaktor durchgeführt. Die TentaGel HL NH<sub>2</sub> Partikel wurden wie in Kapitel 6.6.1 beschrieben vorbereitet und in einem Reaktor vorgelegt. Zunächst wurde die Spacer-Sequenz GGGTERS GG unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese (siehe Kapitel 6.6.2.) hergestellt. Die Peptidsequenz nach der Spacer-Sequenz wurde wie im Abschnitt zuvor beschrieben mit Hilfe der Abbruchsequenzmethode synthetisiert.

Für die MALDI-TOF-MS-Messung wurde ein Gefäß mit einer Spatelspitze der Partikel in eine Kammer mit 2 mL wässriger Ammoniaklösung (30 % in Wasser) am Boden gestellt. Der HMBA-Linker wurde innerhalb von 2 h gespalten. Die Partikel wurden aus der Kammer genommen und 200 µl einer Lösung von Essigsäure/Milli-Q-Wasser/Acetonitril (3/3/4, v/v/v) wurde zu den Partikeln gegeben. Die Partikel wurden suspendiert und anschließend zentrifugiert. 1 µl des Überstandes wurde mit 1 µl CHCA-MALDI-Matrix gemischt und MALDI-TOF-MS gemessen. Der Erfolg der Synthese wurde mittels MALDI-TOF-MS/MS bestätigt und ist in Anhang 8.1 dargestellt.

### **6.6.4 Synthese Peptidbibliothek 1<sup>6</sup>**

Für die Synthese der **Peptidbibliothek 1** wurden 20 mg TentaGel HL NH<sub>2</sub> wie in Kapitel 6.6.1 vorbereitet. Die Synthese wurde in 2 mL Spritzenreaktor durchgeführt. Eine Spacer-Sequenz (GGTERS GG) wurde unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert (siehe Kapitel 6.6.2). Das variable Peptidsegment wurde manuell synthetisiert, indem die Partikel in fünf gleiche Aliquote aufgeteilt wurden. Die Kopplung jedes Aliquots wurde unter Verwendung von 8 Äq. jeder Fmoc-geschützten Aminosäure (Thr, Ile, Asp, Lys, Tyr) und 0,4 Äq. der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäure in DMF mit HCTU (4 Äq.) und NMM (8 Äq.) für 1 Stunde oder über Nacht durchgeführt. Alle Aliquote wurden zum Waschen und zur Fmoc-Entschützung gemischt. Dieser Zyklus des Aufteilens und Mischens wurde achtmal wiederholt. Anschließend wurden die Seitenkettenschutzgruppen und Boc-Schutzgruppen, mit 1 mL einer Lösung aus 95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % Milli-Q-Wasser für 2 h abgespalten. Abschließend wurden die Partikel intensiv mit DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

---

<sup>6</sup> Synthese wurde durchgeführt von Mike Lettow.

### 6.6.5 Synthese Peptidbibliothek 2

Für die Synthese der **Peptidbibliothek 2** wurden 500 mg TentaGel HL NH<sub>2</sub> wie in Kapitel 6.6.1 vorbereitet. Eine Spacer-Sequenz (GGGTERS<sub>2</sub>GG) wurde unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert (siehe Kapitel 6.6.2). Das variable Peptidsegment wurde wie in Kapitel 6.6.4 synthetisiert. Die Kopplung jedes Aliquots wurde unter Verwendung von 8 Äq. jeder Fmoc-geschützten Aminosäure (Gly, His, Ile, Ser, Phe, Pro, Glu, Arg) und 0,4 Äq. der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäure durchgeführt. Dieser Zyklus des Aufteilens und Mischens wurde siebenmal wiederholt.

### 6.6.6 Synthese Peptidbibliothek 3<sup>7</sup>

Für die Synthese der **Peptidbibliothek 3** wurden 500 mg TentaGel HL NH<sub>2</sub> wie in Kapitel 6.6.1 vorbereitet. Eine Spacer-Sequenz (GGTERS<sub>2</sub>GG) wurde unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert (siehe Kapitel 6.6.2). Das variable Peptidsegment wurde wie in Kapitel 6.6.2 synthetisiert. Die Kopplung jedes Aliquots wurde unter Verwendung von 8 Äq. jeder Fmoc-geschützten Aminosäure (Gly, Ser, Pro, Glu, Iso, Gln, Arg, Tyr, His, Phe, Trp) und 0,4 Äq. der entsprechenden Boc-geschützten Aminosäure durchgeführt. Dieser Zyklus des Aufteilens und Mischens wurde achtmal wiederholt.

## 6.7 Immobilisierung der Partikel auf ITO-Slides

Es wurden unmittelbar vor der Silanisierung der *ITO-Slides* 80 ml einer 1 Vol-% (3-Glycidylloxypropyl)trimethoxysilan-Lösung in Toluol (mit 1 ml Wasser gesättigt) hergestellt. Die *ITO-Slides* wurden in einem Objektträger-Färbetrog gestellt und die (3-Glycidylloxypropyl)trimethoxysilan Lösung hinzugegeben. Das *ITO-Slide* wurde für 1 h inkubiert und anschließend ausgiebig zuerst mit Toluol und anschließend mit Wasser gewaschen. Die *ITO-Slides* wurden im Trockenschrank bei 90 °C getrocknet und bis zu Verwendung trocken und kühl gelagert.

Eine Spatelspitze der Partikel wurde in 50 µl Phosphatpuffer (pH 8) suspendiert, in eine abgetrennte Silikonkammer einer Silikonmaske (7 · 7 mm, 1,6 mm Tiefe) auf die silanisierten *ITO-Slides* gegeben und diese bei 60 °C in einem Wärmeschrank für 2 h getrocknet. Anschließend wurde ausgiebig mit Phosphatpuffer (pH 8) und Wasser gewaschen und bei RT getrocknet.

---

<sup>7</sup> Synthese wurde durchgeführt von Michael Linke.

## 6.8 Chip Präparation

Ein Glasobjektträger der Größe  $7,5 \cdot 2,5$  cm wurde mit dem Klebeband *XYZ-Axis Electrically Conductive Double-Sided Adhesive Tape* modifiziert. Der modifizierte Objektträger (Chip) wurde in einen speziell angefertigten Halter (BAM, Werkstatt Adlershof) eingespannt. Das Sieb (Maschenweite  $100 \mu\text{m}$ ) wurde auf die modifizierte Oberseite des Chips gedrückt. Die getrockneten Partikel wurden auf dem Sieb verteilt, damit die Partikel die Maschen des Siebes füllen können. Es wurde leichter Druck auf die Partikel ausgeübt, sodass eine Befestigung der Partikel auf der Chipoberfläche gewährleistet wurde. Das Sieb wurde anschließend, mit allen nicht-gebundenen Partikeln entfernt. Auf dem Chip wurde eine Monolayer von geordneten Partikeln erhalten.

## 6.9 Bindungsassay

Für die Bindungsassays wurden die Partikel wie in Kapitel 6.8 beschrieben auf einem Chip immobilisiert. Die Partikel auf dem Chip wurden in PBS-T-BSA (pH 7,5; 0,1 % Tween 20; 1 % BSA) für 1 h vorgequollen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern:

### *Prescreening*

Der sekundäre Antikörper anti-Maus-Atto633-Antikörper wurde 1:10.000 in PBS-T-BSA verdünnt. Der Chip wurde in einer Petrischale mit 10 mL dieser Lösung bedeckt und auf einem Orbitalschüttler bei 50 rpm für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Chip aus der Lösung genommen, dreimal mit Milli-Q-Wasser gewaschen und direkt in den Fluoreszenzscanner überführt. Dabei wurde ein Scan bei einer Laserwellenlänge von 532 nm durchgeführt, um die Partikel mittels Autofluoreszenz zu lokalisieren. Der Scan bei der Wellenlänge 635 nm wurde verwendet, um falsch-positive Partikel zu detektieren. Die PMT-Gain wurde für 532 nm auf 65 % und für 635 nm auf 70% gestellt. Die Auflösung der Scans betrug  $10 \mu\text{m}$ . Zur Regeneration wurde der Chip 30 min in einer wässrigen 6 M Guanidinhydrochloridlösung behandelt, 5 min in MilliQ-Wasser leicht geschüttelt und anschließend dreimal mit PBS-T BSA gewaschen.

### *Target-Screening*

Der primäre Antikörper (Ausgangskonzentration 1 mg/mL) wurde 1: 10.000 in PBS-T BSA verdünnt. Die Inkubation fand in einer Petrischale, auf einem Orbitalschüttler (50 rpm) für 16 h statt. Der Chip wurde anschließend fünfmal mit PBS-T BSA gewaschen. Nach dem Waschen wurde 1 h lang mit dem Anti-Maus-IgG-Atto633-Antikörper (1: 10.000 in PBS-T BSA) inkubiert. Das Fluoreszenzscannen wurde wie beim Prescreening durchgeführt.

#### *Auswertung*

Für die Auswertung wurden die Scans des Prescreenings und Target-Screenings in die Software ImageJ geladen. Für die Identifizierung von positiven Treffern wurden die Scans bei der Wellenlänge 635 nm verwendet. Partikel wurden als positiv gewertet, wenn die detektierte, mittlere Fluoreszenzintensität eines Partikels im Target-Screening dreifach höher war als im Prescreening.

### **6.10 Peptidabspaltung und Matrixauftragung**

Zur Peptidspaltung von der Partikeloberfläche wurde der Chip in eine Kammer mit 2 mL wässriger Ammoniaklösung (30 % in Wasser) am Boden gestellt. Der HMBA-Linker wurde innerhalb von 2 h gespalten. Die Matrixauftragung wurde unter Verwendung einer Airbrush durchgeführt. Pro Chip wurden 2 mL 2,5-DHAP Matrixlösung verwendet. Der Chip wurde 15 cm unter der Spitze der Airbrush platziert. Mit einem konstanten Druck von 2 bar wurde Druckluft durch die Airbrush gegeben. Dies stellte die Bildung einer dünnen Matrixschicht auf der Oberfläche der Partikel sicher.

### **6.11 Sequenzierung mittels MALDI-TOF-MS/MS**

Für die MS/MS-Experimente wurden Partikel auf einem Chip immobilisiert (siehe Kapitel 6.8). Die Peptide wurden mittels Ammoniak von den Partikeln abgespalten und mit Matrix besprüht (Kapitel 6.10). Die MS-Spektren wurden direkt im positiven Reflektronmodus mit einer durchschnittlichen Laserschussanzahl von 500 direkt vom Partikel gemessen. Die MS/MS-Spektren wurden mit durchschnittlich 5500 Laserschüssen aufgenommen. Die Vorläuferionen wurden in einem Massenfenster von  $m/z = \pm 10$  selektiert. Argon wurde als Kollisionsgas benutzt. Die Datenauswertung fand mit Spec2Seq statt, welches automatisch die Fragmentspektren in Peptidsequenzen übersetzt.

## 6.12 Dekodierung der Abbruchsequenzspektren mittels MALDI-TOF-MS

Für die Dekodierung über die Abbruchsequenzen mittels MALDI-TOF-MS wurden die Partikel auf einem Chip immobilisiert (siehe Kapitel 6.8). Die Peptide wurden von den Partikeln abgespalten und die Matrix aufgebracht (siehe Kapitel 6.10). Die Position der ausgewählten Partikel wurde im MALDI angesteuert. Der eingebaute Schrittmotor erlaubte dabei eine Genauigkeit von 5  $\mu\text{m}$ . Die MS-Spektren wurden im positiven Reflektronenmodus mit durchschnittlich 1500 Laserschüssen direkt von den Partikeln erhalten. Die erhaltenen Abbruchsequenzspektren wurden unter Verwendung eines maßgeschneiderten Software Seq2Spec ausgewertet, wobei die entsprechenden Peptidsequenzen automatisch identifiziert wurden.

## 6.13 Magnetische Anreicherung

50 Partikel mit dem FLAG-Peptid wurden mit 26 mg (ca. 1.000.000 Partikel) einer Mischung aus Partikeln mit NK1-NK3-Peptid gemischt. Die Partikel wurden in 1 mL der anti-FLAG-Antikörper (1:10.000 in PBS-T-BSA) für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer (5 · 1 mL) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Partikel in 1 mL der Anti-Maus-Biotin-Ak (1:10.000 in PBS-T-BSA) für 1 h inkubiert und anschließend mit PBS-Puffer (5 · 1 mL) gewaschen. Daraufhin wurden die Partikel in 1 mL BSA-T-PBS-Puffer suspendiert und 10  $\mu\text{L}$  der magnetischen Mikropartikel (PS-MAG-SA, 1,43  $\mu\text{m}$ , Eisenoxid) hinzugegeben.

Die Durchflusszelle wurde an zwei Schlauchstücke angeschlossen. Das eine Schlauchstück wurde an einer Spritze (60 mL) befestigt. Unter der Durchflusszelle wurde ein Magnet positioniert. Die Spritze wurde in eine automatische Spritzenpumpe eingespannt. Das zweite Schlauchstück wurde an einem Zentrifugenröhrchen (50 mL) befestigt. Die Spritze wurde mit dem Laufpuffer (BSA-T-PBS) aufgefüllt. Mit Hilfe der Spritzenpumpe wurde zunächst die Durchflusszelle mit Laufpuffer gespült bis keine Luftblasen mehr vorhanden waren. Von der Spritze wurde das Schlauchstück entfernt. Die vorinkubierten Partikel wurden in den Schlauch überführt und dieser wieder an die Spritze angeschlossen. Der Laufpuffer wurde mit Hilfe der Spritzenpumpe durch die Durchflusszelle gedrückt und in dem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Dabei wurde eine Flussrate von 5 mL/min gewählt. Nachdem die 60 mL Laufpuffer verbraucht waren, wurde der Magnet entfernt und die zurückgehaltenen Partikel aus der Zelle in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführt. Abschließend wurden die Partikel mit PBS-Puffer (5 · 1 mL) und MilliQ (5 · 1 mL) gewaschen.

## 6.14 Screenings

### 6.14.1 Screening zur Methodvalidierung

Für die Methodvalidierung wurden 1,3 mg (ca. 50.000 Partikel) einer Mischung aus Partikeln mit NK-Peptid1, NK-Peptid2 und NK-Peptid3 eingewogen. 50 Partikel mit FLAG-Peptid wurden unter einem Durchlichtmikroskop ausgezählt und mit den 1,3 mg Partikeln gemischt. Um eine vollständige Durchmischung zu garantieren, wurden die Partikel suspendiert, intensiv geschüttelt und anschließend *in vacuo* getrocknet. Die getrockneten Partikel wurden wie in Kapitel 6.8 beschrieben auf einem Chip immobilisiert. Ca. 33.000 Partikel konnten auf dem Chip immobilisiert werden.

Das Prescreening wurde durchgeführt, wie in Kapitel 6.9 beschrieben. Für das Target-Screening wurde der anti-FLAG-Antikörper (1: 10.000 in PBS-T BSA) verwendet und wie in Kapitel 6.9 verfahren. Es konnten 35 Partikel als positiv identifiziert werden. Anschließend wurde der Chip 30 min mit einer wässrigen 6 M Guanidinhydrochloridlösung behandelt, 5 min in Milli-Q-Wasser leicht geschüttelt und ausgiebig mit Milli-Q-Wasser gespült.

Die Peptide wurden von den Partikeln abgespalten und mit MALDI-Matrix besprüht (siehe Kapitel 6.10). Der Chip wurde in den *MTP Slide-Adapter II* gespannt und in das MALDI-TOF-MS eingeschleust. Die Position der 35 positiven Peptide wurde mit einem EXCEL-Script in die MALDI-Positionen umgerechnet. Die Positionen wurden angesteuert und die Peptide von den Partikeln wie in Kapitel 6.12 beschrieben sequenziert.

### 6.14.2 Screening der Peptidbibliothek 1

Eine Spatelspitze der Partikel aus **Peptidbibliothek 1** wurde wie in Kapitel 6.8 beschrieben auf einem Chip immobilisiert. Ca. 12.000 Partikel konnten auf dem Chip immobilisiert werden. Das Prescreening wurde durchgeführt, wie in Kapitel 6.9 beschrieben. Für das Target-Screening wurde der anti-FLAG-Antikörper (1: 10.000 in PBS-T BSA) verwendet und wie in Kapitel 6.9 verfahren. Es konnten 33 Partikel als positiv identifiziert werden. Anschließend wurde der Chip 30 min mit einer wässrigen 6 M Guanidinhydrochloridlösung behandelt, 5 min in Milli-Q-Wasser leicht geschüttelt und ausgiebig mit Milli-Q-Wasser gespült.

Die Peptide wurden von den Partikeln abgespalten und mit MALDI-Matrix besprüht (siehe Kapitel 6.10). Der Chip wurde in den *MTP Slide-Adapter II* gespannt und in das MALDI-TOF-MS eingeschleust. Die Position der 33 positiven Peptide wurde mit einem EXCEL-Script in die MALDI-Positionen umgerechnet. Die Positionen wurden angesteuert und die Peptide von

den Partikeln wie in Kapitel 6.12 beschrieben sequenziert. Zusätzlich wurden 16 Partikel angesteuert und sequenziert, die als negativ identifiziert wurden.

