

**Kombinatorische Synthese einer Genbibliothek und Analyse ihrer
statistischen Struktur**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Eva Kansy
aus Malapane (Polen)

Göttingen 2003

D 7

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. H.-J. Fritz

PD Dr. A. Schwienhorst

04.11.2003

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung und Zielsetzung | 6 |
| 1.1 Anwendungen des Protein Engineering und Design | 6 |
| 1.2 Herstellung von Genrepertoires für das evolutive <i>Protein Engineering</i> | 8 |
| 1.2.1 Methoden zur Einführung von Mutationen..... | 8 |
| 1.2.1.1 Zufallsmutagenese mit error-prone PCR und Mutatorstämmen | 8 |
| 1.2.1.2 <i>In vitro</i> Rekombination | 9 |
| 1.2.1.3 Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese..... | 9 |
| 1.2.1.3.1 Methode der degenerierten Oligonukleotide | 9 |
| 1.2.1.3.2 Dinukleotid-Methode..... | 10 |
| 1.2.1.3.3 Codonweise Mutagenese | 10 |
| 1.2.2 Gensynthesen | 11 |
| 1.3 Präsentationssysteme für Proteinbibliotheken | 11 |
| 1.4 HisJ: kristallographische und biochemische Daten | 12 |
| 1.5 Zielsetzung..... | 16 |
| 2. Materialien und Methoden | 17 |
| 2.1 Materialien | 17 |
| 2.1.1 Vektoren..... | 17 |
| 2.1.2 Bakterien- und Phagenstämmen | 19 |
| 2.1.3 Oligodesoxyribonukleotide..... | 20 |
| 2.1.4 DNA-Längenstandards | 21 |
| 2.1.5 Molekulargewichtsmarker für Proteine | 22 |
| 2.1.6 Enzyme und Proteine | 23 |
| 2.1.7 Chemikalien | 23 |
| 2.1.8 Geräte..... | 25 |
| 2.1.9 Nährmedien..... | 28 |
| 2.1.10 Lösungen und Puffer..... | 28 |
| 2.1.11 Vorbereitung von Geräten und Lösungen..... | 32 |
| 2.2 Methoden | 32 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 2.2.1.1 Vermehrung und Lagerung von <i>E. coli</i> | 32 |
| 2.2.1.2 Bestimmung der optischen Zelldichte | 33 |
| 2.2.1.3 Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)..... | 33 |
| 2.2.1.3.1 Präparation von Elektroporationszellen..... | 33 |
| 2.2.1.3.2 Elektroporation (Dower <i>et al.</i> , 1988)..... | 34 |
| 2.2.1.3.3 Bestimmung der Transformatioeffizienz..... | 34 |
| 2.2.1.4 Auswaschen der Zellen von den Agar-Platten..... | 34 |
| 2.2.1.5 Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen..... | 34 |
| 2.2.1.5.1 Fällung von DNA mit Ethanol..... | 35 |
| 2.2.1.5.2 Fällung von DNA mit Isopropanol | 35 |
| 2.2.1.5.3 Fällung von DNA mit Polyethyleglycol | 35 |
| 2.2.1.6 Extraktion von DNA in wäßrigen Lösungen mit Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol-Lösung und Chloroform | 36 |
| 2.2.1.6.1 Herstellung einer Phenol- und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- Lösung (Grinsted und Bennet, 1990)..... | 36 |
| 2.2.1.6.2 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform oder Chloroform..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese..... | 36 |
| 2.2.1.8 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des <i>Nucleotrap</i> [®] -Kits (Macherey & Nagel)..... | 37 |
| 2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab mittels alkalischer Lyse..... | 38 |
| 2.2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab mit Hilfe des <i>JetStar</i> -Kits (Genomed)..... | 38 |
| 2.2.1.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Sucrosegradienten-Dichte-zentrifugation..... | 39 |
| 2.2.1.12 Bestimmung der Konzentration von DNA in wäßrigen Lösungen..... | 39 |
| 2.2.1.13 Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA..... | 39 |
| 2.2.1.13.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..... | 39 |
| 2.2.1.13.2 Ligation von DNA-Fragmenten..... | 40 |
| 2.2.1.13.2.1 Ligation von DNA Fragmenten mit einer thermostabilen Ligase (Thompson & Weber, 1993)..... | 40 |
| 2.2.1.13.2.2 Ligasekettenreaktion (LCR) (Lottspeich, Zorbas 1998)..... | 41 |
| 2.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki <i>et al.</i> , 1988)..... | 42 |
| 2.2.1.15 Kolonie-PCR..... | 43 |
| 2.2.1.16 DNA-Sequenzanalyse (Sanger, 1977)..... | 43 |
| 2.2.1.16.1 Sequenzreaktion..... | 43 |
| 2.2.1.16.2 Analyse der Sequenzreaktion mit dem Li-COR TM -DNA-Sequenzier..... | 44 |
| 2.2.1.17 Methoden zur <i>in vitro</i> Rekombination..... | 45 |
| 2.2.1.17.1 Assemblieren des <i>hisJ</i> -Genrepertoires nach modifizierter Methode von Stemmer (Stemmer <i>et al.</i> , 1995)..... | 45 |
| 2.2.1.17.2 StEP-PCR (Zhao, 1995)..... | 46 |
| 2.2.1.18 Klonieren des <i>hisJ</i> -Genrepertoires..... | 47 |
| 2.2.1.18.1 Vorbereitung des Vektors und des Inserts..... | 47 |
| 2.2.1.18.2 Ligation des <i>hisJ</i> -Genrepertoires mit dem pCANTAB-Vektor..... | 48 |
| 2.2.1.18.3 Transformation des <i>hisJ</i> -Repertoires..... | 48 |
| 2.2.1.18.4 Lagerung der transformierten Zellen..... | 48 |
| 2.2.1.19 Selektion der rasterschubfreien Varianten aus dem primären <i>hisJ</i> -Repertoire auf Ampicillin-Medium..... | 48 |
| 2.2.2 Proteinchemische Methoden..... | 49 |
| 2.2.2.1 Präparation der periplasmatischen Proteine aus <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab..... | 49 |
| 2.2.2.2 Präparation der periplasmatischen Proteine aus <i>E. coli</i> | 49 |
| 2.2.2.3 Präparation eines Gesamtzellextraktes der löslichen Proteine aus <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab..... | 50 |
| 2.2.2.4 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung..... | 50 |
| 2.2.2.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 50 |
| 2.2.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)..... | 51 |
| 2.2.2.7 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membran..... | 51 |
| 2.2.3 Methoden zum Phage Display..... | 52 |
| 2.2.3.1 <i>Phage Display</i> (Smith, 1985)..... | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3.2 Herstellung von Phagen durch Infektion des Phasmid tragenden TG1 Stammes mit dem Helferphagen M13KO7..... | 54 |
| 2.2.3.3 Einkonzentrieren der Phagen durch Fällung mit Polyethylenglycol | 54 |
| 2.2.3.4 Bestimmung der Phagenkonzentration durch Infektion des <i>E. coli</i> TG1 Stammes..... | 55 |
| 2.2.3.5 Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche..... | 55 |
| 2.2.3.6 <i>Panning</i> | 55 |
| 2.2.4 Chemische Methoden..... | 58 |
| 2.2.4.1 Aktivierung der CovaLink™ Mikrotiterplatten und Kopplung von EZ-Link™ Biotin-PEO-LC-Amin | 58 |
| 2.2.4.2 Synthese, Aufreinigung und Analyse der randomisierten Oligonukleotide unter Verwendung von Trinukleotidphosphoramiditen..... | 59 |
| 2.2.4.2.1 Handhabung von Trinukleotidphosphoramiditen zur Oligonukleotidsynthese..... | 60 |
| 2.2.4.2.2 Phosphitylierung der Trinukleotide | 60 |
| 2.2.4.2.3 Bestimmung der Kopplungseffizienz von Trinukleotidphosphoramiditen | 61 |
| 2.2.4.2.4 Vorbereitung der Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen für die Oligonukleotidsynthese..... | 61 |
| 2.2.4.2.5 Synthese von 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden | 62 |
| 2.2.4.2.6 Abspaltung der Oligonukleotide von der Matrix und Entfernen der Schutzgruppen..... | 63 |
| 2.2.4.2.7 Aufreinigung von Oligonukleotiden mittels Reverse Phase-HPLC | 63 |
| 2.2.4.2.8 Detritylierung von Oligonukleotiden..... | 64 |
| 2.2.4.2.9 Analyse von Oligonukleotiden mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese | 64 |
| 2.2.5 Computergestützte Planung und Auswertung von Experimenten | 65 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 66 |
| 3.1 Kombinatorische Synthese des <i>hisJ</i> -Genrepertoires..... | 66 |
| 3.1.1 Allgemeines und Planung der Synthese des Genrepertoires..... | 66 |
| 3.1.1.1 Vorteile der codonweisen Mutagenese | 66 |
| 3.1.1.2 Beschreibung von Trinukleotid-Bausteinen für die kombinatorische DNA-Synthese | 67 |
| 3.1.1.3 Auswahl der zu mutagenisierenden Aminosäurepositionen und der Codons für die Mutagenese..... | 73 |
| 3.1.1.4 Planung der Assemblierung des randomisierten <i>hisJ</i> -Gens und definieren der Oligonukleotide | 74 |
| 3.1.1.5 Festlegung der Populationsstruktur: Theorie | 76 |
| 3.1.1.6 Festlegung der Populationsstruktur: praktische Erwägungen..... | 78 |
| 3.1.2 Synthese der randomisierten Oligonukleotide..... | 79 |
| 3.1.2.1 Vorbereitende Arbeiten..... | 79 |
| 3.1.2.1.1 Phosphitylierung der Trinukleotide | 79 |
| 3.1.2.1.2 Bestimmung der Kopplungseffizienz der Trinukleotidphosphoramidite | 80 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.2.2 Synthese der randomisierten Oligonukleotide | 83 |
| 3.1.2.2.1 Automatische Synthese und Charakterisierung der randomisierten Oligonukleotide (Zehl et al., 1996)..... | 83 |
| 3.1.2.2.2. Phosphorylierung und Aufreinigung der randomisierten Oligonukleotide..... | 87 |
| 3.1.3 Herstellung der Genbibliothek..... | 91 |
| 3.1.3.1 Versuche zur Herstellung des <i>hisJ</i> -Genrepertoires durch Ligation | 91 |
| 3.1.3.2 Assemblieren des <i>hisJ</i> -Gens über <i>primerless</i> PCR (Stemmer & Cramer, 1995)..... | 91 |
| 3.1.3.3 Etablierung des <i>hisJ</i> -Genrepertoires als Klonbibliothek durch Transformation..... | 93 |
| 3.1.4 DNA-Sequenzanalyse und statistische Datenanalyse des <i>hisJ</i> -Genrepertoires .. | 93 |
| 3.1.4.1 Vergleich der erwarteten mit den experimentellen Werten | 93 |
| 3.1.4.2 Vergleich der Kopplungseffizienzen der Trinukleotidphosphoramidite mit den Häufigkeiten der entsprechenden Codons..... | 100 |
| 3.1.4.3 Zusammenhang zwischen den Kopplungseffizienzen der Trinukleotid- phosphoramidite mit den Mutationsraten | 103 |
| 3.1.4.4 Verteilung der Deletionen im <i>hisJ</i> -Repertoire..... | 104 |
| 3.2. Versuche zur Isolation einer Variante mit veränderten Bindungseigenschaften aus der HisJ-Bibliothek mittels <i>Phage Display</i> | 107 |
| 3.2.1 Vorversuche zum Phage Display der HisJ-Bibliothek..... | 107 |
| 3.2.1.1 Konstruktion des Phagenvektors pCANTABhisJ..... | 107 |
| 3.2.1.2 Expression des löslichen Histidin-Bindeprotein in einem Nicht-Suppressor <i>E. coli</i> Stamm BL21..... | 110 |
| 3.2.1.3 Expression des HisJ-gpIII Fusionsproteins im Periplasma eines <i>E. coli</i> Suppressorstammes TG1 | 111 |
| 3.2.1.4 Expression des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Oberfläche des M13 Phagen..... | 113 |
| 3.2.1.4.1 Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche..... | 114 |
| 3.2.1.4.2 Versuch zur Anreicherung der HisJ-Phagen aus einem Phagengemisch durch Panning gegen das polyklonale anti-HisJ-Serum | 115 |
| 3.2.2. Präsentation der HisJ-Bibliothek auf den M13 Phagen..... | 116 |
| 3.2.3 Durchmusterung des HisJ-Repertoires nach Varianten mit erhöhter Affinität zum D-Biotin | 117 |
| 3.2.4 Verbesserung der Qualität des HisJ-Rezeptorenrepertoires | 121 |
| 3.2.4.1 Anreicherungsversuche von rasterschubfreien HisJ-Varianten durch Panning der Phagenbibliothek gegen das anti-HisJ Serum..... | 122 |
| 3.2.4.2 Selektion von Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen durch β - Lactamase vermittelte Resistenz..... | 122 |
| 3.2.4.2.1 Konstruktion des Vektors pASKHisJBla..... | 123 |
| 3.2.4.2.2 Selektion der HisJ-Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen aus dem primären <i>hisJ</i> -Repertoire aufgrund vermittelter Ampicillin-Resistenz | 125 |
| 3.2.5 Versuch zur Verbesserung der Diversität des <i>hisJ</i> -Genrepertoires durch in vitro Rekombination..... | 129 |
| 3.2.5.1 Optimierung der StEP-Methode | 130 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.5.2 <i>In vitro</i> Rekombination des <i>hisJ</i> -Genrepertoires nach der StEP Methode (Zhao <i>et al.</i> , 1998)..... | 132 |
| 4. Zusammenfassung..... | 134 |
| 5. Anhang..... | 136 |
| 5.1 Mathematischer Anhang..... | 136 |
| 5.2 Molekularbiologischer und chemischer Anhang..... | 139 |
| 5.2.1 Nukleotidsequenzen des <i>hisJ</i> -Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des HisJ im Einbuchstaben-Code..... | 139 |
| 5.2.2 Nukleotidsequenz des synthetischen <i>hisJ</i> -Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des HisJ im Einbuchstaben-Code *..... | 141 |
| 5.2.3 Programm zur Kopplung von Trinukleotidphosphoramiditen bei zweimaliger Injektion und doppelter Capping-Reaktion (Hartsch, 1998)..... | 143 |
| 5.2.4 Zusammenstellung der Mutationen im <i>hisJ</i> -Repertoire bei 103 sequenzierten Klonen..... | 145 |
| 5.2.5 ³¹ P-NMR Spektren der Trinukleotidphosphoramidite des Typs 5'-DMTrO- dN ¹ pdN ² pdN ³ -p(OEt)(NiPr) ₂ | 147 |
| 5.2.6 RP-HPLC Spektren der Aufreinigung der randomisierten Oligonukleotide ek02, ek05, ek07, ek10 und ek13..... | 160 |
| 5.2.7 CD-ROM mit DNA-Sequenzen..... | 164 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis..... | 165 |
| 7. Literatur..... | 168 |
| 8. Danksagung..... | 175 |

