1 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, kohlenhydratbindende Proteine zu selektieren. Dazu sollte eine DNA-Bibliothek erstellt werden, die Ausgangspunkt für ein „***Ribosome Display***“ ist. Zur Generierung der DNA-Bibliothek sollten **Mutationsmethoden** wie das „***Shuffling***“ und das **SCRATCHY** etabliert werden. Beide Methoden erlauben es, Punktmutationen verstreut über einen Sequenzraum einzubringen, die zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen und so die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins beeinflussen können. Grundlage für solche Modulationen sind die SLH-Domänen der **Surface-layer-Proteine** fünf verschiedener Bakterien. Die Surface-layer-homologen Domänen (SLH) stehen im Verdacht mit den sekundären Zellwandpolymeren (SCWP) zu interagieren, die aus Kohlenhydraten bestehen und im Peptidoglycan vorkommen. Das Peptidoglycan selbst ist bei Gram-positiven Bakterien vielschichtig und besteht aus Kohlenhydraten (N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuramin-säure). Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei den SLH-Domänen um lektinartige Strukturen handelt. So ist es interessant zu erfahren, ob sie Kohlenhydrate bzw. unterschiedliche Kohlenhydrate binden und ob sie so modulierbar sind, dass eine höhere Affinität erzeugt werden kann.

Dazu wurde eine Auswahl an **Kohlenhydraten** getroffen, die einigen Kriterien unterlagen. Die Größe und Sequenz sollte unterschiedlich sein, um auf die Art der Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat und Protein zurück schließen zu können und sie sollten unterschiedliche Funktionen besitzen. So wurden das **Heparin,** das **Streptomycin** und die **Sialyl-Lewis X-Säure** ausgewählt. Das **N-Acetylglucosamin** wurde als Kontrolle mitgeführt, da es in verschiedenen, modifizierten Formen in allen drei Molekülen vorkommt.

Um derartige Untersuchungen durchführen zu können, sollte das „*Ribosome Display*“ angewendet werden, ein Selektionssystem, was die Wechselwirkungen zweier Moleküle analysieren kann. Sowohl die Mutationsmethoden als auch das Selektionssystem sind *in vitro*-Techniken, die ein evolutionäres Proteindesign garantieren.

2 Evolution

Die Evolution ist der Verlauf der Stammesgeschichte von den niedrigsten Organisationsstufen des Lebens bis zu den heutigen hoch organisierten Formen. Die historische Entwicklung des Evolutionsgedankens verlief langsam und stufenweise, weil philosophische und biologisch begründete Hindernisse wirkten. Die bekanntesten Evolutionstheorien sind die von Lamarck und Darwin. Die Evolutionshypothese von Lamarck betont die aktive, auf Zweckmäßigkeit ausgerichtete Anpassung an die Umwelt und die Weitergabe der im individuellen Leben erworbenen Veränderungen oder Neuheiten auf die Nachkommen im Prozess der geschlechtlichen Fortpflanzung. Darwin dagegen führt Evolution auf die natürliche Auslese („Kampf ums Dasein", Selektion) zurück, die durch zufällige Veränderungen (Mutationen) des Erbmaterials einhergeht.

Gegenwärtig wird mit der Evolution „spielerisch" oder auch „kreativ" umgegangen. Der Mensch als Macher – Homo faber, die Selektion außerhalb des Lebenden! *In vitro*-Techniken ermöglichen es in einem hohen Durchsatz an Proben („*HTS – High through put screening*"), Moleküle mit gewünschten Spezifitäten zu selektieren. Dazu wird die DNA zufällig oder direkt mutiert. Bei einer Vielzahl von veränderten DNA-Molekülen wird von DNA-Bibliotheken gesprochen. Eine Translation dieser führt zu verschiedenartigen Aminosäuresequenzen, aus denen das Protein mit den gewünschten Merkmalen selektiert wird, welches die beste Anpassung an die Umgebung (Reaktionsmilieu) zeigt.

Methoden, die nach der Bindungsstärke zwischen zwei Molekülen selektieren, werden oft als Display-Methoden bezeichnet („*Ribosome Display", „Phage Display", „Yeast Surface Display"* usw.). Diese Kombination aus *in vitro*-Mutationen und *in vitro*-Selektionen beschreibt die *in vitro*-Evolution.

3 Selektion von Proteinen

Das Problem bei der Selektion von Proteinen besteht darin, dass die selektierten Moleküle nicht ausreichend und direkt vermehrt werden können, wie es bei den Nukleinsäuren durch PCR der Fall ist. Dazu ist eine Verknüpfung von Genotyp und Phänotyp (DNA oder RNA mit dem Protein) nötig. Zahlreiche Selektionsmethoden wurden zu dieser Problematik entwickelt, die in zwei Klassen unterteilt werden können, die *in vivo*- und *in vitro*-Techniken (Tab.1).

Tabelle 1: Übersicht von Protein-Selektionssystemen

in vivo	**Referenzen**
Plasmid Display	Gates *et al.*, 1996
Phage Display	Smith *et al.*, 1985; Winter *et al.*, 1994
Bacterial Surface Display	Georgiou *et al.*, 1993; Daugherty *et al.*, 1999
Yeast Surface Display	Kieke *et al.*, 1997; Boder & Wittrup 1997
Yeast Two Hybrid System	Fields & Song 1989; Chien *et al.*, 1991
Protein Fragment Complemention Assay	Pelletier *et al.*, 1998
in vitro	
Ribosome Display	Hanes & Plückthun 1997
mRNA Display	Roberts & Szostak, 1997; Nemoto *et al.*, 1997
DARTs (DNA/Protein Attachment and Recovery Tool)	Figueiredo *et al.*, 2004

Die Nachteile der *in vivo*-Systeme liegen auf der Hand. Mögliche Toxizität der exprimierten Proteine im Wirt, Faltung, Transport, Aggregation und proteolytischer Abbau der Proteine können limitierende Faktoren der Selektion sein. Zudem ist das Einbringen der genetischen Information in die Zellen ein Nachteil, da die Selektion von der Effizienz der Transformation abhängig ist. Diese Nachteile sind bei den *in vitro*-Methoden ausgeschlossenn. Basis für die *in vitro*-Techniken ist die zellfreie Proteinbiosynthese, deren Grundstein von Nierenberg & Matthai 1961; Chapeville *et al.*, 1962, De Vries & Zubay 1967, Gold & Schweiger 1969 gelegt wurde. Die ersten zellfreien Systeme zur Herstellung von Proteinen wurden von Zubay, 1973 und Herrlich & Schweiger, 1974 beschrieben. Sie beruhen auf Zellextrakten, die mit Aminosäuren, Energiekomponenten und einer translationsfähigen Nukleinsäure (mRNA oder DNA) versetzt werden. Mit dieser Technik wurde es möglich, rekombinante Proteine herzustellen, die auf den meist gewählten Syntheseort, dem Wirtsorganismus *E. coli*, toxisch wirkten.

3.1 „*Ribosome Display*“

Das erste System zur *in vitro*-Selektion von Peptiden wurde von Mattheakis und Mitarbeitern (1994) entwickelt. Mit Hilfe ihres „*Polysome Display*“, basierend auf dem *E. coli* S30 *in vitro*-Translationssystem, gelang es erstmals, Peptide aus einer Bibliothek zu selektieren. Dieses System (Mattheakis *et al.*, 1996; Gerusk *et al.*, 1997) wurde von Hanes und Plückthun (1997) aufgegriffen und diente als Grundlage für das „*Ribosome Display*“. Mit diesem können funktionale Proteine selektiert werden. Die Translation wurde ebenfalls in einem zellfreien *E. coli* S30 System durchgeführt. Das „*Ribosome Display*“ ist nicht nur auf ein prokaryotisches System beschränkt, sondern kann ebenso mit einem eukaryotischen System erfolgen (He & Taussig, 1997). Es hat das Ziel, Komplexe aus Protein, Ribosomen und mRNA (PRM-Komplexe) zu bilden (Abb. 1), so dass eine Verknüpfung von Geno- und Phänotyp möglich ist. Im Detail heißt dies, dass die DNA durch *in vitro*-Transkription in mRNA und in der nachfolgenden Reaktion mit Hilfe der Ribosomen in eine entsprechende Aminosäuresequenz (*in vitro*-Translation) umgesetzt wird.

Die Stabilität des Komplexes ist ein entscheidendes Kriterium für die Selektion. Bedingungen wie die Verwendung von mRNA-Molekülen, denen das Stoppkodon fehlt, der Einsatz hoher Magnesiumkonzentrationen und geringe Temperaturen tragen zur Beständigkeit bei.

Des Weiteren ist die Faltung des entstehenden Proteins ausschlaggebend für die Affinität zum Zielmolekül. Eine C-terminale Verlängerung des Proteins, deren Länge der des Ribosomentunnels entspricht, sorgt für die richtige Faltung des Proteins. Die hohe Magnesiumkonzentration soll das Ribosom so komprimieren, dass es der Peptidyl-tRNA schwer fällt, vom Ribosom zu dissoziieren. Die niedrige Temperatur verlangsamt die Hydrolyse der Peptidyl-tRNA-Esterbindung und die thermische Bewegung, welche die Dissoziation der Peptidyl-tRNA erleichtern würde. So stabilisierte Komplexe können mehrere Tage aufbewahrt werden (Jermutus *et al.*, 2000). Das entstehende Protein vermittelt die Bindung des Komplexes an ein bestimmtes Zielmolekül, das an einer stationären Phase immobilisiert ist. Das sind Trägermaterialien wie aktivierte Sepharose, Agarose, Mikrotiterplatten oder Magnetpartikel.