### 6.14.3 Screening der Peptidbibliothek 2

Eine Spatelspitze der Partikel aus **Peptidbibliothek 2** wurde wie Kapitel 6.8 beschrieben auf einem Chip immobilisiert. Ca. 31.000 Partikel konnten auf dem Chip immobilisiert werden. Das Prescreening wurde durchgeführt, wie in Kapitel 6.9 beschrieben. Für das Target-Screening wurde polyklonales Maus-IgG (1: 10.000 in PBS-T BSA) verwendet und wie in Kapitel 6.9 verfahren. Es konnten 18 Partikel als positiv identifiziert werden. Anschließend wurde der Chip 30 min mit einer wässrigen 6 M Guanidinhydrochloridlösung behandelt, 5 min in Milli-Q-Wasser leicht geschüttelt und ausgiebig mit Milli-Q-Wasser gespült.

Die Peptide wurden von den Partikeln abgespalten und mit MALDI-Matrix besprüht (siehe Kapitel 6.10). Der Chip wurde in den *MTP Slide-Adapter II* gespannt und in das MALDI-TOF-MS eingeschleust. Die Position der 18 positiven Peptide wurde mit einem EXCEL-Script in die MALDI-Positionen umgerechnet. Die Positionen wurden angesteuert und die Peptide von den Partikeln wie in Kapitel 6.12 beschrieben sequenziert.

### 6.14.4 Screening der Peptidbibliothek 3

Für **Chip 1** wurden 26 mg der **Peptidbibliothek 3** magnetisch angereichert (siehe Kapitel 6.13). Die angereicherten Partikel wurden erhalten und wie in Kapitel 6.8 beschrieben auf **Chip 1** immobilisiert. Ca. 6000 Partikel wurden immobilisiert. Für **Chip 2** wurde eine Spatelspitze der Partikel aus **Peptidbibliothek 2** wie Kapitel 6.8 beschrieben immobilisiert. Ca. 23.000 Partikel konnten auf dem Chip immobilisiert werden. Beide Chips wurden im Bindungsassay komplett gleich behandelt.

Das Prescreening wurde durchgeführt, wie in Kapitel 6.9 beschrieben. Für das Target-Screening wurde der monoklonale Antikörper BAM-mab 01 (CBZ) (1: 10.000 in PBS-T BSA) verwendet und wie in Kapitel 6.9 verfahren. Es konnten auf **Chip 1** 11 Partikel und auf **Chip 2** zwei Partikel als positiv identifiziert werden. Anschließend wurden die Chips 30 min mit einer wässrigen 6 M Guanidinhydrochloridlösung behandelt, 5 min in Milli-Q-Wasser leicht geschüttelt und ausgiebig mit Milli-Q-Wasser gespült.

Die Peptide wurden von den Partikeln abgespalten und mit MALDI-Matrix besprüht (siehe Kapitel 6.10). Die Chips wurden in den *MTP Slide-Adapter II* gespannt und in das MALDI-

TOF-MS eingeschleust. Die Position der positiven Peptide wurde mit einem EXCEL-Script in die MALDI-Positionen umgerechnet. Die Positionen wurden angesteuert und die Peptide von den Partikeln wie in Kapitel 6.12 beschrieben sequenziert.

## 6.15 SPR-Messungen

### 6.15.1 SPR-Chip-Vorbereitung

Als Fließpuffer wurde während aller Experimente HBS-EP (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Tween 20) verwendet. Die Immobilisierung des Antikörpers wurde auf einem Gold-Biosensor-Chip unter Verwendung des folgenden Amin-Kopplungsprotokolls durchgeführt: Der Kopplungspuffer wurde durch Auflösen von EDC (0,1 M) in MES/NHS-Puffer (50 mM MES, pH 6,0, 0,1 M NHS) hergestellt. Dieser wurde direkt über Probe- und Referenzkanal für 4 min (20  $\mu$ l / min) injiziert. 10  $\mu$ g des Antikörpers wurden in 100  $\mu$ L 1 mM Natriumacetat (pH 5,0) verdünnt und 1,5 min lang (50  $\mu$ l/min) über den Probenkanal injiziert. Abschließend wurden 1 M Ethanolamin in Milli-Q-Wasser für 1 min (20  $\mu$ L/min) sowohl über die Probe als auch über den Referenzkanal injiziert.

### 6.15.2 SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 1

Zwei beim Screening der **Peptidbibliothek 1** identifizierte Peptide, ein Konsenspeptid und das FLAG-Peptid, wurden von peptides & elephants GmbH (Hennigsdorf, Deutschland) synthetisiert. Zur Bestimmung ihrer Affinität wurde ein monoklonaler Anti-FLAG-Antikörper M2 auf einem HC200-Chip immobilisiert (siehe Kapitel 6.15.1). 1  $\mu$ M der Peptide wurde in 1 mL HBS-EP-Puffer gelöst. Die Stammlösung wurde verdünnt (6 nM, 18 nM, 55 nM, 166 nM, 500 nM und 1000 nM). Die Sensogramme wurden durch Injizieren der Verdünnungen sowohl über den Proben- als auch den Referenzkanal für 3,5 min (20  $\mu$ L/min) gemessen. Das auf dem Referenzkanal gemessene Signal wurde von dem auf dem Probenkanal gemessenen Signal subtrahiert. Zur Bestimmung der Affinitätskonstante wurde die Signalintensität des Gleichgewichtszustands gegen die Konzentration des injizierten Peptids aufgetragen. Der Fit der Messpunkte fand mit der Software Origin statt. Dieser Fit folgte Gleichung 4, wodurch die Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte.

### 6.15.3 SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 2

Vier im Screening von Peptidbibliothek 2 identifizierte Peptide wurden unter Verwendung der Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert (siehe Kapitel 6.6.2). Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde polyklonales Maus-IgG auf einem HC1500-Chip immobilisiert (siehe Kapitel 6.15.1). 10  $\mu\text{M}$  der Peptide wurden in 1 mL HBS-EP-Puffer gelöst. Die Stammlösung wurde verdünnt (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ). Die Sensogramme wurden durch Injizieren der Verdünnungen sowohl über den Proben- als auch den Referenzkanal für 5 min (10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gemessen. Das auf dem Referenzkanal gemessene Signal wurde von dem auf dem Probenkanal gemessenen Signal subtrahiert. Zur Bestimmung der Affinitätskonstante wurde die Signalintensität des Gleichgewichtszustands gegen die Konzentration des injizierten Peptids aufgetragen. Der Fit der Messpunkte fand mit der Software Origin statt. Dieser Fit folgte Gleichung 4, wodurch die Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte.

### 6.15.4 SPR-Messung ausgewählter Binder aus Peptidbibliothek 3

Zwei Peptide, die im Screening von **Chip 1** und ein Peptid von **Chip 2** (siehe Kapitel 6.14.3) identifiziert wurden, wurden unter Verwendung von Fmoc-Peptidsynthese synthetisiert.<sup>8</sup> Zusätzlich wurde ein literaturbekanntes Peptid synthetisiert. Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde der monoklonale BAM-mab 01 (CBZ) Antikörper auf einem HC1500-Chip immobilisiert (siehe Kapitel 6.15.1). 10  $\mu\text{M}$  der Peptide wurden in 1 mL HBS-EP-Puffer gelöst. Die Stammlösung wurde verdünnt (1  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 64  $\mu\text{M}$ , 256  $\mu\text{M}$ ). Die Sensogramme wurden durch Injizieren der Verdünnungen sowohl über den Proben- als auch den Referenzkanal für 5 min (10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) gemessen. Das auf dem Referenzkanal gemessene Signal wurde von dem auf dem Probenkanal gemessenen Signal subtrahiert. Zur Bestimmung der Affinitätskonstante wurde die Signalintensität des Gleichgewichtszustands gegen die Konzentration des injizierten Peptids aufgetragen. Der Fit der Messpunkte fand mit der Software Origin statt. Dieser Fit folgte Gleichung 4, wodurch die Dissoziationskonstante ermittelt werden konnte.

---

<sup>8</sup> Synthese wurde durchgeführt von Michael Linke.

## 6.16 Software Spec2Seq

Spec2Seq wurde mit Hilfe der Programmiersprache Java<sup>[179]</sup> entwickelt. Für das Schreiben der Software wurde das *Open-source Integrated Development Environment* (IDE) „Eclipse IDE for Java Developers“<sup>[180]</sup> verwendet. Spec2Seq erlaubt die Übersetzung von Massenspektren in die korrespondierende Aminosäuresequenz. Dabei können Fragmentspektren und Abbruchsequenzspektren ausgewertet werden. Mit dem eingebauten *Fragment-Predictor-Tool* können Peaks, Fragmente und Abbruchsequenzen einer bekannten Sequenz zugeordnet werden. Ein eingebauter Batch-Prozess erlaubt die parallele Analyse mehrerer Spektren. Beim Ausführen der Datei öffnet sich zunächst das Hauptmenü (Abbildung 33), wo die unterschiedlichen Funktionen ausgewählt werden können.

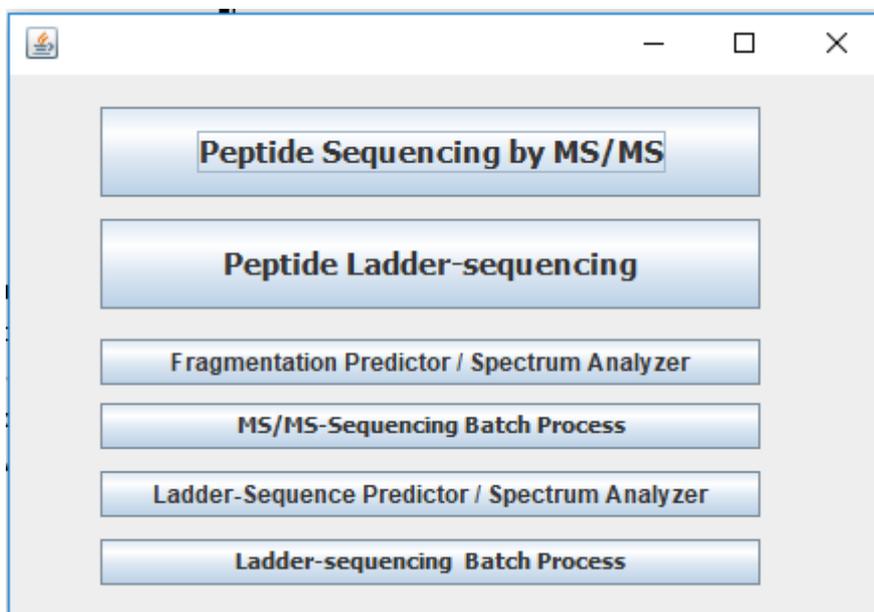


Abbildung 33: Hauptmenü von Spec2Seq.

### 6.16.1 Auswertung von Fragmentspektren mittels Spec2Seq

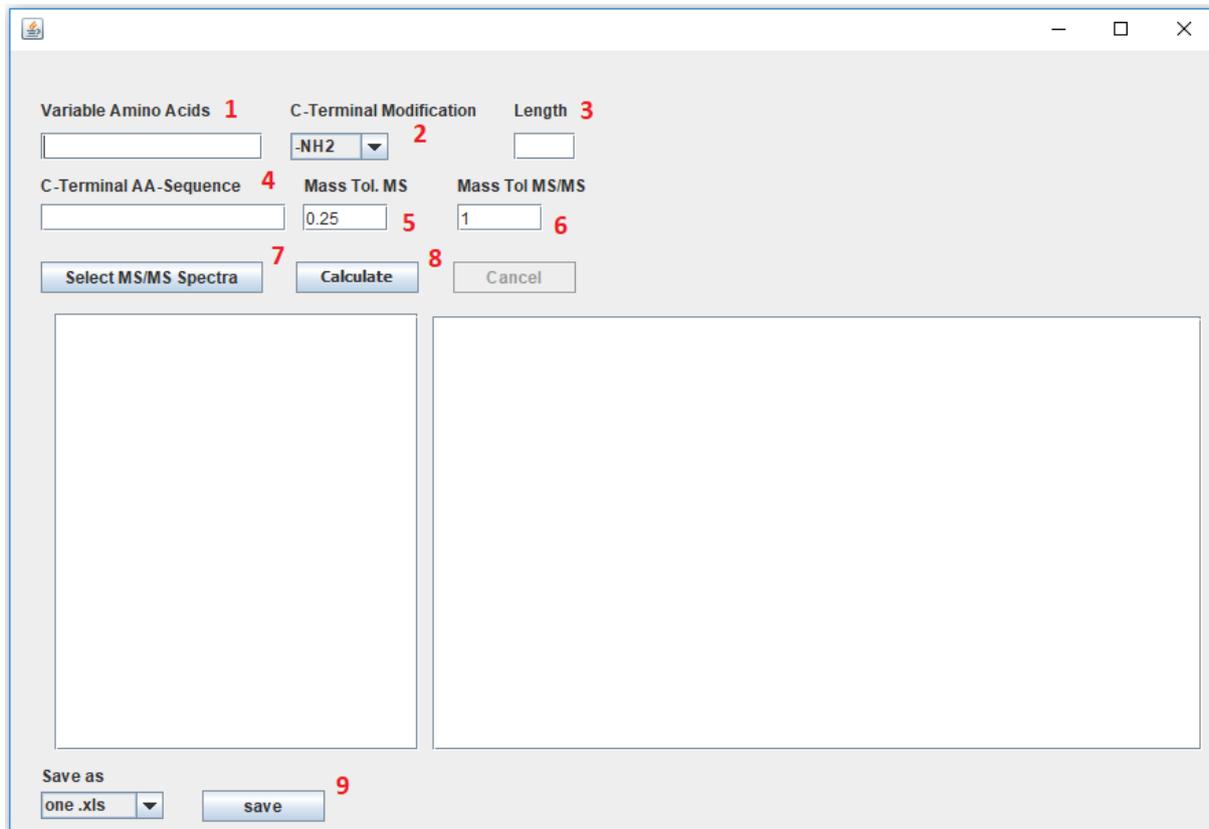
Um die Fragmentspektren auszuwerten, wurde im Hauptmenü die Schaltfläche *Peptide Sequencing by MS/MS* ausgewählt. In einem neuen Fenster (Abbildung 34) konnte die Analyse der Fragmentspektren vorgenommen werden. Dazu mussten zuerst die variablen Aminosäuren festgelegt werden (Abbildung 34, 1). Anschließend musste die C-terminale Modifikation festgelegt werden (Abbildung 34, 2). Da bei der Abspaltung der Peptide von den Partikeln immer das Säureamid entstand, wurde hierbei immer „-NH<sub>2</sub>“ ausgewählt. Konstante Peptidsequenzen

am C- oder N-Terminus wurden definiert (Abbildung 34, **3 bzw. 4**). Hier wurde bei den analysierten Peptiden im Feld *C-Terminal AA-Sequence* die Spacer-Sequenz (z. B. GGG-TERSGG) eingetragen. Durch das Betätigen der Schaltfläche *Select MS/MS-Spectrum* (Abbildung 34, **5**) wurde die ASCII-Datei (z. B. \*.txt oder \*.dat) des Fragmentspektrums ausgewählt. Beim Betätigen der Schaltfläche *Show Peaks* wurde ein Fenster geöffnet, in dem das Spektrum, mit allen für die Analyse berücksichtigten Peaks, angezeigt wurde. Die Anzahl der Aminosäuren, im variablen Segment der Peptidsequenz, wurde im Feld *Length of Peptide* (Abbildung 34, **6**) eingetragen. Die Masse des Vorläuferions wurde automatisch aus der Dateibezeichnung ausgelesen und in das Feld *Parent Mass* eingetragen (Abbildung 34, **7**). Für die Toleranzen bei den Massen des Vorläuferions und der Fragmente wurden die voreingestellten Werte verwendet (Abbildung 34, **8 und 9**). Das Betätigen der Schaltfläche *Calculate* startete die Analyse des Spektrums (Abbildung 34, **10**). Sollten die Ergebnisse in einer externen ASCII-Datei gespeichert werden, wurde die CheckBox bei *Save Results* aktiviert (Abbildung 34, **11**). Die identifizierten Sequenzen wurden, nach Score sortiert, unter *Results* aufgelistet (Abbildung 34, **12**). Das Betätigen der Schaltfläche einer der Sequenzen zeigte das Spektrum mit den jeweils zugeordneten Peaks (siehe Abbildung 20).