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 Anwendungen des Protein Engineering und Design

Die Natur liefert eine enorme Vielfalt von aktiven Biomolekülen, die bei lebenswichtigen Prozessen unentbehrlich, aber oft nicht für die wirtschaftliche Nutzung geeignet sind. Zu den biologisch aktiven Stoffen gehören neben Nukleinsäuren vor allem Proteine die als Antikörper, Enzyme, Rezeptoren, Hormone und Gerüst- oder Transportproteine unterschiedlichste Aufgaben erfüllen. Seit den 80-er Jahren werden zunehmend genetisch veränderte Proteine mit neuartigen Eigenschaften oder sogar künstliche Proteine mit bisher unbekannt Aminosäuresequenzen hergestellt. Dieses Verfahren, mit dem in der Natur existierende Proteine verändert werden als *Protein Engineering* bezeichnet. Das *Protein Design* hat dagegen die Konstruktion künstlicher Proteine mit neuartigen Eigenschaften zum Ziel (Ulmer, 1983; Pabo, 1983). Schon in nächster Zukunft kann es deshalb in der Hand des Menschen liegen, Protein mit geeigneten Werkzeugen für die Bedürfnisse der Biotechnologie, Medizin oder Umwelttechnik maßzuschneidern.

Die Aufgabe des *Protein Engineering* bzw. *Protein Design* ist u. a. die Erhöhung der Stabilität bzw. Aktivität eines Proteins unter veränderten Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, organische Lösungsmittel), Veränderung der Substratspezifität von Enzymen, Erhöhung der Resistenz gegen Toxine oder die Veränderung der Ligandenspezifität von Rezeptoren. Ein wichtiger Aspekt bei der Konstruktion von Proteinen mit veränderter Ligandenspezifität stellt die molekulare Erkennung zwischen dem Liganden und dem Protein dar. Die Identifizierung von Aminosäuren, die für die Funktion des Proteins entscheidend sind oder solcher, die eine Grundlage für neue Funktionen bilden können, stellt eine Herausforderung auf dem Gebiet des rationalen *Protein Engineering* dar.

Liganden für biologische Moleküle binden über hydrophobe und polare Wechselwirkungen nichtkovalent an ihre Zielproteine. Die Komplexbildung zwischen Protein und Ligand ist grundlegend für biologische Prozesse auf molekularer Ebene. Die Veränderung der molekularen Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem Protein ist deshalb wichtig für biologische Studien (Bishop, 2000) und findet ihre Anwendung in der Biotechnologie z. B. bei der Konstruktion von Enzymen (Harris, 1998; Bolon, 2001; Benson 2002), Biosensoren (Hellings, 1998; de Lorimier, 2002), genetischen Schaltkreisen (Hasty, 2002), Signaltransduktion (Koh, 2002) oder Racemattrennung (Maier, 2001).

Durch rationales *Protein Engineering* wurden auf der Basis von periplasmatischen Bindeproteinen, die mit einer hohen Spezifität kleine Moleküle binden (Ribose-, Arabinose- und Histidin-Bindeprotein), Varianten mit einer hohen Selektivität und Affinität zu anderen Liganden wie Trinitrotoluol (TNT), L-Lactat und Serotonin konstruiert. Sie sollten für die Entwicklung von Biosensoren für die Detektion von TNT

Kontaminationen in der Umgebung von Militäranlagen bzw. für die medizinische Diagnostik eingesetzt werden (Looger, 2003). Diese Proteine gehören zur Klasse der sogenannten „Venus-Fliegenfallen“ Proteine. Die Bezeichnung geht auf die Struktur und die Konformationsänderung des Proteins bei der Bindung des Liganden zurück. Rezeptoren dieser Art sind aus zwei Domänen aufgebaut, die über ein Scharnier miteinander verbunden sind, so dass sie in einer offenen oder einer geschlossenen Konformation vorliegen können. Die Bindung eines Liganden in der Furche zwischen den Domänen stabilisiert die geschlossene Konformation (Wolf *et al.*, 1995). Zu diesen Proteinen gehört u. a. auch das Histidin-Bindeprotein aus Gram-negativen Bakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*. Dieser Rezeptor wurde in der vorliegenden Studie als Modellprotein verwendet.

Beim rationalen *Protein Engineering* werden computerbasierte, numerische und graphische Methoden eingesetzt, die unter dem Begriff *Computer Aided Molecular Design* oder *Molecular Modeling* zusammengefaßt werden (Schomburg, 1990). Dadurch können Proteinstrukturen so visualisiert werden, dass die Faltung der Polypeptidkette, die räumliche Anordnung von Aminosäuren und die Kontakte zwischen dem Protein und dem Liganden oder dem Substrat anschaulich werden. *Molecular Modeling* kann nicht nur helfen, Proteine mit neuartigen Eigenschaften zu konstruieren, sondern auch dazu beitragen, die molekulare Mechanismen der Proteinfunktionen und somit z. B. Krankheitsprozesse besser verstehen zu können, an denen defekte oder fehlgefaltete Proteine beteiligt sind (z. B. die Alzheimerkrankheit, BSE oder die Creutzfeld-Jakob-Krankheit).

Oft sind die molekularen Vorgänge bei der Funktion des Proteins komplexer Natur, so dass die Konstruktion von Varianten mit gewünschten Eigenschaften durch rationales *Protein Engineering* problematisch ist. In diesem Fall oder wenn die molekulare Basis der Proteinfunktionen kaum erforscht ist, kann man neue Eigenschaften oft auf dem Weg des evolutiven *Protein Designs* erreichen. Durch Zufallsmutagenese kann ein Repertoire von molekularen Spezies generiert und nach bestimmten Eigenschaften durchmustert werden. Da diese Moleküle durch die Mutagenese ihre natürlichen Funktionen verloren haben, können durch einen entsprechenden Selektionsdruck, der durch die Durchmusterungsbedingungen kontrollierbar ist, nur die Varianten mit den gesuchten Eigenschaften „überleben“. Die Durchmusterung erfolgt in mehreren Runden, wobei es zu einer schrittweise Anreicherung der gesuchten Moleküle kommt. Oft werden die Varianten mit verbesserten Funktionen nach jeder Selektionsrunde erneut mutagenisiert und durchmustert. Durch die sogenannte gerichtete Evolution konnten zahlreiche Makromoleküle konstruiert werden, die neue, teilweise in der Natur nicht vorkommende Eigenschaften zeigen. Dazu gehört z. B. die Entwicklung von GTP-bindenden Aptameren (Davis & Szostak, 2002) oder neuer metabolischer Synthesewege zur Produktion

unterschiedlicher, zum Teil in der Natur nicht vorkommender Carotenoide (Schmidt-Dannert *et al.*, 2000).