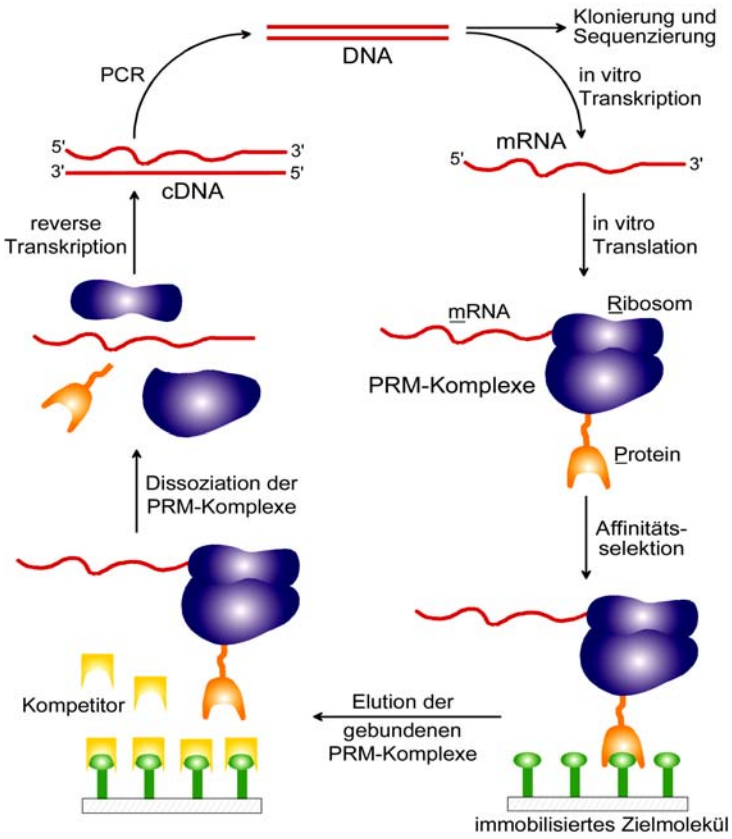

Abb. 1: Prinzip des „*Ribosome Display*“. Das „*Ribosome Display*“ hat seinen Ursprung in einer DNA- bzw. RNA-Bibliothek, die für eine Vielzahl von Proteinen kodiert, von denen einige wiederum in der Lage sind, an dem ausgewählten, immobilisierten Zielmolekül zu binden. Wegen des fehlenden Stoppkodons kann das Ribosom nicht von der mRNA dissoziieren und das Protein freilassen. Es entsteht ein Komplex aus Protein, Ribosom und mRNA, der PRM-Komplex. Die mRNA kann auf verschiedenen Wegen recycelt werden und durch reverse Transkription mit einer anschließenden PCR wieder in DNA umgewandelt werden, die dann für einen neuen Zyklus zur Verfügung steht. (Abb. aus Lamla , 2002)

Die im Ribosom eingeschlossene genetische Information kann auf verschiedenen Wegen wiedergewonnen werden. Die PRM-Komplexe können mit einem Kompetitor gelöst und anschließend Komplexe mit Phenol oder EDTA zerstört werden. Starke Binder, die von dem Kompetitor nicht freigesetzt werden, würden allerdings verloren gehen. Ferner kann die mRNA durch Zugabe von EDTA, was zur Komplexierung von Magnesiumionen und zur Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten führt, gewonnen werden. Erfolgt die Selektion mit Magnetpartikeln, können die gewaschenen Partikel direkt in eine RT-PCR eingesetzt werden (He & Taussig, 1997).

3.2 Das „*Ribosome Display*“-Konstrukt

Das DNA-Konstrukt ist Ausgangspunkt des „*Ribosome Display*“ und muss auf dieser Ebene alle nötigen Elemente für eine Umwandlung von DNA in mRNA (Transkription) bzw. von mRNA in das Protein (Translation) besitzen. Für die Transkription müssen ein Promotor und ein Terminator zur Verfügung stehen, um Transkripte mit einer einheitlichen Länge synthetisieren zu können. Zur Stabilisierung der RNA können „*stem-loop*“-Strukturen hilfreich sein, um eine frühe Degradierung durch RNasen, wie PNPase, RNaseII, die vom 3’-Ende der mRNA agieren (Hajnsdorf *et al.*, 1996) und RNase E, die das 5’-Ende erkennt (Bouvet & Belasco, 1992), zu verzögern.

Die Initiation der Translation in einem prokaryotischen System wird durch die Ribosomenbindungsstelle (RBS), nach ihren Entdeckern auch als Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) benannt, zusammen mit dem Startkodon ausgelöst (Shine und Dalgarno 1975). Bei Verwendung eines eukaryotischen Systems wird die Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak, 1984) integriert. Nach dem Startkodon folgt der offene Leserahmen, der für das gewünschte Protein kodiert. Ein Abstandshalter, der Linker, folgt dem Leserahmen und dient der Überbrückung des Ribosomentunnels, um die Strukturfaltung beim „*Ribosome Display*“ zu ermöglichen (Malkin & Rich, 1967; Smith *et al.*, 1978; Makeyev *et al.*, 1996). Der Ribosomentunnel umfasst 30-35 Aminosäuren (Wilson & Nierhaus, 2003). Das DNA-Konstrukt darf, wie schon erwähnt, kein Stoppkodon aufweisen.

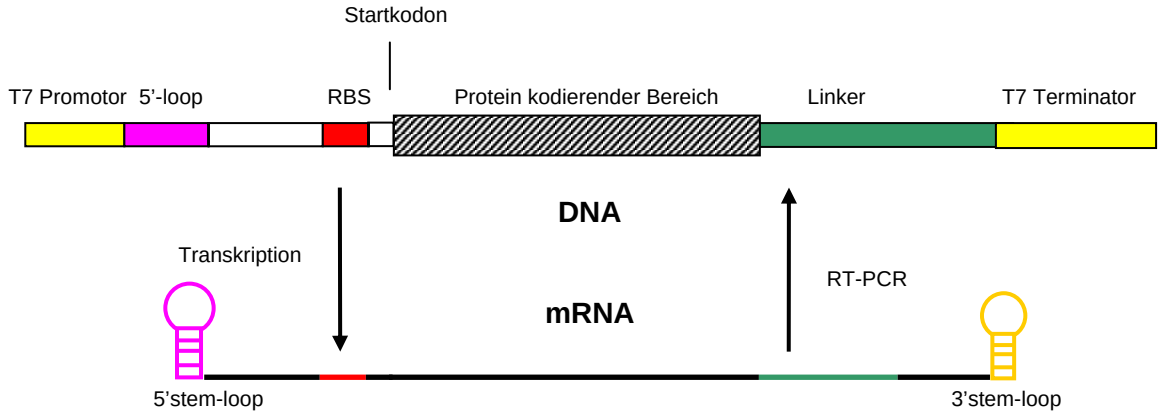

Abb. 2: Konstrukt für das „*Ribosome Display*“ im *E. coli* System. T7 Promotor und T7 Terminator dienen für die Produktion einheitlicher mRNA-Moleküle durch Transkription. Die RBS (Ribosomenbindungsstelle) und das Startkodon initiieren die Translation des offenen Leserahmens, dem Protein kodierenden Bereich. Die Ausprägung von „*stem-loop*“-Strukturen, Sekundärstrukturen, verleihen der mRNA am 3’- und 5’-Ende Stabilität.

Im prokaryotischen System führt ein Stoppkodon zur Dissoziation des Ribosoms und zur Freisetzung des Proteins. Ein Fehlen des Stoppkodons würde allerdings zu fehlerhaften Proteinen führen, eine Zerstörung des Proteins ist die einzige Möglichkeit. Keiler und Mitarbeiter beschrieben 1996 einen neuen Kontrollmechanismus in der prokaryotische Zelle. Entstehende Polypeptide, die von einer fehlerhaften mRNA translatiert werden, werden durch eine Peptidsequenz gekennzeichnet, die wiederum von einer Protease erkannt wird.

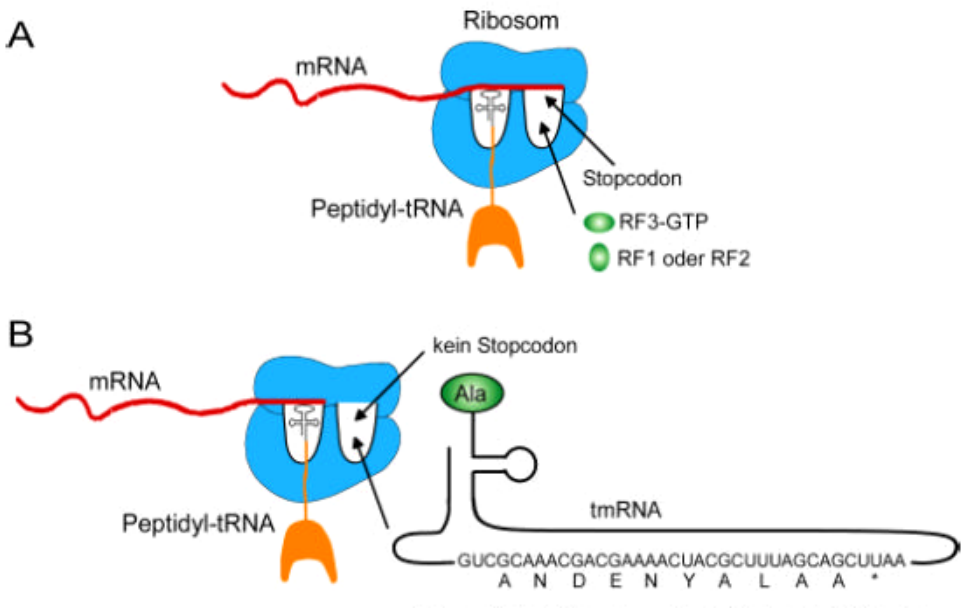

Abb. 3: Mechanismen der Translationstermination bei Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) des Stoppkodons. (A) Stößt ein Ribosom auf ein Stoppkodon, so wird ein Komplex aus zwei Freisetzungsfaktoren RF-1 und RF-3 oder RF-2 und RF-3 gebildet, was die Bindung einer tRNA unterbindet und zur Hydrolyse der Peptidyl-tRNA führt. Das synthetisierte Protein wird freigesetzt. **(B)** Werden mRNAs translatiert, die kein Stoppkodon aufweisen, wird eine kleine Peptidsequenz an das verkürzte, naszierende Protein angehängt, was zur Proteolyse des Proteins führt. Diese Peptidseqeunz wird von einer kleinen RNA, der 10Sa RNA kodiert. Diese erfüllt sowohl tRNA-Aufgaben als auch mRNA-Aufgaben, so dass sie auch als tmRNA bezeichnet wird. (Aus Lamla, 2002)

Diese Peptidsequenz (ANDENYALAA) wird auf einer kleinen (362 nt) stabilen RNA kodiert, der 10Sa RNA, die von dem *ssrA* Gen kodiert wird (Ray & Apirion, 1979). Ein Teil der 10Sa RNA faltet sich in eine tRNA ähnliche Struktur (Komine *et al.*, 1994). Die ambivalente 10Sa RNA erfüllt sowohl tRNA-, als auch mRNA-Eigenschaften, so dass sie auch als tmRNA bezeichnet wird.

