

1 Klonierung, heterologe Expression und Reinigung der DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* HB8

Die DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* wurde für weitere Arbeiten kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Grund dafür war in erster Linie Kostenersparnis, da abzusehen war, dass die Etablierung der Mutationsmethoden und die Erstellung des Expressions-PCR-Konstruktes Unmengen an DNA-Polymerase benötigen würden, so dass der Aufwand für Klonierung, Expression und Reinigung gerechtfertigt war.

Die *Ttb*-DNA-Polymerase ist 94 kDa groß und katalysiert in Anwesenheit von Mg^{2+} die Polymerisation von Nukleotiden unter Verwendung eines Oligonukleotids zu einem komplementären DNA-Strang. Sie besitzt keine „proofreading“-Aktivität, so dass sie im „Shuffling“ (I 4.2) eingesetzt werden kann. Die reverse Transkriptaseaktivität kann durch Mn^{2+} induziert werden.

Um die Gensequenz der *Ttb*-DNA-Polymerase, die einer entsprechenden Gendatenbank entnommen wurde, amplifizieren zu können, wurde der Stamm *T. thermophilus* HB8 (DSM 579) bei 70 °C kultiviert (II 1.2) und daraus die chromosomale DNA (II 2.1.1) isoliert. Die Vervielfältigung der Gensequenz (VII 6) geschah durch PCR, katalysiert durch *Pfu*-Polymerase, die gleichzeitig die Schnittstellen *Kpn* I und *Eco* RI durch die Primer ThDNA PolfKpn und ThDNAPolrEco (VII 3) einführte. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pASK-IBA I (IBA), der entsprechend präpariert wurde, ligiert und in *E. coli* XL 1 transformiert (II 2.1.14). Der pASK-IBA I Vektor ermöglicht eine induzierte Expression. Der Strep-tag I, der dazu verwendet wird, um Proteine über Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können, wurde dabei nicht an die kodierende Polymerasesequenz fusioniert. Zusätzliche Sequenzen könnten störende Effekte auslösen, die zu einem Aktivitätsverlust führen.

Die Expression des Proteins in *E. coli* XL1 wurde bei einer OD_{600} zwischen 0,4-0,6 mit Anhydrotetrazyklin (AHT) induziert. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der Überstand nach Zentrifugation wurde einer Hitzefällung bei 80 °C unterzogen. Die hitzeinstabilen Proteine denaturierten und konnten von den löslichen hitzestabilen Proteinen durch Zentrifugationen abgetrennt werden (Abb. 13).

Der so erhaltene Überstand wird mit einer 20 %igen Streptomycinlösung versetzt und bei RT °C für 30 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Auf diese Weise können Nukleinsäuren in Proteinlösung gefällt werden, ohne dass die Proteine Schaden nehmen.

Der so erhaltene *Tth*-Polymerase-Überstand wurde zur Entfernung von überschüssigen Ionen über eine NAP-5 Säule (Amersham Bioscience) gegeben. Die durchlaufenden Fraktionen sind fertig zum Gebrauch. Um die Konzentration bzw. die Aktivität der erhaltenen *Tth*-Polymerase abschätzen zu können, wurde bei einer anschließenden PCR die *Taq*-Polymerase (Promega) mit bekannter Aktivität als Vergleich mitgeführt (Daten nicht gezeigt).

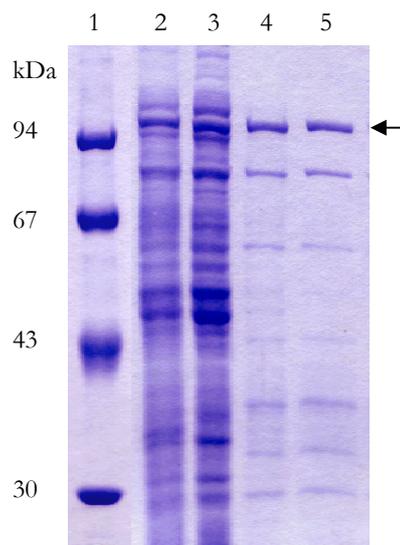


Abb. 13: Expression und Aufreinigung der *Tth*-Polymerase. Der Pfeil markiert die *Tth*-Polymerase Proteinbande. **1:** Marker, **2:** nach Ultraschall-Aufschluß, **3:** nach Zentrifugation der unlöslichen Bestandteile, **4:** nach 20 min Hitzefällung, **5:** nach Streptomycinfällung

2 Einführung

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, findet man auf fast allen Bakterien und Archaeae Surface-layer, bestehend aus Proteinen, die sich selbst zu einer geordneten zweidimensionalen parakristallinen Schicht formen. Die Funktion ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Die Surface-layer-Proteine (Slp) der Gram-positiven Bakterien besitzen einige wichtige Strukturmerkmale. Sie weisen so genannte Surface-Layer-Homologe Domänen (SLH-Domäne) auf. Dies sind hoch konservierte Bereiche, deren Anzahl von Bakterium zu Bakterium variiert und bis zu 3-mal auftreten können (Abb. 14 A). Das Alignment zeigt hoch konservierte und weniger konservierte Aminosäuren, die farblich unterlegt sind (Abb. 14 B). Abbildung 14 C zeigt die ausgewählten Sequenzen in Form eines Alignments.

Die SLH-Domänen stellen über nicht kovalente Wechselwirkungen die Verbindung zu den sekundären Zellwandpolymeren her (SCWP), die aus sich wiederholenden Kohlenhydratmolekülen bestehen. Proteine, die eine spezifische Affinität zu Kohlenhydraten zeigen, werden auch als Lektine bezeichnet. Die Bindung zwischen Lektinen und Kohlenhydraten ist durch bestimmte Proteinbereiche definiert und konzentriert.

A)



B)

	1	10	20	30	40	50	
SLPB EUBAC:77	AQEAA	DFLMGLGLAN	KEDEKFKHPEQGIT	REEFAKLLVGV	LGLENAALLSKG		129
SLPH BACBR:68	MEKTVKRL	EALGLVAGYGN	GDFGADKTI	TRAEFATLIVR	RARGLEQGAKLAQF		145
SLPM BACBR:40	MEKTVKRL	EALGLVAGYGN	GEYGVDKTI	TRAEFATLVVR	RARGLEQGAKLAQF		92
SLAP ACEKI:39	YASAVAR	LYALNITNG	VGDPKFGVDQP	VTRAQMITFVNR	MLGYEDLAEMAKS		91
SLP BACFI:47	AIDDINYL	VEKGAIQY	PDGTFKPNNS	ITRAEIAVVL	LANTLGLD	DVSEVT	99
SBPA BACSH:44	AKEAVQSL	VLDQGV	IQD	TNGFNFNPLN	TVTRAQA	EIFTKALELE	91
SLP BACTH:43	SAEYIDYL	VAKKAIEG	KPDGTFAP	TEALDRASA	AKIMAITL	GLE	91
SLAP BACLI:43	AEDSINYL	VDKGAI	VGKPDGTY	GPTESIDRASA	AAVIFTKI	LNL	95
EAG BACAN:43	AEGSINYL	VDKGAI	TGKPDGTY	GPTESIDRASA	AAVIE	TKI	95
SLP1 CLOTM:1457			CYPDESFR	PERNITRAE	AAVIFAKLL	GADES	1494

C)

Aki-Bsp-Ea-Tht

```

                L       G   D   F       R       X   L
Aki PFTDVKDDAPYAS-----AVARLYALNITNGVDPKFGVDPVTRAQMITFVNRM LGYEDLAEMAK-
Bsp -----ALADAGIINGYADGTFKPNQTINRGQVVKLLGRYLEAQQQEIPADW
Ea  QEEPANKETVYAVSAKAQEAADFIMGLGLANGKEGKPHPEQGITREEFAKLLVGVGLGENAALLSK-
Tht HWAK-----EAVEALAAKGIILGFPGDTRGNENLTRYQAALLIYRLLQQIEEELKT
      F D                A   G   G   G       Q       R
SEKSAFKDVPQ-----NHAVGQINLAYKLGLAQGVGNGKFDENSELRYA QALAFVLRAL
NSKQRFNDLPV----TAEAELVKYAALAKDAGVFNGS--NGNLNASQTMQRQQMAVVLRVRAI
GEQIFTDVER-----DRVSHHYVSMVSMGMTRGFEDGSRFAESVTRAQAAAMLVRCF
QGTSPTEALAPEDLEAMIAELKAQPMPEPGMDQAALKDLMDRVEAASIAADTALAQAQQQLAE
G   D       WP   Y   KA   G   G       RGD AL   AL   K   G
GFKD-----LDWEYGYLAKAQDLGLVHGLNLAYNGVIKRGDLALILDRALVPMVKYVDGKEVLGPELI
KEIAG-----VDLVAEYK-KANFVTEIGDLKAYSAEQRTAIVALEYAGITNVAHFNPNSVTRGQFA
GYNLSYVQ----GSWEANYISKAAELGILSGAEGEHSASLGRGDAAALMVKNALHG---KYLFGQNE-----
RLDALAQDVEGVKGDLAGLRSQVEANADAIQALNELAVLLNQDVLSLQDRVTALEKMVSGGQELPDLEQFATK

```

Abb. 14: **A)** Allgemeine schematische Darstellung der Primärstruktur der S-layer Proteine. ▨ Signalsequenz
B) Alignment von SLH-Domänen aus verschiedenen Organismen. Rot geschriebene Aminosäuren sind hoch konserviert, grau markierte sind homolog zueinander. Grün hervorgehoben sind zusätzliche konservierte Bereiche in der SLH1 Domäne und rot markiert sind zusätzlich konservierte Aminosäuren in der SLH2 Domäne. In Klammern die jeweilige Bezeichnung und die Accession Nummer der Gen- und swisstrembl-Proteinbank. SlpB (SLPB EUBAC), *B. brevis* SlpH (SLPH BACBR, D90050, P38538), *B. brevis* SlpM (SLPM BACBR, M14238, P06546), *A. kivi* Slap (SLAP ACEKI, M31069, P22258), *B. firmus* Slp (SLP BACFI, AF242295, Q9L655), *B. sphaericus* SbpA (SBPA BACSH, AF211170, Q9RER7), *B. thuringiensis* Slp (SLP BACTH,AJ249446, Q9REDO), *B. licheniformis* Slap (SLAP BACLI, U38842, P49052), *B. anthracis* EAG (EAG BACAN, X99724, P94217), *C. thermocellum* Slp1 (SLP1 CLOTM, X67506, Q06852).
C) Alingment der SLH-Domänen aus *A. kivi* (Aki), *B. sphaericus* (Bsp), *E. acidaminophilum* (Ea) und *T. thermophilus* (Tht).

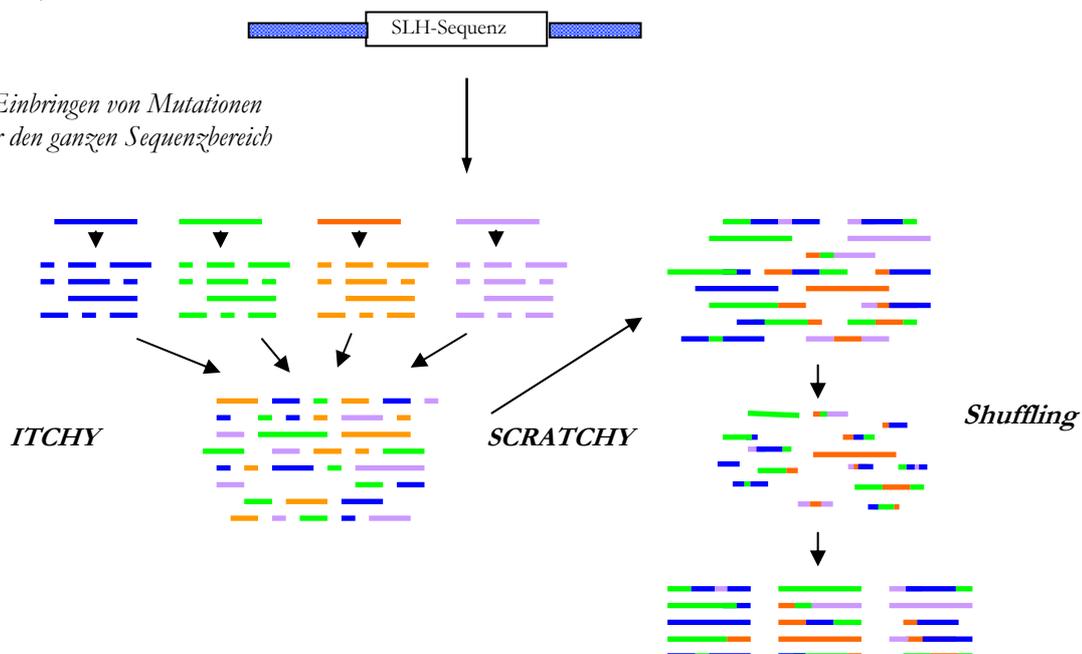
In dieser Arbeit sollten basierend - auf den SLH-Domänen verschiedener Bakterien - kohlenhydratbindende Proteine mittels „*Ribosome Display*“ selektiert werden und nachgewiesen werden, dass SLH-Domänen bzw. mutierte SLH-Domänen in der Lage sind an Kohlenhydrate zu binden. Es würden so erstmals bakterielle, lektinähnliche Proteine generiert werden, die eine *in vitro*-Evolution durchlaufen hätten.

3 Strategie der Selektion von kohlenhydratbindenden Proteinen durch Kombination von „*Shuffling*“, SCRATCHY und dem „*Ribosome Display*“

Die wichtigsten Stufen des Selektionsprozesses kohlenhydratbindender Proteine sind schematisch in Abb. 15 zusammengefasst. Das Design von 4 Bibliotheken, die jeweils nur einer SLH kodierenden Sequenz eines Bakteriums zugrunde liegen, wurden mit verschiedenen Mutations-Techniken erstellt. Zum einen mit Hilfe des „*single gene shuffling*“ und zum anderen mit Hilfe des SCRATCHY (I 4.2 & 4.4).