1.2 Herstellung von Genrepertoires für das evolutive *Protein Engineering*

Für das Gelingen des evolutiven *Protein Engineering* kann es von entscheidender Bedeutung sein, ein geeignetes Repertoires von Proteinen mit randomisierten Strukturelementen zu konstruieren. Dafür werden entweder ganze Gensequenzen oder nur Bereiche, die für die Funktion des Proteins entscheidend sind, zufälligerweise mutagenisiert. Der erste Weg wird meistens dann gewählt, wenn das aktive Zentrum nicht genau charakterisiert ist. In diesem Fall werden mittels *error-prone* PCR oder durch die Verwendung eines Mutatorstammes Genrepertoires konstruiert, die Mutationen enthalten, die sich über das ganze Gen verteilen. Ist die strukturelle Basis der Proteinfunktion erforscht, wird die Mutagenese auf aktive Bereiche des Proteins begrenzt.

1.2.1 Methoden zur Einführung von Mutationen

1.2.1.1 Zufallsmutagenese mit *error-prone* PCR und Mutatorstämmen

Die einfachste Möglichkeit, ein Gen zu randomisieren, stellt die *error-prone* PCR dar. Dabei werden die Mutationen an zufälligen Positionen durch die Verwendung einer Polymerase ohne *proofreading* Aktivität, Mn^{2+} -Salze und einer Mischung aus unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen dNTPs eingeführt (Cadwell & Joyce, 1992).

Durch die Verwendung eines Mutatorstammes können ebenfalls Mutationen eingeführt werden, die zufällig über das ganze Gen verteilt sind. Ein *E. coli* Mutatorstamm wie XL1-Red (Stratagene) enthält Mutationen in Genen, die verantwortlich für die DNA Reparatur sind, z. B. *mutS* (*error prone* Basenfehlpaarungs-Reparatur (Radman, 1980)), *mutD* (defizient für 3'- nach 5'- Exonuklease der DNA-Polymerase III (Scheuermann *et al.*, 1983)) oder *mutT* (unfähig, 8-OxodGTP zu hydrolysieren (Cox, 1973)). Die Mutationsrate des XL1-Red Stammes ist daher 5000-fach höher als die des Wildtyp *E. coli*.

Beim Einsatz der *error-prone* PCR oder eines Mutatorstammes kommt es häufig zum Auftreten von Stop Codons, wodurch unvollständige, falsch gefaltete bzw. funktionsunfähige Proteinsequenzen entstehen. Außerdem können diese Methoden zur unsymmetrischen Verteilung der Codons im Repertoire führen, und die Verteilung der Mutationen kann nicht kontrolliert werden.

1.2.1.2 *In vitro* Rekombination

Durch die Rekombination mehrerer DNA-Sequenzen *in vitro* können neue Genrepertoires hergestellt werden, bzw. die genetische Diversität eines bereits vorhandenen Repertoires vergrößert werden.

Das von Stemmer entwickelte *DNA-Shuffling* beruht auf der kombinatorischen Genassemblierung aus Zufallsfragmenten partieller DNA-Spaltung (Stemmer, 1994). Durch eine *in vitro* Rekombination der Fragmente werden in einer *primerless* PCR zunehmend längere Oligonukleotide produziert, die als *Primer* für die nächsten Reaktionsschritte dienen.

Eine andere Möglichkeit für die *in vitro* Rekombination bietet die StEP-Methode (Zhao *et al.*, 1998). Dabei werden in einer PCR durch die Verwendung extrem kurzer Elongationszeiten zunehmend größere DNA Fragmente generiert und als Primer miteinander kombiniert. Durch die Verwendung unterschiedlicher DNA-Matrizen können in dieser Weise rekombinierte DNA-Sequenzen hergestellt werden.

1.2.1.3 Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese

Eine Proteinbibliothek setzt sich, bedingt durch die Transformationseffizienz, aus maximal 10^9 molekularen Spezies zusammen. Um ein Genrepertoire zu konstruieren, das alle möglichen Codon-Kombinationen enthält, können maximal sieben verschiedene Positionen randomisiert werden ($20^7 = 1,28 \cdot 10^9$). Dabei wird angenommen, dass sich die 20 Aminosäuren des genetischen Codes statistisch gleich an den zu mutagenisierenden Positionen verteilen.

Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer gewünschten Mutante in der Bibliothek zu erhöhen, kann das Repertoire auf Varianten beschränkt werden, bei denen nur ausgewählte Bereiche randomisiert sind, die entscheidend für die Funktion des Proteins sind. Durch den Einsatz randomisierter Oligonukleotide können bei der Mutagenese definierte Positionen im Gen einbezogen werden. Die Mutationen können bei der Oligonukleotidsynthese auf verschiedene Weise eingeführt werden.

1.2.1.3.1 Methode der degenerierten Oligonukleotide

Die Zufallsmutagenese von bestimmten Aminosäurepositionen kann durch die Verwendung äquimolarer Mengen der vier Nukleoside bei der Synthese des entsprechenden Codons erreicht werden. Dabei werden alle 64 Codons generiert, inklusive 41 redundante und drei Stop Codons. Da der genetische Code degeneriert ist und für eine Aminosäure bis zu sechs Codons kodieren (Crick, 1961; Nirenberg, 1973), sind bestimmte Aminosäuren in einem auf diese Weise hergestellten Repertoire überrepräsentiert.

Die Anzahl der zusätzlich vorhandenen Codons kann durch die Berücksichtigung der Redundanz der dritten Position vieler Codons begrenzt werden. Durch die Verwendung äquimolarer Mischungen aus A, C, G und T an den ersten zwei Positionen eines Codons und einer Mischung aus G und C oder A und T bei der Synthese der dritten Position (NNG/C oder NNA/T; Climie, 1990; Schultz, 1986; Wells, 1985) reduziert sich die Anzahl der möglichen Codons von 64 auf 32 mit 11 redundanten Codons und einem Stop Codon. Bei diesem Verfahren wird die Bevorzugung bestimmter Aminosäuren, die durch mehrere Codons kodiert werden, reduziert, aber nicht aufgehoben. Die Anwesenheit eines Stop Codons verursacht verkürzte Aminosäuresequenzen nach der Translation. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass eine Limitierung bestimmter Codons auf eine gewünschte Klasse von Aminosäuren (z. B. hydrophob oder polar) nicht möglich ist.

1.2.1.3.2 Dinukleotid-Methode

Bei der Dinukleotid-Methode (Neuner, 1998) können durch die Verwendung von sieben Dinukleotiden 20 Codons synthetisiert werden, die allen Aminosäuren des genetischen Codes entsprechen. Die Codons werden durch die Kopplung von einem Nukleosid am 5'-Ende und einem Dinukleotid am 3'-Ende synthetisiert. Diese Strategie vermeidet zwar die redundanten und die Stop Codons, allerdings ist sie relativ unflexibel bezüglich dem Einsatz der einzelnen Aminosäuren.

1.2.1.3.3 Codonweise Mutagenese

Eine Möglichkeit, ein Genrepertoire auf gewünschte Codons zu beschränken, besteht in der codonweisen Mutagenese. Für die Oligonukleotidsynthese wurden bisher zwei unterschiedliche Vorgehensweise publiziert. Bei der ersten Methode werden die randomisierten Codons auf separaten Säulen synthetisiert. Das Trägermaterial mit den immobilisierten Oligonukleotiden wird danach gemischt und anschließend die weitere Synthese in einer Säule durchgeführt (Glaser, 1992). Nach dieser Methode können die redundanten Codons und die Stop Codons vermieden werden, allerdings ist dieses Verfahren mit einem relativ großen Arbeitsaufwand verbunden.

Bei der anderen Methode können durch die Verwendung vorgefertigter Mischungen von Trinukleotiden an definierten Aminosäurepositionen relativ einfach Repertoires kontrollierter Diversität hergestellt werden. Die Synthese der Trinukleotid-Bausteine, die eine kopplungsfähige 3'- β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Funktion enthalten, erfolgt auf unterschiedlichen Wegen (Virnekäs *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 1995; Lyttle *et al.*, 1995;

Kayushin *et al.*, 1996, Zehl *et al.*, 1996). Diese Methode wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für die Erzeugung molekularer Genrepertoires eingesetzt, z. B. für die Herstellung einer konformationell stabilisierten, disulfidfreien Variante der menschlichen Immunglobulin-domäne REI_V (Hartsch, 1998) oder für die chemische Synthese eines menschlichen Antikörperrepertoires (HuCAL) mit hochaffinen Bindern für verschiedene Antigene, z. B. Haptene, DNA, Peptide (Knappik, *et al.* 2000).

Der Vorteil der Trinukleotidphosphoramidit-Methode liegt in der Möglichkeit, die Codons bei der Synthese des Genrepertoires flexibel und kontrolliert einzusetzen. Dadurch wird nicht nur ermöglicht, bestimmte Aminosäuren in die Mutagenese einzubeziehen, sondern auch die einzelnen Codons in unterschiedlichen molaren Verhältnissen einzusetzen. Somit ist die Kontrolle über die Populationsstruktur des Repertoires gegeben.

1.2.2 Gensynthesen

Die Fortschritte in der chemischen DNA-Synthese ermöglichen die Herstellung komplexer Genrepertoires. Kurz nach der Aufklärung der Struktur von Nukleinsäuren (Watson & Crick, 1953) wurde die erste erfolgreiche chemische Synthese von Oligonukleotiden (Khorana *et al.*, 1956) durchgeführt. Die erste Totalsynthese eines Gens gelang 1970 (Agarwal *et al.*, 1970).

Die Totalsynthesen von Genen haben viele Vorteile. Das Gen kann unabhängig von einer natürlichen Matrize synthetisiert werden, so dass aufwendige Isolations- und Klonierungsverfahren nicht notwendig sind. Die Codonverwendung und die Expression durch Fusion mit Signalsequenzen oder faltungsfördernden Hilfsproteinen kann in einem Schritt bei der Totalsynthese des Gens optimiert werden (McNulty *et al.*, 2003).

Die Ursachen für den wachsenden Bedarf an modifizierten Genen sind wachsende funktionelle Anforderungen an diverse Proteine, verbunden mit steigender Leistung in der Voraussage der Funktion einer Aminosäuresequenz. Unter Berücksichtigung der Faktoren, die die Genexpression beeinflussen (z. B. *Codon Usage*, Ausbildung unerwünschter Sekundärstrukturen), ist es möglich, optimale Nukleinsäuresequenzen abzuleiten. Das synthetische Gen, das aus kürzeren Subfragmenten assembliert wird, kann anschließend in einen geeigneten Vektor inkloniert, exprimiert und die rekombinanten Proteine gereinigt werden.

1. 3 Präsentationssysteme für Proteinbibliotheken

Die genetischen Informationen über die selektierten Spezies können nur durch die physikalische Kopplung des Phenotyps mit dem Genotyp erhalten werden. Dafür wurden unterschiedliche Präsentationssysteme für Proteine entwickelt, bei denen für jede

exprimierte Proteinvariante die entsprechende kodierende DNA-Sequenz isoliert und analysiert werden kann.