Der C-terminale Peptid-tag wird von einer schwanzspezifischen Protease Tsp („*tail specific protease*“ oder Prc) erkannt (Keiler *et al.*, 1996). Tsp wurde von Hara *et al.* (1991) beschrieben. Tsp ist im Periplasma von *E. coli* zu finden und bindet C-terminale apolare Peptidschwänze von Proteinen und spaltet sie endoproteolytisch (Parsell *et al.*, 1990). Dieser Mechanismus scheint sinnvoll in Bezug auf bereits teilweise degradierte mRNA-Moleküle, die so ihr Stoppkodon verloren haben. Dieser Kontrollmechanismus kann in der zellfreien Proteinbiosynthese durch Zugabe eines Antisens-Oligonukleotides (AS-Oligo) gegen die tmRNA teilweise unterbunden werden (Hanes & Plückthun, 1997), so dass alle Ribosomen, die in der Translation involviert sind, an der mRNA arretiert bleiben.

Das „*Ribosome Display*“ kann als „Drei-Komponenten-System“ angesehen werden. Es werden translatierbare mRNAs ohne Stoppkodon benötigt, ein zellfreies System, welches die Proteinbiosynthese ermöglicht und ein Zielmolekül, gegen das selektiert werden soll. Nachdem das „*Ribosome Display*“ als Selektions-Methode kurz umrissen wurde, sollen im Folgenden Methoden beschrieben werden, die zur Synthese von DNA-Bibliotheken herangezogen werden können.

4 Mutationsmethoden

In den 90er Jahre hielten die *in vitro*-Mutagenese-Techniken Einzug, angefangen von der Mutagenen PCR (Cadwell & Joyce, 1992), dem „*DNA-Shuffling*" (Stemmer, 1994), gefolgt von der Hypermutagenese (Martinez *et al.*, 1996), der Kassetten-Mutagenese (Black *et al.*, 1996) bis hin zum Exon-Shuffling (Kolkman & Stemmer, 2001). Eine Auswahl an *in vitro*- Mutagenese-Methoden ist in Tab. 2 gegeben.

Tabelle 2: Übersicht über *in vitro* -Mutations-Methoden

***in vitro*- Mutations-Methode**	**Referenz**
Mutagene PCR	Leung *et al.*, 1989 Cadwell & Joyce 1992
Oligonucleotide-directed Mutagenesis	Oliphant *et al.*, 1986
DNA Shuffling	Stemmer 1994
Hypermutagenesis	Martinez *et al.*, 1996
Cassette Mutagenesis	Black *et al.*, 1996
Random Elongation Mutagenesis	Matsuura *et al.*, 1999
DNA Family Shuffling	Crameri *et al.*, 1998
StEP (Staggered Extension Process)	Zhao *et al.*, 1998
ITCHY (Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes)	Ostermeier *et al.*, 1999 Ostermeier *et al.*, 1999 Ostermeier *et al.*, 1999
Thio ITCHY	Lutz *et al.*, 2001
RACHITT (Random Chimeragenesis on Transient Templates)	Coco *et al.*, 2001
Exon Shuffling	Kolkman & Stemmer, 2001
SHIPREC (Sequence Homology-Independent Protein Recombination)	Sieber *et al.*, 2001
RM PCR (Random Multi Recombinant PCR)	Tsuji *et al.*, 2001
SCRATCHY (Modellvorschlag) (Experimentell)	Ostermeier 1999 Lutz *et al.*, 2001
DHR (Degenerate Homoduplex Recombination)	Coco *et al.*, 2002
RID (Random Insertion/Deletion mutagenesis)	Murakami *et al.*, 2002
SLIM (Site directed, Ligase Independent Mutagenesis)	Chiu *et al.*, 2004

Prinzipiell können drei Kategorien an Mutagenese-Techniken unterschieden werden. Die chemische Mutagenese, die mit verschiedenen chemischen Agenzien durchgeführt werden kann, die *in vivo*-Mutationsmethoden, wie das Arbeiten mit „*Mutator strains*“ (Grenner & Callahan, 1994), dem CLERY (Abecassis *et al.*, 2000), der Transposon-Technik und die *in vitro*-Mutationsmethoden (Tab. 2).

Diese Arbeit konzentriert sich im Wesentlichen auf drei *in vitro*-Mutationsmethoden, dem „*Shuffling*“, dem „*SCRATCHY*“ und dem „*StEP*“. Alle drei Techniken basieren auf der PCR, die im Folgenden näher erklärt werden soll.

4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro*-Amplifikation von DNA wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt. Wegen der exponentiellen Vermehrung der DNA wurde diese Technik als „*Polymerase chain reaction*“ oder kurz PCR bekannt. Die PCR ist relativ einfach und kann sehr schnell und in einer hohen Durchsatzrate erfolgen. Für eine Reaktion werden mindestens 6 Komponenten benötigt.

PCR-Puffer

Dieser Puffer bietet dem Enzym, der DNA-Polymerase, bei verschiedenen Temperaturen ein optimales Milieu. Weichen die Bedingungen für das Enzym ab, so wird die Aktivität herabgesetzt.

Magnesium

Magnesium ist der Kofaktor für viele Polymerasen. Magnesiumionen beeinflussen die Enzymaktivität, erhöhen die Schmelztemperatur der DNA und bilden mit Nukleotiden einen löslichen Komplex. Die eingesetzte Magnesiumkonzentration hängt von der eingesetzten Konzentration der anderen Komponenten ab, die Magnesium binden können (dNTPs, freies Pyrophosphat, DNA). Die ideale Konzentration sollte für jede Reaktion getestet werden. Meist liegt sie zwischen 1,0 und 2,5 mM.

Nukleotide

Die Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) sind die Substrate für die DNA-Polymerase. Sie gehen mit Magnesiumionen einen Komplex ein und können komplementär an die Matrize über die Basenpaarregelung und über eine Phosphordiesterbindung an ein freistehendes 3’-OH-Ende des zu synthetisierenden Stranges geknüpft werden. Die einzusetzende Konzentration hängt von der Anzahl der PCR-Zyklen, den Oligonukleotiden, der Matrize und der $MgCl_2$-Konzentration ab.

Oligonukleotide

Bei den Oligonukleotiden handelt es sich um meist kleine einzelsträngige DNA-Moleküle, die zu einem Teil der Matrize komplementär sind. Sie sind auch unter Primer oder Oligonukleotide (Oligos) bekannt. Sie dienen als Startermoleküle für die DNA-Polymerase, die an das 3'-OH-Ende die Nukleotide knüpft. Das Oligonukleotid lagert sich bei einer bestimmten Temperatur an das zu amplifizierende DNA-Molekül an. Diese Anlagerungs- bzw. Annealing-Temperatur hängt von der Länge des Oligos und dem AT-GC-Gehalt ab. Die Oligos werden im Überschuss zugegeben (0,2 - 2 µM).

Matrize

Die eingesetzte DNA ist die Vorlage, die vervielfältigt werden soll. Diese DNA sollte einen bestimmten Reinheitsgrad besitzen, der über spektrophotometrische Messung ermittelt werden kann. Die Menge hängt von der Größe der DNA ab und kann 10 fg bis zu ca. 200 ng betragen.

DNA-Polymerase

Das Enzym, das in der PCR Anwendung findet, ist eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA bei 95 °C in Einzelstränge ist bei gleichzeitigem Vorhandensein des Enzyms möglich, das aufgrund seiner thermostabilen Eigenschaft kaum einen Aktivitätsverlust erleidet.

Die thermostabilen DNA-Polymerasen werden aus extrem thermophilen Bakterien wie *Thermus thermophilus, Thermus aquaticus, Thermus flavus, Pyrococcus woesei, Pyrococcus furiosus* gewonnen. Alle Polymerasen benötigen ein freies 3'-OH-Ende, ihre Syntheserichtung ist 5'→3'. Während die Polymerasen aus *Thermus* eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzen, weisen die Polymerasen aus *Pyrococcus* eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf, die zu einer fehlerfreien Polymerisation führt. Sie besitzen eine so genannte *„proofreading"*-Aktivität.