1. Die 4 SLH-Sequenzen aus den 4 verschiedenen Organismen werden mit den gleichen konstanten flankierenden Sequenzen versehen

2. Einbringen von Mutationen über den ganzen Sequenzbereich



3. Über die konstanten Regionen werden für die Transkription und Translation wichtige Elemente angefügt

Lineare „*Ribosome Display*“ Bibliothekskonstrukte

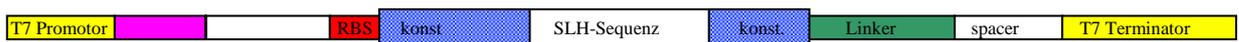


Abb. 15: Design der Bibliothek durch *in vitro*-Mutationsmethoden. Einführung von Mutationen durch SCRATCHY und „*Shuffling*“ und Integration von konstanten, flankierenden Regionen mit wichtigen Elementen für die Transkription/Translation, so dass die linearen „*Ribosome Display*“ Bibliothekskonstrukte generiert und in ein „*Ribosome Display*“ einsetzt werden können.

Beide Methoden wurden in dieser Arbeit etabliert und angewendet.

Die so erstellten Bibliotheken können in ein „*Ribosome Display*“ eingesetzt werden. Hinter dem Begriff „*Ribosome Display*“ versteckt sich eine Aneinanderreihung von Einzelreaktionen, welche einen komplexen Zyklus bilden, der wiederholt wird (Abb. 16). Ziel ist es, verbesserte Moleküle zu selektieren und anzureichern. Die Methoden führen zu einer gerichteten Evolution von Proteinen mit gewünschten bzw. verbesserten Eigenschaften.

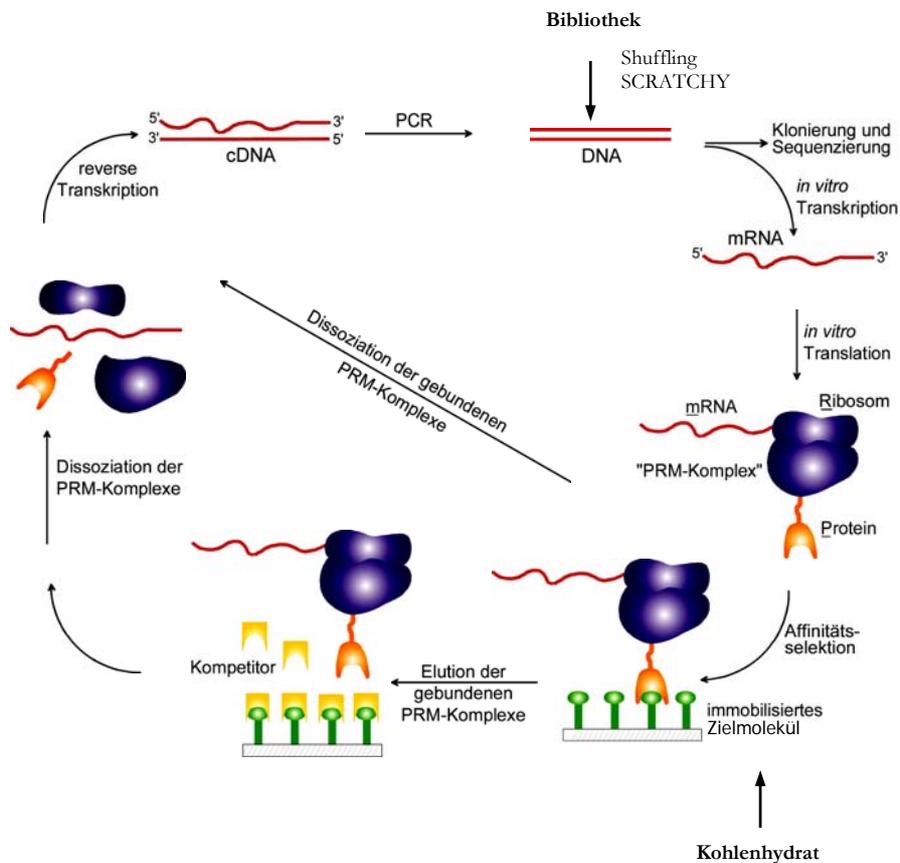


Abb. 16: Prinzip des „*Ribosome Display*“. Eine Protein kodierende DNA-Bibliothek wird durch eine *in vitro*-Transkription in eine mRNA-Bibliothek umgeschrieben. Diese wird *in vitro* translatiert, so dass sich Protein-Ribosom-mRNA-Komplexe (PRM-Komplex) bilden, die direkt mit den Zielmolekülen, den immobilisierten Kohlenhydraten, interagieren können. Die mRNAs aus den PRM-Komplexen, die an den Zielmolekülen, vermittelt über das Protein, gebunden haben, können isoliert werden und stehen nach Umwandlung in cDNA und DNA erneut zur Verfügung.

4 Auswahl und Klonierung Protein kodierender Slp-Sequenzen als Grundlage für die Generierung von DNA-Bibliotheken

Eine große Anzahl Gram-positiver Bakterien besitzen so genannte Surface-layer-Proteine (Slp). Für diese Arbeit wurden S-layer tragende Organismen unterschiedlicher Habitate ausgewählt, deren Anzahl an SLH-Domänen in den S-layer Proteinen variieren. Eine Korrelation zwischen Anzahl der SLH-Domänen und Affinität zu den sekundären Zellwandpolymeren (SCWP) ist wahrscheinlich (I 5.2). Werden zudem Organismen gewählt, die bei unterschiedlichen Temperaturen wachsen, könnten Proteine mit erhöhter Temperaturstabilität selektiert werden. In der Tabelle 10 sind die ausgewählten Organismen und wichtige Auswahlkriterien zusammengefasst.

Tabelle 10: Übersicht der ausgewählten Bakterien nach verschiedenen Kriterien

Bakterium	DSM Nr.	Temperatur	Sauerstoff	Anzahl der SLH Domänen
<i>Enbacterium acidaminophilum</i>	3953	mesophil 30 °C	anaerob	3
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	579	extrem thermophil 75 °C	aerob	1
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	22	thermophil 55 °C	aerob	nicht bekannt
<i>Acetogenium kivui</i> = <i>Thermoanaerobacter kivui</i>	2030	mesophil 37 °C	anaerob	3
<i>Bacillus sphaericus</i>	396	mesophil 30 °C	aerob	2

Die aeroben Bakterien wurden unter den in II 1.2 angegebenen Bedingungen kultiviert, während die anaeroben Bakterien als Lebendkultur von der DSM bezogen wurden. Aus den Bakterien wurde zunächst die chromosomale DNA (II 2.1.1) isoliert und deren Slp-kodierende DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert (mit Ausnahme der von *B. stearothermophilus*), über die 3'- und 5'- eingeführten Schnittstellen *Kpn* I in den Vektor pBluescript (Stratagene) ligiert und in *E. coli* XL 1 propagiert (Primersequenzen VII 3). Die SLH-Sequenzen konnten so direkt aus den entsprechenden Slp-Plasmiden mit spezifischen Primern amplifiziert werden.

Die putative SLH-Sequenz aus *B. stearothersophilus* wurde direkt aus chromosomaler DNA vermehrt, da die Amplifizierung und Klonierung der Slp-Sequenz nicht möglich war. Die SLH-Sequenzen der anderen Organismen wurden in Analogie zu den Slp-Sequenzen ebenfalls über die Schnittstelle *Kpn* I in pBluescript ligiert (II 2.1.12) und ebenfalls in *E. coli* XL1 transformiert (II 2.1.14). Entsprechende Sequenzen und Primer sind dem Anhang zu entnehmen. Die Bezeichnung der verwendeten Primer wurde aus den Namen der Bakterien abgeleitet. Die Tabelle 11 gibt eine kleine Zusammenfassung über Bekanntheitsgrad der Sequenzen bzw. Sequenzbereiche und der in dieser Arbeit klonierten Sequenzen wieder.

Tabelle 11: Übersicht der bekannten und klonierten Sequenzbereiche

Organismus	bekannter Sequenzbereich	klonierter Sequenzbereich
<i>E.acidaminophilum</i>	Slp und SLH	Slp und SLH
<i>T.thermophilus</i>	Slp und SLH	Slp und SLH
<i>G.stearothersophilus</i>	Slp und putative SLH-Region	SLH
<i>A.kivui</i>	Slp und SLH	Slp und SLH
<i>B.sphaericus</i>	Slp-Teilsequenz mit SLH-Region	SLH

Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Konstrukte konnten für die Etablierung des „*Shuffling*“ eingesetzt werden.

5 Etablierung des „*DNA-Shufflings*“

Bei dem „*DNA-Shuffling*“ handelt es sich um eine *in vitro*-Mutationstechnik, die das Einbringen von Punktmutationen erlaubt (I 4.2). Dazu werden DNA-Moleküle einer Art in unterschiedlich lange Bruchstücke gespalten und in einer PCR ähnlichen Reaktion rekonstruiert – Rekonstruktion bzw. Reassemblierung der Sequenz (Abb. 17 B,C). Die DNA-Fragmente dienen dabei sowohl als Matrizen als auch als Primer. In einer PCR, die mit spezifischen Primern erfolgt, wird dann die rekonstruierte Sequenz propagiert und somit aus dem Gemisch reassemblierter Sequenzen isoliert (Abb. 17 D). Auf diesem Wege können über den ganzen Sequenzbereich Mutationen verstreut eingebracht werden.

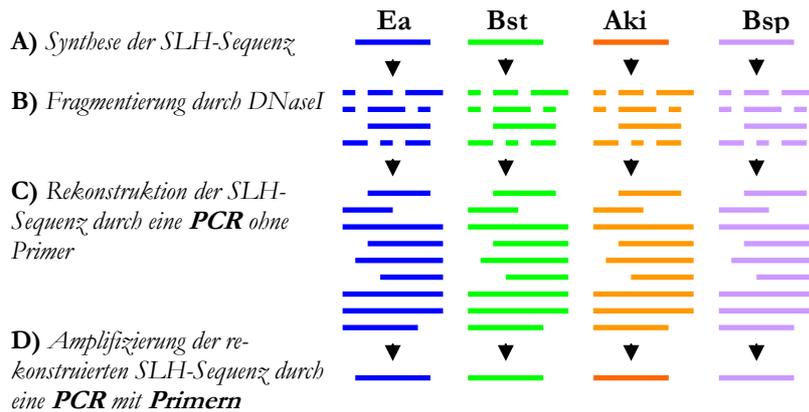


Abb. 17: Prinzip des „DNA-Shufflings“. Komplexe Methode, die sich aus 4 Schritten zusammensetzt. **A)** Synthese der 4 verschiedenen SLH-Sequenzen aus den Bakterien Ea – *E. acidaminophilum*, Bst – *B. stearothersophilus*, Aki – *A. kivui*, Bsp – *B. sphaericus*; **B)** Fragmentierung der SLH-Sequenzen in 50-400 bp große DNA-Stücke; **C)** Rekonstruktion der SLH-Sequenz, die durch eine PCR mit Primern aus dem Rekonstruktionsgemisch herausamplifiziert wird **D)**.

5.1 Synthese der zu „shuffelnden“ SLH-Sequenzen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde kurz die Amplifizierung der Protein kodierenden S-layer-Sequenzen mit sequenzspezifischen Primern aus den entsprechenden Organismen und deren Klonierung in *E. coli* dargestellt. Die Handhabung der DNA-Sequenz aus *T. thermophilus* stellte sich aufgrund des hohen GC-Gehaltes als sehr problematisch dar, so dass sie in dieser Arbeit keine weitere Erwähnung findet.

Die sequenzspezifischen Oligonukleotide (Primer), die zum Klonieren der SLH-Sequenzen und zum Vermehren der verschiedenen SLH-Sequenzen verwendet wurden, führen gleichzeitig sowohl einen 5'- als auch einen 3'- konstanten Sequenzbereich ein.

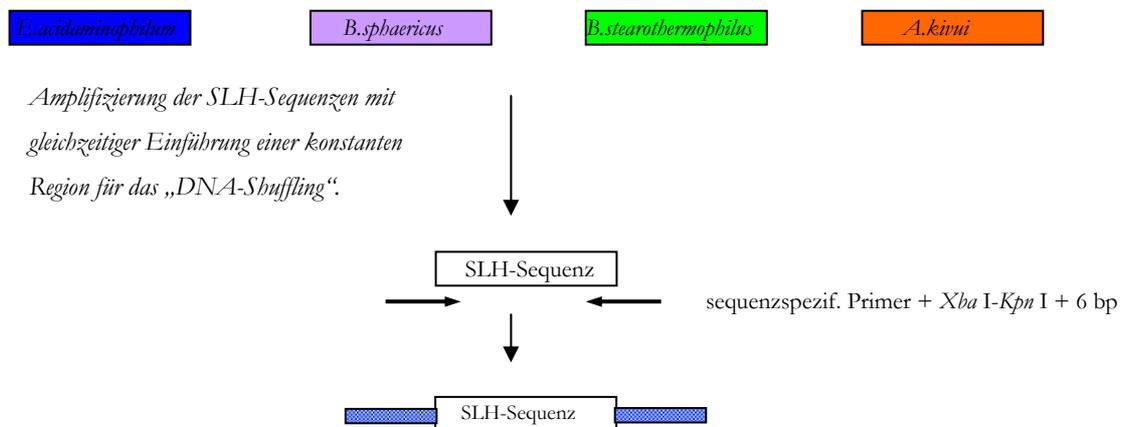


Abb. 18: Amplifizierung der SLH-Sequenzen der 4 verschiedenen Bakterien und die Einführung konstanter Regionen durch Verwendung sequenzspezif. Sequenzen, deren Sequenzüberhang ähnlich ist.

Diese bestehen jeweils aus zwei Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Kpn* I und werden im weiteren Verlauf als konstante Regionen bezeichnet. Sie wurden zur Erleichterung für weitere Arbeiten, Parallelisierung und zur einfachen Gewinnung des linearen Bibliothekskonstruktes eingeführt (Abb. 18).