Eines der in den letzten Jahren etablierten Präsentationssysteme ist das *Phage Display* (Smith, 1985) mit filamentösen Phagen. Dabei werden die Proteine auf der Oberfläche des Phagen als Fusion mit einem phageneigenen Oberflächenprotein präsentiert. Mit Hilfe von *Phage Display* ist es möglich, große Bibliotheken von Proteinvarianten innerhalb kurzer Zeit zu durchmustern. Wegen der Phenotyp-Genotyp-Kopplung kann die Gensequenz nach der Amplifikation der bindenden Varianten in bakteriellen Zellen bestimmt werden. Die genauere Beschreibung des Systems befindet sich im Abschnitt 2.2.3.1.

Andere Möglichkeiten für die Genotyp-Phenotyp-Kopplung und die Durchmusterung großer Bibliotheken bietet die Zelloberflächenpräsentation (Georgiou *et al.*, 1997) sowie *in vitro* Präsentationen, zu denen *Ribosomal Display* (Mattheakis *et al.*, 1994) und *mRNA-Display* (Roberts & Szostak, 1997) gehören.

1.4 HisJ: kristallographische und biochemische Daten

Das Histidin-Bindeprotein (HBP) HisJ sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Modell für Experimente zum evolutiven *Protein Engineering* dienen. Dieser aus 238 Aminosäuren bestehende Rezeptor der Histidin-Permease ist im Periplasma Gram-negativer Bakterien am Transport des Histidins in das Cytoplasma der Zelle beteiligt. Es bindet das Histidin mit einer hohen Affinität ($K_d = 30$ nM), interagiert mit dem membrangebundenen Komplex QMP der Histidin-Permease und löst die Hydrolyse von ATP aus, die die Translokation des Liganden durch die Cytoplasmamembran bewirkt (Wolf *et al.*, 1995).

Die Kristallstruktur des Histidin-Bindeproteins HisJ wurde im Komplex mit L-Histidin mit einer Auflösung von 1,89 Å durch die „*Molecular Replacement*“-Technik aufgeklärt. Der Rezeptor besteht aus zwei durch eine tiefe Furche getrennten globulären Domänen, in der sich die Ligandenbindestelle für das L-Histidin befindet. Das Protein bildet eine ellipsoide Form mit den Abmessungen 60x45x40 Å. Die N-Domäne wird aus zwei separaten Peptidsegmenten gebildet, die aus den Resten 1-86 und 197-238 bestehen. Die Aminosäuren 90-192 befinden sich in der C-Domäne, die etwas größer ist als die N-Domäne. Die N- und C-Domäne sind durch ein zweisträngiges β -Faltblatt miteinander verbunden (Reste 87-89 und 193-196). Dieses fungiert als Scharnier bei der Konformationsänderung des Rezeptors, die durch die Bindung des Liganden verursacht wird.

An der Bindung des Histidins sind insgesamt zwölf Aminosäurereste beteiligt: Y14, L52, S69, S70, L71, S72 und R77 in der N-Domäne sowie L117, T120, T121, Q122 und D161

in der C-Domäne. Eine der wichtigsten Rollen bei der Bindung des Liganden spielt das Tyrosin 14, das mit sieben Atomen des Histidins interagiert und hydrophobe Stapelwechselwirkungen zwischen seinem aromatischen Rest und dem Imidazolring des Histidins ausbildet. Sechs Reste, die eine OH-Gruppe enthalten (drei Serin-, zwei Threonin- und ein Tyrosin-Rest), wechselwirken mit insgesamt 11 Histidin-Atomen. Die α -Amino- und die α -Carboxygruppe des Histidins bilden Salzbrücken mit dem negativ geladenen Asp161-Rest bzw. der positiv geladenen Guanidinium-Gruppe des Arg77 aus. Darüber hinaus werden bei der Bindung des Histidins zehn Wasserstoffbrücken und 63 van-der-Waals-Kontakte ausgebildet. Die Seitenkette des Histidins tritt über van-der-Waals-Kontakte (vorwiegend mit Tyr14) und drei Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung mit dem Rezeptor (Yao *et al.*, 1994).

Die bakteriellen periplasmatischen Bindeproteine, die am Transport zahlreicher Substrate beteiligt sind (z. B. Arabinose-Bindeprotein (ABP), Galaktose-Bindeprotein (GBP), Sulfat-Bindeprotein (SBP), Ribose-Bindeprotein (RBP), Leucin-, Isoleucin-, Valin-Bindeprotein (LIVBP) oder Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein (LAOBP)), zeichnen sich durch relativ große strukturellen Ähnlichkeiten untereinander aus. Das HisJ und das LAOBP weisen 70 % Sequenzidentität auf. Die bindenden Aminosäuren im HisJ sind bis auf das Lys52 auch an der Bindung des Lysins im LAOBP beteiligt (Oh *et al.*, 1994b). Im LAOBP befindet sich an der Position 52 ein Phenylalanin, zwischen dessen aromatischen Ring und dem Tyr14 Rest durch hydrophobe Wechselwirkungen wahrscheinlich eine Fixierung der Seitenkette des gebundenen Lysins stattfindet. Durch einen Austausch des Lys52 im HisJ gegen einen Phenylalanin-Rest wurde das HisJ an die Bindung von L-Lysin adaptiert. Die Variante HisJ^{L52F} zeigte im Vergleich zum wt-HisJ eine um den Faktor 6 erhöhte Affinität für L-Arginin ($K_d(\text{HisJ}^{\text{L52F}}) = 0,12 \mu\text{M}$, $K_d(\text{HisJ}) = 0,77 \mu\text{M}$) und eine um den Faktor 19 erhöhte Affinität für L-Lysin ($K_d(\text{HisJ}^{\text{L52F}}) = 0,71 \mu\text{M}$, $K_d(\text{HisJ}) = 13,6 \mu\text{M}$) (Wittmann, 2002). Weitere Unterschiede in der Bindungstasche des HisJ und des LAOBP bestehen darin, dass der Asp11 Rest an der Bindung des Liganden im LAOBP beteiligt ist, während im HBP keine Kontakte zwischen diesem Rest und dem Histidin existieren. Andererseits ist das Ser69, das im HBP mit dem Liganden wechselwirkt, im LAOBP kein Teil des aktiven Zentrums (Oh *et al.*, 1994a).

Das HisJ eignet sich als ein stabiles Rezeptorprotein bekannter Struktur, das einen Liganden mit einer relativ hohen Affinität bindet, als Modellprotein für das evolutive *Protein Engineering*. In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass durch eine geringe Veränderung der Bindungstasche des HisJ die Bindungseigenschaften des Rezeptors deutlich verändert werden können. Das Histidin-Bindeprotein wurde unter Berücksichtigung der Differenzen zwischen dem hochverwandten Lysin-Arginin-Ornithin-Bindeprotein (LAOBP) durch den Austausch eines Restes an die Bindung des L-Lysins adaptiert (Wittmann, 2002).

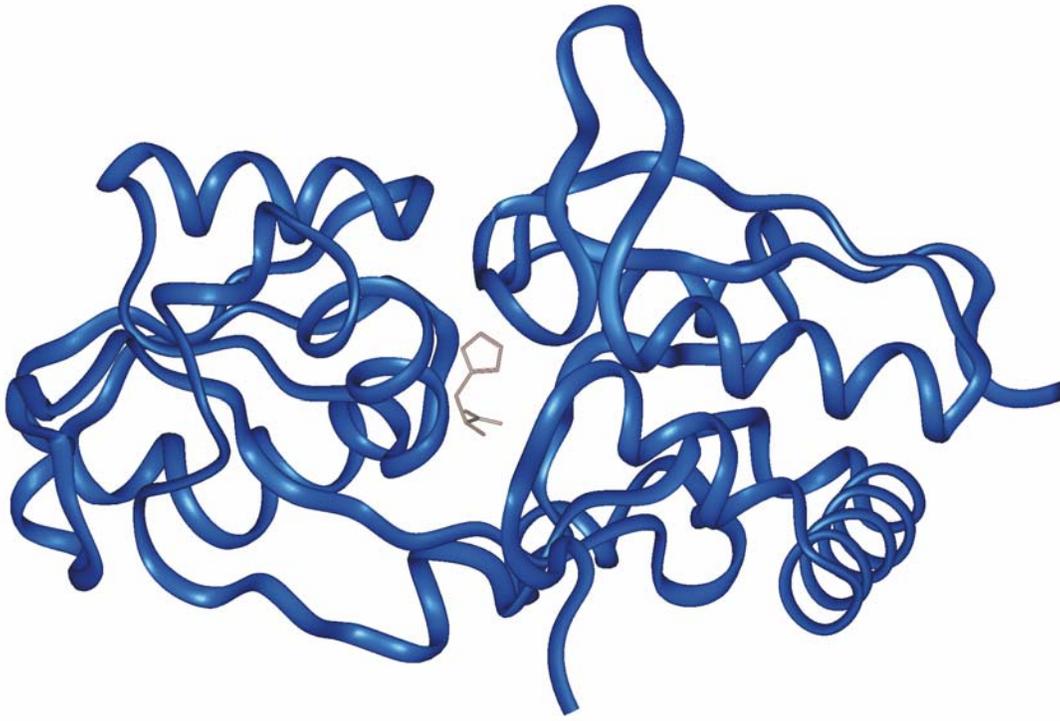


Abb. 1: Hauptkettenverlauf des Histidin-Bindeproteins aus *E. coli* mit L-Histidin als Ligand (grau).