Tabelle 3: Thermostabile DNA-Polymerasen im Vergleich

DNA-Polymerase	Fehlerrate (10^{-6})[a]	5'-3'-Exonuklease	3'-5'-Exonuklease	RT-Aktivität	Bakterienstamm
Taq	18	ja	nein	schwach	*T.aquaticus*
Pwo	3,2	nein	ja	nein	*P.woesei*
Tth	30	ja	nein	stark	*T.thermophilus*

[a] Fehlerrate wurde durch den LacI assay nach Frey *et al.*, 1995 bestimmt

Wenn alle PCR-Komponenten miteinander vereint wurden, erfolgt ein Temperaturprogramm mit folgenden Schritten:

Denaturierung

Bei der Denaturierung werden die DNA-Doppelstränge durch Zerstörung der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren voneinander getrennt. Dies findet bei 95 °C für kurze Zeit statt. Zu Beginn der PCR-Zyklen sollte eine 1-5 minütige Inkubation stattfinden. Werden die DNA-Stränge nicht vollständig getrennt, wirkt sich dies auf die Annealingeffizienz der Oligos aus.

Oligonukleotid-Anlagerung (Hybridisierung, Annealing)

Die Anlagerung findet bei einer bestimmten Temperatur statt. Diese muss für jedes Oligopaar optimiert werden. Zu hohe Temperaturen führen zu keinem Annealing und demzufolge zu keinem Produkt. Zu niedrige Temperaturen führen zu Fehlbasenpaarungen, so dass Nebenprodukte entstehen können. Meist liegt die Temperatur zwischen 50-65 °C.

Oligonukleotid-Verlängerung (Elongation)

Die Elongation findet bei einer Temperatur statt, die dem Aktivitätsoptimum des Enzyms entspricht. Dies liegt in der Regel zwischen 70-72 °C. Die Elongationszeit ist wiederum abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Moleküls. Ein Richtwert sind 1000 verknüpfte Nukleotide pro 60 s. Ausnahmen sind die „*proofreading*"- Polymerasen, die für 1000 bp ca. 2 min benötigen.

Zyklenzahl

Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation bilden einen Zyklus. Ein solcher Zyklus kann 20-30-mal wiederholt werden. Mit zunehmender Zyklenzahl steigt das Risiko, dass Nukleotide fehlerhaft eingebaut werden oder unspezifische Fragmente synthetisiert werden.

Das Prinzip der PCR kehrt in den verschiedenen Mutationsmethoden wieder.

4.2 „DNA-*Shuffling*"-„*single gene shuffling*"

Die *in vitro*-Proteinevolution dient der Untersuchung von Struktur-Funktionsbeziehungen und der Verbesserung von Enzymaktivitäten und anderen Proteinfunktionen. Um die Eigenschaften eines Proteins verbessern zu können, müssen einzelne Veränderungen in der Aminosäuresequenz vorgenommen werden.

Das Protein dient dabei als so genanntes „*Scaffold*“, d.h. es ist das Gerüst für weitere Modulationen. Dabei muss nicht jede eingeführte Veränderung zwangsläufig zu einer Verbesserung der Eigenschaft führen. Um die gewünschten Moleküle von den ungewünschten Molekülen trennen zu können, müssen Selektionsmethoden herangezogen werden. Dabei nutzt man die zu selektierende Eigenschaft des Proteins. Handelt es sich zum Beispiel um ein Enzym, könnte ein Enzymtest erfolgen, der ausgewählte Kriterien wie Temperaturstabilität oder Aktivität beinhalten könnte. Um Bindungseigenschaften von mindestens zwei Molekülen zu untersuchen bzw. zu detektieren, wurden in den letzten Jahren so genannte „*Display*“-Methoden entwickelt.

Das Einbringen von Mutationen in die DNA führt zu Abwandlungen in der Aminosäuresequenz, was Modifikationen in der Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur nach sich zieht. Eine Technik um DNA zu verändern bzw. zu mutieren, ist das „*Shuffling*“, das auf dem Prinzip der PCR (I 4.1) beruht und über einen vorgegebenen Sequenzbereich ungerichtet Mutationen einbaut. Der Prozess des „*Shufflings*“, wie es von Stemmer 1994 erdacht wurde, besteht aus mehreren Reaktionen. Die Protein kodierende Nukleinsäuresequenz wird zuerst mit Hilfe der Desoxyribonuklease I (DNase I) in Fragmente unterschiedlicher Größe gespalten (Abb. 4). Das Gemisch aus den DNA-Fragmenten wird nach Aufreinigung in eine PCR ähnliche Reaktion eingesetzt (Rekonstruktion des Gens). Wichtiger Unterschied dabei ist, dass die Oligos fehlen, welche eventuell noch vorhandene, ganze DNA-Sequenzen bevorzugt amplifizieren. Die DNA-Fragmente werden bei 95 °C denaturiert, so dass Einzelstränge vorliegen. Diese Einzelstränge lagern sich dann nach Absenkung der Temperatur auf 45 °C-55 °C zusammen und dienen einerseits als Matrize und andererseits als Primer (Reassemblierung bzw. Rekonstruktion). Durch die geringe Temperatur kommt es zu Fehlbasenpaarungen. Die anschließende Verlängerung der Stränge führt zur Manifestierung der Mutationen. Unterstützend wirkt sich dabei eine erhöhte Mg^{2+}-Konzentration aus, die negative Ladungen abschirmen und so Wechselwirkungen zwischen DNA-Polymerase, Nukleotiden und DNA verschlechtert. Wird die Elongationszeit sehr kurz gehalten, erfolgt eine unvollständige Verlängerung. Eine erneute Fehlhybridisierung im nachfolgenden Zyklus ist wahrscheinlich. Dieser Prozess basiert auf dem Prinzip des „*StEP*“ (staggered extension process) von Zhao 1998 entwickelt und hier teilweise realisiert (eigene Arbeit).

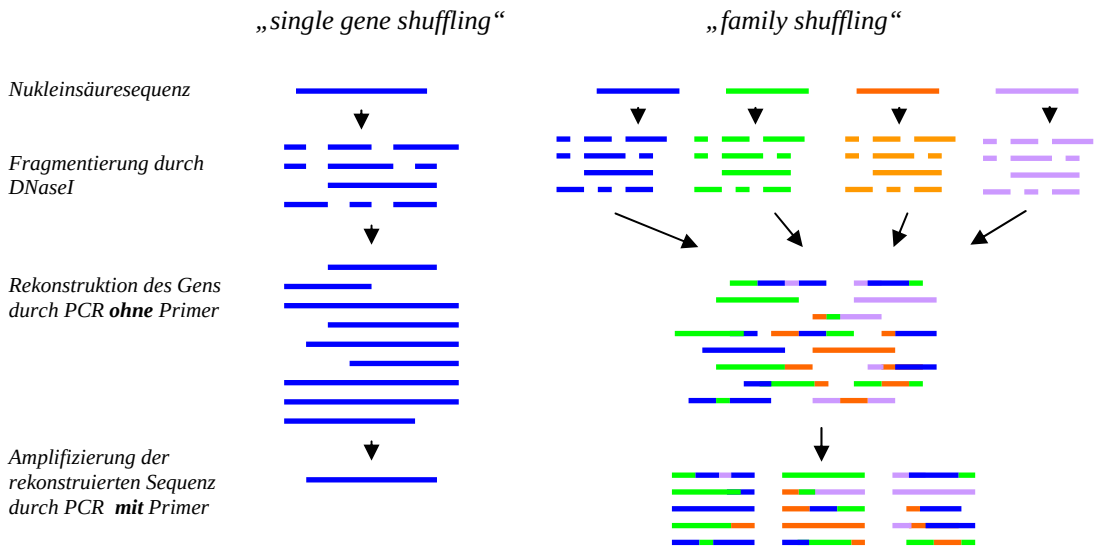

Abb. 4: Prinzip des „*DNA-Shufflings*“. Gegenübergestellt sind das „*single gene shuffling*“ und das „*family shuffling*“. Während das „*single gene shuffling*“ eine Ausgangssequenz besitzt, kombiniert das „*family shuffling*“ mehrere Sequenzen mit hoher Homologie. Beide vereinigen vier aufeinander folgende Reaktionen: Synthese, Fragmentierung, Rekonstruktion und Amplifizierung der Nukleinsäuresequenz, wodurch Punktmutationen über den ganzen Sequenzraum eingebaut werden können.

Es gibt praktisch keine Elongationszeit, so dass ein stetiger Wechsel zwischen Denaturierung und stark verkürztem Annealing stattfindet. Es kommt zu unvollständigen Verlängerungen und Fehlhybridisierungen. Zusätzlich wirken sich viele Zyklen, z.B. 40, negativ auf die Enzymaktivität der DNA-Polymerase aus. Verwendet man zudem die *Tth*-DNA-Polymerase, die im Vergleich zur *Taq*-Polymerase eine höhere Fehlerrate besitzt (Tab.3), so sollte eine Mutationsrate von 0,05-0,7 % (Stemmer 1994) möglich sein (Bezug zur eigenen Arbeit). Deletionen bzw. Insertionen führen zu weitreichenderen Konsequenzen als Transition oder Transversion, da es zu einer Verschiebung des „*Open Reading Frames*“ (ORF) kommen kann. Die anschließende PCR mit Primern soll die rekonstruierte DNA-Sequenz amplifizieren, so dass die ursprüngliche Sequenz inklusive Mutationen gewonnen werden kann (Abb 4).

Der kritische Punkt am „*Shuffling*“ ist die Fragmentierung der DNA. Die Qualität der DNA-Fragmente ist bei jedem Verdau anders, so dass an diesem Schritt viele Optimierungen und Varianten erfolgten. So wurde der DNase I-Verdau unter Anwesenheit von Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} zur Erhöhung der Mutationsrate durchgeführt (Lorimer & Pastan, 1995). Zhao und Arnold führten 1997 einen DNase I-Verdau unter Verwendung von Mn^{2+} durch und testeten in diesem Zusammenhang weitere Komponenten, z.B. die Benutzung verschiedener Polymerasen bzw. Polymerasegemischen während der Reassemblierung der Sequenz und der anschließenden PCR.