**Abbildung 34:** Das Fenster *Peptide Sequencing by MS/MS* der Software Spec2Seq zur Auswertung von Fragmentspektren.

Die Analyse der Fragmentspektren konnte mit der Software auch im Batch-Prozess durchgeführt werden. Hierzu musste im Hauptmenü die Schaltfläche *MS/MS-Sequencing Batch Process* betätigt werden. Daraufhin öffnete sich ein neues Fenster (siehe Abbildung 35). Hierbei musste wie im Abschnitt zuvor beschrieben vorgegangen werden. Das Betätigen der Schaltfläche *Select MS/MS-Spectra* ermöglichte das Öffnen mehrerer ASCII-Dateien gleichzeitig (Abbildung 35, 7). Wichtig hierbei war es, dass die Masse des Vorläuferions in der Dateibezeichnung stand. Durch das Betätigen der Schaltfläche *Calculate* startete die Auswertung (Abbildung 35, 8). Im rechten Fenster der Auswertung wurden die Dateinamen dargestellt. Mit einem einfachen Klick auf den Dateinamen erschienen im linken Fenster der Auswertung die identifizierten Sequenzen. Ein Doppelklick auf die Sequenz öffnete das Spektrum mit den jeweils

zugeordneten Peaks (siehe Abbildung 20). Mit dem Betätigen der *save* Schaltfläche wurden die Ergebnisse in eine Excel-Tabelle exportiert (Abbildung 35, 9).

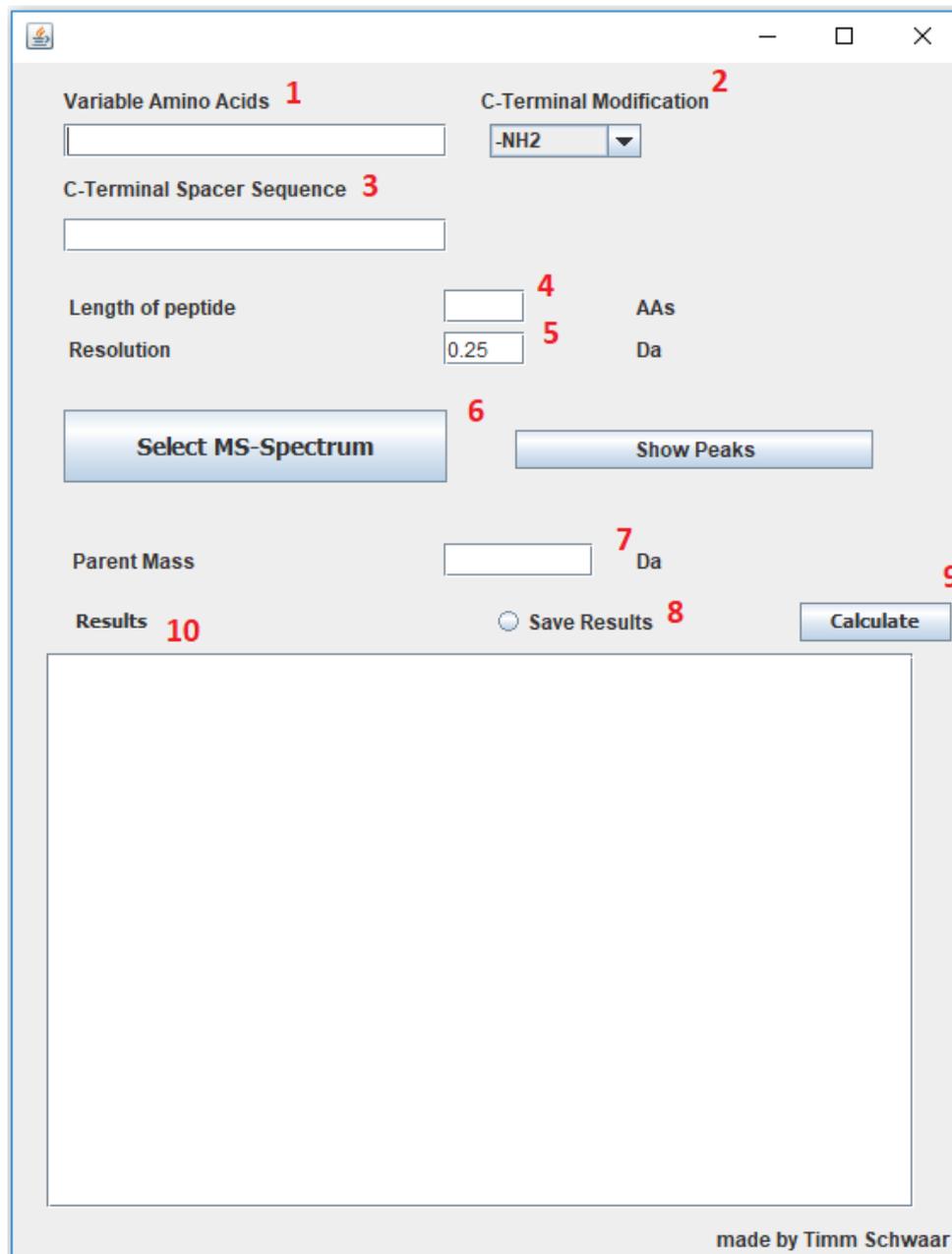


**Abbildung 35:** Das Fenster *MS/MS-Sequencing Batch Process* der Software Spec2Seq zur parallelen Batch-Auswertung mehrerer Fragmentspektren.

### 6.16.2 Auswertung von Abbruchsequenzspektren mittels Spec2Seq

Um die Abbruchsequenzspektren auszuwerten, wurde im Hauptmenü die Schaltfläche *Peptide Ladder-Sequencing* ausgewählt. In einem neuen Fenster (Abbildung 36) konnte die Analyse der Abbruchsequenzspektren vorgenommen werden. Dazu mussten zuerst die variablen Aminosäuren festgelegt werden (Abbildung 36, 1). Hier wurden alle Aminosäuren eingetragen, die zur Synthese der jeweiligen Peptidbibliothek verwendet wurden. Anschließend musste die C-terminale Modifikation festgelegt werden (Abbildung 36, 2). Da bei der Abspaltung der Peptide von den Partikeln immer das Säureamid entstand, wurde hierbei immer „-NH<sub>2</sub>“ ausgewählt. Die Spacer-Sequenz wurde im Feld *C-Terminal Spacer-Sequence* eingetragen (Abbildung 36, 3). Die Anzahl der Aminosäuren, im variablen Segment der Peptidsequenz, wurde im Feld *Length of Peptide* (Abbildung 36, 4) eingetragen. Für die Toleranzen bei den Massen des Vollängenpeptids wurde der voreingestellte Wert von 0,25 Da verwendet (Abbildung 36, 5).

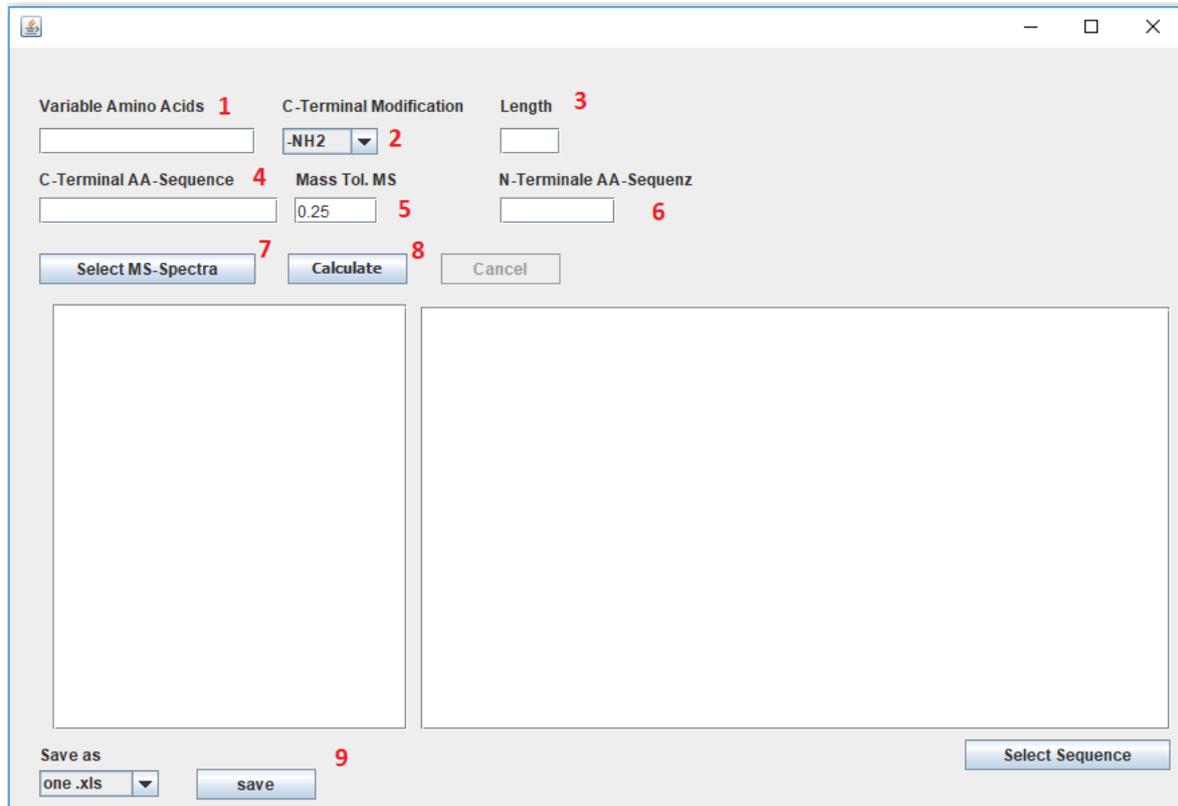
Durch das Betätigen der Schaltfläche *Select MS-Spectrum* (Abbildung 36, **6**) wurde die ASCII-Datei (z. B. \*.txt oder \*.dat) des Abbruchsequenzpektrums ausgewählt. Beim Betätigen der Schaltfläche *Show Peaks* wurde ein Fenster geöffnet, in dem das Spektrum mit allen für die Analyse berücksichtigten Peaks gezeigt wurde. Die Masse des Volllängenpeptids wurde automatisch aus dem Spektrum ausgelesen. Hierfür verwendete Spec2Seq den höchsten Peak im Spektrum. Diese Masse wurde von der Software automatisch in das Feld *Parent Mass* eingetragen (Abbildung 36, **7**). Das Betätigen der Schaltfläche *Calculate* startete die Analyse des Spektrums (Abbildung 36, **9**). Sollten die Ergebnisse in einer externen ASCII-Datei gespeichert werden, wurde die CheckBox bei *Save Results* aktiviert (Abbildung 36, **8**). Die identifizierten Sequenzen wurden nach den gefundenen Abbruchsequenzen sortiert unter *Results* aufgelistet (Abbildung 36, **10**). Doppelklick auf eine der Sequenzen zeigte das Spektrum mit den jeweils zugeordneten Peaks.



**Abbildung 36:** Das Fenster *Peptide Ladder-Sequencing* der Software Spec2Seq zur Auswertung von Abbruchsequenzspektren.

Die Analyse der Abbruchsequenzspektren konnte mit Spec2Seq auch im Batch-Prozess durchgeführt werden. Hierzu musste im Hauptmenü die Schaltfläche *Ladder-sequencing Batch Process* betätigt werden. Daraufhin öffnete sich ein neues Fenster (Abbildung 37). Hierbei musste wie im Abschnitt zuvor beschrieben vorgegangen werden. Das Betätigen der Schaltfläche *Select MS-Spectra* ermöglichte das Öffnen mehrerer ASCII-Dateien gleichzeitig (Abbildung 37, 7). Die Massen des Volllängenpeptids werden im Programm automatisch erfasst. Hierbei wird

immer der intensivste Peak im Spektrum verwendet. Durch das Betätigen der Schaltfläche *Calculate* startet die Auswertung (Abbildung 43, **8**). Im rechten Fenster der Auswertung werden die Dateinamen dargestellt. Mit einem einfachen Klick auf den Dateinamen erscheinen im linken Fenster der Auswertung die identifizierten Sequenzen. Ein Doppelklick auf die Sequenz öffnet das Spektrum mit den jeweils zugeordneten Peaks. Mit dem Betätigen der *save* Schaltfläche werden die Ergebnisse in eine Excel-Tabelle exportiert



**Abbildung 37:** Das Fenster *Ladder-Sequencing Batch Process* der Software Spec2Seq zur Batch-Auswertung mehrere Fragmentspektren parallel.

## 7 Literatur

- [1] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *A one-letter notation for amino acid sequences. Tentative rules*, The Biochemical Journal (1969), **113**, 1-4.
- [2] Top drugs and pharmaceutical companies of 2018 by revenues, <https://www.pharmacompass.com/radio-compass-blog/top-drugs-and-pharmaceutical-companies-of-2018-by-revenues>, Zugegriffen am: 17.12.2019.
- [3] Arzneimittel-Ranking: Welche 10 Medikamente 2018 weltweit die größten Umsätze gebracht haben, <https://deutsch.medscape.com/artikelansicht/4907760>, Zugegriffen am: 17.12.2019.
- [4] G. M. Bartelds, C. A. Wijbrandts, M. T. Nurmohamed, S. Stapel, W. F. Lems, L. Aarden, B. A. Dijkmans, P. P. Tak, G. J. Wolbink, *Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis*, Annals of the rheumatic diseases (2007), **66**, 921-926.
- [5] O. H. Brekke, I. Sandlie, *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*, Nature Reviews Drug Discovery (2003), **2**, 52.
- [6] G. P. Smith, *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*, Science (1985), **228**, 1315-1317.
- [7] They harnessed the power of evolution, <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/>, Zugegriffen am: 17.12.2019.
- [8] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos, *Comparison of the proteolytic susceptibilities of homologous L-amino acid, D-amino acid, and N-substituted glycine peptide and peptoid oligomers*, Drug Development Research (1995), **35**, 20-32.
- [9] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity*, Nature (1991), **354**, 82-84.
- [10] V. V. Komnatnyy, T. E. Nielsen, K. Qvortrup, *Bead-based screening in chemical biology and drug discovery*, Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) (2018), **54**, 6759-6771.
- [11] J. H. Choi, S. Lee, *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*, Applied Microbiology and Biotechnology (2004), **64**, 625-635.
- [12] N. Sethuraman, T. Stadheim, *Challenges in therapeutic glycoprotein production*, Current Opinion in Biotechnology (2006), **17**, 341-346.
- [13] W. W. Su, *Bioreactors, perfusion*, Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (2009), 1-17.
- [14] F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, A. A. Fletcher, *Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus*, Canadian Medical Association Journal (1922), **12**, 141-146.
- [15] R. B. Merrifield, *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide*, Journal of the American Chemical Society (1963), **85**, 2149-2154.
- [16] J. L. Lau, M. K. Dunn, *Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions*, Bioorganic & Medicinal Chemistry (2018), **26**, 2700-2707.
- [17] Y. S. Chang, B. Graves, V. Guerlavais, C. Tovar, K. Packman, K.-H. To, K. A. Olson, K. Kesavan, P. Gangurde, A. Mukherjee, T. Baker, K. Darlak, C. Elkin, Z. Filipovic, F. Z. Qureshi, H. Cai, P. Berry, E. Feyfant, X. E. Shi, J. Horstick, D. A. Annis, A. M. Manning, N. Fotouhi, H. Nash, L. T. Vassilev, T. K. Sawyer, *Stapled  $\alpha$ -helical peptide*

- drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy*, PNAS (2013), **110**, E3445-E3454.
- [18] K. Meerovitch, G. Torkildsen, J. Lonsdale, H. Goldfarb, T. Lama, G. Cumberlidge, G. Ousler III, *Safety and efficacy of MIM-D3 ophthalmic solutions in a randomized, placebo-controlled Phase 2 clinical trial in patients with dry eye*, Clinical ophthalmology (2013), **7**, 1275.
- [19] A. V. Birk, S. Liu, Y. Soong, W. Mills, P. Singh, J. D. Warren, S. V. Seshan, J. D. Pardee, H. Szeto, *The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin*, Journal of the American Society of Nephrology (2013), **24**, 1250-1261.
- [20] V. I. Lyamichev, L. E. Goodrich, E. H. Sullivan, R. M. Bannen, J. Benz, T. J. Albert, J. J. Patel, *Stepwise Evolution Improves Identification of Diverse Peptides Binding to a Protein Target*, Scientific Reports (2017), **7**, 12116.
- [21] P. L. Ey, S. J. Prowse, C. R. Jenkin, *Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose*, Immunochemistry (1978), **15**, 429-436.
- [22] B. Akerström, L. Björck, *A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties*, Journal of Biological Chemistry (1986), **261**, 10240-10247.
- [23] L. Ghitescu, Z. Galis, M. Bendayan, *Protein AG-gold complex: an alternative probe in immunocytochemistry*, Journal of Histochemistry and Cytochemistry (1991), **39**, 1057-1065.
- [24] A. Konrad, A. Eriksson Karlström, S. Hober, *Covalent Immunoglobulin Labeling through a Photoactivable Synthetic Z Domain*, Bioconjugate Chemistry (2011), **22**, 2395-2403.
- [25] B.-M. Kihlberg, A. G. Sjöholm, L. Björck, U. Sjöbring, *Characterization of the Binding Properties of Protein LG, an Immunoglobulin-Binding Hybrid Protein*, European Journal of Biochemistry (1996), **240**, 556-563.
- [26] B. Nilsson, T. Moks, B. Jansson, L. Abrahmsén, A. Elmblad, E. Holmgren, C. Henrichson, T. A. Jones, M. Uhlén, *A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A*, Protein Engineering, Design & Selection (1987), **1**, 107-113.
- [27] W.-C. Lee, K. H. Lee, *Applications of affinity chromatography in proteomics*, Analytical Biochemistry (2004), **324**, 1-10.
- [28] W. Choe, T. A. Durgannavar, S. J. Chung, *Fc-binding ligands of immunoglobulin G: an overview of high affinity proteins and peptides*, Materials (2016), **9**, 994-999.
- [29] A. Xue, W.-W. Zhao, X. Liu, Y. Sun, *Affinity chromatography of human IgG with octapeptide ligands identified from eleven peptide-ligand candidates*, Biochemical Engineering Journal (2016), **107**, 18-25.
- [30] H. G. Svensson, H. R. Hoogenboom, U. Sjöbring, *Protein LA, a novel hybrid protein with unique single-chain Fv antibody- and Fab-binding properties*, European Journal of Biochemistry (1998), **258**, 890-896.
- [31] W. S. Kish, A. D. Naik, S. Menegatti, R. G. Carbonell, *Peptide-Based Affinity Adsorbents with High Binding Capacity for the Purification of Monoclonal Antibodies*, Industrial & Engineering Chemistry Research (2013), **52**, 8800-8811.
- [32] H. Yang, P. V. Gurgel, D. K. Williams Jr, B. G. Bobay, J. Cavanagh, D. C. Muddiman, R. G. Carbonell, *Binding site on human immunoglobulin G for the affinity ligand HWRGWV*, Journal of Molecular Recognition (2010), **23**, 271-282.
- [33] W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos, J. A. Wells, *Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface*, Science (2000), **287**, 1279-1283.
- [34] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Phage display*, Chemical Reviews (Washington, DC, United States) (1997), **97**, 391-410.