5.2 Fragmentierung der SLH-Sequenzen

Die Fragmentierung der SLH-kodierenden DNA-Sequenzen erfolgte mit DNase I, einer Endonuklease, die die DNA wahllos an verschiedenen Stellen spaltet. Der enzymatische Verlauf der Reaktion ist vor allem stark temperatur- und zeitabhängig. Die Konzentration der DNA, der DNase I und die Inkubationszeit wurden variiert, um geeignete Bedingungen zu ermitteln. Zu verschiedenen Zeiten (30 s, 1 min, 3 min) wurden Proben entnommen und mittels Agarosegelelektrophorese untersucht (Abb. 19). Die Versuche führten zu folgenden Resultaten.

Die Reaktionstemperatur der DNase I wurde auf 22 °C festgelegt, die damit unter dem Aktivitätsoptimum von 37 °C liegt. Die Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit durch Temperatursenkung bei gleich bleibender spezifischer Enzymaktivität bietet eine bessere Kontrolle über den Reaktionsverlauf, der über die Qualität der DNA-Fragmente entscheidet. Bei einer Ausgangssequenzgröße von 600-800 bp sind DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 50-400 bp für eine Rekonstruktion nötig.

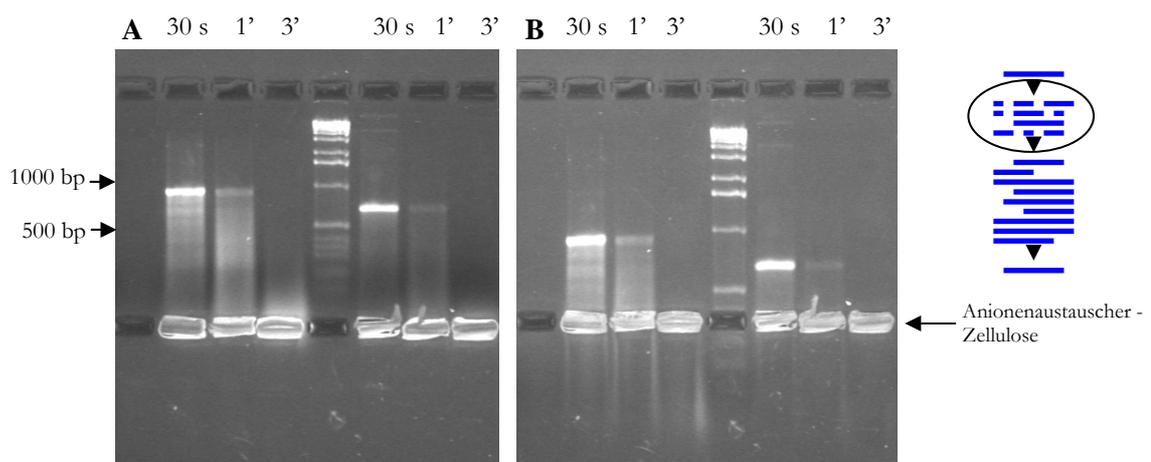


Abb. 19: DNase I-Verdau zweier SLH-Sequenzen, abgestoppt nach 30 s, 1 und 3 min durch Zugabe von EDTA und Aufreinigung der DNA Fragmente über Band Interception. **A)** Die Agarosegelelektrophorese wurde unterbrochen und DEAE-Zellulose eingefügt. Es wurde erneut Spannung angelegt, so dass die DNA auf die DEAE-Zellulose lief und dort gebunden wurde **B)**.

Dabei muss beachtet werden, dass der Einsatz verschieden langer DNA-Bruchstücke in einem bestimmten Verhältnis zueinander erfolgt. Das heißt, die Verwendung überwiegend kurzer Fragmente kann zu Schwierigkeiten bei der Reassemblierung der Sequenz führen, während überwiegend lange Fragmente eine verminderte Mutationsrate ergeben. Deswegen wurde die DNase I-Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten beendet und die entsprechenden Ansätze miteinander kombiniert.

Ein sofortiges Abbrechen der Reaktion wurde durch Schockgefrieren mittels flüssigem Stickstoff und anschließender Inkubation bei 90 °C für 5 min erzielt. Die Reaktion kann auch durch Zugabe von EDTA abgebrochen werden, da die DNase I für ihre Aktivität Mg^{2+} -Ionen benötigt, deren Entzug zu einer Inaktivierung führt. Wird die Fragmentierung durch EDTA gestoppt, müssen die DNA-Fragmente aufgereinigt werden. Die Methode des Band Interception (II 2.1.11) hat sich in diesem Fall als effiziente Methode bewährt. Der Anspruch an die Reinigung der Fragmente ist hoch, da ein diffuser Größenbereich (50-400 bp) vorherrscht. Die Fragmente müssen nicht zwangsweise aufgereinigt werden. Es sollte allerdings durch PCR sichergestellt werden, dass keine vollständigen SLH-Sequenzen vorhanden sind. Die Methodik ist dem Methodenteil II 2.1.16.1 zu entnehmen.

5.3 Rekonstruktion der SLH-Sequenzen

Die Rekonstruktion der DNA-Sequenzen ist der Mittelpunkt des „Shufflings“. Sie beinhaltet einen Reassemblierungs-Prozess, ausgelöst durch eine PCR ähnliche Reaktion, in der DNA-Fragmente als Matrize und als Primer gleichzeitig fungieren. Sie ist abhängig von der DNA-Konzentration, der Magnesiumkonzentration, der DNA-Polymerase und des PCR-Programms (I 4.1).

Magnesiumkonzentration

In einem typischen PCR-Ansatz beträgt die Magnesiumkonzentration 1-2 mM. Für die Rekonstruktion wurde die Konzentration leicht auf 2,2 mM erhöht, um zusammen mit der niedrigen Hybridisierungstemperatur (50 °C) Falschbasenpaarungen zu ermöglichen, die Ursache von Mutationen sind.

DNA-Konzentration

Die Menge an DNA entscheidet über die Menge an rekonstruierten DNA-Sequenzen (Abb. 20).

Für eine Reassemblierung bzw. Rekonstruktion werden 5-12,5 ng/μl benötigt. Nach der PCR kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese die Reaktion überprüft werden, obwohl sie sich als Schmier zeigt, kann die Menge an reassemblierter DNA abgeschätzt werden (Abb. 20)

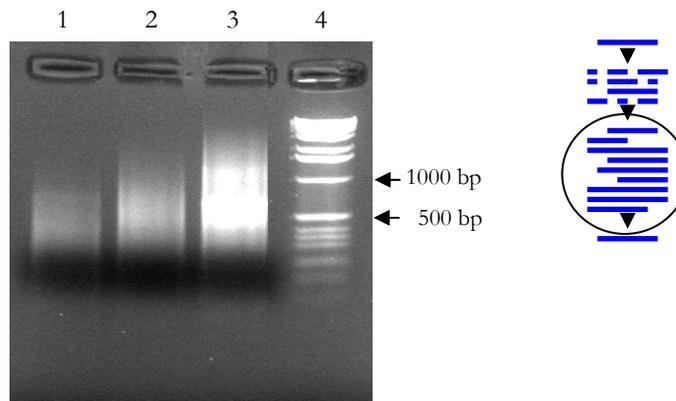


Abb. 20: Beispiel für eine Rekonstruktions-Reaktion in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration.
 1: 1 ng/μl, 2: 5 ng/μl, 3: 12 ng/μl, 4: Marker (Hyperladder I)

DNA-Polymerase

Die Wahl einer DNA-Polymerase bzw. eines DNA-Polymerasegemisches spielt eine wichtige Rolle bei der Rekonstruktion und der Anzahl an Mutationen. Die Polymerase sollte nach Möglichkeit keine Korrekturlesefunktion und eine geringere Prozessivität besitzen. Beide Ansprüche können nur durch ein Polymerasegemisch erfüllt werden. Die „*proofreading*“-Enzyme wie *Pfu*- und *Pwo*-Polymerase zeigen eine geringere Prozessivität gegenüber den Enzymen wie *Taq* und *Tth*, die keine „*proofreading*“ Aktivität haben, dafür aber eine höhere Syntheserate aufweisen. Die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden ist bei der *Tth*-Polymerase am höchsten (I 3.1, Tab. 3), somit ist sie prädestiniert für einen Einsatz. Die Prozessivität wurde über die Elongationszeit reguliert.

PCR-Programm

Um möglichst viele Hybridisierungen eines DNA-Moleküls mit anderen innerhalb der 40 Zyklen zu gewähren, bietet sich eine Verkürzung der Elongationszeit an bzw. - wie bereits angedeutet - ein Enzym geringer Syntheseleistung. Für die Arbeit als optimal erwies sich eine Verkürzung der Elongationszeit auf Null.

0.	Denaturierung	3 min	95 °C
1.	Denaturierung	25 s	95 °C
2.	Annealing	30 s	50 °C
3.	Schritte 1-2 wurden 40x durchlaufen		
4.	Nachsynthese	3 min	72 °C
5.	Pause		4 °C

Lediglich der Temperaturbereich zwischen Denaturierung und Annealing wurde für die Synthese des komplementären Stranges zur Verfügung gestellt, so dass die Verlängerung auf ein Minimum reduziert wurde.

Im Gegenzug musste die Zyklenzahl erhöht werden, um ausreichend Produkt zu garantieren. Nebenwirkung ist die starke Beanspruchung der Polymerase, was zu einem vermehrten Fehleinbau von Nukleotiden führt, allerdings auch zu einer Steigerung an Mutationen beiträgt.

5.4 Amplifizierung der rekonstruierten SLH-Sequenzen

Die spezifische Vermehrung der rekonstruierten SLH-Sequenzen geschieht mit den spezifischen Primern Exp fow I, Exp fow II und Exp rev (VII 3), die an den konstanten Regionen angreifen. Der Grund für die Verwendung von zwei „forward“ Primern begründet sich in der Absicht, eine Leserahmenverschiebung zu erzeugen, welche eine Steigerung der Diversität der Bibliothek nach sich ziehen soll. Zu diesem Zweck wurde in einem Primer ein Nukleotid nach dem ATG-Startkodon weggelassen. Beide Primer wurden zu gleichen Teilen in die PCR-Reaktion eingesetzt, so dass Konstrukte im gleichen Verhältnis synthetisiert werden.

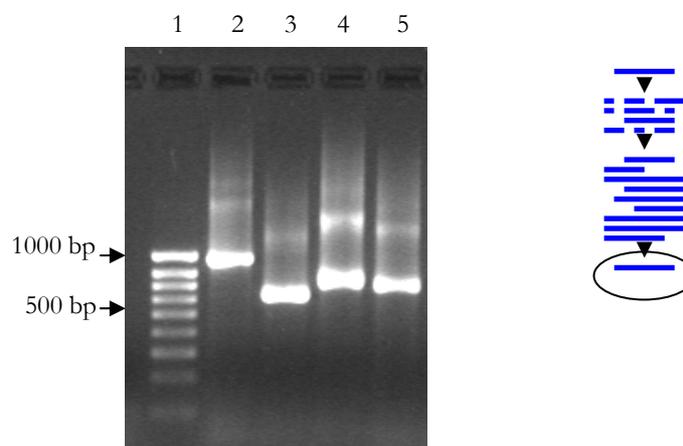


Abb. 21: Rekonstruierte SLH-Sequenzen verschiedener Organismen. 1: Marker (Hyperladder IV, Bioline), PCR-Produkte von 2: Bst-SLH, 3: Bsp-SLH, 4: Aki-SLH, 5: Ea-SLH

Nach erfolgreicher Rekonstruktion erscheint auf dem Agarosegel eine Bande der richtigen Größe, meist verbunden mit einem Hintergrundschmier (Abb. 21). Im Anschluss an diese PCR (1. PCR, II 2.1.16.1) erfolgte eine weitere PCR (2. PCR, mit dem gleichen PCR-Programm) mit den Primern Ade fow und Ade rev (VII 3, Übersicht siehe Abb. 22), die genetisch wichtige Elemente einfügte und so zu einer Verlängerung der bestehenden Produkte führte. Es liegt nun das vollständige PCR-Produkt vor, was in eine *in vitro*-Transkription/Translation eingesetzt werden kann. Das Prinzip einer so genannten Expressions-PCR wird hier realisiert, d.h. aus einem vektorunabhängigen, linearen PCR-Produkt kann *in vitro* ein Protein synthetisiert werden.

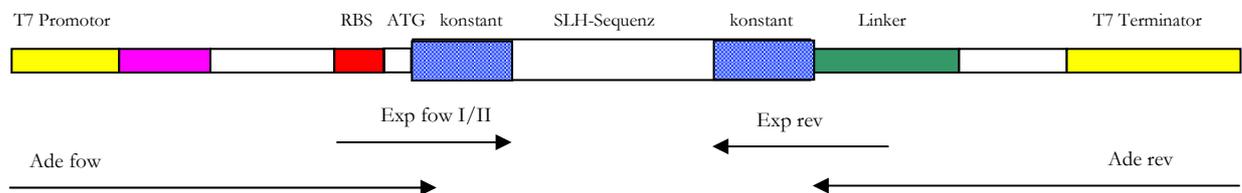


Abb. 22: Überblick über die verwendeten Primer, die zum Entstehen der linearen „*Ribosome Display*“ Bibliothekskonstrukte verwendet wurden. Die Primer-Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen.

Auf die Bedeutung der einzelnen Elemente wird in der Einleitung (I 3.2) näher eingegangen.

6 Etablierung des SCRATCHY

Verbindet man das ITCHY (I 4.3) mit dem „*Shuffling*“ (I 4.2) wird vom SCRATCHY (I 4.4) gesprochen. Der gerichtete Abbau von doppelsträngigen Nukleinsäuren in einzelsträngige Überhänge durch die Exonuklease III kann über die Reaktionszeit und Reaktionstemperatur kontrolliert werden. Die optimierten Bedingungen sind dem Methodenteil zu entnehmen (II 2.1.16.2/2.1.16.3).