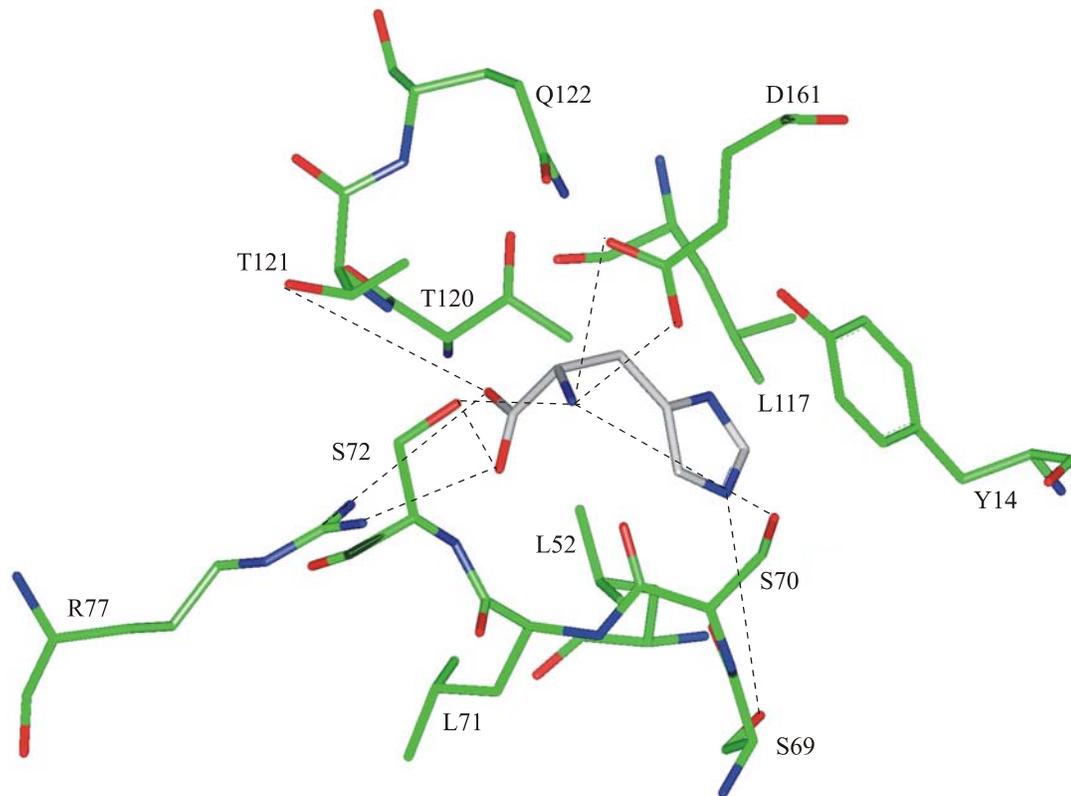


Abb. 2: Bindungstasche des Histidin-Bindeproteins HisJ aus *E. coli*. Die 12 bindenden Aminosäurenreste sind in grün, der Ligand ist in grau dargestellt. Die gestrichelten Linien repräsentiert die Wasserstoff- und Salzbrücken zwischen dem Liganden und dem Rezeptor.

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollte mit Hilfe von kopplungsfähigen Trinukleotiden auf Basis des *hisJ*-Gens eine Genbibliothek mit einer vorgegebenen Populationsstruktur hergestellt werden. Die experimentelle Populationsstruktur sollte durch DNA-Sequenzanalyse und statistische Datenanalyse charakterisiert werden. Die vorgegebenen Werte sollten mit den experimentellen Ergebnissen verglichen und Rückschlüsse auf das Reaktionsverhalten der Trinukleotide während der chemischen Synthese gemacht werden. Die Rezeptorenbibliothek sollte in einem Modellexperiment eingesetzt werden, bei dem die Spezifität des Histidin-Bindeproteins für einen niedermolekularen Liganden auf dem Weg des evolutiven *Protein Engineering* verändert werden sollte.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Vektoren

pCANTAB 5E (Pharmacia Biotech)

Der für die Präsentation der Peptidbibliothek auf der Phagenoberfläche verwendete Vektor pCANTAB 5E enthält die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI*, über die eine Klonierung des zu präsentierenden möglich ist. Ein in dieser Weise konstruiertes *Phagemid*, in dem sich am C-Terminus der peptidkodierenden Sequenz ein *Etag* Epitop, ein *amber* Stopcodon und das Phagen-gen gIII befindet, ermöglicht nach der Einführung einer Signalsequenz die Expression des Fusionsproteins mit gpIII im Periplasma eines E. coli Suppressorstammes wie TG1. Die Expression des Fusionsproteins steht unter Kontrolle des *lac* Promotors. Der Vektor enthält als Selektivmarker die Ampicillin Resistenz.

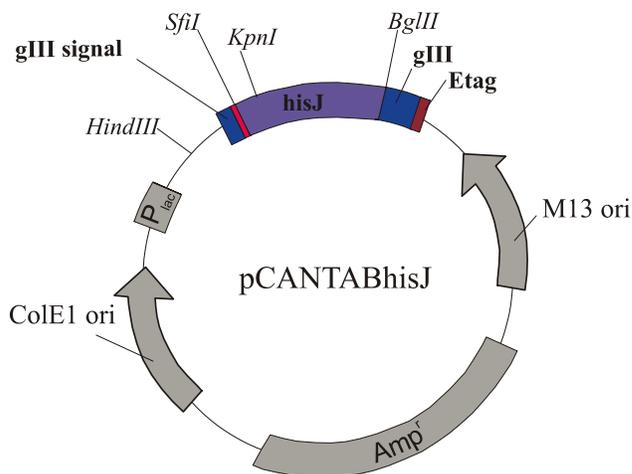


Abb. 3: Schematische Darstellung des für das *Phage Display* verwendeten Vektors pCANTABhisJ, der auf dem pCANTAB5E (Pharmacia) basiert. gIII signal: gpIII Signalsequenz, verantwortlich für die Translokation des Proteins ins Periplasma; pIII: Gen für das Phagenprotein gpIII; P_{lac}: *LacZ* Promotor/Operator Region; ETag: Kodierende Region für das Epitop, das von Anti-E-Antikörper erkannt wird; Amp^r: β -Lactamase Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin; M13: Replikationsursprung des filamentösen Phagen M13; colE1: Replikationsursprung.

Das *hisJ*-Gen wurde aus der genomischen *E. coli* DNA mit einer synthetischen *pelB* Signalsequenz (PAMA) amplifiziert. Das Konstrukt wurde in den pCANTAB 5E Vektor inkloniert, wobei die Restriktionsschnittstelle BglII so eingeführt wurde, dass ein *hisJ*-Kassettenaustausch zwischen dem Phagenvektor pCANTAB 5E und dem Expressionsvektor pASK möglich ist.

PASKhisJ Bla

Das zur Selektion der *hisJ*-Varianten mit offenem Leserahmen verwendete Plasmid pASKhisJBla basiert auf dem Vektor pASKIntBla, der seinerseits ein Derivat des pASK75 (Skerra, 1994), der neben dem regulierbaren Tetracyclin Promotor zwei Ribosomenbindestellen besitzt, die eine effiziente Initiation der Transkription gewährleisten.

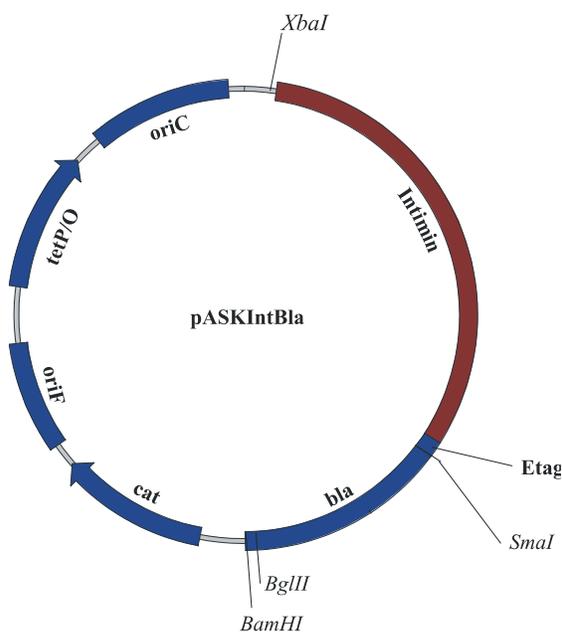


Abb. 4: Genetische Karte des pASKIntBla Vektors zur Klonierung des *hisJ*-Gens bzw. des *hisJ*-Genrepertoires. Die Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. Intimin: Kodierende Region des *eaeA* Gens aus EHEC; tetP/O: Tc Promotor/Operator Region; ETag: Kodierende Region für das Epitop, das von Anti-E-Antikörper erkannt wird; cat: Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Chloramphenicol; f1: Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1; tetR: kodierender Bereich für den Tetracyclin Repressor; colE1: Replikationsursprung; sendai: Kodierender Bereich für das sendai-Epitop.

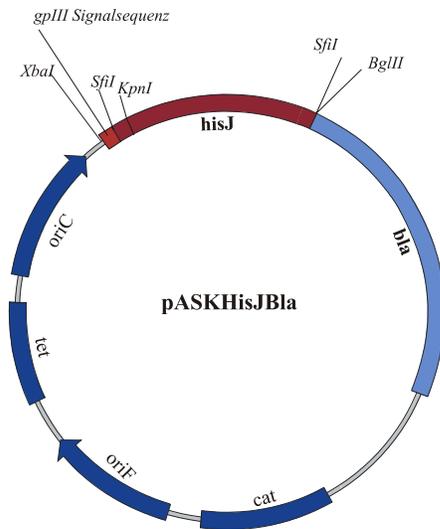


Abb. 5: Genetische Karte des pASKHisJBla Vektors zur Selektion der Varianten mit offenen Leserahmen aus dem *hisJ*-Genrepertoire. Nähere Beschreibung s. Abb. 4.

2.1.2 Bakterien- und Phagenstämme

M13K07 (Vieira & Messing, 1987)

Der Phage M13K07 ist ein 8,7 kb großes Derivat des M13-Wildtyps. Er enthält ein Kanamycin Resistenzgen des Transposons Tn903 inseriert in der *AvaI*-Schnittstelle der intergenen Region (Position 5825). Durch die zusätzliche Einklonierung des P15A-Replikationsursprungs wurde die Replikationsinitiationsfrequenz herabgesetzt. Der Phage vermittelt infizierten Wirtszellen eine Resistenz bis mindestens 70 µg/ml Kanamycin.

DH5α (Hanahan, 1983)

[F⁻, *endA1*, *hdsR17*, (*r_km_k*), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA96(Nal^r)*, *relA1*, $\Delta(lacZYAargF)$ U196, $\Phi80lacZ\Delta M15$]

BL21 (Sambrook *et al.*, 1989)

[F⁻ *ompT* [*lon*] *hdsSB* (*r_Bm_B*)]

BMH71-18 (Müller-Hill)

[$\Delta(lac-proAB)$, *supE*, *thi*, F' *lacI^q*, *lacZ* Δ M15, *proA⁺B⁺*]

TG1 (Sambrook *et al.*, 1989)

[*supE hsdD5 thi Δ(lac-proAB)*; *F'* [*traD36 proAB+ lacIq lacZDM15*]

2.1.3 Oligodesoxyribonukleotide

Ask-hisJup:

5'-GCGCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGAAAAAATTATTATTTCGCAATTCC

Bla_rechtsABI: 5'- GTTGAGATCCAGTTCGATG

CantupABI: 5'-CAACTTTCAACAGTCTATGC

CantdownABI: 5'-TTACGCCAAGCTTTGGAGCC

cant-MA-us: 5'-GTCGGTACCGATGCGGATGTTCTGCGGAATCGCGGCCATGGCC
GGCTGGGCCG CATAGAAAGGAACAACACTAAAGG

Cantos-ir: 5'- CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC (Sequenzierprimer, IRD 800)

Eval: 5'-GCGATTCCGCAGAACATC

EvalII: 5'-CGCACCAGATCTGCCACC

gp3down: 5'-CTTTCTATGCGGCCAGC

HisJin: 5'-CGACCTATGCTCCATTG

HisjLowsfi-sma: 5'-GCGCCCCCGGGAGATCTGGCCCCCGAGGCCGAGCCACCAT
AAACATCAAAATC

hisjSfi_up: 5'-GATCTGGCCCCCGAGGCCGAGCCACCATAAACATCAAAATCG

PASKupABI: 5'- GTAGCGGTAAACGGCAGAC

PASKdownABI: 5'-GACAGCTATCGCGATTGCAG

HisJBglHind: 5'-CATTTACTAAAGCTTAGATCTGCCACCATAAACATCAAA

Sall-hisJ: 5'-ATTCCGTCGACATGCGATTCTCAGAACATC

Pasku-ir: 5'-TTAATGCGCCGCTACAGG (Sequenzierprimer, IRD 800)