Im Jahre 2002 wurde eine Alternative von Miyazaki entwickelt. Das Enzym Endonuklease V spaltet Uracil enthaltende DNA. Es wurde ein Gemisch aus dUTP und dTTP zur Generierung des Gen-Fragmentes eingesetzt. Die Länge der DNA-Fragmente beim DNase I-Verdau konnte so über das Verhältnis von dUTP und dTTP gesteuert werden. Auf diese Art und Weise können reproduzierbare Qualitäten der DNA-Fragmente erhalten werden.
Alles in allem werden unter Verwendung einer DNA-Sequenz als Grundlage, Bibliotheken mit einzelnen Punktmutationen erzeugt.
Werden nun mehrere DNA-Sequenzen verschiedener Organismen mit einer hohen Sequenzhomologie in eine „*Shuffling*"-Reaktion eingesetzt, wird vom „*family shuffling*" gesprochen (Abb. 4), während vorher vom „s*ingle gene shuffling*" gesprochen wurde (Abb.4). Mit dem „*family shuffling*" können aus verschiedenen Spezies Merkmale miteinander vereint werden. Dies wurde erstmals 1998 im Labor von Stemmer und Crameri *et al.* gezeigt. Hier wurden 4 Cephalosporinase-Antibiotika-Sequenzen aus vier Organismen (*Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae und Yersina enterocolitica*) sowohl einem „s*ingle gene shuffling*" als auch einem „*family shuffling*" unterzogen. Aus der Bibliothek, bestehend aus Punktmutanten konnten Mutanten selektiert werden, die eine 8-fach höhere Resistenz zeigten, während bei der Chimären-Bibliothek Mutanten mit einer 270-540-fachen Resistenzsteigerung isoliert wurden.
Das „*family shuffling*" bringt zwar eine höhere Mutationsrate mit sich, allerdings ist eine hohe Sequenzhomologie von ca. 70 % nötig. Diese Sequenzhomologie muss bei der Mutationsmethode SCRATCHY nicht beachtet werden (I 4.4).

4.3 ITCHY

Das ITCHY (*„Incremental Truncation for the Creation of Hybrid enzymes")* wurde 1999 von Ostermeier *et al.* erdacht und entwickelt. Es ist eine Methode zur Generierung von kombinatorischen DNA-Bibliotheken, die für Hybrid-Proteine kodieren und die unabhängig von der DNA-Sequenzhomologie erstellt werden. Dazu werden zwei Protein kodierende DNA-Sequenzen oder auch DNA-Sequenzen, die für Domänen kodieren, in einen entsprechenden Vektor inseriert.
Die grundlegenden Reaktionen des ITCHY beinhalten eine Linearisierung des Plasmides, so dass die Enden für die Exonuklease III zugänglich werden (Abb. 5).

Diese Exonuklease III baut dann unter kontrollierten Bedingungen den DNA-Doppelstrang zu einem partiellen Einzelstrang ab (Abb. 5).

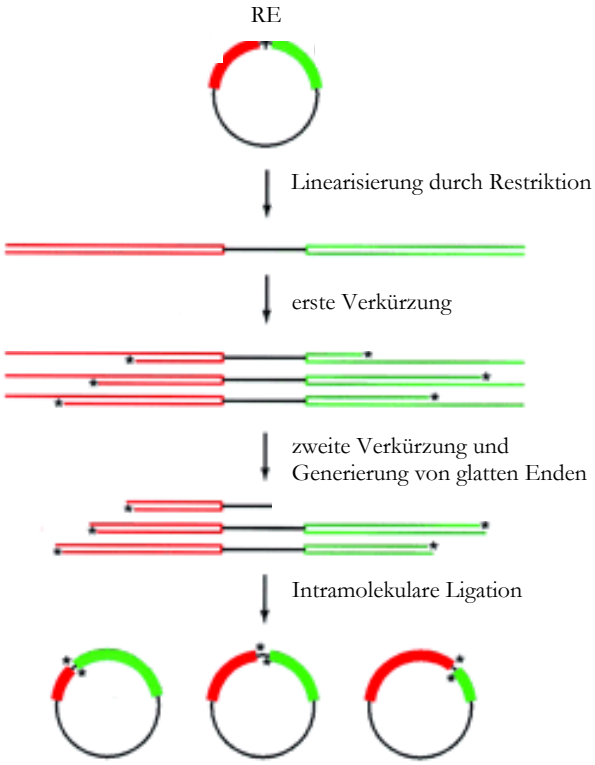

Abb. 5: Schema des ITCHY. Linearisierung des Plasmides durch Restriktion zwischen zwei Genen oder Genfragmenten. Sukzessive Verkürzung des einen Stranges der DNA durch Exonuklease III, so dass unterschiedlich lange Überhänge entstehen, die in einer zweiten Reaktion durch Exonuklease S1 oder Mung Bean Nuklease reduziert werden. Es entstehen verkürzte DNA-Doppelstränge mit glatten Enden, die intramolekular ligiert werden können, so dass Hybrid-Proteine bzw. Chimären entstehen.

Dieser Einzelstrang kann durch Exonukleasen wie der S1 oder der Mung Bean Nuklease entfernt werden. Die so verkürzten DNA-Fragmente tragen glatte Enden, die intramolekular miteinander ligiert werden können (Abb. 5).

Bei diesen Reaktionen handelt es sich um statistische Prozesse, deren Verlauf stark von der Zeit, der Konzentration und der Temperatur abhängig sind. Im idealen Fall kann eine Bibliothek mit hoher Varietät erhalten werden.

3.4 SCRATCHY

Das SCRATCHY wurde 1999 von Ostermeier *et al.* im Zuge der Mutationstechnik ITCHY als Modell aufgestellt und noch im selben Jahr erfolgreich angewendet. Diese Methode führt das ITCHY und das „*Shuffling*“ zusammen.

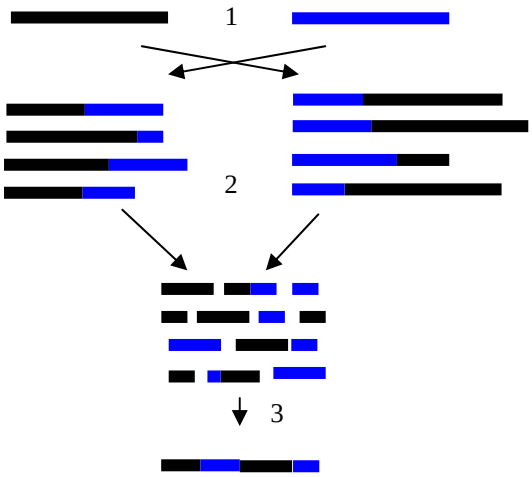

Abb. 6: SCRATCHY. 1: mit zwei DNA-Molekülen wird mittels ITCHY eine Bibliothek erstellt, die **2:** mit DNase I fragmentiert und in das „*Shuffling*“ eingesetzt wird, resultierend in **3:** einer DNA-Sequenz mit vielen „*cross over*“ Ereignissen.

Es wurde eine DNA-Bibliothek mit Hilfe des ITCHY hergestellt, basierend auf überlappenden N- und C-terminal verkürzten DNA Sequenzen. Das Gen *purN* (Glycinamidribonukleotid-Transferase) mit einer Größe von 212 bp wurde N-terminal (63-212) und C-terminal (1-144) verkürzt und in zwei Vektoren kloniert, die für das *„incremental truncation“* präpariert worden sind. Das Plasmid mit dem C-terminal verkürzten Gen wurde weiter C-terminal verkürzt und das Plasmid mit dem verkürzten N-Terminus wurde weiterhin vom N-Terminus verkürzt. Die Verkürzung erfolgte mit Exonuklease III und S1 Nuklease. Durch einen Funktionstest konnten aus der hergestellten PurN-Heterodimer-Bibliothek aktive Proteine selektiert werden.

Werden die Reaktionen des ITCHY verwendet, führt dies unter anderem zu chimären DNA-Fragmenten, die in das „*Shuffling*“ eingesetzt werden können. Nach der Rekonstruktion wird die ganze DNA-Sequenzlänge mit multiplen „*cross over*“ Ereignissen erhalten.

5 Surface-layer-Proteine (S-layer-Proteine)

Die S-layer-Proteine mit ihren SLH-Domänen wurden für diese Arbeit als Basisstruktur -„*Scaffold*"- ausgewählt. Durch bestimmte Mutationsmethoden sollten die putativen Bindungseigenschaften der SLH-Domänen als Kohlenhydratbinder (Lektine) verbessert werden.

5.1 Einführung

S-layer sind parakristalline, einschichtige, zwei-dimensionale Anordnungen aus (Glyko-) Proteinuntereinheiten, die auf den meisten Bakterien und fast allen Archaeae vorkommen (Sleytr 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Lebensbedingungen der prokaryotischen Mikroorganismen ist es schwer, eine gemeinsame, generelle Funktion der S-layer zu finden. Es wird angenommen, dass die S-layer als Schutzschild dienen und in der Zelladhäsion bzw. der Zellerkennung involviert sind. Eine Aufgabe wie die eines molekularen Siebes scheint naheliegend (Sleytr 1997). Morphologische und morphogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass S-layer den einfachsten Typ von biologischen Zellhüllen in der Entwicklung darstellen. Die Elektronenmikroskopie konnte die Oberflächenstruktur der S-layer definieren (Sleytr 1997). So unterscheidet man schräge (oblique), tetragonale (square) und hexagonale Gittertypen (Abb. 7).

