

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob aus einer natürlich vorkommenden putativen kohlenhydratbindenden Domäne eine verbesserte und allgemeingültige kohlenhydratbindende Domäne abgeleitet werden kann.

Dazu wurde eine Domäne, die in Gram-positiven Bakterien weit verbreitet ist, aus fünf verschiedenen Bakterienstämmen (*B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *T. thermophilus*, *E. acidaminophilum*, *T. kivui*) isoliert. Es handelte sich dabei um die SLH-Domäne (Surface-Layer-Homologe-Domäne) der Surface-Layer-Proteine. Es wurden nur vier der fünf SLH-DNA-Sequenzen mit Hilfe von *in vitro*-Mutationsmethoden wie dem “DNA-Shuffling” und dem SCRATCHY in zahlreiche Varianten moduliert. Die beiden Techniken wurden in dieser Arbeit etabliert und garantieren die ungerichtete Mutation eines DNA-Sequenzraumes. Es wurde eine Mutationsrate von durchschnittlich 1,6 % erreicht. Die Bsp-DNA-Bibliothek, abgeleitet von der SLH-Sequenz aus *Bacillus sphaericus*, wurde in ein “Ribosome Display” eingesetzt, welches das primäre Ziel verfolgte, kohlenhydratbindende Proteine anzureichern. Es wurden Proteine gegen Heparin, Streptomycin und Sialyl-Lewis X selektiert. Als Kontrolle wurde N-Acetylglucosamin mitgeführt, das in unterschiedlich modifizierter Form in allen ausgewählten Kohlenhydraten vorhanden ist.

Das “Ribosome Display” führte zu verschiedenen Proteinen unterschiedlicher Länge und Sequenz, welche Heparin, Streptomycin und N-Acetylglucosamin binden. Erste Bindungsstudien der selektierten Proteine zeigten unterschiedliche Affinitäten zu den Kohlenhydraten. Diese ließen die Schlußfolgerungen zu, dass das modifizierte Glucosamin-Molekül aller Kohlenhydrate wahrscheinlich der Interaktionspunkt für die Proteine ist, dass ein Vorhandensein eines Stoppkodons am Ende eines 170 Aminosäure langen Proteins das “Ribosome Display” nicht stört und eine gleichzeitige Anreicherung eines Aptamers und eines Proteins denkbar ist.

Es bleibt zu klären, ob die Affinität der kohlenhydratbindenden Proteine mit Zunahme der Anzahl an SLH-Domänen steigt.

Diese Arbeit demonstriert das erfolgreiche Zusammenwirken von *in vitro*-Techniken, die eine *in vitro*-Evolution bzw. ein “Protein Engineering” bewirken, mit gleichzeitiger Untersuchung von Interaktionen zwischen verschiedenen Molekülklassen wie Kohlenhydraten und Proteinen ermöglichen.

Summary

The work presented here addresses the question whether an improved and generally accepted carbohydrate binding domain can be derived from a naturally occurring putative carbohydrate binding domain. For this purpose the surface layer homology (SLH) domain was selected because it is widely distributed in gram-positive bacteria. The SLH domains of five different strains of bacteria (*B. sphaericus*, *B. stearothermophilus*, *T. thermophilus*, *E. acidaminophilum*, *T. kivui*) were isolated. Four out of these five SLH-DNA sequences were modulated by *in vitro* mutation methods like the DNA-shuffling and the SCRATCHY in numerous variations. Both technologies were established in this work and guaranteed an undirected mutation of DNA sequence space. An average mutation rate of 1.6 % was achieved. The Bsp-DNA library derived from the SLH sequence from *Bacillus sphaericus* was used in a ribosome display, the primary purpose of which was the enrichment of carbohydrate binding proteins. Proteins were selected against heparin, streptomycin and sialyl-lewis X. As a control N-acetyl-glucosamin was used because it is present in several modified forms in all selected carbohydrates. The ribosome display against heparin, streptomycin and N-acetyl-glucosamin led to the identification of different affinity proteins of diverse lengths and sequences.

The first affinity studies of the selected proteins showed different affinities to the carbohydrates. From the experimental results the following conclusions could be drawn: *i.* The modified glucosamin molecule of all carbohydrates is probably the primary interaction point for the proteins. *ii.* The presence of a stop codon at the end of the 170-residue protein did not disturb the ribosome display. *iii.* In addition to the desired enrichment of affinity proteins, there are some experimental results that indicate the concurrent enrichment of RNA sequences which may act as aptamers. It remains to be analysed whether there is a dependence of the number of SLH domains and the efficiency of binding.

This work demonstrates the successful co-operation of *in vitro* technologies, such as *in vitro* evolution and protein engineering, with the simultaneous investigation of interactions between different classes of molecules, namely carbohydrates and proteins.