Paskd-ir: 5'-GTGATAGAGAAAAGTGAA (Sequenzierprimer, IRD 800)

Für die Synthese des *hisJ*-Repertoires eingesetzte, nicht randomisierte Oligonukleotide, synthetisiert von der Fa. Metabion:

ek01: 5'-CTTTCTATACGGCCCAGCCGGCCATGGCTGCGATTCCGC

ek02: 5'- AGAACATCCGCATCGGTACCGACCCGACCTATGCGCCATTTGAATCA
AAAAA

ek03: 5'- TTCACAAGGCGAACTGGTTGGCTTC

ek04: 5'- GATATCGATCTGGCAAAGGAATTATGCAAACGCATCAATACGCAAT

ek06: 5'- CTAAAAGCGAAGAAG

ek08: 5'- TTTACCGATAAACTGTACGCTGCCGATTCTCGTTTGGTGGTGGCGAA
AAA

ek09: 5'- TTCTGACATTCAGCCGACAGTCGAGTCGCTGAAAGGC

ek11: 5'- GAACATTGGGCACCAAAAAGGCATTGAAATCGTCTCGTATCAGGGGCA
GGACAACA
ek12: 5'- TTTATTCTGACCTGACTGCCGGAC
ek14: 5'- TTTCCTCAAACAACCTGTTCGGTAAAGATTACAAATTCGGTGGCCCGT
ek15: 5'- CTGTTAAAGATGAAAAACTGTTTGGCGTAGGGACCGGCATGGGCC
TGCGTAAAGAAG
ek16: 5'- ATAACGAACTGCGCGAAGCACTGAACAAAGCCTTTGCCGAAATG
ek17: 5'- CGCGCTGACGGTACTTACGAGAAATTAGCGAAAAAGTAC
ek18: 5'- TTCGATTTTGATGTTTATGGTGGCAGATCTGGTGCGCCGGT
ek19: 5'- GGTACCGATGCGGATGTTCTGCGGAATCGCAGCCATCGCCGGCT
ek20: 5'- CCTTTGCCAGATCGATATCGAAGCCAACCAGTTCGCCTTGTGAATTTT
TTGATTCAAATGGCGC
ek21: 5'- CGGATTTTCGACGAACGTACATTGCGTATTGATGCGTTTGCATAATT
ek22: 5'- CATGATGGCGTCAATCTTCTTCGCTTTTAAGGACGGGATCAAAGCATC
ek23: 5'- AGAATCGGCAGCGTACAGTTTATCGGTAAAGGCTATTTCTTGCTG
ek24: 5'- TGTCGGCTGAATGTCAGAATTTTTCGCCACCACCAAACG
ek25: 5'- TACGCCTACACGTTTGCCTTTCAGAGACTCGAC
ek26: 5'- CGAGACGATTTCAATGCCTTTTGGTGCCCAATGTTCAATTACC
GAACGTCTC
ek27: 5'- CTGGAACGCGGCATCAATACGTCCGGCAGTCAGGTCAGAATAAATG
TTGTCCTGCCCTGATA
ek28: 5'- ATCTTTACCGACAGGTTGTTTGGAGGAAACCTTCGCTGGCAGCAACCTC
ek29: 5'- CCCTACGCCAAACAGTTTTTTCATCTTTAACAGACGGGCCACCGAA
TTTGTA
ek30: 5'- TGCTTCGCGCAGTTCGTTATCTTCTTTACGCAGGCCCATGCCGGT
ek31: 5'- TCGTAAGTACCGTCAGCGCGCATTTTCGGCAAAGGCTTTGTTTCAG
ek32: 5'- ACCGGCGCACCGATCTGCCACCATAAACATCAAATCGAAGTACTT
TTTCGCTAATTTT

2.1.4 DNA-Längenstandards

Lösungen von DNA-Längenstandards (MBI-Fermentas) wurden mit TE-Puffer und Sucrosefarbmarker auf eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt und bei 4 °C gelagert.

1kb-DNA-Leiter

Fragmentlängen in bp:

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 500

100 bp-DNA-Leiter

Fragmentlängen in bp:

1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

λ -DNA, *Eco47I* geschnitten

Fragmentlängen in bp:

8126, 6555, 6442, 3676, 2605, 2555, 2134, 2005, 1951, 1612, 1420, 1284, 985, 974, 894, 597, 590, 513, 511, 433, 398, 345, 310, 308, 272, 242, 215, 151, 88, 72, 67, 45, 42, 32, 28, 23

λ -DNA, *Eco91I* geschnitten

Fragmentlängen in bp:

8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117

λ -DNA, *HindIII* geschnitten

Fragmentlängen in bp:

23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125

2.1.5 Molekulargewichtsmarker für Proteine

"low-range"- Standard (BioRad) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

relatives Molekulargewicht: 97 400 (Phosphorylase B, Kaninchenmuskel)
66 200 (Rinderserum-Albumin, Rinderserum)
45 000 (Ovalbumin, Hühnereiweiß)
31 000 (Kohlensäure-Anhydrase, Rind)
21 500 (Trypsin-Inhibitor, Soyabohne)
14 400 (Lysozym, Hühnereiweiß)

„high-range“- Standard (BioRad) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

relatives Molekulargewicht: 200 000 (Myosin, Kanninchenmuskel)
116 250 (β -Galaktosidase, *E. coli*)
97 400 (Phosphorylase B, Kaninchenmuskel)
66 200 (Rinderserum-Albumin, Rinderserum)
45 000 (Ovalbumin, Hühnereiweiß)

„Mid-range“- Standard (BioRad) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

relatives Molekulargewicht: 97 400 (Phosphorylase B, Kaninchenmuskel)
66 200 (Rinderserum-Albumin, Rinderserum)
55 000 (Glutamat Dehydrogenase)
42 700 (Ovalbumin)
40 000 (Aldolase)
31 000 (Carbonanhydrase)
21 500 (Trypsininhibitor, Sojabohnen)
19 700 (Trypsininhibitor, Sojabohnen)
14 400 (Lysozym)

Protein Ladder, 10-200 kDa (MBI)

relatives Molekulargewicht: 200 000, 150 000, 120 000, 100 000, 85 000,
70 000, 60 000, 50 000, 40 000, 30 000, 25 000, 20 000, 15 000, 10 000

2.1.6 Enzyme und Proteine

BioRad Laboratories, München

Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE
Molecular weight Standard, 'low-range')

Eurogentec, Seraing, Belgien

Antikörper gegen HisJ (polyklonales anti-rabbit Serum)

Polyklonaler Antikörper gegen HisJ (anti-rabbit)

zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Ames, Berkeley, Kalifornien, USA

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

DNA-Längenstandard, Restriktionsendonukleasen, Rinderserumalbumin (BSA), T4-
DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase

New England Biolabs, Bad Schwalbach

Restriktionsendonukleasen

Promega, Madison, USA

Tfl-Polymerase (5 U/μl)

Roche, Mannheim

Taq-Polymerase

2.1.7 Chemikalien

Applichem, Darmstadt

Imidazol, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Baker, Deventer, Holland

Dimethylformamid

BIOMOL, Hamburg

5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat *p*-Toluidinsalz (BCIP); Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranosid (IPTG)

Boehringer Mannheim, Mannheim

Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Ampicillin (Natriumsalz), 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Difco, Dreieich

Bacto-Agar

Eurogentec, Seraing (Belgien)

CPRII (*Chemical Phosphorylation Reagent II*)

Fluca, Neu-Ulm

Dimethylsulfoxid (DMSO), Bromphenolblau, Glycerin, β -Mercaptoethanol, Saccharose, Coomassie Brillant Blue, Natriumchlorid, D(+)-Glucose Monohydrat

Genomed, Bad Oeyenhausen

JetStar™ Plasmid Midiprep Kit 2.0

Gibco/BRL, Eggenstein:

Agar Bacteriological Grade; Trypton; Hefe Extrakt

ICN Biochemicals, Aurora, USA

Borsäure, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan (Tris)

Machery-Nagel, Düren

Nucleotrap® und NucleotraP®CR Kit

Merck, Darmstadt

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄; Kieselgel; Trichloressigsäure (TCA)

Metabion, Martinsried

Oligodesoxyribonukleotide

MJ Research, Watertown, USA

Chill out 14® (Flüssigwachs)

MWG, Ebersberg

Oligodesoxyribonukleotide

NAPS, Göttingen

Oligodesoxyribonukleotide

National Diagnostics, Simerville, USA

Protogel®, Sequagel® XR, Sequagel® Complete

Oxoid, Wesel

Agar Bacteriological, Trypton, Yeast Extract

Pharmacia/LKB, Freiburg

AutoRead[®] 1000 Sequencing Kit

Riedel-De Haen, Seelze

Ammoniumacetat, Chloroform, Ethanol, Formamid, Methanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Ammoniumsulfat

Serva, Heidelberg

Dithiotreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), D(+)-Glukose Monohydrat, Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Ammoniumpersulfat, Polyethylenglycol PEG 6000

Sigma, Deisenhofen

Borsäure, Ethidiumbromid, Polyethylenglycol 8000 (PEG), Bromphenolblau, Triethylamin, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Triton X-100, Chloramphenicol, Kanamycin, TWEEN 20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat)

American National Can., Chicago, USA

Parafilm[®] "M" Laboratory Film

Ansell, München

Puderfreie Einmal-Handschuhe

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Vortex[®] Genie 2

³¹P-NMR Spektren wurden im Institut für Anorganische Chemie, Abteilung für Massenspektroskopie der Universität Göttingen im Auftrag gemessen. Sie wurden bei einer Frequenz von 80 MHz aufgenommen.