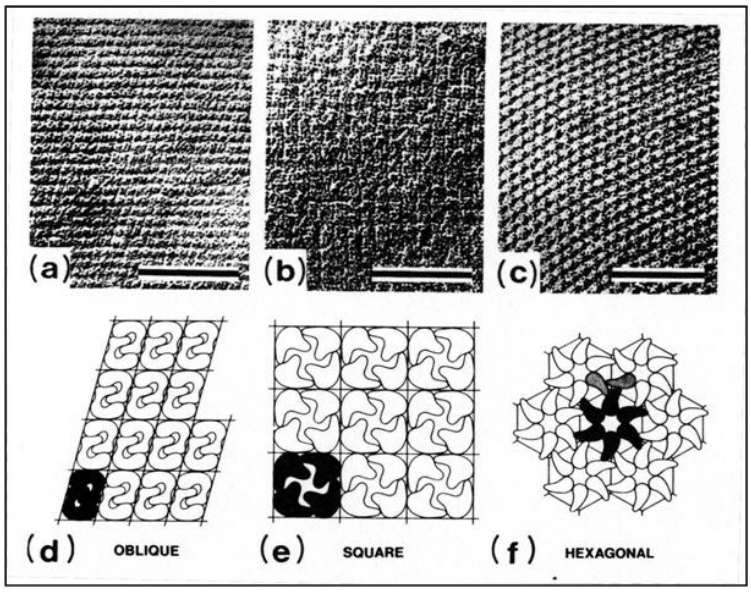

Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen (a)-(c) von Gefrier-Ätzpräparaten von intakten Zellen, und (d)-(f) schematische Darstellung der dazugehörigen Gittertypen. (a) und (d) oblique (p2) von *B. stearothermophilus* NRS 2004/3a ; (b) und (e) square (p4) von *B. stearothermophilus*, Stämme H4-65; (c)-(f) hexagonal (p6) von *C. thermohydrosulfuricum*, Stamm L111-69. Vergrößerungsmarker 100 nm. Aus Archibald *et al.* (1988)

Die S-layer sind 5-25 nm dick, besitzen eine Porengröße von 2-8 nm und bedecken die gesamte Oberfläche der Bakterienzelle (Sára & Sleytr 2000). Die S-layer-Proteine unterscheiden sich deutlich in ihren Primärstrukturen, enthalten jedoch Strukturelemente, über die sie mit der Zelle verbunden sind. Bei Gram-positiven Bakterien können die S-layer über sogenannte SLH-Domänen („*Surface Layer Homologe*") an die Zelle gebunden sein (Sára & Sleytr 2000). Bei Gram-negativen Bakterien sind die S-layer-Proteine mit den Lipopolysacchariden assoziiert, und bei den Archaeae sind die S-layer-Proteinuntereinheiten mit dem Pseudomurein verbunden (Engelhardt & Peters 1998).
Anwendungen mit S-layer-Proteinen sind in den Bereichen der Biotechnologie, Biomimetic, Biomedizin, molekularen Nanotechnologie, Vaccin-Entwicklung und Diagnostik denkbar (Sleytr 1997).

5.2 S-layer-Domänen der S-layer-Proteine

Die S-layer-Proteine verschiedener Bakterien können unterschiedliche Domänen besitzen, die im folgenden kurz skizziert werden:

(1) LPS-Bindedomäne bei *Campylobacter fetus* (Dworkin *et al.*, 1995)
(2) Ca^{2+}- Bindedomäne bei *Caulobacter cresentus* (Walker *et al.*, 1994)
(3) C-terminal hydrophobe Membran-Bindedomänen bei S-layer-Proteinen von *Corynebacterium glutamicum* (Peyret *et al.*, 1993), *Halobacterium halobium* (Lecher & Sumper 1987) und *Halobacterium volcanii* (Sumper *et al.*, 1990)
(4) SLH-Domänen („*Surface Layer Homologe*") für die Verankerung der S-layer-Proteine und der Exoenzyme bei Gram-positiven Bakterien (Ries *et al.*, 1997).

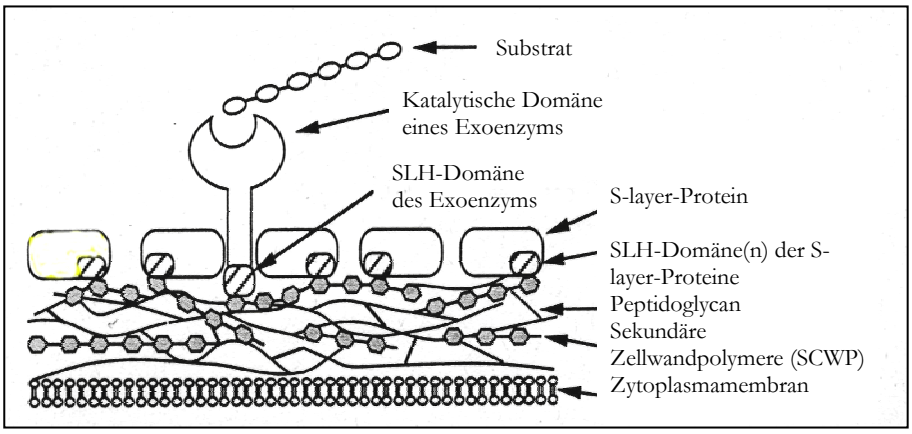

Abb. 8: Hypothetisches Modell einer Gram-positiven Zellwand. Die SLH-Domänen an Exoenzymen und S-layer-Proteinen interagieren mit den SCWP im Peptidoglycan. Modifiziert nach Brechtel & Bahl (1999).

SLH-Domänen sind konservierte Sequenzen aus 50-60 Aminosäuren, von Lupas *et al.* (1994) entdeckt und bis zu dreimal in S-layer-Proteinen vorkommen können. Diese Motive liegen meist C-terminal bei Exoenzymen und N-terminal bei S-layer-Proteinen (Engelhardt & Peters 1998). Eine Domäne ist durch zwei α-Helices (H_I und H_{II}), die ein kurzes β-Faltblatt (S) flankieren, und eine „*loop*"-Struktur charakterisiert (H_I-S-H_{II}-L) (Engelhardt & Peters 1998).
Es wurde diskutiert, ob die SLH-Domänen essentiell für die Verankerung am Peptidoglycan sind. Untersuchungen von Ries *et al.* (1997), Egelseer *et al.* (1998), Chauvaux *et al.* (1999), Mesnage *et al.* (2000) und Sára *et al.* (1998) weisen auf eine nicht-kovalente Verankerung über die sekundären Zellwandpolymere (SCWP) hin. Die Basisstruktur der SCWP (Abb. 9) können Teichonsäuren, Teichuronsäuren, Lipoteichonsäuren und Lipoglycan sein (Ilk *et al.* 1999).

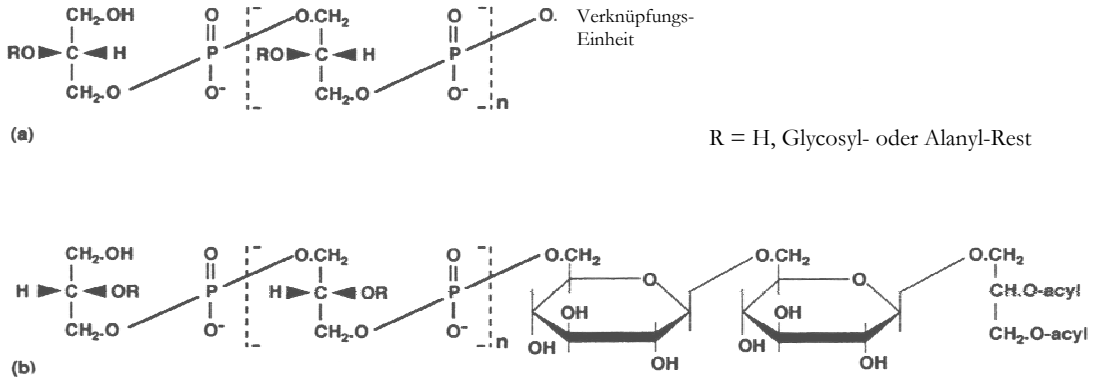

Abb. 9: Struktur von Glycerin-Teichonsäuren aus *B. subtilis*. a) 1-3-Glycerinphosphat-Teichonsäuren, b) 1-3-Glycerin-Lipoteichonsäuren

Die SLH-Domänen der S-layer Proteine von *Bacillaceae* sind über distinkte SCWP an der Zellwand verankert (Mesnage *et al.*, 2000, Mader *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen isoelektrischen Punkte (pI) der SLH-Domänen und der negativen Ladungen der SCWPs wurde spekuliert, ob die Bindung über elektrostatische Interaktionen erfolgt. Allerdings scheint die Erkennung nach einem ähnlichen Mechanismus abzulaufen, wie es bei den Lektinen der Fall ist, nämlich über hoch spezifische Erkennung der Kohlenhydratstruktur durch Proteinbindungsstellen. Das Austauschen der SCWP durch Heparin, was ebenfalls ein Polykation ist, oder durch andere SCWP anderer Organismen, zeigten keinerlei Bindungen.

Nur das S-layer-Protein und die dazu gehörigen SCWP des Organismus zeigten Wechselwirkungen (Mader *et al.* 2004). Eine vergleichende Studie von Huber *et al.* (2005) demonstrierte, das die SLH-Domänen allein nicht ausreichen, um eine Verankerung zu den SCWPs herstellen zu können. Ein SLH ähnliches Motiv 11 Aminosäuren nach der dritten SLH-Domäne ist nötig, um eine Verankerung herstellen zu können. Festzuhalten ist, dass die SLH-Motive eine wichtige Rolle bei der Verankerung der S-layer-Proteine spielen, aber allein nicht für eine Bindung in der Zellwand ausreichen.