Die Degradierung der einzelsträngigen Überhänge erfolgte mit Mung Bean Nuklease zu glatten DNA-Enden. Die 4 SLH-Sequenzen wurden parallel auf diese Art und Weise sukzessive von beiden Enden verkürzt und dann miteinander ligiert, was wahllos passiert.

Es entstanden unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die dann mittels DNase I in kleine Bruchstücke gespalten wurden, so dass kleine chimäre bzw. hybride DNA-Fragmente erhalten wurden (Abb. 23), die die Mutationsrate beim „*Shuffling*“ erhöhte.

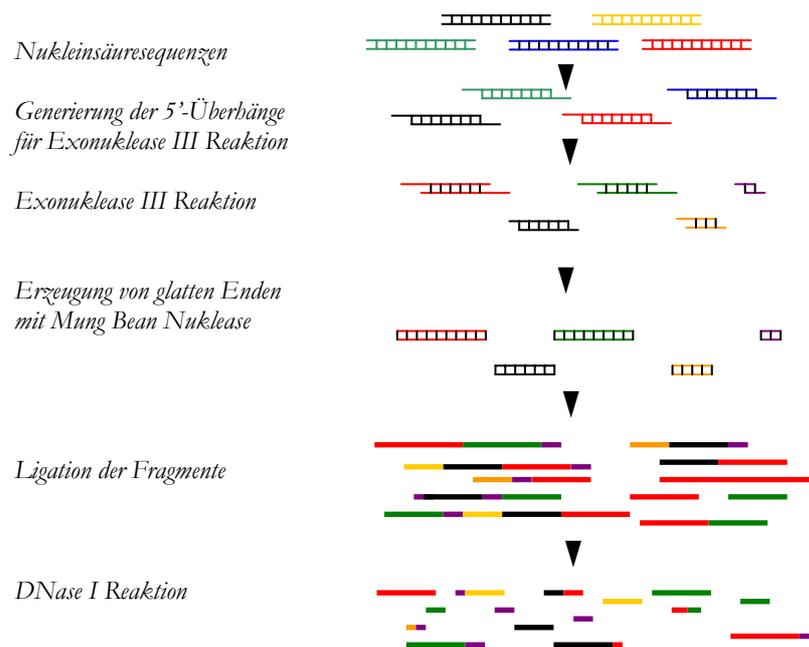


Abb. 23: Prinzip des ITCHY/SCRATCHY, modifiziert. Eine beliebige Nukleinsäuresequenz kann durch Exonuklease III unter Voraussetzung eines 5'-Überhangs oder glatten Endes sukzessive abgebaut werden. Dabei wird nur ein Strang degradiert, der Komplementäre bleibt unverändert zurück. Der vollständige Abbau des DNA-Doppelstranges erfolgt erst durch Mung Bean Nuklease, die Einzelstränge abbaut, so dass ein glattes 3' und 5' Ende an der DNA erhalten wird. Diese unterschiedlich langen Fragmente unterschiedlicher Herkunft können zu Chimären zusammengesetzt werden. Anschließend werden diese mit DNase I gespalten und in ein „DNA-Shuffling“ eingesetzt.

Die einzelnen Reaktionen konnten mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft werden. Die schrittweise Verkürzung der einzelnen Stränge führt zu einem DNA-Schmier, deren Größenbereich von der Inkubationszeit der Enzyme abhängt (Daten nicht gezeigt).

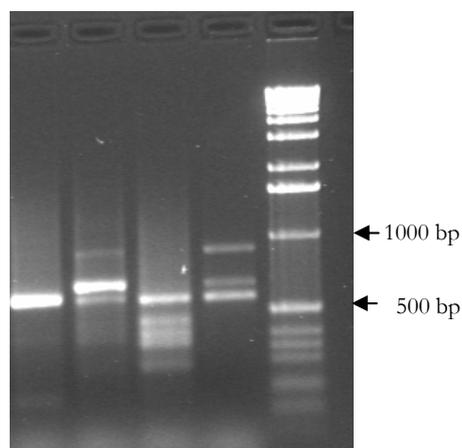


Abb. 24: Rekonstruierte SLH-Sequenzen nach dem SCRATCHY. Verwendung unterschiedlicher Mengen-Verhältnisse von DNA-Chimären zu einfachen DNA-Fragmenten, einer SLH-Sequenz. Durch zusätzliche Verwendung von chimären DNA-Fragmenten können Gemische von rekonstruierten Sequenzen entstehen.

Der Erfolg der Reaktion wurde durch PCR überprüft. Es sollte kein PCR-Produkt synthetisiert werden, da bei erfolgreicher sukzessiver Degradierung die Primer an den Enden der Sequenz nicht hybridisieren können. Die chimären DNA-Fragmente kombiniert mit Fragmenten einer SLH-Sequenz, die nur einem DNase I –Verdau unterzogen wurden, in einem optimierten Verhältnis von 1:3, zeigten nach Rekonstruktion oft mehrere Banden, die einem Gemisch aus den verschiedenen SLH-Sequenzen entsprechen (Abb. 24). Sind chimäre DNA-Fragmente im Überschuss vorhanden, kann ein großer Anteil unspezifischer Sequenzen entstehen.

Zusammenfassung

Es wurden 4 Bibliotheken erstellt, die jeweils auf einer SLH-Sequenz basieren. Jede Bibliothek setzt sich aus drei Teilen zusammen. Der erste Teil ist durch „DNA-Shuffling“ hergestellt, der zweite Teil durch SCRATCHY und bei dem dritten handelt es sich um die unveränderte SLH-Sequenz, die minimal eingeht. Alle drei Teile sind zur Hälfte durch eine Leserahmenverschiebung generiert.

7 Auswertung der Mutagenese und Ermittlung der Mutationsrate

Nach Durchführung des „*Ribosome Display*“ wurden die erhaltenen DNA-Sequenzen kloniert und sequenziert. Es wurden 120 Plasmide zur Sequenzierung geschickt. Die Klone wurden zuvor mittels Kolonie-PCR selektiert. Es wurden lediglich Plasmide isoliert, die ein entsprechendes Produkt mit der richtigen Größe zeigten. Die Auswertung der Sequenzen ergab Mutationsraten von 0,8 bis 3,7 %, die durch Deletionen, Insertionen als auch Transitionen und Transversionen hervorgerufen worden sind. Damit ergibt sich eine durchschnittliche Mutationsrate von 1,75 %, welche die Mutationsrate eines normalen DNA-„Shufflings“ von 0,7 % übersteigt (Stemmer, 1994). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Methode des SCRATCHY die Mutationsrate um ca. 1 % erhöht hat.

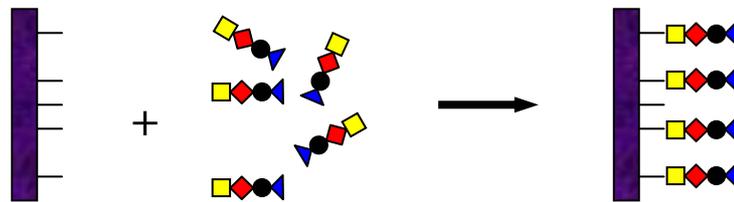
8 Immobilisierung von Molekülen an aktivierter Sepharose

Die Zielmoleküle, gegen die selektiert wird, müssen an eine stationäre Matrix kovalent geknüpft werden. Dabei sind folgende Punkte zu beachten.

Matrix: sollte chemisch und physikalisch inert sein und für eine Kopplung entsprechend voraktiviert sein.

Spacerarm: sollte so gewählt werden, dass die Bindung zwischen Zielmolekül (Kohlenhydrat) und Ligand (zu selektierendes Protein) erlaubt wird.

Bindung: die Pufferbedingungen müssen so gewählt werden, dass eine effektive Bindung zwischen Zielmolekül und Matrix stattfindet und die Stabilität des Zielmoleküls gewährleistet ist.



8.1 Immobilisierung von Kohlenhydraten

Als Kopplungsmatrix wurde Sepharose gewählt. Es ist eine makroporöse Matrix mit hoher chemischer und physikalischer Stabilität und einer unspezifischen Adsorptionsrate. Sie kann so präpariert werden, dass auch kleine Moleküle (unter 5 kDa, Tab. 12) kovalent verknüpft werden können, ohne dass eine ungewollte Wechselwirkung mit der Matrix (Sepharose) stattfindet.

Tabelle 12: Auswahl der Kohlenhydrate, die immobilisiert wurden

Kohlenhydrat	Molekulargewicht in g/mol
Heparin	6000-14000
Streptomycin	1457,38
N-Acetylglucosamin	222
Sialyl-Lewis X	842,8

Für die Kopplungen in dieser Arbeit wurde eine 1,4-bis(2,3-epoxy-propoxy-)Butan-aktivierte Sepharose 6B (Amersham Biosciences) verwendet, die sich durch einen 12 Atom langen, hydrophilen Spacer auszeichnet.

Dies erlaubt eine Immobilisierung von kleinen Molekülen mit OH-, SH- und NH₂-Gruppen. Das Austesten der Immobilisierungsbedingungen, d.h. der Nachweis des Kopplungserfolges und die Wahl des Kopplungspuffers, der keine funktionelle Gruppe enthalten darf, erfolgte im Vergleich mit Sepharose 6B und Heparinsepharose (Amersham Bioscience). Heparin wurde dazu an epoxyaktivierte Sepharose 6B immobilisiert. Der Nachweis, ob die Immobilisierung erfolgreich war, wurde im direkten Vergleich mit Sepharose 6B und käuflicher Heparinsepharose erhalten. Möglich wurde dies durch Verwendung einer 70S Ribosomensuspension, deren Bestandteile, vor allem die ribosomale RNA, an Heparin binden. Der Affinitätstest fand unter den Pufferbedingungen des „*Ribosome Display*“ statt (III 9.2, Tab.14). Der chromatographische Verlauf wurde sowohl über die ribosomalen Proteine als auch über die ribosomale RNA verfolgt. Die Verifizierung über die rRNA ist dabei sensitiver. Ein direkter Kohlenhydrat-Nachweis über sensible Farbreaktion, wie z.B. Anthron (II 2.3.3), erwiesen sich als nicht reproduzierbar, da ein geringer Teil der Sepharose, welche ebenfalls aus Kohlenhydraten besteht, bei der Präparation aus dem Kohlenhydrat-Netzwerk zerstört wird und bei der Abtrennung von ungebundenem Kohlenhydraten und matrixgebundenen Kohlenhydraten den direkten Nachweis stört. Die Prozedur einer Immobilisierung wird exemplarisch am Heparin kurz beschrieben.

Für die Kopplung von Heparin wurden 600 µl einer epoxyaktivierten Sepharose 6B – Suspension (1:1 in 100 mM HEPES, pH 8) mit 1,5 ml Heparin (0,27 g/ml) in 100 mM HEPES (pH 8) über Nacht bei 40 °C im Hybridisierungssofen unter Rotation inkubiert. Die freien Bindungsstellen wurden anschließend durch Zugabe von 1 M Ethanolamin (pH 8) blockiert und freie Liganden durch exzessives Waschen entfernt (II 2.4.3).

Der Nachweis erfolgte mit 10 µl 70S Ribosomensuspension (799 OD/ml), die auf 50 mM Mg²⁺ eingestellt und mit 390 µl Bindungspuffer (Tab. 14) versetzt wurden. Je 200 µl wurden auf die erhaltene Heparinsepharose und die blockierte Sepharose 6B, die als Kontrolle diente, aufgetragen. Es wurde 3x mit 400 µl Bindungspuffer, 1x mit 600 µl und 2x mit 400 µl Elutionspuffer (Tab. 14) und 1x mit Reinigungspuffer (Tab. 14) gewaschen. Jeweils 200 µl der entsprechenden Fraktionen wurden einer Isopropanolfällung und je 200 µl einer Acetonfällung unterzogen und durch Agarosegelelektrophorese und SDS-PAGE dargestellt (Abb.25).

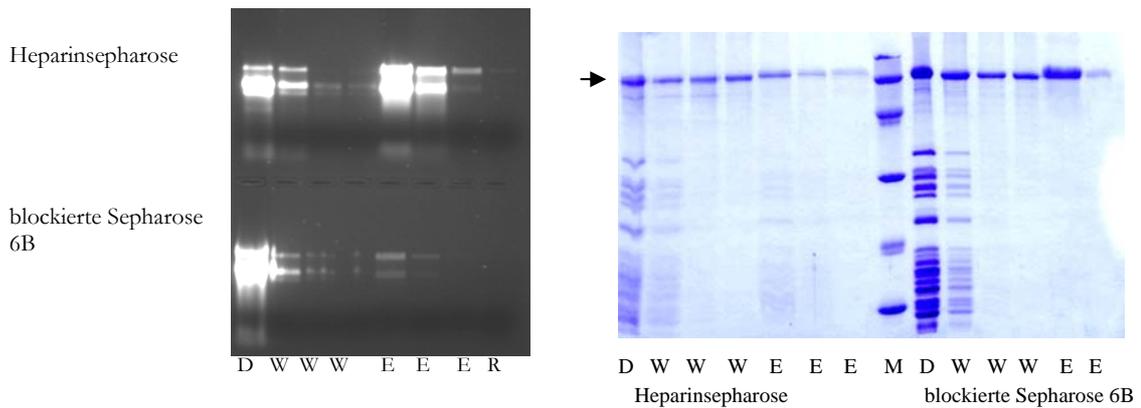


Abb. 25: Gelelektrophoretischer Nachweis der Kopplung von Heparin an epoxyaktivierter Sepharose 6B
 Links: ein 1% iges Agarosegel, das den säulenchromatographischen Verlauf der rRNA zu Heparinsepharose und blockierter Sepharose wiedergibt, die obere Bande ist die 23S rRNA, die untere die 16S rRNA.
 Rechts: ein 15 %iges SDS-Gel, das den säulenchromatographischen Verlauf der ribosomalen Proteine widerspiegelt. (D - Durchlauf, W – Waschfraktion, E – Elutionsfraktion, R - Reinigungsfraktion) Mit Pfeil markiert die BSA-Bande, die aus den Puffern herrührt.

