

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
|           | <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>                                   | <b>I</b>  |
|           | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>                                | <b>V</b>  |
| <b>I</b>  | <b>EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| 1         | Zielsetzung   | 1         |
| 2         | Evolution   | 2         |
| 3         | Selektion von Proteinen                                     | 3         |
| 3.1       | „ <i>Ribosome Display</i> “                                 | 4         |
| 3.2       | Das „ <i>Ribosome Display</i> “-Konstrukt                   | 6         |
| 4         | Mutationsmethoden   | 9         |
| 4.1       | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)                             | 10        |
| 4.2       | „ <i>DNA-Shuffling</i> “ – „ <i>single gene shuffling</i> “ | 12        |
| 4.3       | ITCHY   | 15        |
| 4.4       | SCRATCHY  | 17        |
| 5         | S-layer-Proteine  | 18        |
| 5.1       | Einführung  | 18        |
| 5.2       | S-layer-Domänen der S-layer-Proteine                        | 19        |
| 5.3       | Funktionen der S-layer-Proteine                             | 21        |
| 5.4       | Applikationspotential                                       | 21        |
| 6         | Kohlenhydrate   | 22        |
| 6.1       | Streptomycin  | 23        |
| 6.2       | Heparin   | 24        |
| 6.3       | Sialyl-Lewis X  | 26        |
| <b>II</b> | <b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>                              | <b>28</b> |
| 1         | Material  | 28        |
| 1.1       | Organismen und Plasmide                                     | 28        |
| 1.2       | Medien und Stammhaltung                                     | 29        |
| 1.3       | Zellernte und Zellaufschluss                                | 30        |
| 1.4       | Puffer und Lösungen   | 30        |
| 2         | Methoden  | 32        |
| 2.1       | Molekularbiologische Methoden                               | 32        |
| 2.1.1     | Präparation genomischer DNA                                 | 32        |
| 2.1.2     | Isolierung von Plasmid-DNA                                  | 32        |
| 2.1.3     | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen              | 33        |
| 2.1.4     | Spaltung von DNA mit DNase I                                | 34        |
| 2.1.5     | Abbau von DNA-Einzelsträngen                                | 34        |