2.1.8 Geräte

Amersham Biosciences

NAP-5[™] Sephadex Säulen

BioRad, München

Gene Pulser[®] und Pulse Controller, Elektroporationsküvetten

Biozym, Hessisch Oldendorf

PCR-Tube ultradünn, 0,2 ml

CEAG Schirp Reinraumtechnik

Envirco Sterilbank

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Reaktionsgefäße 2,0 ml Safe-Lock, Reaktionsgefäße 1,5 ml (blau, grün, gelb, rot), Multipipette, Combitips für die Multipipette 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 12,5 ml

Gilson, USA

Mikroliter-Pipetten, 1000 µl, 200 µl und 20 µl

C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen

Petrischalen, Röhrchen 12 ml

Heinemann, Schwäb. Gmünd:

Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250

Heinzinger, Rosenheim

Stromversorger LNGs 350-06

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten (0,5 ml und 2 ml, 1 cm Schichtdicke)

Herolab, Wiesloch

UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, Kühlzentrifuge Roto Silenta/RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP, Mikroliter-Tischzentrifuge

Hitachi, Tokio, Japan

Fluoreszenz Spektrophotometer Modell F-4500

Hoefer Scientific, San Francisco, USA

Platten für SDS-Gele, Midget-Apparatur

Ingold, Steinbach/Ts

pH-Elektrode U402-M5

IKA-Labortechnik, Staufen

beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT

Jandel Scientific, Erkrath:

Sigma Plot® für Windows™ 5.0

Kimberley-Clark, USA

Kimwipes® Papiertücher, fusselfrei

Knick, Berlin

pH-Meter 761 Calimatic

Kontron, Eching

Zweistrahlspektralphotometer Uvicon® 930, Centrikon® T-1055 Ultrazentrifuge + TST41-14 Schwenkbecherrotor, HPLC-Pumpen 420, HPLC-Steuerung Data System 450; HPLC Detektor Typ 430

Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen

Wasserbad, Schüttelwasserbad

Li-Cor, Lincoln, USA

DNA Sequencer Model 4000L, incl. Softwarepaket BaseImagIR® V2.21

Machery-Nagel, Düren

RP-HPLC Säule NUCLEOSIL 100-5 C18

Messer Griesheim, Düsseldorf:

Argon

Millipore, Eschborn

Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage

MJ Research, Watertown, USA

DNA Thermal Mini-Cycler[®] PTC-150

Nalgene, Hereford, England

Cryoware Cryovial (2 ml-Röhrchen für Gefrierkulturen)

Nunc, Dänemark

96U MikroWell-Platten SH ohne Deckel, CovaLink[™] 96-MikroWell Platten, 3 ml MaxiSorb[™] Immunotubes

Pharmacia /LKB, Freiburg

DNA Synthesizer GENE-ASSEMBLER PLUS; Probeninjektor AUTOSAMPLER Typ 2157Elektrophorese Stromversorger ECPS 3000/150, 2117-250 Novoblot[®] Elektrophoretische Transferapparatur NOVABLOT 2117-2250, Ultraspec II Spektralphotometer (LKB Biochrom),

Sarsted, Nürnberg

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Röhrchen 5 ml, Röhrchen 50 ml; Filtereinheiten, Porengröße 0,2 µm und 0,45 µm

Sartorius, Göttingen

Minisart NML Sterilfilter, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

Savant Instruments, Vaterstetten

Speed Vac[®] Concentrator SVC 200 H

Schleicher und Schuell, Dassel

Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm), 3 MM-Filterpapier (Whatman)

Schott, Mainz

Glaswaren

Serva, Heidelberg

Visking Dialyseschläuche 20/32 (6 mm)

Silicon Graphics, Haar

IRIS 4D/80GTB Graphic Workstation

SLT Labinstruments, Gröding/Salzburg, Österreich

ELISA-Reader 340 ATTC

Sorvall, Bad Nauheim

Zentrifuge RC-5C, Rotortypen SS34 und GSA

Terumo, Leuven, Belgien

Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

Ziegra, Stockport, England

Eismaschine

2.1.9 Nährmedien

dYT-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

M9-Minimalmedium

7 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, H₂O ad 1000 ml. Komplettiert mit 25 ml 20 % (w/v) Glukose, 1 ml 100 mM CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄, 5 ml 0,1 mM FeCl₃, 1 ml 0,1 % (w/v) Thiamin, jeweils aus sterilen Lösungen zugesetzt.

SOB-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2,5 mM (w/v) KCl, 0,05 % (w/v) NaCl.

SOC-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2,5 mM (w/v) KCl, 0,05 % (w/v) NaCl, nach dem Autoklavieren 2 % (w/v) Glucose sowie MgCl₂ und MgSO₄ mit einer Endkonzentration von 10 mM zugeben.

Die Nährmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,8 % (w/v) Agar Bacteriological (Oxoid) zugegeben.

Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000-fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/l Chloramphenicol, 100 mg/l Ampicillin bzw. 75 mg/l Kanamycin zugegeben.

2.1.10 Lösungen und Puffer

Aktivator Lösung

0,5 M H-Tetrazol in Acetonitril

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

"Annealing-Buffer" (AutoRead® 1000 Sequencing Kit (Pharmacia))

1 M Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 50 % (v/v) Glycerin

APS-Stammlösung

10 % APS in Wasser

Blocking-Puffer

5 % BSA in PBS-Puffer

Capping-Lösung: 10% (v/v) N-Methylimidazol, 20% (v/v) Essigsäureanhydrid in Acetonitril

Chloramphenicol-Stammlösung

25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol

Detritylierungslösung

1% (w/v) Trichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan

dNTP-Stammlösung

je 100 mM dNTP (N = A, C, G, T), mit 1 M Tris-Base auf pH 7,0 eingestellt

dNTP-Stammlösung für die PCR

je 10 mM dNTP (N = A, C, G, T), aus dNTP-Stammlösungen mit Wasser verdünnt

E1 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA

E2 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

E3 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

3,2 M Kaliumacetat-Essigsäure, pH 5,5

E4 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E5 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,0

E6 (Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed))

1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

"Enzyme Dilution Buffer" (AutoRead® 1000 Sequencing Kit (Pharmacia))

20 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 1 mM DTT, 0,1 M EDTA, 50 % (v/v) Glycerin

Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)

10 mg/ml Ethidiumbromid

"Extension-Buffer" (AutoRead® 1000 Sequencing Kit (Pharmacia))

40 mM MnCl₂, 304 mM Natriumcitrat, 324 mM DTT, 50 % (v/v) Glycerin

Formamid-Farbmarker

91,2 % Formamid, 20 mM EDTA, pH 8,3, 0,15 mM Bromphenolblau

Hoechst-Puffer (nicht reduzierend)

8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 2 % (w/v) SDS, 0,15 mM Bromphenolblau

Hoechst-Puffer (reduzierend)

8 M Harnstoff, 200 mM Tris-Base, 2 % (w/v) SDS, 200 mM Dithiothreitol (DTT),
0,15 mM Bromphenolblau

HPLC-Startpuffer

90,5 % (v/v) TEAA-Puffer, 9,5 % (v/v) Acetonitril

IMAC-Puffer I

100 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,0, 100 mM NaCl

IMAC-Puffer II

100 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 M Imidazol

IPTG-Stammlösung

1 M IPTG in Wasser, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung

75 mg/ml Kanamycin in Wasser

KGB-Puffer (10x)

1 M Kaliumglutamat, 250 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM β -Mercaptoethanol

Laemmli-Puffer (Laufpuffer für die SDS-PAGE)

25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

Lysis-Puffer: 0,1 M Tris-HCl, 0,2 mM KCl, 1mM EDTA, pH 8,0 bei 4 °C

Nucleotrap[®]- und NucleotraP[®]CR-Puffer (Macherey & Nagel)

Zusammensetzung der Puffer NT1, NT2, NT3, sowie der Nucleotrap[®]- und NucleotraP[®]CR-Suspension sind vom Hersteller nicht angegeben.

Oxidations-Lösung: 0,25% (w/v) Iod, 30% (v/v) H₂O, 6% (v/v) sym.-Collidin in Acetonitril

PAGE-Färbelösung

1000 ml Methanol, 15 g Coomassie Brilliant Blue R[®]

PBS-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

PEG-Lösung für die Präzipitation von Phagen

2,5 M NaCl, 20 % (w/v) PEG 6000

Phenol/TE

Phenol *p.A.* mit TE-Puffer gesättigt, 0,1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin

Phenol/Chloroform

1 Vol Phenol/TE, 1 Vol Chloroform

Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v) Ponceau S (3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo)-2,7-naphthalendisulfonsäure), 3 % (w/v) Trichloressigsäure, 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)

Blau: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂

Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl

Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl

Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl

Gelb: 33 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (NEB)

NEB1: 10 mM Bis-Tris Propan-HCl, pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT

NEB2: 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl 1 mM DTT

NEB3: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

NEB4: 20 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT

Resuspendierungs-Puffer: 0,2 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 20% (w/v) Saccharose, pH 9,0 bei 4 °C

RNaseA-Stammlösung

10 mg/ml RNaseA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl, 20 min auf 100 °C erhitzt, langsam auf RT abgekühlt und bei 4 °C gelagert

Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

1,25 M Tris-HCl, pH 6,8

Schock-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 4 °C

SSC (1x)

150 mM NaCl, 15 mM Tri-Na-Citrat, pH 7,0

Sucrosefarbmarker

60 % (w/v) Sucrose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1x TAE

Sucrosegradientenpuffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 18,5 % (w/v) Saccharose

T4-DNA-Ligase-Puffer

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP

Taq-Polymerase-Puffer / Taq-Puffer

50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM MgCl₂, 1 % (w/v) Triton X 100

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,4

TBE-Puffer

89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 8,0, aus Stammlösungen zusammengestellt

TEA-Puffer

20 mM Triethanolamin-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,0

TEAA-Puffer

100 mM Tetraethylammoniumacetat (pH 7,0), sterilfiltriert, entgast und bei 4 °C gelagert

Terminationsmische (AutoRead® 1000 Sequencing Kit (Pharmacia))

Jeder Mix enthält 80 µM dATP, 80 µM dCTP, 80 µM dGTP, 80 µM dTTP und 50 mM NaCl; dazu im A-Mix 8 µM didesoxyATP, im C-Mix 8 µM didesoxyCTP, im G-Mix 8 µM didesoxyGTP und im T-Mix 8 µM didesoxyTTP.

TES-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl

Tfi-DNA-Polymerase-Puffer (20x)

1 M Tris-HCl, pH 9,0, 400 mM Ammoniumsulfat, 30 mM MgCl₂

Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

1,875 M Tris-HCl, pH 8,8

Tris-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (z.B. Sigma 7-9) in Wasser auflösen und den pH-Wert mit Säure einstellen. Für Tris-HCl wird Salzsäure, für Tris-Acetat wird Essigsäure verwendet. Der pH-Wert von Tris-Puffer kann mit normalen pH-Elektroden nicht genau bestimmt werden, weswegen pH-Indikatorpapier verwendet werden muß.

Wasch-Puffer (GFX[®] Micro Plasmid Prep Kit (Pharmacia))

Tris-EDTA-Puffer mit 80 % (v/v) Ethanol

Western Blot-Transferpuffer

25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

Alle Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt und sterilfiltriert.

2.1.11 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte wurden für 20 min bei 181 °C und hitzestabile Lösungen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter der Porengröße von 0,2 µl sterilfiltriert.

2.2 Methoden**2.2.1 Molekularbiologische Methoden****2.2.1.1 Vermehrung und Lagerung von E. coli**

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C in dYT, LB oder SOC Medium vermehrt. Stämme mit plasmidcodierter Resistenz wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Die Vorkulturen wurden in 3 ml des entsprechenden Mediums mit Zellmaterial von einer Platte bzw. mit 100 µl einer DMSO- oder Glycerinkultur inokuliert und unter Rollen in Kulturröhrchen aufgezogen. Kulturen mit einem Volumen von 50 ml wurden bei 150 Upm geschüttelt. Kulturen mit einem Volumen von 1000 ml wurden bei ebenfalls 150 Upm im Schüttel-Wasserbad vermehrt.