Die Gele geben eindeutig den Erfolg der Kopplung wieder. Während bei der blockierten Sepharose kaum ribosomale Proteine und rRNA ein Bindungsverhalten zeigen, ist dieses bei der Heparinsepharose vor allem auf RNA-Ebene zu sehen.

Die Elutionsfraktionen besitzen einen hohen Gehalt an rRNA, was für eine hohe Bindungskapazität spricht, die nur durch Heparinsepharose erreicht werden kann. In den Elutionsfraktionen der Heparinsepharose zeigen sich auf dem SDS-Gel schwache Proteinbanden, bei der blockierten (ungekoppelten) Sepharose 6B dagegen treten starke Proteinbanden im Durchlauf und in der Waschfraktion und kein Bandenmuster in den Elutionsfraktionen. Die meisten ribosomalen Proteine zeigen keine nachweisbare Bindung an Sepharose 6B. Sie werden bereits am Anfang der Chromatographie herunter gewaschen.

Die so etablierten Bedingungen und die Handhabung für die Immobilisierung von Heparin wurden entsprechend auf andere Kohlenhydratmoleküle angewendet (II 2.4.3).

9 Das „*Ribosome Display*“

Um das „*Ribosome Display*“ realisieren zu können sollten einige Voraussetzungen erfüllt sein. Dazu gehörte die Konstruktion der DNA-Bibliothek, ausgehend von der isolierten chromosomalen DNA, die zur Amplifizierung der gewünschten Genfragmente verwendet wurde, deren Veränderung durch „*Shuffling*“, SCRATCHY und teilweise Verschiebung des Leserahmens zu den linearen Bibliothekskonstrukten (Tab. 13) führte. Des Weiteren die Immobilisierung der Kohlenhydrat-Zielmoleküle an eine stationäre Phase und die Auswahl der mRNA-Konzentration in Korrelation zu der Translationszeit, die Etablierung der Pufferbedingungen und Untersuchungen zur Proteinlöslichkeit erfolgten in Vorbereitung auf das „*Ribosome Display*“ (Daten nicht gezeigt; in Anlehnung an Lamla, 2002).

Tabelle 13: Übersicht der Konstrukte mit entsprechenden Größen

	PCR aus chromo- somer DNA in bp	DNA mit konstanten Regionen für das „ <i>Shuffling</i> “ in bp	lineare Bibliotheks- konstrukte in bp	mRNA in nt
Aki	636	675	865/864	845/844
Bsp	547	586	776/775	756/755
Bst	873	912	1102/1101	1082/1081
Ea	624	663	853/852	833/832
Tht	669			

9.1 Das lineare Bibliothekskonstrukt

Einige wichtige Eigenschaften des Konstruktes wurden bereits in der Einleitung (I 3.2) beschrieben. Ein wichtiger Aspekt ist die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur des Proteins im Komplex mit dem Ribosom und der mRNA. Dies sollte mit Hilfe einer zusätzlichen funktionslosen Sequenz am C-Terminus (Linker) des Proteins möglich sein, da so der Ribosomentunnel überbrückt werden kann.

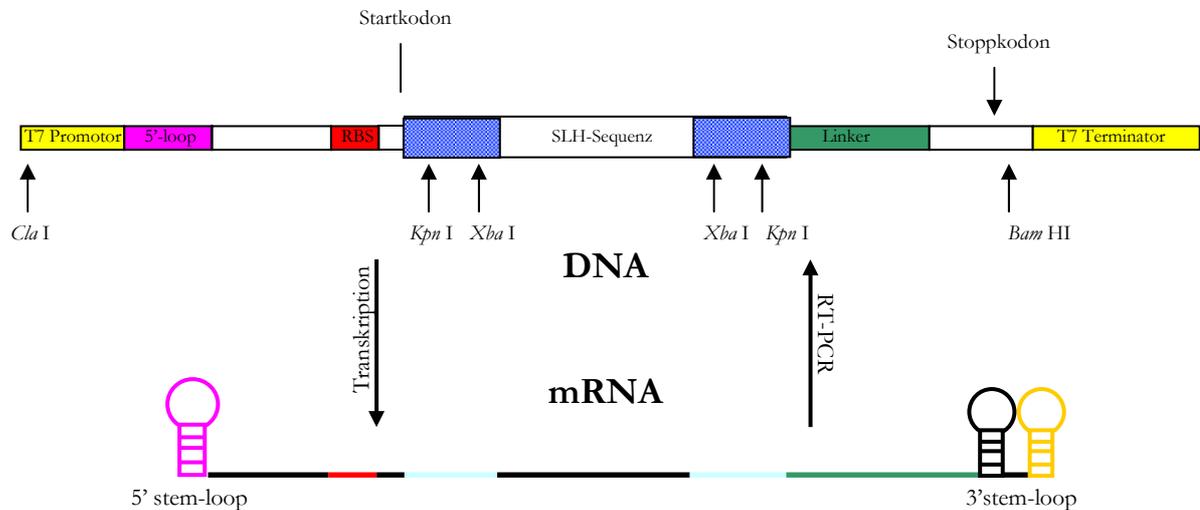


Abb. 26: Schematischer Aufbau der linearen Bibliothekskonstrukte auf DNA- und RNA-Ebene

Der Linker darf dabei nicht länger als nötig sein, um Komplikationen bei der Transkription, der RT-PCR und der Translation zu vermeiden. Die Transkription steht unter Kontrolle des T7 Promotors und des T7 Terminators. Die Protein kodierende Region, in diesem Fall die putative SLH-Domäne, ist von konstanten Regionen flankiert. Konstant heißt, dass diese zur Rekonstruktion des „geschuffelten“ Genfragmentes verwendet wurden und für alle SLH-Sequenzen gültig sind. Diese sind gleichzeitig auch Ausgangspunkte für die Einführung der genetischen Elemente, die für das „*Ribosome Display*“ nötig sind. Zusätzlich zu dem T7 Terminator, der auf mRNA-Ebene eine Sekundärstruktur ausbildet, die das Transkript vor RNasen schützen soll, wurde davor noch eine „*stem-loop*“-Sekundärstruktur eingebaut. In dem „*loop*“ befindet sich ein Stoppkodon, was bei dem hier durchgeführten „*Ribosome Display*“ keine Rolle spielt, da das Ribosom durch diese Sekundärstruktur zum Arretieren veranlasst wird. Das Stoppkodon kann so seine Funktion nicht ausüben, das Ribosom in seine Untereinheiten zu lösen. Des Weiteren kann dieses Stoppkodon durch Mutationen, verursacht durch eine Leserahmen-Verschiebung, eliminiert werden, da die genetischen Elemente erst nach dem „*Shuffling*“ bzw. SCRATCHY angefügt wurden.

9.2 Durchführung der Selektion mit der Bsp-Bibliothek

Nach einer Reihe von Optimierungen wurde das „*Ribosome Display*“ unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Bibliothek wurde als erstes *in vitro* transkribiert (II 2.1.18.4).

Die Transkription, ausgehend von der Bsp-DNA-Bibliothek, wurde nicht in Anwesenheit von α -³⁵S-CTP durchgeführt, da der zeitliche Rahmen für den Start nicht erfassbar war. Für alle weiteren Transkriptionen wurde α -³⁵S-CTP eingesetzt.

Die *in vitro*-Translation fand in Anwesenheit von 100 – 150 nM mRNA und 5 μ M AS-Oligo (Lamla, 2002) in einem 100 μ l Reaktionsansatz statt. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 7,5 min wurde der Ansatz in ein Eisbad überführt und auf 50 mM Magnesium mit Magnesiumchlorid eingestellt. Es erfolgte eine Zugabe von 3 Matrixvolumen Bindungspuffer. Die Sepharosen (Heparin-, Streptomycin-, N-Acetylglucosamin- und Sialyl-Lewis X, je 450-500 μ l Sepharose) wurden in Bindungs-/Waschpuffer vorinkubiert und dann mit dem Translationsansatz vereinigt. Die Inkubation fand bei 4 °C im Eismantel unter Rollen 30 min statt. Danach wurde kurz bei max. 3000x g zentrifugiert, um die Sepharosen (Matrizen) zu sammeln. Der Überstand wurde abgenommen. Die Matrizen wurden insgesamt mit 3 Vol. Bindungs-/Waschpuffer behandelt. Eluiert wurde mit dem Elutionspuffer und dem Reinigungspuffer, jeweils mit 3 Matrixvolumen.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Puffer für die Chromatographie beim „*Ribosome Display*“

Komponente	Bindungs-/ Waschpuffer	Elutionspuffer	Reinigungspuffer
1 M HEPES (pH 7,5)	20 mM	20 mM	20 mM
5 M NaCl	150 mM	150 mM	1 M
1 M CaCl ₂	2 mM	-	
1 M MgCl ₂	50 mM	-	
100 % Nonidet P 40	0,05 %	0,1 %	
10 mg/ ml BSA	50 μ g/ml	50 μ g/ml	
1 mg/ml tRNA	1 μ g/ml	1 μ g/ml	
0,5 M EDTA	-	20 mM	

Die Pufferkomponenten

Grundlage des Puffers ist HEPES mit einem pH-Wert von 7,5. Dieser Puffer ist ebenfalls Basis für die Transkriptionen, Translationen und Lagerung der Kohlenhydrate. Zudem reagiert er auf Temperaturschwankungen nicht so sensibel wie Tris-Puffer. Bei den NaCl - und CaCl₂ - Konzentrationen handelt es sich um physiologische Konzentration.

Ca²⁺ ist für die Bindung von Proteinen an Kohlenhydrate essentiell, während Natriumchlorid dem Puffer eine gewisse Stringenz gibt. 50 mM MgCl₂ dienen der Stabilisierung des PRM-Komplexes. Das Detergenz Nonidet P40 wurde gewählt, da es mögliche Aggregatbildungen von Proteinen und Lipiden verhindert. BSA („Bovine serum albumin“) und tRNA sollen als Begleitprotein bzw. –RNA stabilisierend auf das System wirken, indem sie Heterogenität verleihen. EDTA ist ein Chelatormolekül, was mit Mg²⁺ und Ca²⁺ Komplexe eingehen kann. Im Elutionspuffer eingesetzt, lässt es Ribosomen in seine Untereinheiten dissoziieren, so dass die festgehaltene mRNA freigesetzt wird.

Aufarbeitung der mRNA

Die mRNA wird durch -20 °C kaltes Isopropanol gefällt und nach Pelletierung durch Zentrifugation in Wasser aufgenommen. So behandelte mRNA wird anschließend über das „High Pure RNA Purification Kit“ (Roche) gereinigt. Die mRNA wurde mit 55 µl Wasser eluiert. Die so gereinigte RNA wurde in die RT-PCR eingesetzt. Dazu wurden für jede Probe zwei parallele reverse Transkriptionen mit 22 µl mRNA und 10 pmol des Oligonukleotides UniRLink angesetzt (II 2.1.18.5). Die erhaltene cDNA wurde mittels „Quick Clean“ der Firma Bionline aufgereinigt, so dass das Volumen auf 30 µl reduziert werden konnte. Anschließend erfolgte eine PCR mit den Primern Ade fow und Exp rev (VII 3). Das DNA-Volumen betrug 5 % des Gesamtansatzes. Dieser Ansatz wurde auf einem 1,25 %igen Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNA aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „High Pure DNA Purification Kit“ (Roche, Mannheim) aufgereinigt. Diese DNA wurde in einer zweiten PCR zusammen mit den Primern Ade fow, Ade rev, T7 ProRiDi und T7 TerRiDi eingesetzt (Abb. 27).

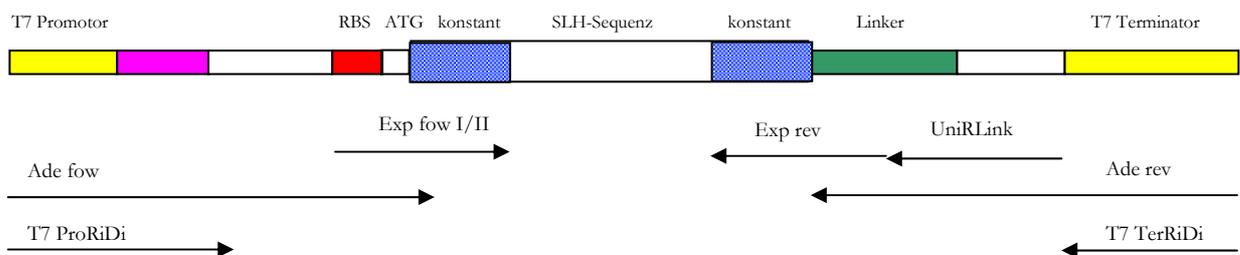


Abb. 27: Übersicht über die verwendeten Primer im „Ribosome Display“

Folgende Temperaturprogramme sind für die PCRs relevant:

1. PCR-RT			2. PCR-RT	
95 °C	3 min		95 °C	3 min
95 °C	25 s	} 31x	95 °C	30 s
70 °C	25 s		60 °C	35 s
72 °C	80 s		72 °C	80 s
72 °C	3 min		72 °C	3 min
4 °C	∞		4 °C	∞

Nach erfolgter PCR wurde das PCR-Produkt - wie zuvor - gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA aus dem entsprechenden Gelstück isoliert. Die DNA wurde in mRNA umgeschrieben und diese konnte für eine weitere Selektionsrunde eingesetzt werden.

9.3 Vorversuche

In einem der ersten Vorversuche wurde unter anderem getestet, ob ein „*Ribosome Display*“ möglich ist, wie sich die ribosomale RNA gegenüber den Kohlenhydrat-Sepharosen verhält und ob unspezifische Bindungen auftreten. Dazu wurden die vier SLH kodierenden Bibliotheken zu gleichen Teilen vereint und einem „*Ribosome Display*“ (III 9.2) unterzogen. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt und mit 1 Volumen -20 °C kaltem Isopropanol gefällt. Die Pellets wurden in 70 µl Wasser aufgenommen und mittels „*High Pure RNA Purification Kit*“ (Roche, Mannheim) gereinigt. Es wurde mit 60 µl Wasser eluiert und 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 28). Als Kontrolle diente Sepharose 6B (Spur 1, Abb. 28).