- [35] D. A. Marvin, R. D. Hale, C. Nave, M. H. Citterich, *Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages: Ff (fd, fl, M13), Ifl and IKE*, Journal of Molecular Biology (1994), **235**, 260-286.
- [36] H. Qi, H. Lu, H.-J. Qiu, V. Petrenko, A. Liu, *Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction*, Journal of Molecular Biology (2012), **417**, 129-143.
- [37] S. K. Straus, H. E. Bo, *Filamentous bacteriophage proteins and assembly in Virus Protein and Nucleoprotein Complexes*, Springer, **2018**, 261-279.
- [38] D. Enshell-Seijffers, L. Smelyanski, J. M. Gershoni, *The rational design of a 'type 88' genetically stable peptide display vector in the filamentous bacteriophage fd*, Nucleic Acids Research (2001), **29**, 1-13.
- [39] M. Sioud, Ø. Førre, A. Dybwad, *Selection of ligands for polyclonal antibodies from random peptide libraries: potential identification of (auto) antigens that may trigger B and T cell responses in autoimmune diseases*, Clinical Immunology and Immunopathology (1996), **79**, 105-114.
- [40] D. Gang, D. W. Kim, H.-S. Park, *Cyclic peptides: Promising scaffolds for biopharmaceuticals*, Genes (2018), **9**, 556-569.
- [41] H. Kessler, *Conformation and biological activity of cyclic peptides*, Angewandte Chemie International Edition in English (1982), **21**, 512-523.
- [42] S.-M. Lee, E.-J. Lee, H.-Y. Hong, M.-K. Kwon, T.-H. Kwon, J.-Y. Choi, R.-W. Park, T.-G. Kwon, E.-S. Yoo, G.-S. Yoon, *Targeting bladder tumor cells in vivo and in the urine with a peptide identified by phage display*, Molecular cancer research (2007), **5**, 11-19.
- [43] T. Teesalu, K. N. Sugahara, E. Ruoslahti, *Mapping of vascular ZIP codes by phage display in Methods in Enzymology, Vol. 503*, Elsevier, **2012**, 35-56.
- [44] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries*, Nature biotechnology (1997), **15**, 553.
- [45] X. Yan, Z. Xu, *Ribosome-display technology: applications for directed evolution of functional proteins*, Drug discovery today (2006), **11**, 911-916.
- [46] T. N. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor, M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display*, Science (1996), **271**, 1854-1857.
- [47] W. L. Matochko, S. C. Li, S. K. Y. Tang, R. Derda, *Prospective identification of parasitic sequences in phage display screens*, Nucleic Acids Research (2014), **42**, 1784-1798.
- [48] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid*, Proceedings of the National Academy of Sciences (1984), **81**, 3998-4002.
- [49] R. V. D. Zee, W. V. Eden, R. H. Meloen, A. Noordzij, J. D. Van Embden, *Efficient mapping and characterization of a T cell epitope by the simultaneous synthesis of multiple peptides*, European Journal of Immunology (1989), **19**, 43-47.
- [50] R. A. Houghten, *General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids*, Proceedings of the National Academy of Sciences (1985), **82**, 5131-5135.
- [51] K. Nicolaou, X. Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Radiofrequency encoded combinatorial chemistry*, Angewandte Chemie International Edition in English (1995), **34**, 2289-2291.
- [52] T. Aboye, Y. Kuang, N. Neamati, J. A. Camarero, *Rapid Parallel Synthesis of Bioactive Folded Cyclotides by Using a Tea-Bag Approach*, ChemBioChem (2015), **16**, 827-833.
- [53] S. Fodor, J. Read, M. Pirrung, L. Stryer, A. Lu, D. Solas, *Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis*, Science (1991), **251**, 767-773.

- [54] E. LeProust, J. P. Pellois, P. Yu, H. Zhang, X. Gao, O. Srivannavit, E. Gulari, X. Zhou, *Digital light-directed synthesis. A microarray platform that permits rapid reaction optimization on a combinatorial basis*, Journal of Combinatorial Chemistry (2000), **2**, 349-354.
- [55] B. Forsström, B. B. Axnäs, K.-P. Stengele, J. Bühler, T. J. Albert, T. A. Richmond, F. J. Hu, P. Nilsson, E. P. Hudson, J. Rockberg, *Proteome-wide epitope mapping of antibodies using ultra-dense peptide arrays*, Molecular and Cellular Proteomics (2014), **13**, 1585-1597.
- [56] R. Frank, *SPOT-synthesis – an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support*, Tetrahedron (1992), **48**, 9217-9232.
- [57] Z. Wang, R. Laursen, *Multiple peptide synthesis on polypropylene membranes for rapid screening of bioactive peptides*, Peptide research (1992), **5**, 275-280.
- [58] H. Wenschuh, *Positionally addressable parallel synthesis on continuous membranes*, Combinatorial Chemistry (2000), 95-116.
- [59] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures*, International Journal of Peptide and Protein Research (1991), **37**, 487-493.
- [60] M. Lebl, V. Krchňák, S. E. Salmon, K. S. Lam, *Screening of Completely Random One-Bead One-Peptide Libraries for Activities in Solution*, Methods (1994), **6**, 381-387.
- [61] F. García-Martín, M. Quintanar-Audelo, Y. García-Ramos, L. J. Cruz, C. Gravel, R. Furic, S. Côté, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *ChemMatrix, a Poly(ethylene glycol)-Based Support for the Solid-Phase Synthesis of Complex Peptides*, Journal of combinatorial chemistry (2006), **8**, 213-220.
- [62] M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barrett, M. A. Gallop, *Generation and screening of an oligonucleotide-encoded synthetic peptide library*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1993), **90**, 10700-10704.
- [63] J. K. Chen, W. S. Lane, A. W. Brauer, A. Tanaka, S. L. Schreiber, *Biased combinatorial libraries: novel ligands for the SH3 domain of phosphatidylinositol 3-kinase*, Journal of the American Chemical Society (1993), **115**, 12591-12592.
- [64] M. N. Rozinov, G. P. Nolan, *Evolution of peptides that modulate the spectral qualities of bound, small-molecule fluorophores*, Chemistry & Biology (1998), **5**, 713-728.
- [65] J.-E. Jee, J. Lim, H. Hyun, J. Oon, Y. S. Ong, C. Massif, Y.-T. Chang, H. S. Choi, S. S. Lee, *Investigating fluorescent dyes in fluorescence-assisted screenings*, Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom) (2014), **50**, 15220-15223.
- [66] M. Kubo, E. Nashimoto, T. Tokiyo, Y. Morisaki, M. Kodama, H. Hioki, *Development of calixarene-based host molecules for peptides in aqueous media*, Tetrahedron Letters (2006), **47**, 1927-1931.
- [67] T. M. Doran, Y. Gao, K. Mendes, S. Dean, S. Simanski, T. Kodadek, *Utility of Redundant Combinatorial Libraries in Distinguishing High and Low Quality Screening Hits*, Acs Combinatorial Science (2014), **16**, 259-270.
- [68] J. Horsch, P. Wilke, H. Stephanowitz, E. Krause, H. G. Börner, *Fish and Clips: A Convenient Strategy to Identify Tyrosinase Substrates with Rapid Activation Behavior for Materials Science Applications*, ACS Macro Letters (2019), **8**, 724-729.
- [69] M. M. Marani, M. Paradis-Bas, J. Tulla-Puche, S. Côté, S. A. Camperi, O. Cascone, F. Albericio, *From the one-bead-one-compound concept to one-bead-one-reactor*, Journal of combinatorial chemistry (2007), **9**, 395-398.
- [70] H. G. Baek, R. Liu, K. S. Lam, *Development of hydrogel TentaGel shell-core beads for ultrahigh throughput solution-phase screening of encoded OBOC combinatorial small molecule libraries*, Journal of combinatorial chemistry (2009), **11**, 91-102.

- [71] P. Edman, *A method for the determination of the amino acid sequence in peptides*, Archives of Biochemistry (1949), **22**, 475-476.
- [72] J. B. Smith, Peptide Sequencing by Edman Degradation in *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, NJ, **2001**, 1-3.
- [73] J. W. Metzger, S. Stevanović, J. Brünjes, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Electrospray Mass Spectrometry and Multiple Sequence Analysis of Synthetic Peptide Libraries*, Methods (1994), **6**, 425-431.
- [74] A. H. Franz, R. Liu, A. Song, K. S. Lam, C. B. Lebrilla, *High-Throughput One-Bead-One-Compound Approach to Peptide-Encoded Combinatorial Libraries: MALDI-MS Analysis of Single TentaGel Beads*, Journal of Combinatorial Chemistry (2003), **5**, 125-137.
- [75] B.-H. Hu, M. R. Jones, P. B. Messersmith, *Method for Screening and MALDI-TOF MS Sequencing of Encoded Combinatorial Libraries*, Analytical Chemistry (2007), **79**, 7275-7285.
- [76] Y. Yan, A. J. Kusalik, F.-X. Wu, *De novo peptide sequencing using CID and HCD spectra pairs*, PROTEOMICS (2016), **16**, 2615-2624.
- [77] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Letter to the editors*, Biomedical Mass Spectrometry (1984), **11**, 601-601.
- [78] K. F. Medzihradszky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, *The Characteristics of Peptide Collision-Induced Dissociation Using a High-Performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer*, Analytical Chemistry (1999), **72**, 552-558.
- [79] R. Apweiler, A. Bairoch, C. H. Wu, W. C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M. J. Martin, D. A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, L. S. L. Yeh, *UniProt: the Universal Protein knowledgebase*, Nucleic acids research (2004), **32**, D115-D119.
- [80] K. D. Pruitt, T. Tatusova, D. R. Maglott, *NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins*, Nucleic acids research (2005), **33**, 501-504.
- [81] J. Griss, *Spectral library searching in proteomics*, Proteomics (2016), **16**, 729-740.
- [82] H. Lam, E. W. Deutsch, J. S. Eddes, J. K. Eng, N. King, S. E. Stein, R. Aebersold, *Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS*, Proteomics (2007), **7**, 655-667.
- [83] C. Bartels, *Fast algorithm for peptide sequencing by mass spectroscopy*, Biomedical & environmental mass spectrometry (1990), **19**, 363-368.
- [84] B. Ma, K. Zhang, C. Hendrie, C. Liang, M. Li, A. Doherty-Kirby, G. Lajoie, *PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry*, Rapid communications in mass spectrometry (2003), **17**, 2337-2342.
- [85] J. Fernandez-de-Cossio, J. Gonzalez, Y. Satomi, T. Shima, N. Okumura, V. Besada, L. Betancourt, G. Padron, Y. Shimonishi, T. Takao, *Automated interpretation of low-energy collision-induced dissociation spectra by SeqMS, a software aid for de novo sequencing by tandem mass spectrometry*, Electrophoresis: An International Journal (2000), **21**, 1694-1699.
- [86] T. Sakurai, T. Matsuo, H. Matsuda, I. Katakuse, *Paas 3: A computer program to determine probable sequence of peptides from mass spectrometric data*, Biomedical Mass Spectrometry (1984), **11**, 396-399.
- [87] S. Andreotti, G. W. Klau, K. Reinert, *Antilope—A Lagrangian Relaxation Approach to the de novo Peptide Sequencing Problem*, IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics (2012), **9**, 385-394.

- [88] T. Chen, M.-Y. Kao, M. Tepel, J. Rush, G. M. Church, *A dynamic programming approach to de novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry*, Journal of Computational Biology (2001), **8**, 325-337.
- [89] S. A. Robotham, A. P. Horton, J. R. Cannon, V. C. Cotham, E. M. Marcotte, J. S. Brodbelt, *UVnovo: a de novo sequencing algorithm using single series of fragment ions via chromophore tagging and 351 nm ultraviolet photodissociation mass spectrometry*, Analytical Chemistry (2016), **88**, 3990-3997.
- [90] N. H. Tran, X. Zhang, L. Xin, B. Shan, M. Li, *De novo peptide sequencing by deep learning*, Proceedings of the National Academy of Sciences (2017), **114**, 8247-8252.
- [91] K. F. Medzihradzky, R. J. Chalkley, *Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry*, Mass Spectrometry Reviews (2015), **34**, 43-63.
- [92] B. Meyer, D. G. Pappasotiropoulos, M. Karas, *100% protein sequence coverage: a modern form of surrealism in proteomics*, Amino Acids (2011), **41**, 291-310.
- [93] S. Bringans, T. S. Kendrick, J. Lui, R. Lipscombe, *A comparative study of the accuracy of several de novo sequencing software packages for datasets derived by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray*, Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry (2008), **22**, 3450-3454.
- [94] S. Brenner, R. A. Lerner, *Encoded combinatorial chemistry*, Proceedings of the National Academy of Sciences (1992), **89**, 5381-5383.
- [95] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *The Generality of DNA-Templated Synthesis as a Basis for Evolving Non-Natural Small Molecules*, Journal of the American Chemical Society (2001), **123**, 6961-6963.
- [96] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanskaya, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuzzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Geftter, S. P. Hale, N. J. V. Hansen, D. I. Israel, J. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. Tang, K. van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. Zhao, B. A. Morgan, *Design, synthesis and selection of DNA-encoded small-molecule libraries*, Nature Chemical Biology (2009), **5**, 647-654.
- [97] A. B. MacConnell, P. J. McEnaney, V. J. Cavett, B. M. Paegel, *DNA-Encoded Solid-Phase Synthesis: Encoding Language Design and Complex Oligomer Library Synthesis*, Acs Combinatorial Science (2015), **17**, 518-534.
- [98] L. Marcon, B. J. Battersby, A. Rühmann, K. Ford, M. Daley, G. A. Lawrie, M. Trau, *'On-the-fly' optical encoding of combinatorial peptide libraries for profiling of protease specificity*, Molecular bioSystems (2010), **6**, 225-233.
- [99] R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough, *Matrix-assisted laser-desorption ionization for rapid-determination of the sequences of biologically-active peptides isolated from support-bound combinatorial peptide libraries*, Rapid Communications in Mass Spectrometry (1994), **8**, 77-81.
- [100] P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *Oligosaccharide Mimetics Obtained by Novel, Rapid Screening of Carboxylic Acid Encoded Glycopeptide Libraries*, Journal of the American Chemical Society (1998), **120**, 13312-13320.
- [101] C. O'Brien, D. R. Flower, C. Feighery, *Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules*, Immunome research (2008), **4**, 1-7.
- [102] H. R. Hulett, W. A. Bonner, J. Barrett, L. A. Herzenberg, *Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence*, Science (1969), **166**, 747-749.
- [103] M. Hintersteiner, M. Auer, *A two-channel detection method for autofluorescence correction and efficient on-bead screening of one-bead one-compound combinatorial*