5.3 Funktionen der S-layer-Proteine

Mikroorganismen besiedeln unterschiedliche Habitate und müssen dementsprechend diverse Strategien entwickeln, um sich anzupassen. Eine Form der Anpassung ist die unterschiedliche Ausprägung der Zelloberflächen verschiedener Bakterien. Eine bedeutende Rolle nimmt dabei die S-layer ein, die z.B. die Zellform mitbestimmt, als Schutzhülle vor Phagozytose schützt oder bei der Phagenresistenz durch S-layer-Variationen eine große Bedeutung besitzt (Kotiranta *et al.*, 1998). Als Virulenzfaktor übernimmt sie eine wichtige Rolle bei der Invasion und dem Überleben im Wirt und der spezifischen Bindung von Wirtsmolekülen. Sie haben die Fähigkeit, mit Makrophagen zu assoziieren und dienen dem Widerstand gegen Proteasen (Kotiranta *et al.*, 1998, Sillanpää *et al.*, 2000). Des Weiteren dienen sie der Oberflächenerkennung und Zelladhäsion für Substrate (Egelseer *et al.*, 1995 & 1996). Aufgrund ihrer gleichmäßig angeordneten Poren identischer Größe können sie als molekulares Sieb fungieren. (Sleytr 1997).

5.4 Applikationspotential

Das breite Applikationspotential von S-layer-Proteinen ist auf die parakristalline, monomolekulare Anordnung zurückzuführen und ist von der Fähigkeit der S-layer, sich nach Denaturierung in geordneten Formen zusammenzulagern, abhängig. Eine besondere Eigenschaft ist die Ausbildung von Poren definierter Größe. Im Folgenden werden die möglichen Applikationen nur zusammengefasst. Zur weiteren Vertiefung siehe Sleytr *et al.*, (1997) und Beverdige *et al.*, (1997).

S-layer können als Ultrafiltrationsmembran mit definierten physikochemischen Oberflächeneigenschaften eingesetzt werden.

Als Matrix für Immobilisierungen von funktionellen Molekülen, wie Enzymen, würden sie als amperometrische, optische und bioanalytische Sensoren dienen. Denkbar ist auch eine Anwendung in der ELISA (Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay) bei einer zusätzlichen Immobilisierung von Antikörpern. S-layer bedeckte Liposomen können bei Immobilisierung von funktionellen Molekülen als Adressormolekül für „*drug targeting*", als Vehikel für Produkte und Fusionsproteine und für das Fangen von Molekülen („*drug transfer*") eingesetzt werden. Weiterhin können sie funktionelle Lipidmembranen stützen und als biomimetische Templats eingesetzt werden. (Sleytr 1997, Beverdige *et al.*, 1997)

6 Kohlenhydrate

Vier Kohlenhydrate wurden für das „*Ribosome Display*" als Zielmoleküle ausgewählt. Es handelt sich dabei um das Heparin, das Streptomycin und die Sialyl-Lewis X-Säure, die aus mindestens zwei Kohlenhydratmolekülen bestehen und das N-Acetylglucosamin, was als Monosaccharid in unmodifizierter Form (Glucosamin) in allen ausgesuchten Kohlenhydratmolekülen vorkommt.

Die Kohlenhydrate gehören zu den primären Naturstoffen, wie auch die Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Die Kohlenhydrate können sowohl als Monomere als auch als Polymere vorkommen und so vielfältige Funktionen haben. Die Komplexität kann durch verschiedene Verzweigungen bzw. Verknüpfungen mit anderen Molekülen wie Proteine und Lipide erhöht werden, so dass eine nahezu unbegrenzte Strukturvielfalt und somit auch ein hoher Informationsgehalt besteht. Derzeit sind die Glykoproteine von besonderem Interesse. Sie sind in verschiedenen biologisch aktiven Substanzen anzutreffen wie zum Beispiel Enzyme, Antikörper, Hormone, Cytokine, Rezeptoren oder Strukturproteine. Die Abfolge der Kohlenhydrate kann dabei linear oder verzweigt sein und ihre Struktur kann sich während Wachstum, Differenzierung, Entwicklung und Krankheit ändern. Aufgrund dieser Tatsache ist die Untersuchung von Struktur und Funktionsbeziehungen von Bedeutung. Im Nachfolgenden wird auf drei Kohlenhydrate näher eingegangen.

6.1 Streptomycin

Streptomycin war das erste Aminoglycosid-Antibiotikum, das 1944 von Schatz *et al.*, (1944) entdeckt wurde. Schatz war ein Mitarbeiter von S.A. Waksman, der 1952 für dessen Entdeckung den Nobelpreis erhielt. Das Streptomycin war das erste effektive Antibiotikum gegen Tuberkulose. Zu dieser Antibiotika-Familie gehören auch Neomycin B, Paromomycin und Gentamycin. Sie besitzen die Fähigkeit, RNA zu binden.

Von den Aminoglycosiden ist bekannt, dass sie die Aktivität von Ribozymen *in vitro* hemmen können. Prominente Beispiele dafür sind die selbstspleißenden Introns der Gruppe I (von Ahsen *et al.*, 1991), das selbstspleißende Hammerhead- (Stage *et al.*, 1995) und das menschliche Hepatitis-delta-Virus (HDV) -Ribozym (Roger *et al.*, 1996; Chia *et al.*, 1997), die Magnesium induzierte Spaltung des Hairpin-Ribozyms (Earnshaw & Gait, 1998) und die tRNA-Prozessing-Aktivität von RNase P-RNA (Mikkelsen *et al.*, 1999). Sie werden alle durch die gleichen Aminoglycoside inhibiert, besonders durch Neomycin B und Tobramycin. Aminoglycoside sind eine Gruppe von „*miscoding*"-Reagenzien, die an das Ribosom binden und so die Fehlerrate der Proteinbiosynthese erhöhen (Davies *et al.*, 1964,1965; Pestka *et al.*, 1965; Gorini, 1974). Streptomycin interagiert sowohl mit der 16S rRNA als auch mit dem ribosomalen Protein S12 (Carter *et al.*, 2000). S12 ist an der tRNA-Erkennung und dem Entschlüsseln in der „*A-site*" des Ribosoms beteiligt (Brodersen & Nissen, 2005; Moazed & Noller, 1987). Streptomycin interagiert mit der „*decoding*"-Region der 16S rRNA (Spickler *et al.*, 1997) und führt durch Abschirmung bestimmter Basen zu einem Fehlverhalten des Ribosoms, was in einem „*miscoding*" resultiert. Des Weiteren kann auch Streptomycin mit den Introns der Gruppe I interagieren, indem es das Selbstspleißen inhibiert (von Ahsen & Schröder, 1991). Streptomycin ist ein Trisaccharid, das aus den selten vorkommenden Zuckern L-Streptose und Streptidin in Verknüpfung mit N-Methyl-L-Glucosamin besteht (Abb. 10).

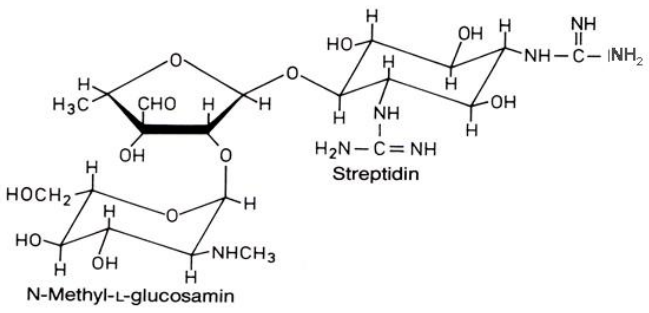

Abb. 10: Struktur von Streptomycin. Streptomycin besteht aus L-Streptose, Streptidin und N-Methyl-L-Glucosamin.

6.2 Heparin

Heparin, ein sulfatiertes Polysaccharid, was zu den Glycosaminoglycanen gehört, wurde 1916 von Jay McLean entdeckt und zeigt eine Reihe wichtiger biologischer Wirkungen, die aus der Wechselwirkung mit Proteinen resultieren. Die bekannteste Anwendung ist die als Antikoagulanz (Antiblutgerinnungsmittel). Es erhöht die Geschwindigkeit, mit der Antithrombin die Serinproteasen in der Blutgerinnungskaskade inhibiert. Die Struktur des Heparins wurde erst nach und nach verstanden. Heparin und das strukturverwandte Heparansulfat sind komplizierte lineare Polymere, die aus Kohlenhydrat-Ketten unterschiedlicher Länge und Sequenz bestehen. Jorpes und später Charles wiesen nach, dass Heparin einen hohen Anteil an kovalent gebundenem Sulfat enthält, der es zu einer der stärksten Säuren in der Natur macht (Jorpes & Bergstrom, 1936; Charles & Todd, 1940).

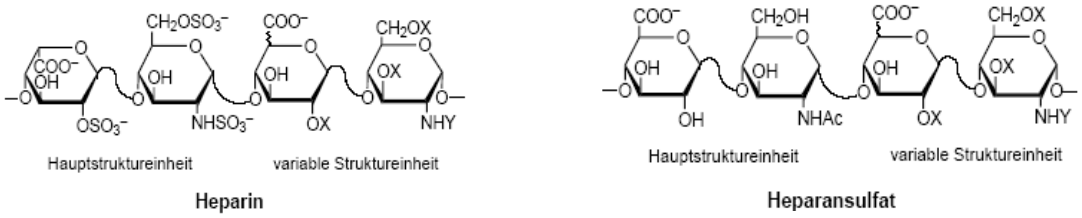

Abb. 11: Struktur von Heparin und dem strukturverwandten Heparansulfat. (X=H oder SO_3^-, Y= Ac, SO_3^- oder H). entnommen aus (Linhardt & Capila, 2002).