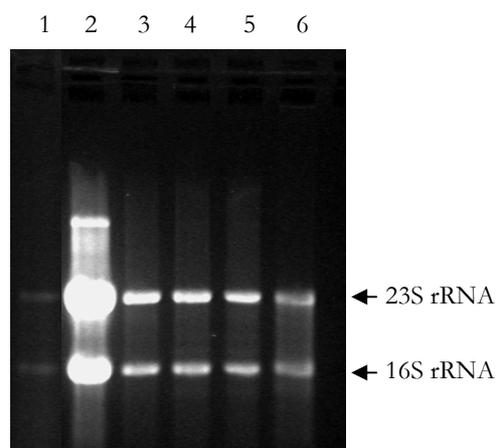


Abb. 28: Test des „*Ribosome Display*“ und auf die Möglichkeit unspezifischer Wechselwirkung zu den Matrizen. 1: Sepharose 6B, 2: Heparin-, 3: Streptomycin-, 4: N-Acetylglucosamin-, 5: Sialyl-Lewis X-Sepharose, 6: Referenz (ribosomale RNA)

Die ribosomale RNA kann als Indikator für die Funktionalität des „*Ribosome Display*“ benutzt werden, da die Ribosomen Verknüpfungspunkt von Geno- und Phenotyp sind.

Aufgrund der Mengenverhältnisse an rRNA (Abb. 28) könnte davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der vereinten Protein-Bibliotheken zu Heparin stärker ist als zu den anderen Kohlenhydratsepharosen (Spur2, Abb. 28), während die rRNA-Menge der Sepharose 6B darauf schließen lässt, dass keine Wechselwirkungen der Bestandteile des PRM-Komplexes nachweisbar sind. Gleichzeitig stellt dies auch den Beweis für die erfolgreiche Immobilisierung der Kohlenhydrate dar.

Die enorme Menge an rRNA aus der Chromatographie mit Heparinsepharose und die Tatsache, dass Heparin in den generell in den Puffern des „*Ribosome Display*“ verwendet wird, ließ vermuten, dass eine Bindung von Ribosomen an Heparin denkbar ist. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde eine 70S Ribosomensuspension auf die Heparinsepharose aufgetragen und wie unter III 8.1 beschrieben, verfahren.

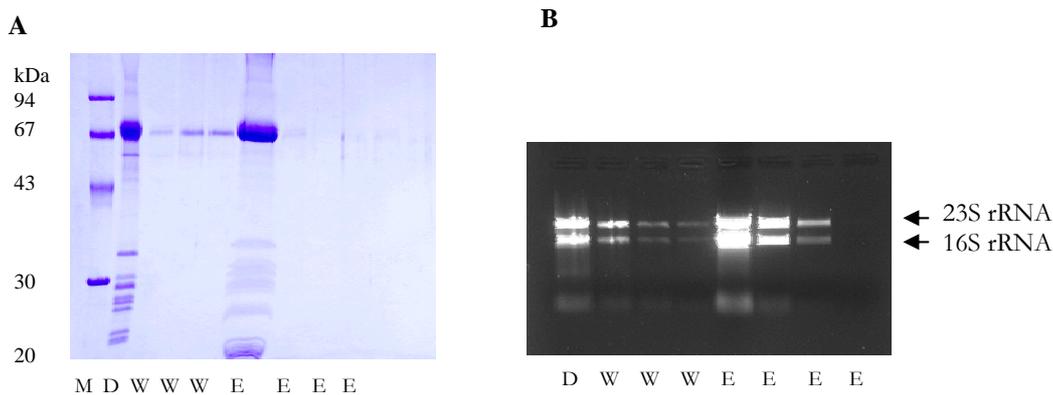


Abb. 29: Interaktion von 70S Ribosomen und Heparinsepharose. **A)** SDS-PAGE: chromatographischer Verlauf der ribosomalen Proteine, **B)** Agarosegel: chromatografischer Verlauf der rRNA, (M-Marker, D-Durchlauf-, W-Wasch-, E-Elutionsfraktion)

Sowohl der Nachweis der ribosomalen Proteine über SDS-PAGE (Abb. 29 A) als auch der der rRNA mittels Agarosegelelektrophorese (Abb. 29 B) geben der Vermutung recht, dass eine Wechselwirkung zwischen Ribosomen und Heparin vorhanden ist, da die Elutionsfraktion(en) Bestandteile der Ribosomen in größerer Menge zeigt. So wurde diese Beobachtung als Nachweis für das Austesten der Immobilisierungs-Bedingungen verwandt. Es stellt sich also die Frage, ob eine Selektion gegen Heparin sinnvoll ist? Da die Stärke der Bindung aus diesen Experimenten nicht bestimmbar ist, ist somit auch die Beeinflussung der Ribosomen auf die Selektion nicht abschätzbar.

Es sollte dennoch möglich sein, eine Anreicherung von Proteinen zu erhalten, unter der Voraussetzung, dass diese eine höhere Affinität zu Heparin zeigen. Die Ribosomen stellen so einen nachweisbaren Konkurrenten neben den Bibliotheksproteinen dar.

9.4 Verlauf der Selektionen

Während die Vorversuche mit einem Gemisch aus den 4 SLH-kodierenden Bibliotheken erfolgte, wurde für die Selektionen gegen Heparin, Streptomycin, N-Acetylglucosamin und Sialyl-Lewis X die Bsp-DNA-Bibliothek verwandt, die auf der SLH-kodierenden Sequenz des Bakteriums *Bacillus sphaericus* (Bsp) basiert. N-Acetylglucosamin diente lediglich als Kontrolle, da es ein Monosaccharid ist, was als Glucosamin sowohl in Heparin, Streptomycin als auch in Sialyl-Lewis X vorkommt. Die Selektionen wurden parallel und wie unter III 9.2 beschrieben durchgeführt. Am Anfang fand eine Vorselektion gegen Sepharose 6B statt, um eine mögliche Anreicherung von Proteinen und mRNA gegen Sepharose 6B auszuschließen. Sie wurde gleichzeitig auch als Kontrolle in der ersten Selektionsrunde mitgeführt.

Während nach der ersten Selektionsrunde gegen die vier Kohlenhydrate ein PCR-Produkt synthetisiert werden konnte, war dies gegen Sepharose 6B nicht der Fall, so dass eine Anreicherung von Molekülen gegen Sepharose 6B im weiteren Verlauf unwahrscheinlicher werden würde. Die Selektion gegen Sialyl-Lewis X musste wiederholt werden (Spur 6 & 7 Abb. 30).

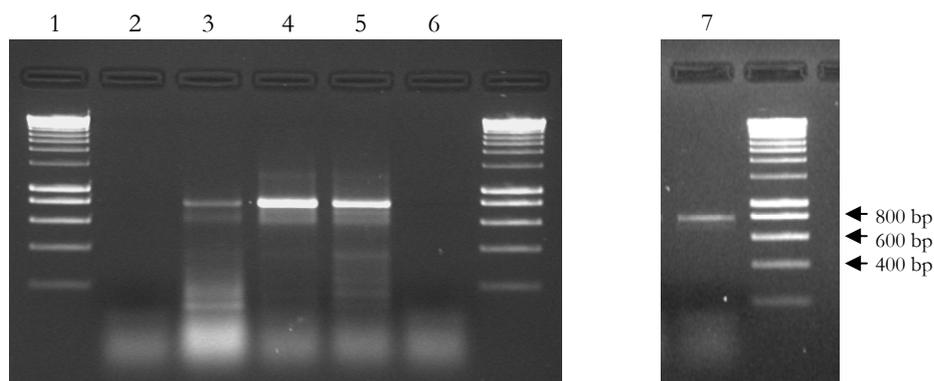


Abb. 30: PCR-Produkte nach der 1. Selektionsrunde gegen 2: Sepharose 6B, **3:** Heparin, **4:** Streptomycin, **5:** N-Acetylglucosamin, **6&7:** Sialyl-Lewis X, **1:** Marker (Hyperladder I)

Nach zwei Zyklen wurden neu präparierte Matrizen verwandt. Sowohl das Translationsvolumen als auch die Inkubationszeit zwischen Zielmolekülen und naszierenden Proteinen wurden während der Selektion nicht geändert. Für alle vier Kohlenhydrate konnte eine Anreicherung erreicht werden.

III EXPERIMENTE & ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind in der Abb. 31 und Tabelle 15 zusammengefasst. Der Verlauf wurde anhand eluierter ^{35}S -CTP markierter mRNA-Moleküle detektiert.

Tabelle 15: Zusammenfassung der Selektionsverläufe anhand eluierter ^{35}S -mRNA in [%]

Selektionsrunde	Heparin	Streptomycin	N-Acetyl- glucosamin	Sialyl-Lewis X
2	4,3	0,7	1,5	1,2
3			4,5	3,1
4	13	8,5	7	3,3
5	18	10	7	4,7
6		10,4		3,6

Den prozentualen ^{35}S -mRNA-Werten kann entnommen werden, dass eine Anreicherung nach vier bis fünf Selektionszyklen erreicht wurde (Abb. 31, Tabelle 15).

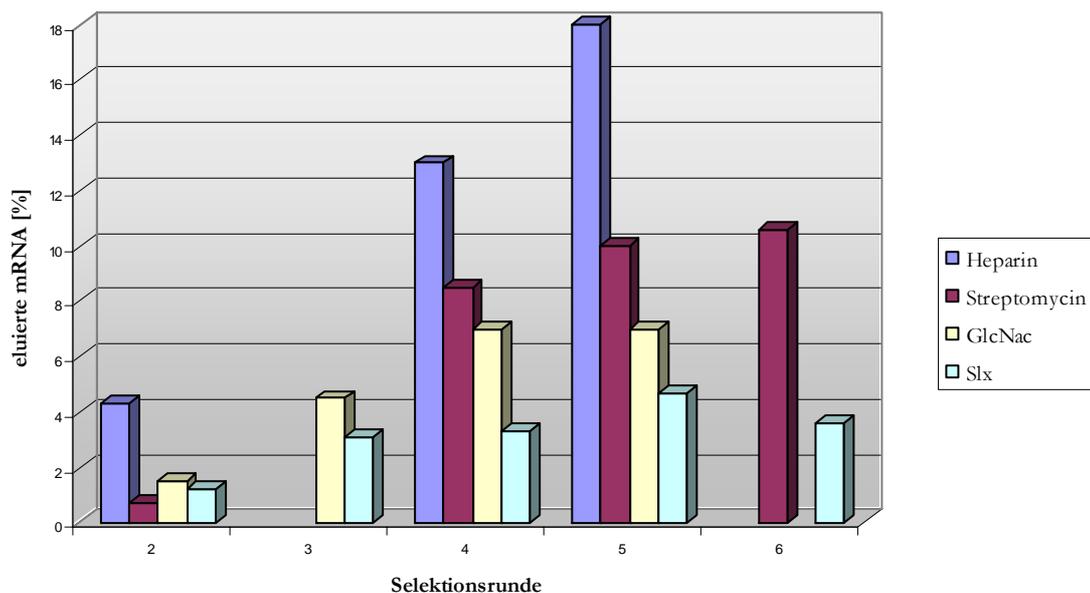


Abb. 31: Verlauf der Selektion gegen Heparin, Streptomycin, N-Acetylglucosamin (GlcNac) und Sialyl-Lewis X mit der Bsp-Bibliothek. Die Menge eluierter mRNA bezieht sich auf die Menge eingesetzter mRNA

Um das erhaltene Ergebnis zu verifizieren, wurde die ribosomale RNA aus der 5. Selektionsrunde auf einem Agarosegel überprüft. Die prozentuale Anreicherung auf mRNA-Ebene sollte sich auch auf der Ebene der rRNA widerspiegeln, denn je höher die Anreicherung an ^{35}S -mRNA, desto höher der naszierende Proteinanteil und desto größer der Anteil an Ribosomen.

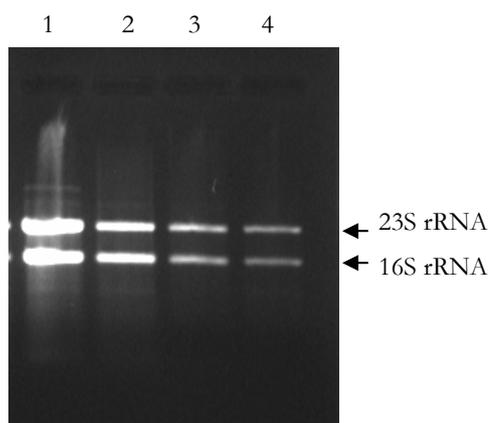


Abb. 31: Darstellung der relativen Mengenverhältnisse auf rRNA-Ebene nach der 5. Selektionsrunde. 1: Heparin-, **2:** Streptomycin-, **3:** N-Acetylglucosamin-, **4:** Sialyl-Lewis X. Korrelation der ³⁵S-mRNA-Werte und rRNA-Mengen.

Die rRNA-Mengen stimmen relativ zu einander mit den prozentualen Ergebnissen überein. Heparin mit der höchsten Anreicherung, gefolgt von Streptomycin, N-Acetylglucosamin und Sialyl-Lewis X (Abb. 31).

9.5 Klonierung und Sequenzanalyse

Die PCR Produkte der vier Selektionen aus der 4. Runde, wurden mit Hilfe des „*TA-Cloning Kits*“ (pGEM-T Easy II) der Fa. Promega kloniert. Dazu wurden die PCR-Produkte aus einem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. 40 Plasmide pro Selektion wurden zur Sequenzierung (IBA, Göttingen) geschickt. Die Klonierung des PCR-Produktes aus der Sialyl-Lewis X-Selektion erbrachte keinerlei Klone. Es wurde der Primer UniRLink für die Sequenzierung verwendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in der Tabelle 16 und der Abb. 33 dargestellt. Die Proteinsequenzen sind dem Anhang (VII 7) zu entnehmen.