- libraries using the COPAS fluorescence activated bead sorting system*, *Methods and applications in fluorescence* (2013), **1**, 1-7.
- [104] L. A. Fernandez, E. W. Hatch, B. Armann, J. S. Odorico, D. A. Hullett, H. W. Sollinger, M. S. Hanson, *Validation of large particle flow cytometry for the analysis and sorting of intact pancreatic islets*, *Transplantation* (2005), **80**, 729-737.
- [105] C.-F. Cho, B. Behnam Azad, L. G. Luyt, J. D. Lewis, *High-Throughput Screening of One-Bead–One-Compound Peptide Libraries Using Intact Cells*, *Acs Combinatorial Science* (2013), **15**, 393-400.
- [106] O. Erharuyi, S. Simanski, P. J. McEnaney, T. Kodadek, *Screening one bead one compound libraries against serum using a flow cytometer: Determination of the minimum antibody concentration required for ligand discovery*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2018), 2773-2778.
- [107] W. Z. Wang, Z. H. Wang, X. L. Bu, R. Li, M. X. Zhou, Z. Y. Hu, *Discovering of Tumor-targeting Peptides using Bi-functional Microarray*, *Advanced Healthcare Materials* (2015), **4**, 2802-2808.
- [108] W. Wang, M. Li, Z. Wei, Z. Wang, X. Bu, W. Lai, S. Yang, H. Gong, H. Zheng, Y. Wang, Y. Liu, Q. Li, Q. Fang, Z. Hu, *Bimodal Imprint Chips for Peptide Screening: Integration of High-Throughput Sequencing by MS and Affinity Analyses by Surface Plasmon Resonance Imaging*, *Analytical Chemistry* (2014), **86**, 3703-3707.
- [109] Z. Wang, W. Wang, L. Geng, Z. Hu, *Distinguishing of tumor cell-targeting peptide ligands through a color-encoding microarray*, *Lab on a Chip* (2015), **15**, 4512-4516.
- [110] J. M. Astle, L. S. Simpson, Y. Huang, M. M. Reddy, R. Wilson, S. Connell, J. Wilson, T. Kodadek, *Seamless bead to microarray screening: rapid identification of the highest affinity protein ligands from large combinatorial libraries*, *Chemistry & Biology* (2010), **17**, 38-45.
- [111] K. Mendes, J. M. Ndungu, L. F. Clark, T. Kodadek, *Optimization of the Magnetic Recovery of Hits from One-Bead-One-Compound Library Screens*, *Combinatorial Science* (2015), **17**, 506-517.
- [112] C.-F. Cho, K. Lee, M.-C. Speranza, F. C. Bononi, M. S. Viapiano, L. G. Luyt, R. Weissleder, E. A. Chiocca, H. Lee, S. E. Lawler, *Design of a microfluidic chip for magnetic-activated sorting of one-bead-one-compound libraries*, *Combinatorial Science* (2016), **18**, 271-278.
- [113] C.-F. Cho, G. A. Amadei, D. Breadner, L. G. Luyt, J. D. Lewis, *Discovery of Novel Integrin Ligands from Combinatorial Libraries Using a Multiplex “Beads on a Bead” Approach*, *Nano Letters* (2012), **12**, 5957-5965.
- [114] M. Oh, J. H. Lee, W. Wang, H. S. Lee, W. S. Lee, C. Burlak, W. Im, Q. Q. Hoang, H.-S. Lim, *Potential pharmacological chaperones targeting cancer-associated MCL-1 and Parkinson disease-associated  $\alpha$ -synuclein*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2014), **111**, 11007-11012.
- [115] E. Engvall, P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes*, *The Journal of Immunology* (1972), **109**, 129-135.
- [116] B. Friguet, A. F. Chaffotte, L. Djavadi-Ohanian, M. E. Goldberg, *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*, *Journal of Immunological Methods* (1985), **77**, 305-319.
- [117] J. D. Beatty, B. G. Beatty, W. G. Vlahos, *Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay*, *Journal of Immunological Methods* (1987), **100**, 173-179.
- [118] A. Galkin, A. Komar, Y. Gorshunov, A. Besarab, V. Soloviova, *New monoclonal antibodies to the prostate-specific antigen: obtaining and studying biological*

- properties*, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences (2019), **2019**, 573-577.
- [119] Z. Qiao, X. Li, N. Kang, Y. Yang, C. Chen, T. Wu, M. Zhao, Y. Liu, X. Ji, *A Novel Specific Anti-CD73 Antibody Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Cell Motility by Regulating Autophagy*, International journal of molecular sciences (2019), **20**, 1057-1068.
- [120] A. J. Pesce, J. G. Michael, *Artifacts and limitations of enzyme immunoassay*, Journal of Immunological Methods (1992), **150**, 111-119.
- [121] M. E. Goldberg, L. Djavadi-Ohanian, *Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA*, Current opinion in immunology (1993), **5**, 278-281.
- [122] R. H. Ritchie, *Plasma losses by fast electrons in thin films*, Physical review (1957), **106**, 874-881.
- [123] S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, K.-T. Yong, *Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications*, Chemical Society Reviews (2014), **43**, 3426-3452.
- [124] D. G. Myszka, *Improving biosensor analysis*, Journal of Molecular Recognition (1999), **12**, 279-284.
- [125] R. J. Ober, E. S. Ward, *The choice of reference cell in the analysis of kinetic data using BIAcore*, Analytical Biochemistry (1999), **271**, 70-80.
- [126] L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hämäläinen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, Å. F. Karlsson, A. Plückthun, *BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip*, Analytical Biochemistry (1997), **252**, 217-228.
- [127] P. A. Van Der Merwe, *Surface plasmon resonance*, Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry (2001), **1**, 137-170.
- [128] M.-D. Duong-Thi, G. Bergström, C.-F. Mandenius, M. Bergström, T. Fex, S. Ohlson, *Comparison of weak affinity chromatography and surface plasmon resonance in determining affinity of small molecules*, Analytical Biochemistry (2014), **461**, 57-59.
- [129] B. A. Prabowo, A. Purwidyantri, K.-C. Liu, *Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology*, Biosensors (2018), **8**, 80-107.
- [130] T. Wilkop, Z. Wang, Q. Cheng, *Analysis of  $\mu$ -contact printed protein patterns by SPR imaging with a LED light source*, Langmuir (2004), **20**, 11141-11148.
- [131] L. N. Wafer, W. W. Streicher, S. A. McCallum, G. I. Makhatadze, *Thermodynamic and kinetic analysis of peptides derived from CapZ, NDR, p53, HDM2, and HDM4 binding to human S100B*, Biochemistry (2012), **51**, 7189-7201.
- [132] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter*, Analytical Biochemistry (1989), **179**, 131-137.
- [133] J. Angulo, P. M. Enriquez-Navas, P. M. Nieto, *Ligand–receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: the binding isotherm of STD initial growth rates*, Chemistry–A European Journal (2010), **16**, 7803-7812.
- [134] L. Fielding, *NMR methods for the determination of protein–ligand dissociation constants*, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2007), **51**, 219-242.
- [135] W. Becker, K. C. Bhattiprolu, N. Gubensäk, K. Zangger, *Investigating Protein–Ligand Interactions by Solution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, ChemPhysChem (2018), **19**, 895-906.
- [136] W. B. Dandliker, S. P. Halbert, M. C. Florin, R. Alonso, H. C. Schapiro, *Study of penicillin antibodies by fluorescence polarization and immunodiffusion*, The Journal of Experimental Medicine (1965), **122**, 1029-1048.
- [137] G. Weber, *Polarization of the fluorescence of macromolecules. 1. Theory and experimental method*, Biochemical Journal (1952), **51**, 145.

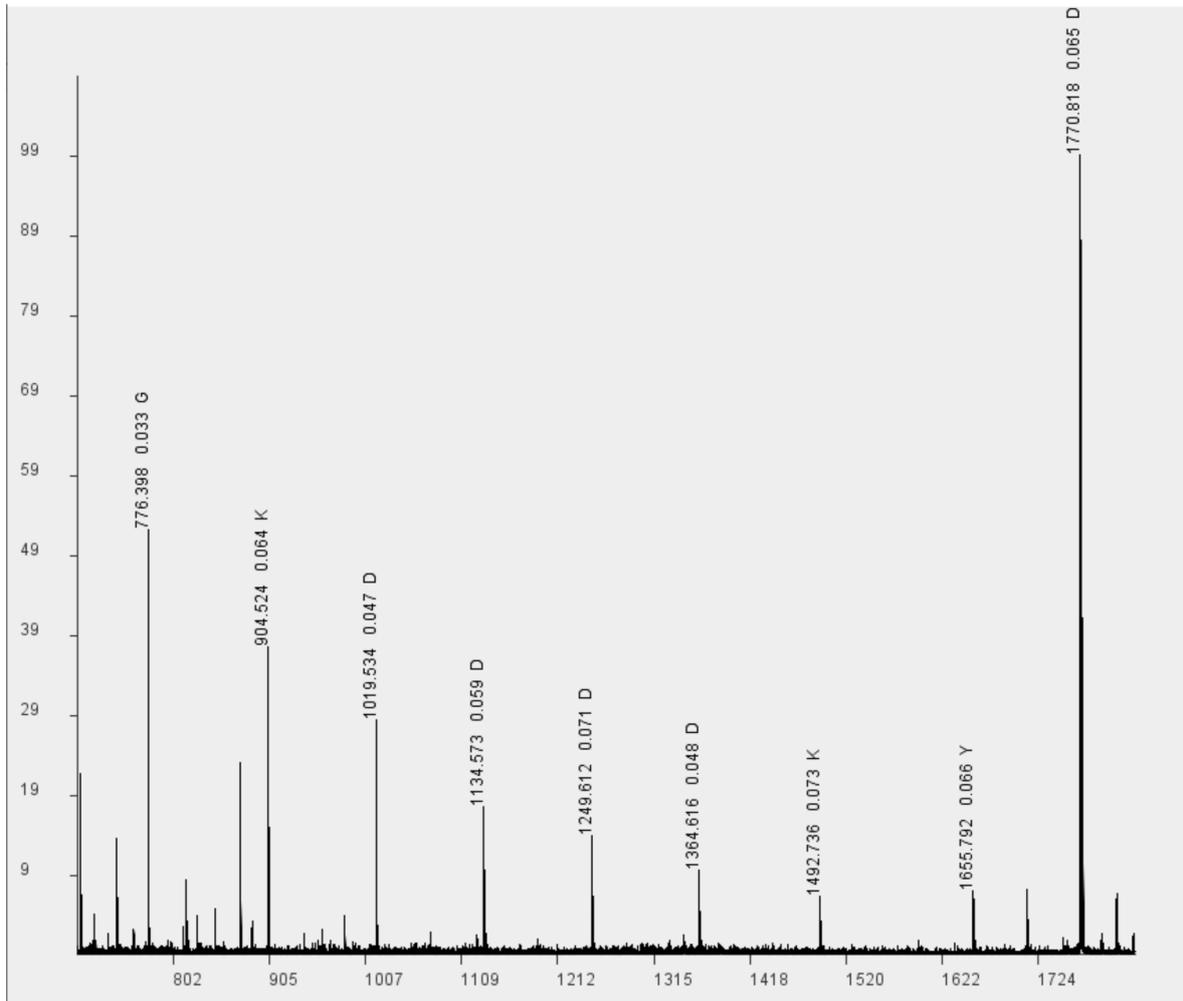
- [138] D. S. Smith, S. A. Eremin, *Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules*, Analytical and Bioanalytical Chemistry (2008), **391**, 1499-1507.
- [139] C. Ludwig, *Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösung*, Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften Math.-naturw. (1856), **Klasse Abt. I.**, 539.
- [140] C. J. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis*, Nature Communications (2010), **1**, 100-107.
- [141] M. Jerabek-Willemsen, T. André, R. Wanner, H. M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, D. Breitsprecher, *MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond*, Journal of Molecular Structure (2014), **1077**, 101-113.
- [142] T. Schwaar, *Entwicklung von multidimensionalen Hochdurchsatzmethoden zur Analyse von partikelbasierten Peptidbibliotheken*, Humboldt-Universität zu Berlin (Berlin), **2015**.
- [143] P. Carl, I. I. Ramos, M. A. Segundo, R. J. Schneider, *Antibody conjugation to carboxyl-modified microspheres through N-hydroxysuccinimide chemistry for automated immunoassay applications: A general procedure*, PLoS One (2019), **14**, 1-18.
- [144] A. Semmler, R. Weber, M. Przybylski, V. Wittmann, *De Novo Sequencing of Peptides on Single Resin Beads by MALDI-FTICR Tandem Mass Spectrometry*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry (2010), **21**, 215-219.
- [145] D. Remmler, T. Schwaar, M. Pickhardt, C. Donth, E. Mandelkow, M. G. Weller, H. G. Börner, *On the way to precision formulation additives: 2D-screening to select solubilizers with tailored host and release capabilities*, Journal of Controlled Release (2018), **285**, 96-105.
- [146] A. M. Bray, R. M. Valerio, N. J. Maeji, *Cleavage of resin-bound peptide esters with ammonia vapour. Simultaneous multiple synthesis of peptide amides*, Tetrahedron Letters (1993), **34**, 4411-4414.
- [147] E. Krause, H. Wenschuh, P. R. Jungblut, *The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins*, Analytical Chemistry (1999), **71**, 4160-4165.
- [148] A. Wattenberg, A. J. Organ, K. Schneider, R. Tyldesley, R. Bordoli, R. H. Bateman, *Sequence dependent fragmentation of peptides generated by MALDI quadrupole time-of-flight (MALDI Q-TOF) mass spectrometry and its implications for protein identification*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry (2002), **13**, 772-783.
- [149] T. Ganz, *Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation*, Blood (2003), **102**, 783-788.
- [150] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, *Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation*, Analytical Chemistry (1994), **66**, 3281-3287.
- [151] M. Roth, J. Kim, E. Maresh, D. Plymire, J. Corbett, J. Zhang, S. Patrie, *Thin-Layer Matrix Sublimation with Vapor-Sorption Induced Co-Crystallization for Sensitive and Reproducible SAMDI-TOF MS Analysis of Protein Biosensors*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry (2012), **23**, 1661-1669.
- [152] M. Karas, R. Krüger, *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*, Chemical Reviews (Washington, DC, United States) (2003), **103**, 427-440.
- [153] S. Munro, H. R. Pelham, *Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of Drosophila hsp 70*, The EMBO Journal (1984), **3**, 3087-3093.

- [154] A. Einhauer, A. Jungbauer, *The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods (2001), **49**, 455-465.
- [155] D. Firsov, L. Schild, I. Gautschi, A.-M. Mérillat, E. Schneeberger, B. C. Rossier, *Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach*, Proceedings of the National Academy of Sciences (1996), **93**, 15370-15375.
- [156] W. Srila, M. Yamabhai, *Identification of Amino Acid Residues Responsible for the Binding to Anti-FLAG™ M2 Antibody Using a Phage Display Combinatorial Peptide Library*, Applied Biochemistry and Biotechnology (2013), **171**, 583-589.
- [157] T. P. Roosild, S. Castronovo, S. Choe, *Structure of anti-FLAG M2 Fab domain and its use in the stabilization of engineered membrane proteins*, Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications (2006), **62**, 835-839.
- [158] M. Hintersteiner, T. Kimmerlin, F. Kalthoff, M. Stoeckli, G. Garavel, J. M. Seifert, N. C. Meisner, V. Uhl, C. Buehler, T. Weidemann, M. Auer, *Single Bead Labeling Method for Combining Confocal Fluorescence On-Bead Screening and Solution Validation of Tagged One-Bead One-Compound Libraries*, Chemistry & Biology (2009), **16**, 724-735.
- [159] H. Ding, W. M. Proding, J. Kopeček, *Two-Step Fluorescence Screening of CD21-Binding Peptides with One-Bead One-Compound Library and Investigation of Binding Properties of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer–Peptide Conjugates*, Biomacromolecules (2006), **7**, 3037-3046.
- [160] ImageJ (1.48v), National Institutes of Health, **2012**.
- [161] BioTools (3.2), Bruker, **2011**.
- [162] S. Celasun, D. Remmler, T. Schwaar, M. G. Weller, F. Du Prez, H. G. Börner, *Digging into the Sequential Space of Thiolactone Precision Polymers: A Combinatorial Strategy to Identify Functional Domains*, **58**, 1960-1964.
- [163] S. Ickert, T. Schwaar, A. Springer, M. Grabarics, J. Riedel, S. Beck, K. Pagel, M. W. Linscheid, *Comparison of the fragmentation behavior of DNA and LNA single strands and duplexes*, Journal of Mass Spectrometry (2019), **54**, 402-411.
- [164] J. W. Slootstra, D. Kuperus, A. Plückthun, R. H. Meloen, *Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies M1, M2 and M5*, Molecular Diversity (1997), **2**, 156-164.
- [165] G. E. Crooks, G. Hon, J.-M. Chandonia, S. E. Brenner, *WebLogo: a sequence logo generator*, Genome research (2004), **14**, 1188-1190.
- [166] M. Huang, Q. Ma, X. Liu, B. Li, H. Ma, *Initiator integrated poly (dimethylsiloxane)-based microarray as a tool for revealing the relationship between nonspecific interactions and irreproducibility*, Analytical Chemistry (2015), **87**, 7085-7091.
- [167] X. Chen, P. H. Tan, Y. Zhang, D. Pei, *On-bead screening of combinatorial libraries: reduction of nonspecific binding by decreasing surface ligand density*, Journal of combinatorial chemistry (2009), **11**, 604-611.
- [168] S. Menegatti, B. G. Bobay, K. L. Ward, T. Islam, W. S. Kish, A. D. Naik, R. G. Carbonell, *Design of protease-resistant peptide ligands for the purification of antibodies from human plasma*, Journal of Chromatography A (2016), **1445**, 93-104.
- [169] H. W. Schroeder Jr, J. L. Hillson, R. M. Perlmutter, *Structure and evolution of mammalian VH families*, International Immunology (1990), **2**, 41-50.
- [170] D. Lancet, E. Sadovsky, E. Seidemann, *Probability model for molecular recognition in biological receptor repertoires: significance to the olfactory system*, Proceedings of the National Academy of Sciences (1993), **90**, 3715.