Heparansulfat findet man an der Oberfläche von tierischen Zellen und in der extrazellulären Matrix. Es ist ebenfalls an einer Reihe wichtiger physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Durch Untersuchungen konnte eine 1→4-Verknüpfung zwischen dem C-1 des Glucosamins und dem C-4 der Uronsäure sowie die Stellung der O-Sulfogruppen im Heparin festgestellt werden. Dieses Disaccharid wiederholt sich unterschiedlich oft. Die Uronsäurereste bestehen im Allgemeinen zu 90 % aus L-Iduronsäure und zu 10 % aus D-Glucuronsäure. Wegen seines hohen Anteils negativer Sulfo- und Carboxylgruppen hat Heparin die höchste Dichte negativer Ladungen aller bekannten biologischen Makromoleküle (Linhardt & Capila, 2002). Heparin kann in der Anzahl von Sulfo- und Acetylgruppen variieren. Das Molekulargewicht schwankt aufgrund der Längenheterogenität von 5-40 kDa. Die durchschnittliche Molmasse liegt bei 15 kDa.

Wegen der polyanionischen Struktur kann Heparin Nukleinsäuren nachahmen und so als RNase-Inhibitor fungieren und zur Anreicherung von DNA- oder RNA bindenden Proteinen eingesetzt werden. Es gibt eine Reihe Heparin bindender Proteine wie IL-8 (Spillmann *et al.*, 1998), Annexin II (Kassam *et al.*, 1997), HIV-1 gp120 (Harrop *et al.*, 1991; Rider *et al.*, 1994), Selektine (Nelson *et al.*, 1993; Koenig *et al.*, 1998), Fibronectin (Calaycay *et al.*, 1985) und Malaria-CS-Protein (Lyon *et al.*, 1994; Cerami *et al.*, 1992; Rathore *et al.*, 2001), deren Struktur-Funktionsbeziehung noch nicht eindeutig definiert werden konnten. Es kann von verschiedenen Interaktionen ausgegangen werden. Die Wichtigste ist die ionische Wechselwirkung. Dabei bilden Cluster von positiv geladenen basischen Aminosäuren in den Proteinen Ionenpaare mit räumlich festgelegten, negativ geladenen Sulfo- und Carboxylgruppen der Heparinkette aus. Wasserstoffbrücken zwischen polaren Aminosäuren können ebenso einen erheblichen Beitrag leisten (Hilemann *et al.*, 1998).

Heparin kommt als Antikoagulanz zum Einsatz, zur Behandlung von Thrombosen in tiefen Beinvenen und bei vielen chirurgischen Verfahren (Freedmann, 1992). Die Interaktion von Heparin mit zahlreichen Proteinen, die bei verschiedenen Prozessen eine regulatorische Funktion einnehmen bzw. bei Erkrankungen bestimmte Aufgaben besitzen, weckten das Interesse an anderen Anwendungen außer der als gerinnunghemmendes (antithrombisches) Mittel. Bei venöser Thromboembolie konnte gezeigt werden, dass sich die Lebensdauer von Krebspatienten um durchschnittlich drei Monate verlängern ließ, wenn die Thrombose mit LMW-Heparin („*Low Molecular Weight*“) behandelt wurde (Bijsterveld *et al.*, 1999). Heparin kann wahrscheinlich seine Aktivität an mehreren Stellen der Tumorprogression sowie in Prozessen, die mit Malignität zusammenhängen, ausüben. Weiterhin kann es die Zellwucherung beeinflussen, welche die Adhäsion von Krebszellen am Gefäßendothel stört, das Immunsystem steuern und sowohl hemmend als auch anregend auf die Angiogenese wirken (Smorenburg & van Noorden, 2001). Es wird vermutet, dass Heparin die Metastasenbildung bei Mäusen verringert, indem es inhibierend auf die Wechselwirkung von Blutplättchen mit Mucinliganden der Karzinomoberfläche wirkt (Borsig *et al.*, 2001).

Die Funktionspalette von Heparin ist ebenso umfangreich wie seine Struktur. Daher ist die Aufklärung seiner Funktions- und Strukturbeziehungen ein wichtiger Bestandteil heutiger Forschung.

6.3 Sialyl-Lewis X

Das Sialyl-Lewis X (sLeX)-Tetrasaccharid ist ein terminaler Bestandteil vieler Oligosaccharidstrukturen in Glykokonjugaten und wurde als Minimalligand für Selektine identifiziert. Es besteht aus N-Acetylglucosamin, L-Fucose, Galactose und Neuraminsäure (Neu5Ac α 2-3Gal β1-4 (Fuc α1-3)GlcNAc-R).

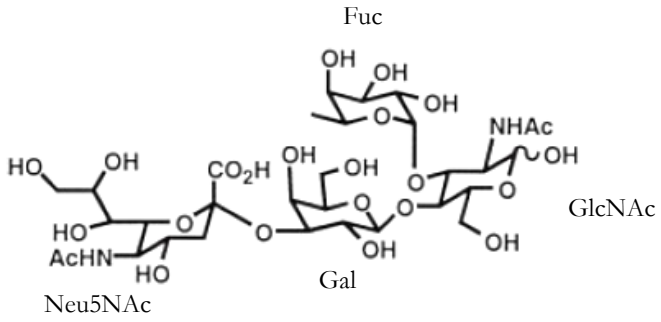

Abb. 12: Struktur des Tetrasaccharides Sialyl-Lewis X bestehend aus L-Fucose, Galactose, Neuraminsäure und N-Acetylglucosamin.

Das Sialyl-Lewis X-Molekül spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen, indem es bei der Zell-Zellerkennung hilfreich ist. Eine Entzündung ist eine Reaktion auf einen Erreger. Liegt eine solche vor, müssen vermehrt Granulozyten aus dem Blut an den Infektionsort transportiert werden. Damit Granulozyten in die infizierte Zelle eindringen können, müssen sie zuerst an der Gefäßwand der Zelle andocken. In die Zelle eingedrungen, umschließen sie die Erreger und nehmen sie in sich auf (Phagozytose). Das Andocken an der Zelle wird von zwei Komponenten vermittelt. Die infizierte Zelle präsentiert vermehrt P- und E-Selektine, ausgelöst von Signalmolekülen wie Cytokinen und Tumornekrosefaktoren.

Allgemein sind Selektine kohlenhydratbindende Proteine. Der Gegenspieler sollte demnach ein Kohlenhydrat sein. Das heißt, Zellen wie Granulozyten, die eine Untergruppe der Leukozyten darstellen, tragen Kohlenhydrate auf ihrer Oberfläche, die von den Selektinen der infizierten Zelle erkannt werden. Dies führt zu einer Verlangsamung der Granulozyten an der Gefäßwand, die in einer festen Adhäsion und Ausschleusung resultiert (Abb. 13). Bisher sind drei Selektinmoleküle bekannt, die L-(Leukozyten), P-(Platelet) und E-(Endothel) Selektine. Die Expression von P-Selektinen wird nach Stimulation durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) hoch reguliert.

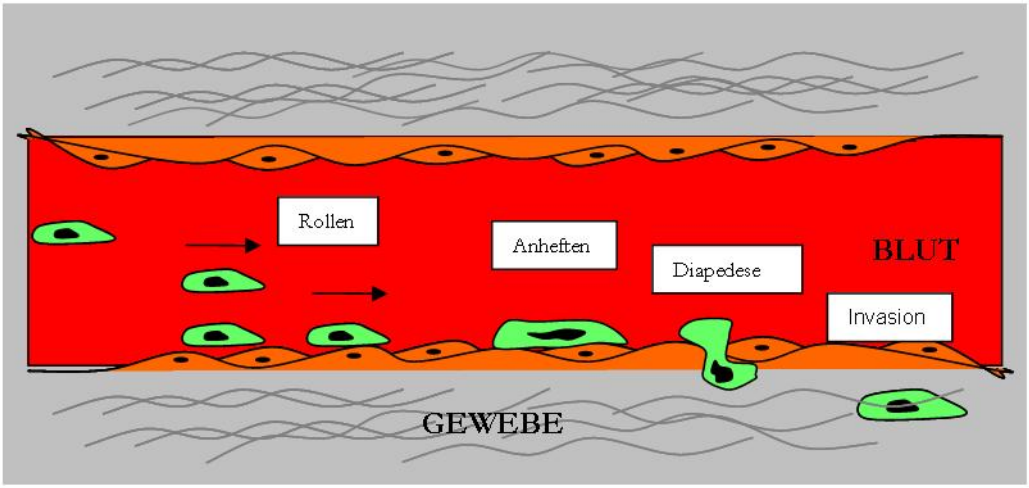

Abb. 13: Schema des sogenannten Leukozyten –„*Homing*".

Fukuda und Mitarbeiter postulierten 1995 einen ähnlichen Mechanismus für die Metastasierung von Tumorzellen. Sie fanden, dass Tumorzellen verstärkt Sialyl-Lewis X-Moleküle auf der Oberfläche präsentierten. Bei der *in situ*-Untersuchung von Darmkarzinomen wurde eine Korrelation zwischen Sialyl-Lewis X-Expression und Tumorprogression gefunden (Fukuda, 1995). Die Annahme, dass das Eindringen von Tumorzellen durch Selektine vermittelt wird (Zhang *et al.*, 2002) ist so mehr als wahrscheinlich.

Eine Strategie zur Entwicklung anti-inflammatorischer (entzündungshemmender) Therapeutika ist die Unterbrechung der Leukozyten-Endothelium-Interaktion. Dies könnte realisiert werden, indem der Initialschritt, das Andocken der Leukozyten (Leukozyten-„*Homing*", Abb. 13), vermittelt durch Sialyl-Lewis X, an die Selektine gestört würde. Nahe liegend ist eine Synthese von Sialyl-Lewis X ähnlichen Molekülen, die an E-und P-Selektine binden und so weitere Interaktionen unterbinden.