Tabelle 16: Ergebnisse der Sequenzierung. Verteilung der Sequenzen nach Aminosäurelänge und Vorhandensein eines Stoppkodons

	Heparin	Streptomycin	N-Acetylglucosamin
Anzahl an auswertbaren Sequenzen (max. 40)	1	3	3
≤ 19 Aminosäuren	23	19	20
≥ 19 Aminosäuren mit Stoppkodon	16	11	9
Aminosäuren ohne Stopp	2	7	8
davon länger als 100 As	5	10	13

III EXPERIMENTE & ERGEBNISSE

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Heparin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--ISALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
Heparin	MAYGTSRAGF	PDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQGIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
Heparin	MVYGTSRGGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FEPNQT--IN	RGQVVKLLGR	DLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--VN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRLN	DLPV--TAEA	ELVKYAAPAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADST	FKPNQT--IN	RGQVVELLDR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IS	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ESVKYAALAE
Streptomycin	MVYGTPRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAGA	ELVKYAALAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--ISAPADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLSR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYTALAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNYHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
Streptomycin	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEA	P--INALADA	GIINGYADGT	SKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADRNSEQRFN	DPPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVMVPLEPGS	PDAAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADCT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQGIP	ADWNSKQRLN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGFADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVYGTSRAGF	SDVAGNDYEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQETP	ADWNSKQRSN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVMVPLEPGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADST	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQREIL	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELLKYAALAK
GlcNac	MVYGTSRAGF	SDVAGNDYEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQETP	ADWNSKQRSN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADAT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWDSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
GlcNac	MVYGTSRAGF	SDVAGNDHEV	A--ISALADA	DIINGYADGT	FKPIQT--TN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWYSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK
original	-----GF	SDVAGNDHEV	A--INALADA	GIINGYADGT	FKPNQT--IN	RGQVVKLLGR	YLEAQQQEIP	ADWNSKQRFN	DLPV--TAEA	ELVKYAALAK

III EXPERIMENTE & ERGEBNISSE

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Heparin	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSAT	RGQFVLFRR--
Heparin	DAGAFNSSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YPAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASSSRG
Heparin	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYRK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASS---
Streptomycin	DAGVFNGSNG	NLNPSQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDSDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGVTNV	AHFNLGNSVT	RGQFASSSRG
Streptomycin	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIVGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSSEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASSSRG
Streptomycin	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLGRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGTTNV	AHFNLGNSVT	RGQFASSSRG
Streptomycin	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIA	ALEYAGITNV	AHSNPGNSVT	RGQFVHLLLEV
Streptomycin	GAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IEE IAGVDLV	AEYKK--ANF	VTVIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASILEV
Streptomycin	AAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANL	VTEIGDLDKA	YSAEQRTATA	ALEYAGITNV	AHFNPGNVT	RGQFACSSRG
Streptomycin	DAGVFNGSNG	NLNASRTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVGLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	ARLNPGNSVT	RGQFASSSRG
GlcNac	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIASVDLV	AEYEK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQHTAIV	ALEYAGITNV	AHLNPGNSVT	RGQFVHPLEV
GlcNac	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VAEIGDLDKA	YSTEQRTVIV	ALEYAGITNV	AHFNPSNSVT	RGLFASSSRG
GlcNac	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTGIV	ALEYAGITNV	AHVNPGNSVT	RGHSF-FXEV
GlcNac	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQTAVVLVRA	IKEIADVDLV	AEYRK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTATV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RRQSASSSRV
GlcNac	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTGIV	ALEYAGITNV	AHVNPGNSVT	RGQFVSFLXV
GlcNac	DAGVFSGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKR--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASSSRG
GlcNac	GAGVFNGTNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVCA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIDDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASSSRG
orig	DAGVFNGSNG	NLNASQTMQR	QQMAVVLVRA	IKEIAGVDLV	AEYKK--ANF	VTEIGDLDKA	YSAEQRTAIV	ALEYAGITNV	AHFNPGNSVT	RGQFASF---

Abb. 33: Proteinalignment der 17 Sequenzen ohne Stoppkodon. Gelb unterlegt sind die Punktmutationen. Rot unterlegt die konservierten Aminosäuren.

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme BioEdit und pDraw ausgewertet. Von 120 sequenzierten Plasmiden ergaben 7 Plasmide keine auswertbare Sequenz. In Abbildung 33 ist in Alignment der 17 Proteine, die kein Stoppkodon tragen. Die geringe Anzahl an Sequenzen ohne Stoppkodon (Tab.16) ist überraschend, wenn die Bedeutung des Stoppkodons berücksichtigt wird (I 3.2). Dagegen wurden Sequenzen gefunden, die für 19 oder weniger Aminosäuren kodieren, was gegen jede Theorie des „*Ribosome Display*“ spricht, denn von diesen Sequenzen dissoziieren die Ribosomen und das gebildete Protein wird freigelassen. Ein PRM-Komplex wird nicht gebildet, so dass mRNA nicht isoliert werden dürfte, eine Anreicherung dieser mRNA also nicht stattfinden sollte. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die Bindung der mRNA an die entsprechenden Kohlenhydrate. Binden Nukleinsäuren hoch affin an Molekülen, so wird von Aptameren gesprochen. Dass die Anreicherung aus der Bindung der mRNA an die ribosomale RNA, die an Heparin binden kann, herrührt, wurde ausgeschlossen. Erstens war die rRNA nicht radioaktiv markiert, so dass eine Anreicherung darüber nicht messbar gewesen wäre und zweitens hätte die rRNA-Verteilung immer konstant sein müssen, da keine Bibliothek, also keine Diversität der rRNA Moleküle vorliegt (Abb. 31), es also zu keiner typischen Anreicherung hätte führen dürfen.

9.6 Test auf mögliche Aptamere

Dem Verdacht eines Aptamers wurde nachgegangen. Ein Teil der Bibliothek, die mRNA-Moleküle aus der 5. Runde und je 20 mRNAs, der entsprechend selektionierten Plasmide wurden durch Transkription mit ³⁵S-CTP radioaktiv markiert und einem „*Ribosome Display*“ (RD) ähnlichen Prozess unterzogen. Das heißt, die mRNA-Moleküle wurden nicht *in vitro* translatiert, sondern lediglich unter RD-Bedingungen den Kohlenhydratmolekülen ausgesetzt (III 9.3). Dabei wurden die in Tabelle 17 aufgeführten Werte ermittelt.

Tabelle 17: Bindungsstudien der ³⁵S-mRNA aus der 0.Runde, 5.Runde und von je 20 klonierten Plasmiden

	Sepharose [%]	Heparin [%]	Streptomycin [%]	GlcNac [%]	SLx [%]
Bibliothek, 0. Runde	0,84	1,77	0,89	1,85	1,17
Bibliothek, 5. Runde		2,66	5,02	10,85	3,27
Kontrolle Sepharose		(1,43)	(0,1)	(0,1)	(2,67)
Bibliothek (je 20 Sequenzen)		8,8	10,8	6,5	

GlcNac: N-Acetylglucosamin; SLx: Sialyl-Lewis X

Die Daten in Tabelle 17 deuten auf ein Aptamer hin. Sowohl die Bibliothek aus der 5. Selektionsrunde als auch die jeweiligen 20 Sequenzen zeigten eine erhöhte Affinität gegenüber den Kohlenhydraten. Allerdings ist festzustellen, dass die Werte zum Teil deutlich differieren, was darauf hindeutet, dass die Affinität stark von der Sequenz abhängig sein muss. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde vermutet, dass die putativen Aptamere auf den Sequenzen beruhen, die für die verkürzten (≤ 19 Aminosäuren) Proteine kodieren. Zehn entsprechende Sequenzen wurden wahllos gewählt, unter Verwendung von ^{35}S -CTP transkribiert und dem gleichen Bindungstest unterzogen. Eine Affinität gegenüber den Kohlenhydraten konnte nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

9.7 Bindungsstudien

Für das Austesten der selektierten Proteine wurde ein ähnlicher Ansatz gewählt wie für das „*Ribosome Display*“. Es wurden in erster Linie Proteine getestet, deren Proteinsequenzen länger als 100 Aminosäuren sind, da davon auszugehen war, dass kürzere Proteine keinem Selektionsdruck unterliegen und die Termination durch das Stoppkodon zum Auseinanderfallen des PRM-Komplexes führt bzw. ca. 30 Aminosäuren vom Ribosomentunnel überdeckt werden, eine Bindung nicht möglich ist.

Zur Untersuchung der Bindung zwischen selektiertem Protein und dem entsprechenden Zielmolekül wurden zur Generierung des linearen Bibliothekskonstruktes zwei PCRs angewandt. Die 1. PCR erfolgte mit der Plasmid-DNA unter Verwendung der Primer T7 fow und UniR Link. Das PCR-Produkt wurde ungereinigt in die 2. PCR eingesetzt. Die DNA-Menge wurde auf 5 % des Endvolumens festgesetzt und mit Hilfe der Primer T7 fow, Ade fow und Ade rev umgesetzt. Die folgenden PCR-Programme wurden benutzt:

1. PCR-RT			2. PCR-RT	
95 °C	3 min		95 °C	3 min
95 °C	25 s	} 30x	95 °C	30 s
55 °C	25 s		60 °C	25 s
72 °C	50 s		72 °C	50 s
72 °C	3 min		72 °C	3 min
4 °C	∞		4 °C	∞

Nach Reinigung des PCR-Produktes mit „*Quick Clean*“ (Bioline) erfolgte eine Transkription mit anschließender Reinigung der RNA durch das „*High Pure RNA Purification Kit*“ (Roche).

Ein Teil dieser RNA wurde dann in eine 100 µl Translations-Reaktion unter Verwendung von ¹⁴C-Leucin eingesetzt (II 2.2.2). Die Translation fand bei 37 °C für 40 min statt. Danach wurde wie beim „*Ribosome Display*“ verfahren. Der Translationsansatz wurde mit der Zielsepharose (450 µl -500 µl) vereint und für 30 min bei 4 °C unter Rollen inkubiert. Der Überstand wurde nach Absetzen der Sepharose für die SDS-PAGE aufbewahrt. Es wurde 5x mit 500 µl Bindungspuffer gewaschen, eluiert mit 1x 200 µl, 1x 500 µl Elutionspuffer und 1x mit 500 µl Reinigungspuffer. Die Fraktionen wurden mit Hilfe einer Acetonfällung auf ein handhabbares Volumen gebracht und für die SDS-PAGE präpariert (II 2.2.3). Exemplarisch wird jeweils nur ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel gezeigt und ansonsten nur Autoradiogramme, da die Proteinmenge von ca. 1 µg unterhalb der sichtbaren Nachweisgrenze eines Coomassie gefärbtes Geles liegt.

Bindungstest der selektierten Proteine gegen Heparin

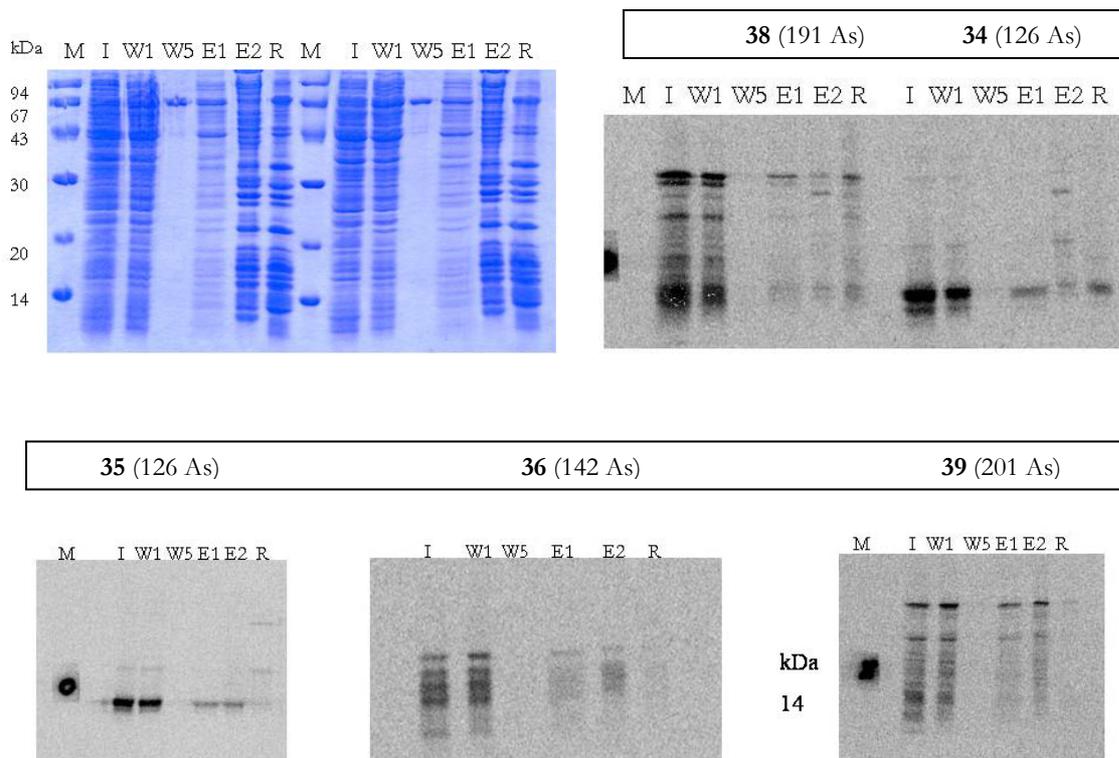
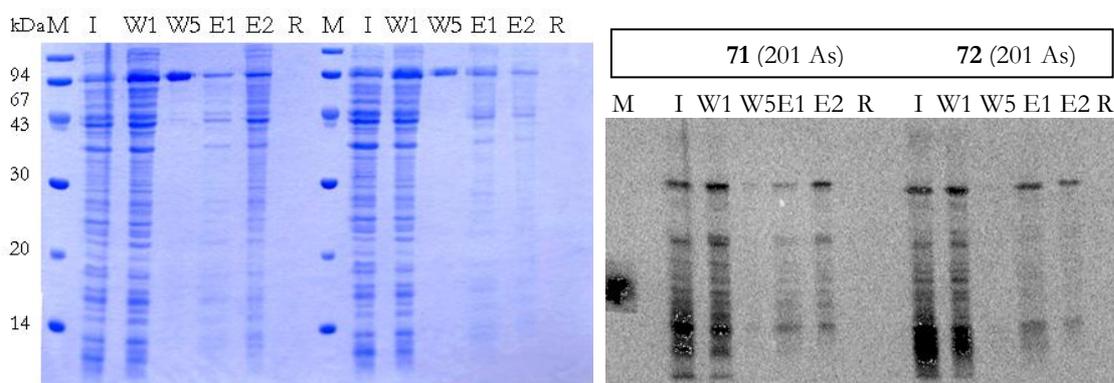


Abb. 34: Affinitätschromatographie einiger selektierter Proteine aus dem „*Ribosome Display*“ gegen Heparin. Links oben: 15 %iges SDS-Gel Coomassie-gefärbt (blau), daneben das dazugehörige Autoradiogramm. Die Autoradiogramme sind mit Nummern beschriftet, die den Sequenzen im Anhang VII 7.1 entsprechen. In Klammern die Länge der Proteinsequenz in Aminosäuren. **M:** „LMW 6“-Marker, **I:** Inkubations-, **W:** Wasch-, **E:** Elutions- und **R:** Reinigungsfraction. Die Bande in der W5-Fraktion rührt vom BSA aus dem Puffer her. Im Autoradiogramm ist das Molekulargewicht von 14 kDa mit einem radioaktiven Punkt (schwarz) gekennzeichnet.