---

---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

---

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.1.5.1  | Degradierung mit Exonuklease III  | 34 |
| 2.1.5.2  | Degradierung mit Mung Bean Nuklease   | 34 |
| 2.1.6    | Dephosphorylierung von DNA-Enden  | 35 |
| 2.1.7    | Phosphorylierung von DNA-Enden  | 35 |
| 2.1.8    | Agarosegelelektrophorese von DNA  | 35 |
| 2.1.9    | Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten                                     | 35 |
| 2.1.10   | Ethanol- und Isopropanol-Präzipitation  | 36 |
| 2.1.11   | Band Interception   | 36 |
| 2.1.12   | Ligation von DNA-Fragmenten   | 37 |
| 2.1.13   | Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> Zellen                    | 37 |
| 2.1.14   | Transformation von <i>E. coli</i> nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode               | 38 |
| 2.1.15   | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 38 |
| 2.1.16   | Mutagenese  | 39 |
| 2.1.16.1 | „DNA-Shuffling“   | 39 |
| 2.1.16.2 | ITCHY (Incremental Truncation for the Creation of HYbrid enzymes) mod.              | 41 |
| 2.1.16.3 | SCRATCHY mod.   | 41 |
| 2.1.17   | DNA-Sequenzierung   | 42 |
| 2.1.18   | Molekularbiologisches Arbeiten mit RNA  | 42 |
| 2.1.18.1 | Isolierung bzw. Aufreinigung von RNA  | 42 |
| 2.1.18.2 | Fällung von RNA mittels Trichloressigsäure  | 43 |
| 2.1.18.3 | Denaturierende Agarosegelelektrophorese von RNA                                     | 43 |
| 2.1.18.4 | T7 <i>In vitro</i> -Transkription   | 44 |
| 2.1.18.5 | Reverse Transkription (RT)  | 45 |
| 2.2      | Proteinbiochemische Methoden  | 45 |
| 2.2.1    | Heterologe Expression und Aufreinigung der <i>Ttb</i> -Polymerase in <i>E. coli</i> | 45 |
| 2.2.2    | <i>In vitro</i> -Proteinbiosynthese   | 46 |
| 2.2.3    | Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen                         | 48 |
| 2.2.4    | Färbung und Trocknung von SDS-Polyacrylamid-Gelen                                   | 49 |
| 2.2.5    | Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA)                              | 49 |
| 2.2.6    | „Ribosome Display“  | 49 |
| 2.3      | Analytische Methoden  | 50 |
| 2.3.1    | Detektion von $\beta$ -Strahlung  | 50 |
| 2.3.2    | Autoradiographie  | 51 |
| 2.3.3    | Nachweis von Kohlenhydraten mittels Anthron-Reaktion                                | 51 |
| 2.4      | Chromatographische Methoden   | 51 |
| 2.4.1    | Präparation von Heparinsepharose CL-6B  | 51 |
| 2.4.2    | Präparation von epoxy-aktivierter Sepharose 6B (epa Sepharose)                      | 52 |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.4.3      | Immobilisierung von Kohlenhydraten an epoxy-aktivierte Sepharose 6B  | 52        |
| <b>III</b> | <b>EXPERIMENTE &amp; ERGEBNISSE</b>  | <b>54</b> |
| 1          | Klonierung, heterologe Expression und Reinigung der DNA-Polymerase aus <i>Thermus thermophilus</i> HB8   | 54        |
| 2          | Einführung   | 56        |
| 3          | Strategie der Selektion von kohlenhydratbindenden Proteinen durch Kombination von „ <i>Shuffling</i> “, SCRATCHY und dem „ <i>Ribosome Display</i> “ | 58        |
| 4          | Auswahl und Klonierung Protein kodierender Slp-Sequenzen als Grundlage für die Generierung von DNA-Bibliotheken                                      | 60        |
| 5          | Etablierung des „ <i>DNA-Shufflings</i> “  | 61        |
| 5.1        | Synthese der zu „shuffelnden“ SLH-Sequenzen  | 62        |
| 5.2        | Fragmentierung der SLH-Sequenzen   | 63        |
| 5.3        | Rekonstruktion der SLH-Sequenzen   | 64        |
| 5.4        | Amplifizierung der rekonstruierten SLH-Sequenzen   | 66        |
| 6          | Etablierung des SCRATCHY   | 68        |
| 7          | Auswertung der Mutagenese und Ermittlung der Mutationsrate   | 69        |
| 8          | Immobilisierung von Molekülen an aktivierter Sepharose   | 70        |
| 8.1        | Immobilisierung von Kohlenhydraten   | 70        |
| 9          | Das „ <i>Ribosome Display</i> “  | 73        |
| 9.1        | Das lineare Bibliothekskonstrukt   | 73        |
| 9.2        | Durchführung der Selektion mit der Bsp-Bibliothek  | 74        |
| 9.3        | Vorversuche  | 77        |
| 9.4        | Verlauf der Selektionen  | 79        |
| 9.5        | Klonierung und Sequenzanalyse  | 81        |
| 9.6        | Test auf mögliche Aptamere   | 84        |
| 9.7        | Bindungsstudien  | 85        |
| <b>IV</b>  | <b>DISKUSSION</b>  | <b>91</b> |
| 1          | Auswahl des „ <i>Scaffolds</i> “ zur Generierung kohlenhydratbindender Proteine  | 91        |
| 2          | Klonierung des S-layer-Proteins aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>   | 92        |
| 3          | Mutagenese-Methoden  | 93        |
| 3.1        | „ <i>DNA-Shuffling</i> “   | 93        |
| 3.2        | SCRATCHY   | 94        |
| 3.3        | Einschätzung des Mutageneseerfolges  | 95        |

---

---

## INHALTSVERZEICHNIS

---

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4          | Screening-Systeme bzw. Selektionssysteme  | 96         |
| 4.1        | Selektion kohlenhydratbindender Proteine mittels „ <i>Ribosome Display</i> “      | 97         |
| 4.2        | Sequenzvergleiche der selektierten Moleküle                                       | 99         |
| 4.3        | Diskussion der Bindungsstudien im Zusammenhang mit dem Stoppkodon                 | 102        |
| <b>V</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>104</b> |
| <b>VI</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>106</b> |
| <b>VII</b> | <b>ANHANG</b>   | <b>115</b> |
| 1          | Geräte  | 115        |
| 2          | Enzyme, Proteine, Nukleinsäuren und Chemikalien                                   | 116        |
| 3          | Primersequenzen   | 118        |
| 4          | Übersicht über die Primer der Expressions-PCR und des „ <i>Ribosome Display</i> “ | 120        |
| 5          | SLH- und Slp-Sequenzen aus:   | 121        |
| 5.1        | <i>Acetogenium kivui</i>  | 121        |
| 5.2        | <i>Bacillus sphaericus</i>  | 122        |
| 5.3        | <i>Geobacillus stearothermophilus</i>   | 124        |
| 5.4        | <i>Eubacterium acidaminophilum</i>  | 126        |
| 5.5        | <i>Thermus thermophilus</i>   | 129        |
| 6          | <i>Ttb</i> -DNA-Polymerase aus <i>Thermus thermophilus</i> HB8                    | 131        |
| 7          | Selektierte Proteinsequenzen nach dem „ <i>Ribosome Display</i> “                 | 133        |
| 7.1        | Proteinsequenzen aus der Selektion gegen Heparin                                  | 133        |
| 7.2        | Proteinsequenzen aus der Selektion gegen Streptomycin                             | 134        |
| 7.3        | Proteinsequenzen aus der Selektion gegen N-Acetylglucosamin                       | 135        |
| 8          | Lebenslauf  | 137        |