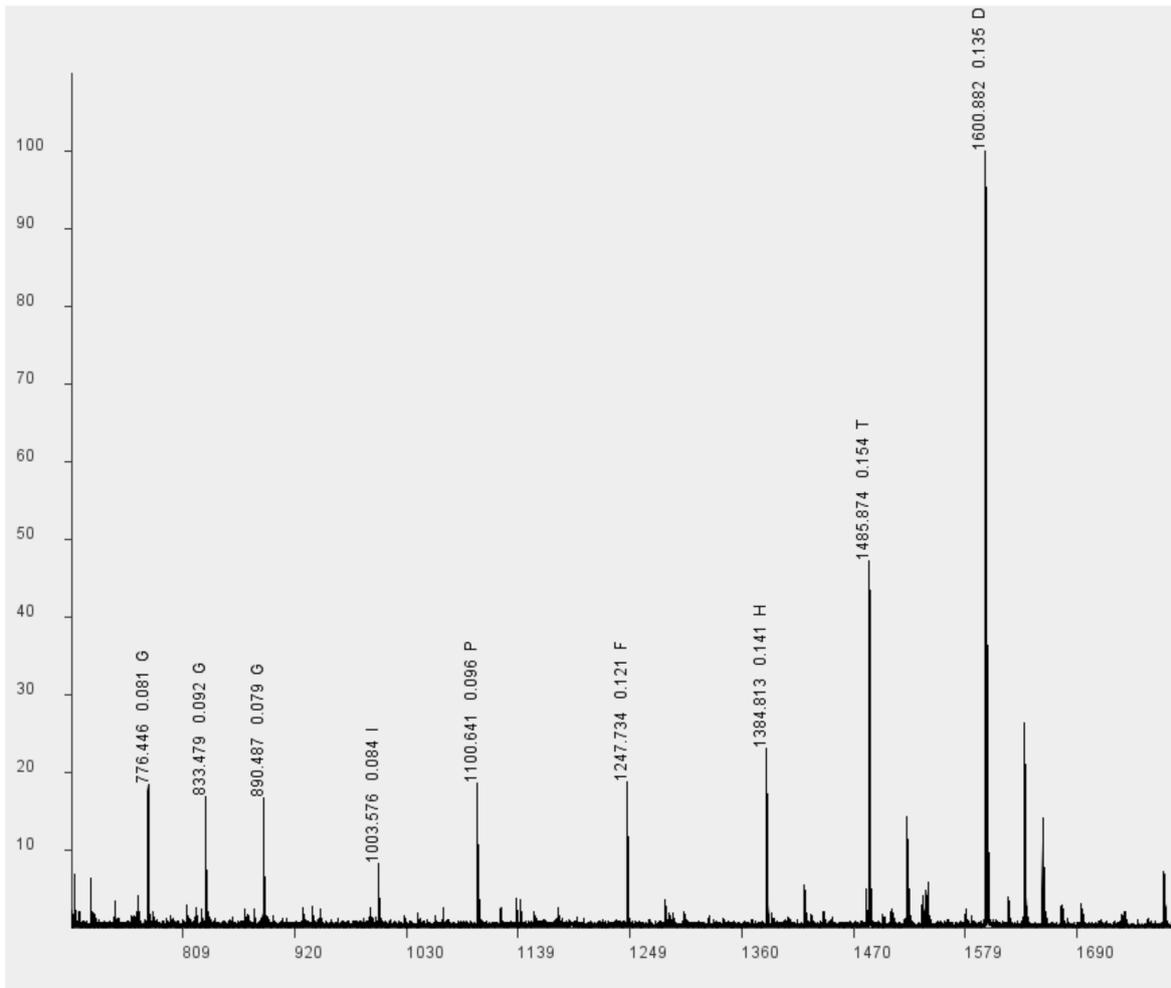
- [171] A. J. de Jesus, T. W. Allen, *The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2013), **1828**, 864-876.
- [172] C. A. Hunter, J. Singh, J. M. Thornton,  *$\pi$ - $\pi$  interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins*, *Journal of Molecular Biology* (1991), **218**, 837-846.
- [173] N. M. Green, *Avidin. 1. The use of [(14)C]biotin for kinetic studies and for assay*, *Biochemical Journal* (1963), **89**, 585-591.
- [174] L. Oberleitner, U. Dahmen-Levison, L.-A. Garbe, R. J. Schneider, *Improved strategies for selection and characterization of new monoclonal anti-carbamazepine antibodies during the screening process using feces and fluorescence polarization immunoassay*, *Analytical Methods* (2016), **8**, 6883-6894.
- [175] H. Yang, P. V. Gurgel, R. G. Carbonell, *Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography*, *Journal of Chromatography A* (2009), **1216**, 910-918.
- [176] T. L. McMeekin, M. Wilensky, M. L. Groves, *Refractive indices of proteins in relation to amino acid composition and specific volume*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1962), **7**, 151-156.
- [177] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS*, *Analytical Chemistry* (1997), **69**, 4751-4760.
- [178] M. Paschke, *Phage display systems and their applications*, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2006), **70**, 2-11.
- [179] Java SE Development Kit (8u231), Oracle Corporation, **2019**.
- [180] Eclipse IDE for Java Developers (Luna Service Release 2 (4.4.2)), Eclipse Foundation, Inc., **2015**.

## 8 Anhang

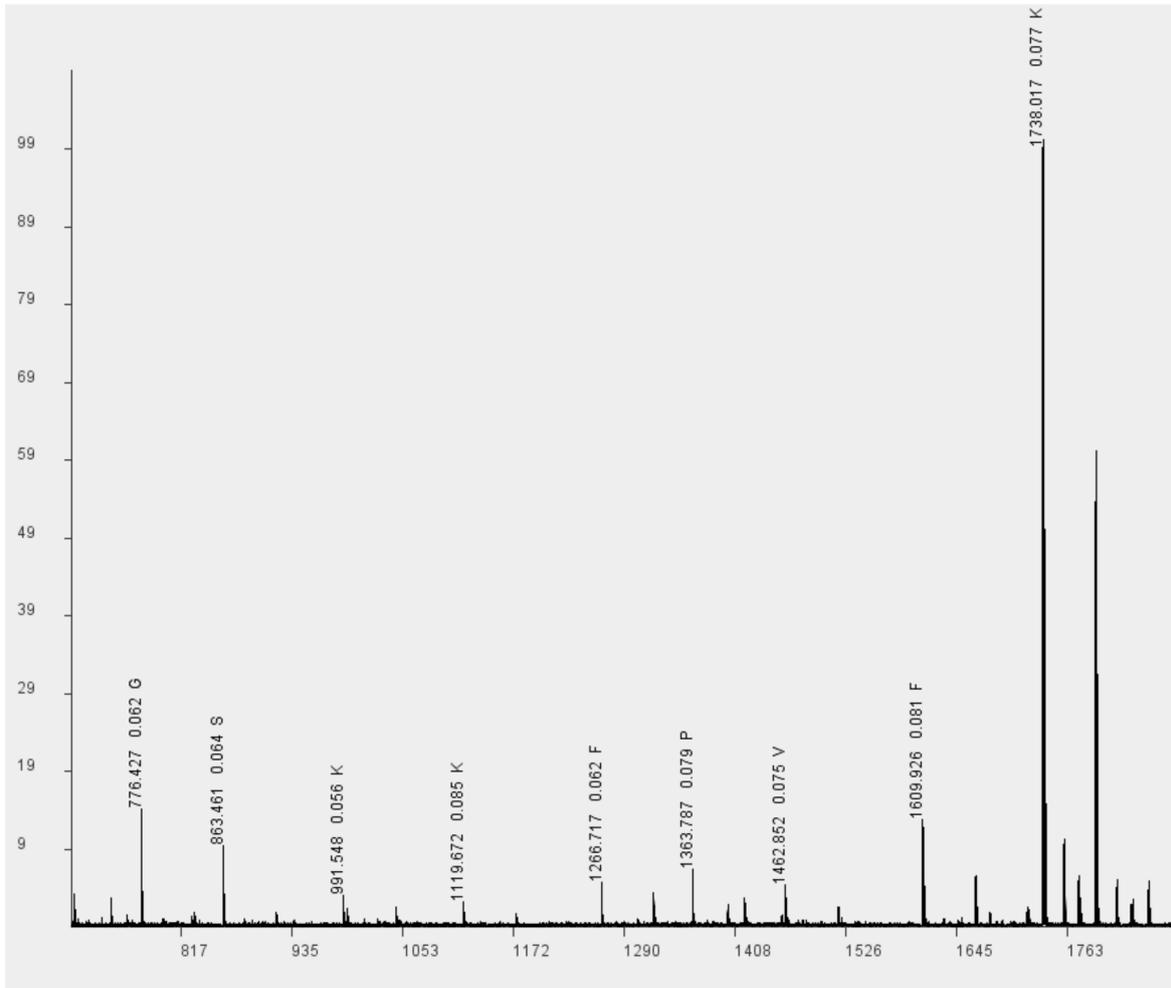
### 8.1 MALDI-TOF-MS-Messungen der Testpeptide



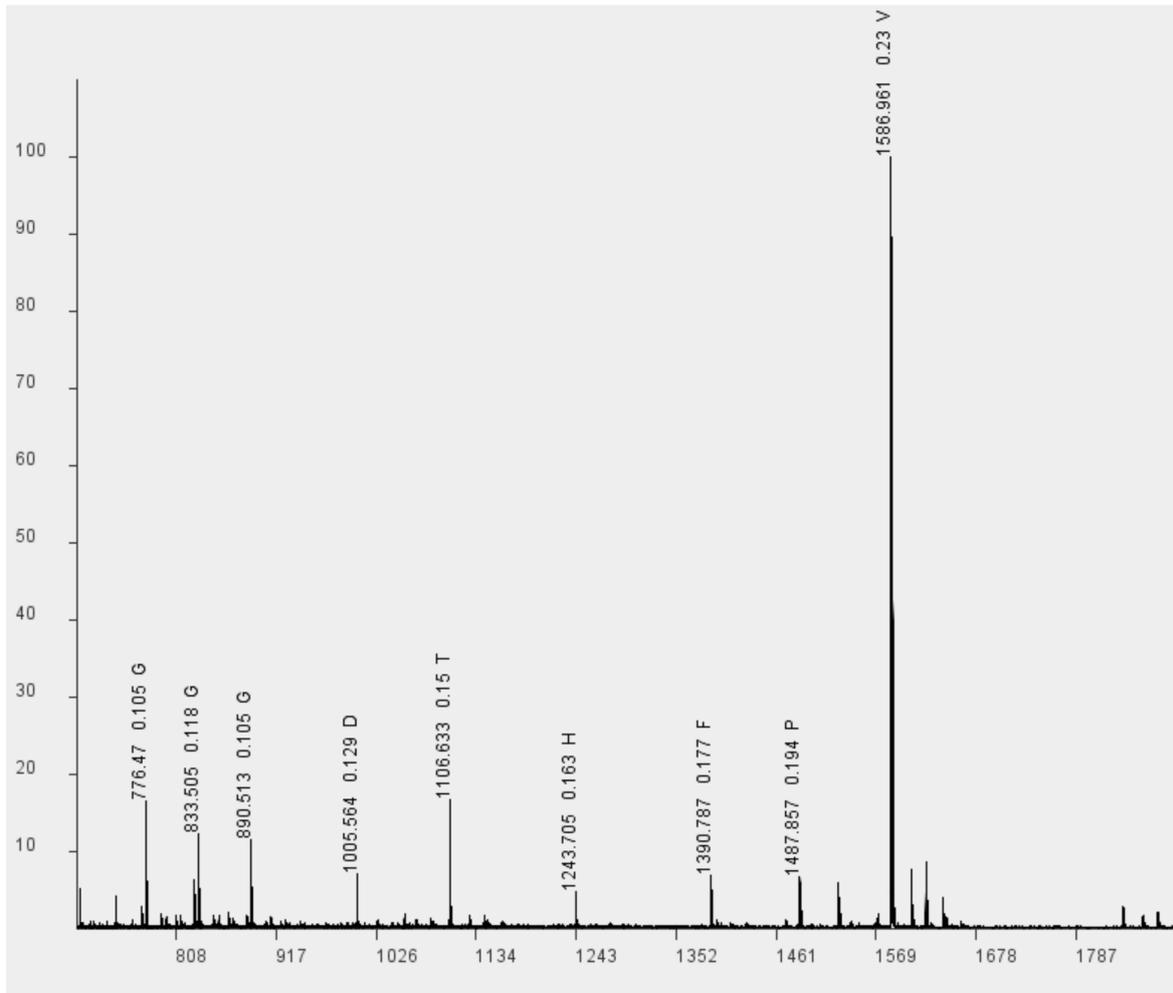
**Abbildung 38:** MS-Spektren des Testpeptids: **FLAG-Peptid**. Spektren und Auswertung wurden mit Spec2Seq erstellt. Peaks, die Abbruchsequenzen zugeordnet werden konnten, wurden markiert. In der Beschriftung der Peaks sind das gefundene m/z, die Abweichung zum theoretischen m/z und die Aminosäure, die der Differenz zum Peaks davor entspricht.



**Abbildung 39:** MS-Spektren des Testpeptids: **NK1-Peptid**. Spektren und Auswertung wurden mit Spec2Seq erstellt. Peaks, die Abbruchsequenzen zu geordnet werden konnten, wurden markiert. In der Beschriftung der Peaks sind das gefundene  $m/z$ , die Abweichung zum theoretischen  $m/z$  und die Aminosäure, die der Differenz zum Peaks davor entspricht.



**Abbildung 40:** MS-Spektren des Testpeptids: **NK2-Peptid**. Spektren und Auswertung wurden mit Spec2Seq erstellt. Peaks, die Abbruchsequenzen zugeordnet werden konnten, wurden markiert. In der Beschriftung der Peaks sind das gefundene m/z, die Abweichung zum theoretischen m/z und die Aminosäure, die der Differenz zum Peaks davor entspricht.



**Abbildung 41:** MS-Spektren des Testpeptids: **NK3-Peptid**. Spektren und Auswertung wurden mit Spec2Seq erstellt. Peaks, die Abbruchsequenzen zugeordnet werden konnten, wurden markiert. In der Beschriftung der Peaks sind das gefundene m/z, die Abweichung zum theoretischen m/z und die Aminosäure, die der Differenz zum Peaks davor entspricht.