Aus der Selektion gegen Heparin wurden 5 Proteinsequenzen auf eine mögliche Bindung getestet, indem eine Affinitätschromatographie unter „*Ribosome Display*“-Bedingungen durchgeführt wurde. Dabei wurden Sequenzen ausgewählt, die bereits aus der Selektion ein Stoppkodon mitbrachten und Sequenzen die erst durch die nachfolgende PCR-Reaktion mit einem solchen versehen wurden. Konsequenz ist, dass unterschiedlich große Proteine getestet wurden. Das typische Bandenmuster des Bindungsverlaufes ist im Coomassie-gefärbten Gel zu sehen (Abb. 34). Dem kann entnommen werden, dass nach 5 Waschschrritten keine Proteine nachweisbar sind. Die Elutionsfraktionen zeigen eine große Menge an Protein, was zum großen Teil von den ribosomalen Proteinen stammt, die an der Heparinsepharose gebunden haben. Dieser chromatographische Verlauf ist typisch für diesen Bindungstest. Alle gewählten Proteine zeigen Affinität zu Heparin. In den Autoradiogrammen können unterschiedliche Banden in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden, die allerdings in ihrer Schwärzungs-Intensität und Dicke verschieden sind, so dass davon auszugehen ist, dass die Stärke der Bindung zu Heparin variiert. Eine Tendenz in Abhängigkeit von der Größe kann nicht formuliert werden. Was auffällt ist, dass zum Teil mehr als eine erwartete Proteinbande auftritt, die entweder von Nebenprodukten oder durch Proteolyse entstanden sein könnten. Ähnliche Verhältnisse sind auch bei Streptomycin (Abb. 35) und N-Acetylglucosamin (Abb. 36) zu verzeichnen.

Bindungstest der selektierten Proteine gegen Streptomycin



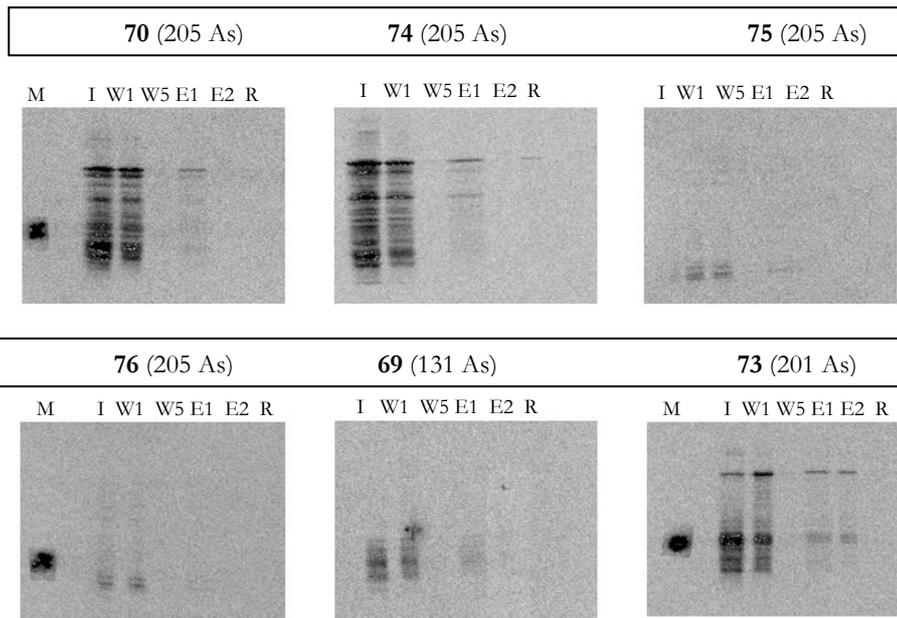


Abb. 35: Affinitätschromatographie einiger selektierter Proteine aus dem „Ribosome Display“ gegen Streptomycin. Links oben: 15 %iges SDS-Gel Coomassie-gefärbt (blau), daneben das dazugehörige Autoradiogramm. Die Autoradiogramme sind mit Nummern beschriftet, die den Sequenzen im Anhang VII 7.2 entsprechen. In Klammern ist die Länge der Proteinsequenz in Aminosäuren angegeben. **M:** „LMW 6“-Marker, **I:** Inkubations-, **W:** Wasch-, **E:** Elutions- und **R:** Reinigungsfraktion. Die Bande in der W5-Fraktion rührt vom BSA aus dem Puffer her. Im Autoradiogramm ist das Molekulargewicht von 14 kDa mit einem radioaktiven Punkt (schwarz) gekennzeichnet.

Aus der Selektion gegen Streptomycin wurden 8 Proteinsequenzen getestet. Das Coomassie-gefärbte Gel gibt wiederum den typischen affinitätschromatographischen Verlauf wieder. Die Elutionsfraktionen weisen kaum zusätzlich Proteine auf. Aufgrund der Autoradiogramme kann eine Affinität zu Streptomycin von den Proteinen mit den Sequenznummern 71, 72, 73 und eine wesentlich schwächere Bindung bei 70 und 74 detektiert werden. Die Proteine 75 und 76 konnten nicht und 81 in geringer Menge synthetisiert werden. Hier zeigen sich keine zusätzlichen radioaktiven Banden wie es zum Beispiel bei den Proteinen 34 und 35 der Fall ist. Diese sind größer als das eigentliche Protein, so dass dies als Phänomen für diese Proteine angesehen werden sollte.

Bindungstest der selektierten Proteine gegen N-Acetylglucosamin

Für die Selektion gegen N-Acetylglucosamin, der Kontrolle, die mitgeführt wurde, wurden 11 Sequenzen unterschiedlicher Größe, getestet. Hier können Affinitäten verifiziert werden, die unabhängig von der Größe sind.

III EXPERIMENTE & ERGEBNISSE

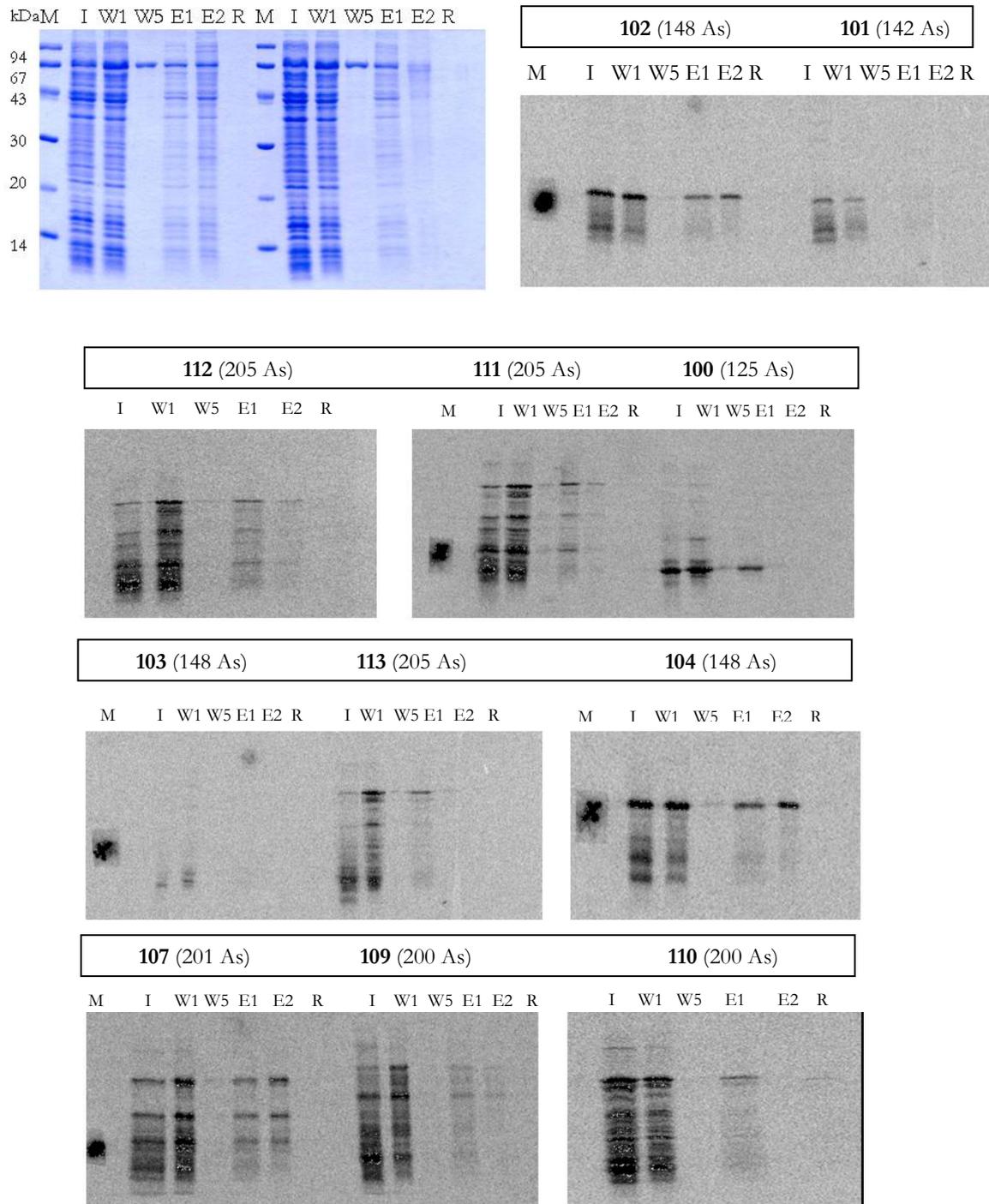


Abb. 36: Affinitätschromatographie einiger selektierter Proteine aus dem „Ribosome Display“ gegen N-Acetylglucosamin. Links oben: 15 %iges SDS-Gel Coomassie-gefärbt (blau), daneben das dazugehörige Autoradiogramm. Die Autoradiogramme sind mit Nummern beschriftet, die den Sequenzen im Anhang VII 7.3 entsprechen. In Klammern ist die Länge der Proteinsequenz in Aminosäuren angegeben. **M:** „LMW 6⁶-Marker, **I:** Inkubations-, **W:** Wasch-, **E:** Elutions- und **R:** Reinigungsfraktion. Die Bande in der W5-Fraktion rührt vom BSA aus dem Puffer her. Im Autoradiogramm ist das Molekulargewicht von 14 kDa mit einem radioaktiven Punkt (schwarz) gekennzeichnet.

Das Protein mit der Nummer 55 konnte nicht synthetisiert werden. Ansonsten können die bereits festgehaltenen Ergebnisse aus den Selektionen gegen Heparin und Streptomycin hier wieder gefunden werden: starke Affinitäten wie z.B. bei den Proteinen 102, 104, 107, schwächere bei den Proteinen 112, 111, 100, 113, 119 bis keine Bindung bei den Proteinen 101 und 111.

Zusammenfassung

Die Selektionen gegen Heparin, Streptomycin und N-Acetylglucosamin konnten erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden Proteine unterschiedlicher Größe selektiert, die die Fähigkeit haben, an das jeweilige Zielmolekül zu binden. Die chromatographischen Verläufe zeigen verschiedene Bandenmuster, die zum Teil in dieser Arbeit ungeklärt bleiben. Es müssten z.B. weitere Untersuchungen zum Abbau oder zu Nebenprodukten erfolgen, die zusätzliche Banden erklären würden. Des Weiteren sollten die Pufferbedingungen für die Elution selektiver eingestellt werden, um spezifischere SLH-Fusionsproteine zu garantieren.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien gegen N-Acetylglucosamin lassen den Schluss zu, dass Glucosamin, was sich in modifizierter Form in allen Zielmolekülen zeigt, als Angriffspunkt für eine Interaktion dient. Diese Vermutung liegt nahe, da N-Acetylglucosamin in der Bakterienzellwand in großen Mengen vorkommt und die SLH-Domänen der S-layer-Proteine in der Zellwand verankert sind.

Kreuzreaktionen der selektierten Proteine mit den Zielmolekülen könnten für Aufklärung sorgen. Auch die Tatsache, dass Proteine selektiert worden sind, die ein Stoppkodon tragen, sollte untersucht werden.