## 8.2 Auswertung von MS/MS-Spektren mittels Spec2Seq

**Tabelle 10:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids DYKDDDDK-GGGTERSGG ( $m/z$  1770,8) sortiert nach Score, welcher Maß für die übereinstimmenden Fragmente ist. Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERSGG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Vorläuferions	Sequenz	Score
1	1770,9	TTPKIYYK	174
		KDIYYSPK	172
		KDIYHIPK	172
2	1770,9	KDTYFDPK	162
		KDTYFPDK	162
		DKTYFDPK	160
3	1770,9	TDKTHHFK	138
		TDKTHFHK	138
		KPYGHHFK	136

**Tabelle 11:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids VPFHTDGG-GGGTERSGG ( $m/z$  1586,7) sortiert nach Score, welcher Maß für die übereinstimmenden Fragmenten ist. Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERSGG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Vorläuferions	Sequenz	Score
1	1586,8	SVGHTDDV	160
		SVGHTDVD	160
		SVGHTTID	160
2	1586,8	SGISHDVD	150
		SGTVHDVD	150
		SGISHTID	150
3	1586,8	SGISHDTI	158
		SGTVHDTI	158
		SGISHTDI	158

**Tabelle 12:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids KFPVFKKS-GGGTERSGG ( $m/z$  1737,9) sortiert nach Score, welcher Maß für die übereinstimmenden

Fragmenten ist. Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGG-TERS GG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Vorläuferions	Sequenz	Score
1	1737,9	KKTDYKVV	118
		KKTYDKVV	118
		KKSKKFKS	110
2	1737,9	VYPIYKVV	154
		VYPIFKDV	154
		KKSKFKKS	152
3	1737,9	HTGGFPDI	132
		HTSSSPDI	130
		DIPSSPDI	130

**Tabelle 13:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids DTHFPIGG-GGGTERS GG (m/z 1600,8) sortiert nach Score, welcher Maß für die übereinstimmenden Fragmenten ist. Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGG-TERS GG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Vorläuferions	Sequenz	Score
1	1600,8	KKSKFKKS	154
		KITFFTHS	152
		KITFFHTS	152
2	1600,8	DIGVDVII	150
		TSPVDVII	150
		DIGVDPDI	150
3	1600,8	DTGIIPDI	138
		DTHFPGGI	136
		IPGTIVFP	132

### 8.3 Auswertung von Abbruchsequenzspektren-Spektren mittels Spec2Seq

**Tabelle 14:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids DYKDDDDK-GGGTERS GG (m/z 1770,8) sortiert nach gefundenen Abbruchsequenzen (TP). Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERS GG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Volllängenpeptids	Sequenz	TP
1	1770,7	DYKDDDDK	9
		DYKDDDKD	8
		DKYDDDDK	8
2	1770,8	DYKDDDDK	9
		DYKDDDKD	8
		DKYDDDDK	8
3	1770,8	DYKDDDDK	9
		DYKDDDKD	8
		DKYDDDDK	8

**Tabelle 15:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids VPFHTDGG-GGGTERSGG (m/z 1586,7) sortiert nach gefundenen Abbruchsequenzen (TP). Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERSGG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Volllängenpeptids	Sequenz	TP
1	1586,8	VPFHTDGG	9
		VPFDTHGG	8
		VPFTDHGG	8
2	1586,9	VPFHTDGG	9
		VPFHDTGG	8
		VPFTHDGG	8
3	1586,6	VPFHTDGG	9
		VPFHDTGG	8
		VPFTHDGG	8

**Tabelle 16:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids KFVPFKKS-GGGTERSGG (m/z 1737,9) sortiert nach gefundenen Abbruchsequenzen (TP). Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERSGG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Volllängenpeptids	Sequenz	TP
1	1737,9	KFVPFKKS	9
		KFVPKFKS	8

		KFPVFKKS	8
		KFVVPFKKS	9
2	1738,1	KFVVPFKKS	8
		KFPVFKKS	8
		KFVVPFKKS	9
3	1738,0	KFVVPFKKS	8
		KFPVFKKS	8

**Tabelle 17:** Die drei am höchsten bewerteten Sequenzen des Testpeptids DTHFPIGG-GGGTERSSG (m/z 1600,8) sortiert nach gefundenen Abbruchsequenzen (TP). Ausgewertet wurden die Aminosäuren nach der Spacer-Sequenz GGGTERSSG. Die Peptide wurden von drei unterschiedlichen Partikeln gemessen.

Partikel	Detektierte Masse des Volllängenpeptids	Sequenz	TP
		DTHFPIGG	9
1	1600,7	DTHPFIGG	8
		TDHFPIGG	8
		DTHFPIGG	9
2	1600,8	DTHPFIGG	8
		TDHFPIGG	8
		DTHFPIGG	9
3	1600,8	DTHPFIGG	8
		TDHFPIGG	8

### 8.4 Peptidsequenzen der des Screenings der Peptidbibliothek 1

**Tabelle 18:** Sequenzen, die während des Screenings mit dem M2 anti-FLAG-Antikörper als bindend identifiziert wurden.

Sequenz	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Pos 8
1	D	Y	K	D	T	D	I	D
2	Y	D	D	Y	K	D	Y	D
3	D	D	Y	K	T	K	D	Y
4	T	Y	K	D	I	D	Y	Y
5	D	Y	I	D	Y	D	Y	K
6	Y	D	D	Y	K	T	D	D
7	Y	Y	D	I	D	I	T	Y
8	Y	Y	K	D	Y	D	T	D
9	Y	Y	D	Y	Y	I	I	D
10	D	Y	K	D	Y	K	D	T
11	I	Y	I	D	Y	K	D	I
12	Y	K	D	T	D	T	T	Y
13	D	Y	K	K	Y	D	I	I
14	D	Y	K	D	Y	Y	Y	D
15	I	Y	D	I	I	T	T	I
16	Y	K	Y	D	D	I	K	T
17	D	Y	D	I	Y	I	Y	D
18	D	Y	K	Y	D	D	Y	D
19	D	Y	D	I	I	Y	I	D
20	Y	Y	D	Y	I	I	I	D
21	D	Y	K	Y	Y	D	Y	T
22	D	Y	D	I	Y	I	D	T
23	D	Y	K	D	Y	D	K	D
24	Y	T	D	Y	K	Y	I	D
25	Y	Y	D	I	Y	I	T	D
26	Y	Y	D	I	I	I	Y	D
27	I	D	Y	K	D	T	D	Y
28	Y	Y	D	I	D	I	I	T
29	Y	Y	D	I	D	I	Y	I
30	Y	Y	D	I	I	Y	D	T
31	I	Y	D	Y	I	Y	T	D
32	Y	Y	D	Y	Y	T	I	D
33	D	Y	D	Y	I	T	I	T

Farbkodierung: Blau = basische AS, rot = saure AS, gelb = hydrophobe AS, orange = aromatische AS, grün = polare AS.

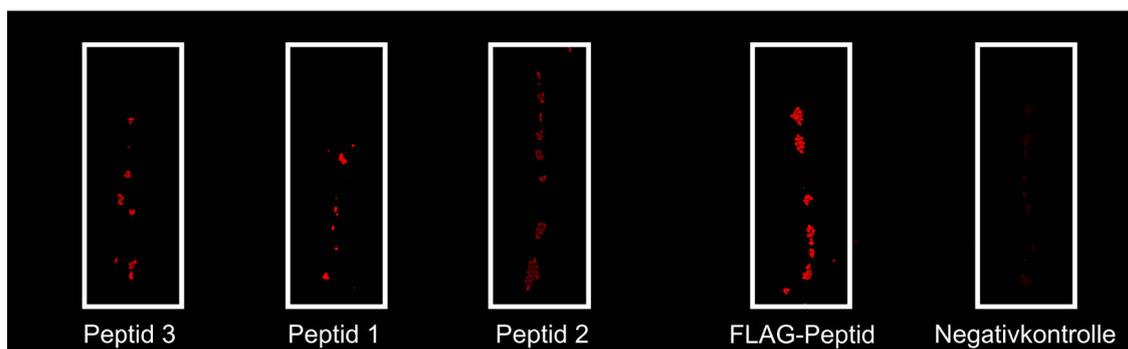
**Tabelle 19:** Sequenzen, von zufällig ausgewählten Peptiden, die während des Screenings keine Interaktion mit M2 anti-FLAG-Antikörper aufwiesen.

Sequenz	Pos 1	Pos 2	Pos 3	Pos 4	Pos 5	Pos 6	Pos 7	Pos 8
1	Y	K	I	T	D	Y	K	T
2	I	Y	Y	K	K	D	D	Y
3	Y	D	I	Y	Y	T	T	T
4	T	D	I	Y	D	I	D	T
5	I	T	Y	Y	T	K	K	K
6	D	K	D	I	Y	K	Y	D
7	I	D	I	D	T	D	Y	Y
8	I	Y	I	I	I	D	D	I
9	T	T	T	Y	D	D	I	Y
10	D	D	I	K	T	T	K	Y
11	Y	D	K	I	T	D	K	I
12	I	T	I	T	T	T	Y	K
13	I	Y	I	D	I	D	I	I
14	K	Y	D	K	I	Y	I	Y
15	D	I	T	T	D	T	Y	I
16	K	I	Y	D	T	Y	I	Y

Farbkodierung: Blau = basische AS, rot = saure AS, gelb = hydrophobe AS, orange = aromatische AS, grün = polare AS.

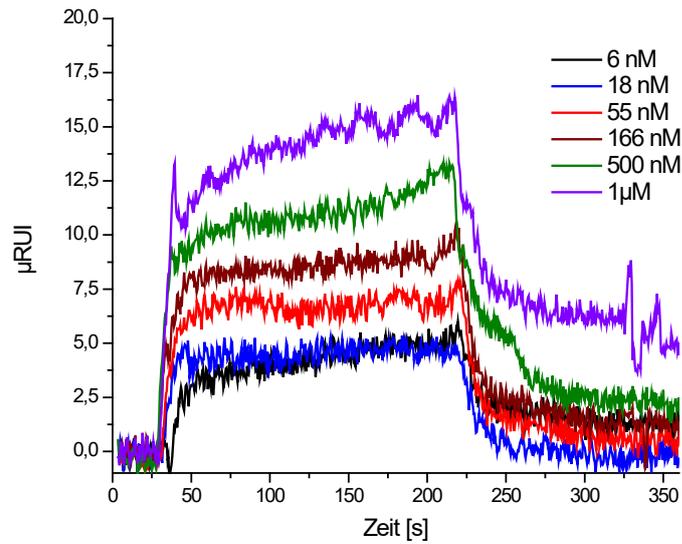
## 8.5 Affinitätsranking der anti-FLAG-Ak-bindenden Peptide

### Fluoreszenzassay

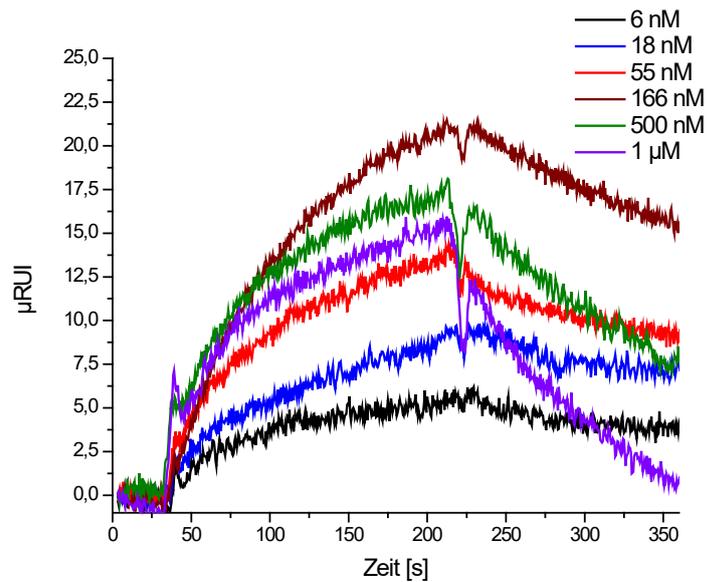


**Abbildung 42:** Fluoreszenzscan (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) von den Peptiden 1-3, dem FLAG-Peptid und einer Negativkontrolle, immobilisiert auf TentaGel-Partikel, nach der Inkubation mit dem anti-FLAG-Ak, angefärbt mittels anti-Maus-Atto633-Antikörper.

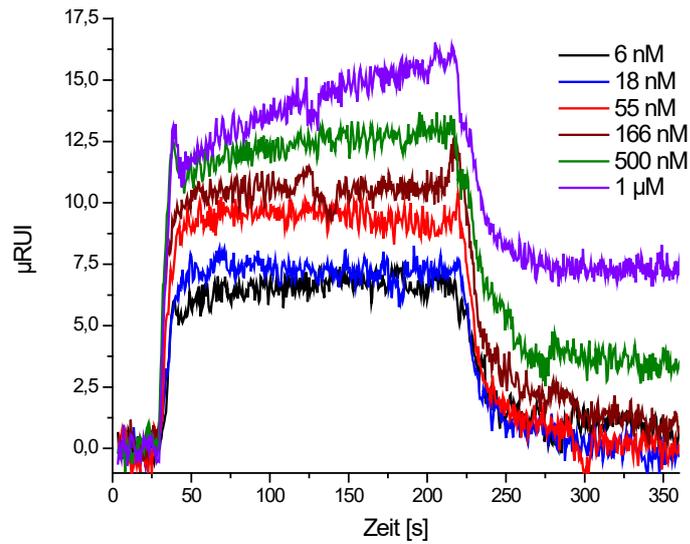
### SPR-Messungen



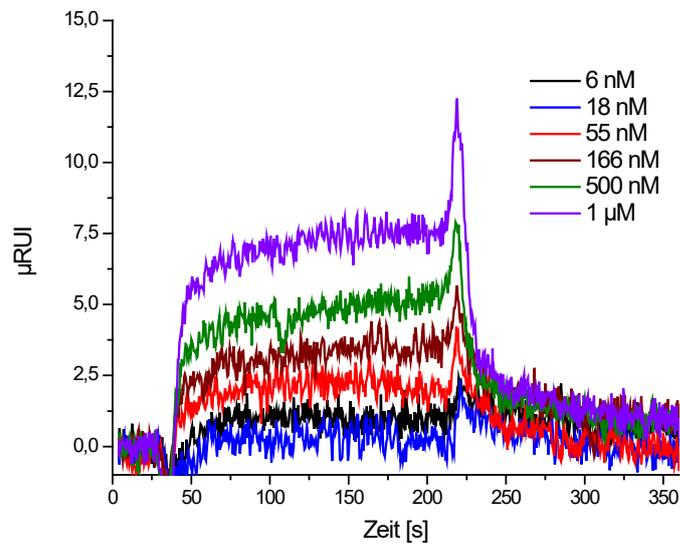
**Abbildung 43:** SPR-Messungen für das **FLAG-Peptid** (DYKDDDDK) gegen den auf einem HC200 SPR-Chip immobilisierten FLAG-Antikörper.



**Abbildung 44:** SPR-Messungen für das **Peptid 1** (DYKDYDKD) gegen den auf einem HC200 SPR-Chip immobilisierten FLAG-Antikörper.

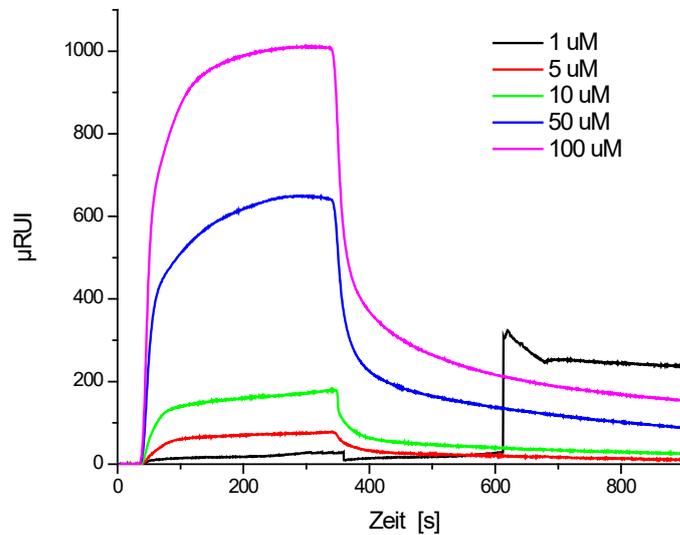


**Abbildung 45:** SPR-Messungen für das **Peptid 2** (DYIDYDYK) gegen den auf einem HC200 SPR-Chip immobilisierten FLAG-Antikörper.

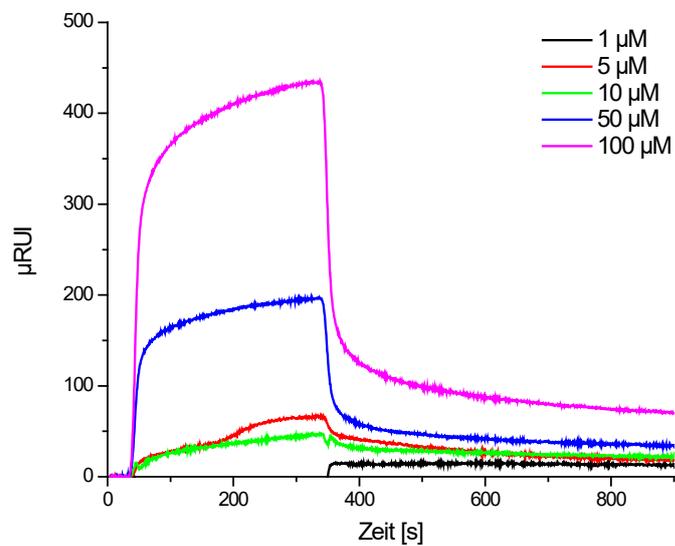


**Abbildung 46:** SPR-Messungen für das **Peptid 3** (DYDIYIYD) gegen den auf einem HC200 SPR-Chip immobilisierten FLAG-Antikörper.

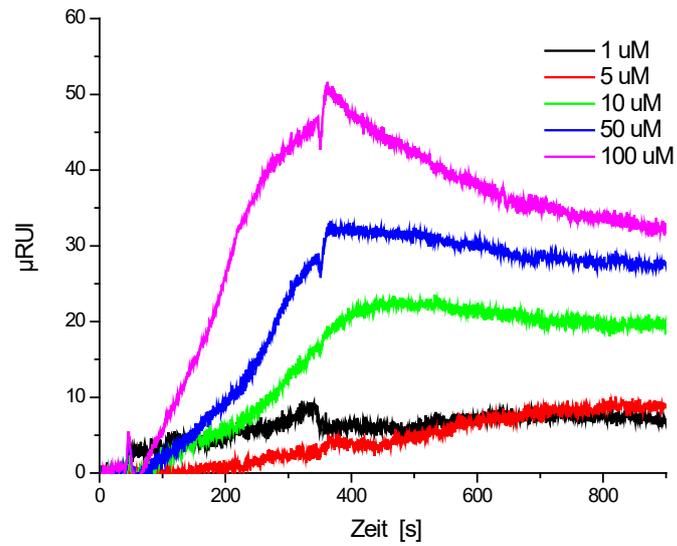
## 8.6 Affinitätsbestimmung ausgewählter Peptide zu Maus-IgG



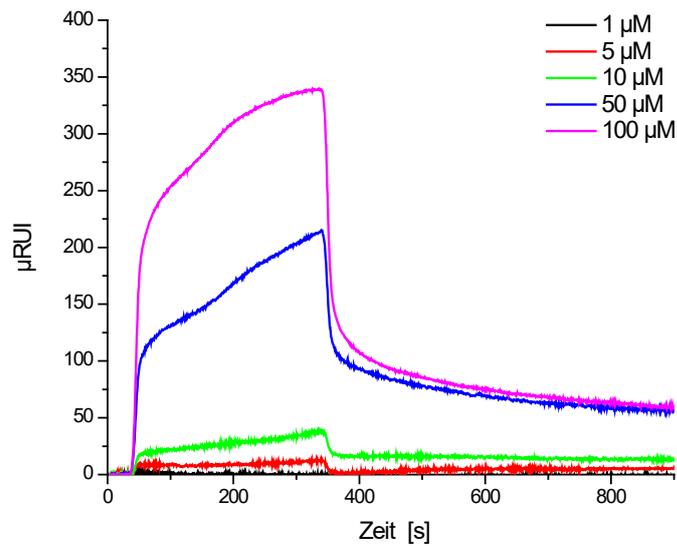
**Abbildung 47:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP1** (GRIHGPR) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit polyklonalem Maus-IgG.



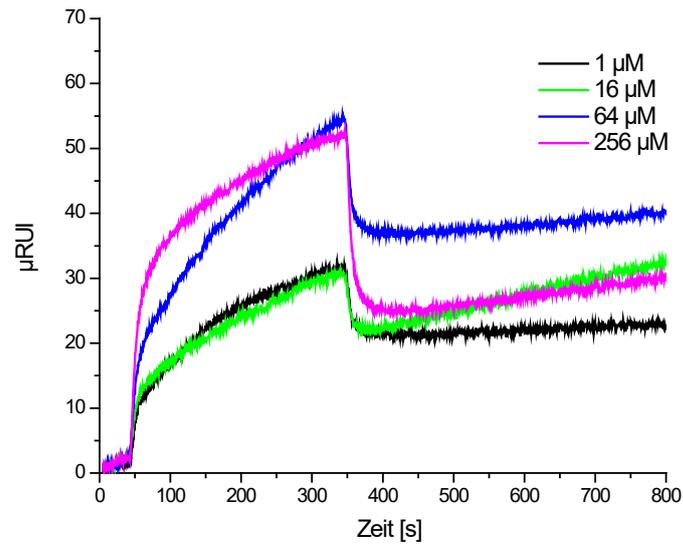
**Abbildung 48:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP2** (GIHPFGR) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit polyklonalem Maus-IgG.



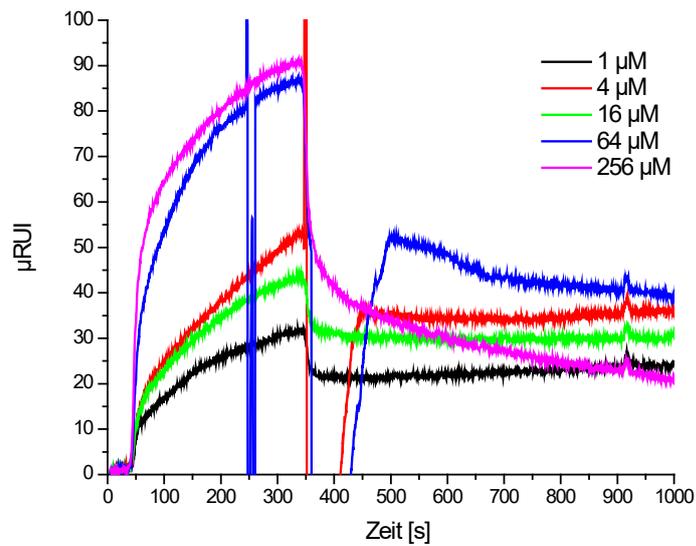
**Abbildung 49:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP3 (GEPFSIP)** gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit polyklonalem Maus-IgG.



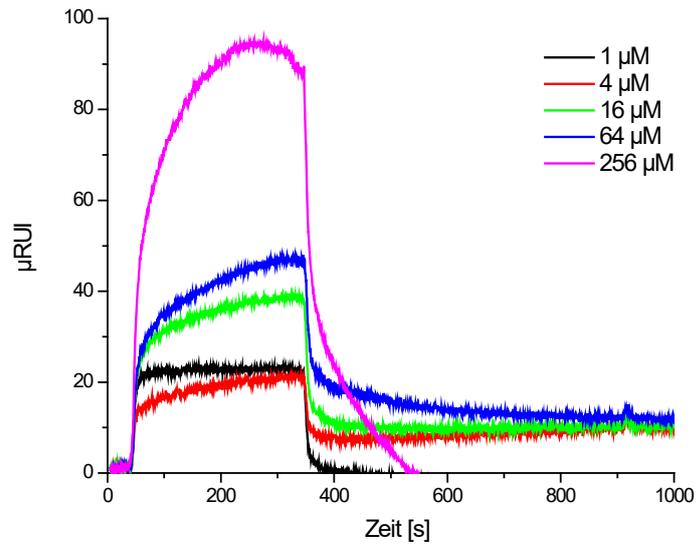
**Abbildung 50:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP4 (SHSGIFR)** gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit polyklonalem Maus-IgG.



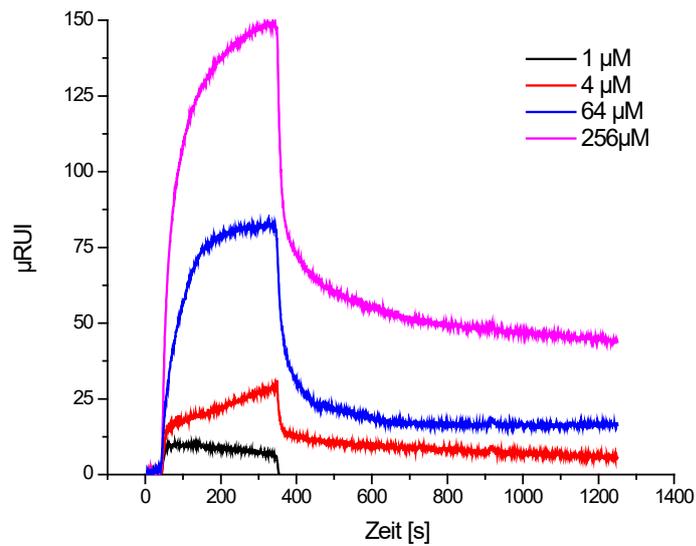
**Abbildung 51:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP5** (WIEESWEF) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit monoklonalem Maus-IgG.



**Abbildung 52:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP6** (WHEERGYW) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit monoklonalem Maus-IgG.

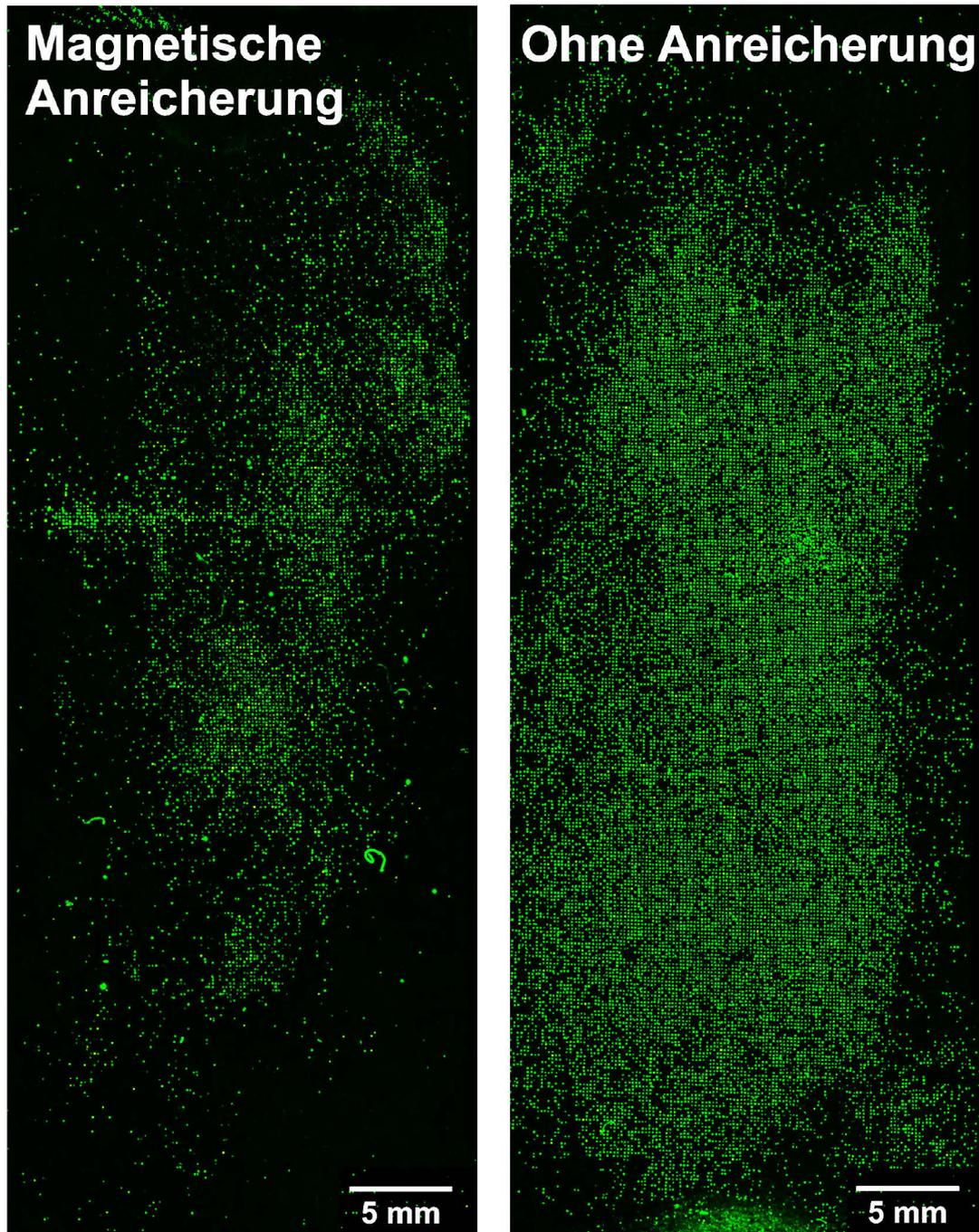


**Abbildung 53:** SPR-Sensogramme für das Peptid **IgG BP7** (EWFWHFPR) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit monoklonalem Maus-IgG.



**Abbildung 54:** SPR-Sensogramme für das Literaturpeptid<sup>[175]</sup> (HFRRHL) gemessen auf einem HC1500 SPR-Chip mit monoklonalem Maus-IgG.

## 8.7 Prescreenings der Peptidbibliothek 3



**Abbildung 55:** Fluoreszenz-Scans (Auflösung 10  $\mu\text{m}$  per Pixel) zweier Chips mit Überlagerung von grüner (Anregung: 532 nm; Emission 570 nm) und roter (Anregung 635 nm; Emission 670 nm) Fluoreszenz. Die grüne Fluoreszenz detektiert die Eigenfluoreszenz der Tenta-Gel-Partikel und die rote Fluoreszenz indiziert die Bindung des anti-Maus-Atto633-Antikörpers. Links: Chip mit Partikeln, die nach einer magnetischen Anreicherung gewonnen wurden. Rechts: Partikel aus der Bibliothek ohne Anreicherung. Prescreening: Beide Chips wurden mit dem anti-Maus-Atto633-Antikörper inkubiert.

**Publikationsliste**

1. T. Schwaar, M. Lettow, D. Remmler, H. G. Börner, M. G. Weller, *Efficient Screening of Combinatorial Peptide Libraries by Spatially Ordered Beads Immobilized on Conventional Glass Slides*, High-throughput (2019), **8**, 11.
2. S. Ickert, T. Schwaar, A. Springer, M. Grabarics, J. Riedel, S. Beck, K. Pagel, M. W. Linscheid, *Comparison of the fragmentation behavior of DNA and LNA single strands and duplexes*, Journal of Mass Spectrometry (2019), **54**, 402-411.
3. D. Remmler, T. Schwaar, M. Pickhardt, C. Donth, E. Mandelkow, M. G. Weller, H. G. Börner, *On the way to precision formulation additives: 2D-screening to select solubilizers with tailored host and release capabilities*, Journal of Controlled Release (2018), **285**, 96-105.
4. I. M. Abbas, T. Schwaar, F. Bienwald, M. G. Weller, *Predictable Peptide Conjugation Ratios by Activation of Proteins with Succinimidyl Iodoacetate (SIA)*, Methods and protocols (2017), **1**, 2.
5. S. Wieczorek, T. Schwaar, M. O. Senge, H. G. Börner, *Specific Drug Formulation Additives: Revealing the Impact of Architecture and Block Length Ratio*, Biomacromolecules (2015), **16**, 3308-3312.
6. S. Celasun, D. Remmler, T. Schwaar, M. G. Weller, F. Du Prez, H. G. Börner, *Digging into the Sequential Space of Thiolactone Precision Polymers: A Combinatorial Strategy to Identify Functional Domains*, **58**, 1960-1964.
7. F. Eisenreich, M. Kathan, A. Dallmann, S. P. Ihrig, T. Schwaar, B. M. Schmidt, S. Hecht, *A photoswitchable catalyst system for remote-controlled (co)polymerization in situ*, Nature Catalysis (2018), 516–522.
8. M. Dippong, P. Carl, C. Lenz, J. A. Schenk, K. Hoffmann, T. Schwaar, R. J. Schneider, M. Kuhne, *Hapten-Specific Single-Cell Selection of Hybridoma Clones by Fluorescence-Activated Cell Sorting for the Generation of Monoclonal Antibodies*, Analytical Chemistry (2017), **89**, 4007-4012.

**Software**

1. T. Schwaar, D. Remmler, H.G. Börner, M.G. Weller, *Spec2Seq*, Open-Access-Publikationsserver der Humboldt-Universität, **2018**.

**Patente**

1. M. G. Weller, T. Schwaar, D. Remmler, H. G. Börner, *High-Throughput-Screening-Methode von kombinatorischen Bibliotheken mittels optischer on-chip-Detektion und massenspektrometrischer Sequenzierung*, Patent DE102017123744A1.
2. P. Carl T. Schwaar, K. Rurack, R. Schneider, S. Dominik, *Verfahren zur simultanen Bestimmung verschiedener Analyten in einer Umweltprobe, gestützt auf Kern/Schale-Mikropartikel*, Amtliches Aktenzeichen: 10 2019 120 455.0, Status: Offengelegt.

### Poster-Vorträge

1. ANAKON, Münster, *MALDI-Supported Screening of Large Peptide Libraries for Identification of Protein Binders*, **2019**.
2. European Mass Spectrometry Conference (EMSC), Saarbrücken, *MALDI-Supported Screening of Large Peptide Libraries for Identification of Protein Binders*, **2018**.
3. Chemistry and Biology of Peptides Gordon Research Conference, Ventura, *Multidimensional high throughput methods for the analysis of particle-based peptide libraries*, **2018**.
4. Tag der Chemie, Berlin, Particle-based epitope analysis of a monoclonal antibody, **2017**.
5. PhD Students Day, Berlin, Development of multidimensional high-throughput methods for the analysis of particle-based peptide libraries **2015**.

**Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

---

Datum

Unterschrift