Die Bakterienstämme wurden zur längerfristigen Aufbewahrung als Glycerinkulturen gelagert. Dazu wurden 2 ml autoklaviertes Glycerin mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes vermischt und bei -20 °C aufbewahrt. Die für die Transformation präparierten Zellen sowie der mit dem HisJ-Genrepertoire transformierte TG1 Stamm wurden mit 10% DMSO bei -80°C gelagert.

Häufig verwendete Bakterienstämme wurden als Übernachtskultur auf M9-Minimalagarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C angezogen und bei 4 °C für 5-6 Wochen aufbewahrt werden.

2.2.1.2 Bestimmung der optischen Zelldichte

Die optische Dichte einer Flüssigkultur wurde in einem Kontron Photometer (*Uvicon[®] 930*) bei 600 nm bestimmt. Als Referenz diente das unbeimpfte Medium. Die Zellen wurden ggf. so verdünnt, dass die OD₆₀₀ kleiner als 1 war. Die tatsächliche Zelldichte wurde dann aus dem gemessenen Wert errechnet.

2.2.1.3 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988)

Die Transformation durch Elektroporation beruht auf der Permeabilisierung der Zellmembran durch einen Elektroschock, so dass die Aufnahme von Makromolekülen erleichtert wird.

2.2.1.3.1 Präparation von Elektroporationszellen

Für eine Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation zwecks Plasmidvermehrung und zur Vermehrung von standardmäßig ligierten Plasmiden wurden 50 ml dYT mit dem entsprechenden Stamm von M9-Minimalplatte inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Zellen 15 min bei 4 °C und 4000 Upm zentrifugiert, in 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser vorsichtig mit einem Glasstab resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 25 ml und 10 ml Wasser wiederholt, wobei die Zellen ständig auf Eis gehalten wurden. Nach und dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in dem restlichen Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden frisch präpariert zur Transformation eingesetzt oder mit 10% DMSO (v/v) versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.1.3.2 Elektroporation (Dower et al., 1988)

Die Elektroporation wurde mit einem *Gene Pulser*[®] mit angeschlossenem *Pulse Controller* (BioRad Laboratories, München) durchgeführt.

Für die Elektroporation wurde ionenfreie DNA verwendet. Ein Ligationsansatz wurde zuvor mit Ethanol gefällt. In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl Zellsuspension mit 100-300 ng DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde bei 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0 - 4,5 ms Zeitkonstante und Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Potentialpuls wurde 1 ml steriles dYT-Medium in die Elektroporationsküvette pipetiert und der Inhalt in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wird die Antibiotika Resistenz exprimiert. Die Inkubationsdauer betrug 45 min für die Entwicklung der Ampicillin Resistenz und 30 min für die Chloramphenicol Resistenz. Die Kultur wurde anschließend auf festem Selektivmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde nach der einstündigen Inkubation bei 37°C vom Transformationsansatz 10 µl Zellsuspension entnommen und eine Verdünnungsreihe im dYT Medium hergestellt. Anschließend wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung auf Selektivmedium ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und danach die Kolonien gezählt.

2.2.1.4 Auswaschen der Zellen von den Agar-Platten

Auf die bewachsenen Agar-Platten (92 x 16 mm) wurde 1 ml dYT Medium pipetiert, die Zellen mit einem sterilen Metallstück ausgewaschen und die Zellsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß pipetiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die 150 x 20 mm großen Agar-Platten wurden mit zweimal 2 ml dYT Medium ausgewaschen.

2.2.1.5 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

Durch die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die DNA einkonzentriert und Salze, Proteine bzw. Nukleotide entfernt.

2.2.1.5.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Durch Zugabe monovalenter Kationen wie Ammoniumacetat wird die Dielektrizitätskonstante der Lösung erhöht, wodurch die Abstoßung des negativ geladenen Phosphordiester-Rückgrats vermindert wird. Der Lösungsmittelentzug durch die Zugabe von Ethanol bewirkt die Fällung von DNA.

Zu der DNA-haltigen Lösung wurden 1/10 Volumen 7 M Ammoniumacetatlösung und 3 Volumen 96 % Ethanol *p.A.* zugegeben und 30 min bei -20 °C gefällt. Danach wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 15 000 Upm, 15 min, 4 °C), das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde danach entfernt und das Pellet 10 min bei 37 °C im Heizblock oder 5 min in der *Speed Vac*[®] getrocknet. Anschließend wurde die DNA je nach gewünschter Konzentration in einem entsprechenden Endvolumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.5.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

DNA kann auch mit Isopropanol anstelle von Ethanol gefällt werden. Bei der Verwendung von Isopropanol wird dabei die Präzipitation von Salzen vermindert. Diese Art der Fällung bietet sich besonders dann an, wenn Salze aus der zu fällenden Lösung entfernt werden sollen. Dazu wurde analog zur DNA-Fällung mit Ethanol verfahren. Im Unterschied dazu wurden jedoch nur 0,7 Vol bis 1 Vol Isopropanol eingesetzt. Wie auch nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.

2.2.1.5.3 Fällung von DNA mit Polyethyleglycol

Polyethylenglycol eignet sich für die fraktionierte Fällung von DNA-Fragmenten. Dabei werden DNA-Fragmente, die kürzer sind als 150 bp, in Lösung und werden mit dem Überstand entfernt (Painthankar & Prasad, 1991). Die Fällung erfolgte mit PEG 8000 in einer Endkonzentration von 6,5 % (w/v) und NaCl in einer Endkonzentration von 0,4 M. Nach 30 min Zentrifugation bei 4°C, 12000 rpm, wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 ml 70 % -igem Ethanol (v/v) gewaschen.

2.2.1.6 Extraktion von DNA in wäßrigen Lösungen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung und Chloroform

Zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontamination diente die Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform. Die Extraktion mit Chloroform diente auch der Entfernung von Phenol aus der wäßrigen Phase.

Durch die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen mit den Seitenketten der Aminosäuren werden die Proteine denaturiert und reichern sich in der organischen Phase an. Das Chloroform erleichtert die Phasentrennung, und der Isoamylalkohol verhindert das Schäumen der Interphase.

2.2.1.6.1 Herstellung einer Phenol- und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (Grinsted und Bennet, 1990)

500 g festes Phenol wurden mit 130 ml Wasser, 7,5 ml 2 N NaOH und 6 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Zum Schutz vor Oxidation wurde 8-Hydroxychinolin (0,1 % (w/v)) hinzugefügt.

Zur Herstellung der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurden 160 ml der Phenol-Lösung mit 153,6 ml Chloroform und 6,4 ml Isoamylalkohol gemischt.

Die Lösungen wurden lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.6.2 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform oder Chloroform

Die DNA-Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform versetzt und kräftig gemischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation (Hettich-Tischzentrifuge, 15 000 Upm, 1 min, RT). Die wäßrige Phase wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in gleicher Weise mit Chloroform extrahiert, um die Phenolreste zu entfernen.

Die DNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von doppelsträngiger DNA wurde in 1% - 2 % (w/v) Agarosegelen im TBE- oder TAE-Puffer durchgeführt. Fragmente bis 200 bp wurden in 1%- bis 2%-igen, größere Fragmente in 1%-igen Gelen aufgetrennt. Eine präparative Auftrennung wurde mit 1%-igen Agarosegelen mit TAE Puffert durchgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer

konstanten Spannung zwischen 40 V und 130 V für 30 - 60 min durchgeführt (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht (302 nm) durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung für die resultierenden DNA-Banden wurden DNA-Fragmentlängenstandards (DNA-Konzentration: 100 ng/µl) verwendet.

2.2.1.8 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe des *Nucleotrap*[®]-Kits (Macherey & Nagel)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *Nucleotrap*[®]-Kit von Macherey & Nagel verwendet. Das DNA-Fragment wurde aus dem Gel auf dem UV-Durchlicht-Tisch mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Pro 100 mg Gelmasse wurden 300 µl NT1-Puffer und 20 µl *Nucleotrap*[®]-Suspension zugegeben und ca. 10 min bei 50 °C inkubiert bis das Gel vollständig aufgelöst war. Nach Zentrifugation (12000 Upm, 30 s, RT) wurde der Überstand abgetrennt und das Pellet in 500 µl NT2-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (s.o.) und der Überstand entfernt. Der Waschschrift wurde mit 500 µl NT2-Puffer und danach mit 500 µl NT3-Puffer wiederholt. Das gewaschene Pellet wurde an der Luft 10 min bei RT getrocknet. Die Elution der gebundenen DNA erfolgte durch Inkubation bei RT (15 min) durch Zugabe von 50 µl Wasser oder TE-Puffer, wobei ca. alle 3 min die Suspension gemischt wurde. Nach der Zentrifugation (s.o.) wurde der DNA enthaltende Überstand abgenommen und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt.

Für die Abtrennung von Oligonukleotiden (z.B. PCR-Primer) und kurzen DNA-Fragmenten (<150 bp) aus einer DNA-Lösung wurde das *NucleotraP*[®]*CR*-Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet. Mit der *NucleotraP*[®]*CR*-Suspension werden längere Fragmente präzipitiert, und die mit einer Größe von bis zu 150 bp verbleiben in der Lösung.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht, mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase mit 15 µl *NucleotraP*[®]*CR*-Suspension und 400 µl NT2-Puffer versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur, wobei der Ansatz ungefähr alle 3 min durchmischt wurde. Es wurde zentrifugiert (12 000 Upm, 30 s, RT) und der Überstand verworfen. Das DNA-enthaltende Pellet wurde in 400 µl NT2-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 400 µl NT3-Puffer, wobei nach Abtrennung des Überstandes nach dem zweiten Durchgang das Pellet erneut zentrifugiert und der letzte Rest an Flüssigkeit abgenommen wurde. Das Pellet wurde nun für 15 min bei 37 °C getrocknet und zur Elution im Anschluß in 50 µl Wasser aufgenommen. Dabei wurde die Mischung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und alle 2 min gemischt. Nach

Abzentrifugation wie oben angegeben wurden ca. 50 µl gereinigte, wässrige DNA-Lösung erhalten.

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischem Maßstab mittels alkalischer Lyse

Zur Isolierung von Plasmid DNA im analytischem Maßstab wurden 2 ml einer Übernachtskultur in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl Jetstar E1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl E2-Puffer und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Danach wurden 150 µl E3-Puffer zugegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurde die chromosomale DNA und ein Teil der Proteine gefällt. Nach der Zentrifugation (4°C, 10 min. bei 13000 U/min) wurde der die DNA enthaltende Überstand abgenommen.

Die Reinigung der DNA erfolgte über jeweils einmalige mit Phenol/Chloroform und Chloroform Extraktion und anschließende Ethanol Fällung oder über eine Fällung mit Polyethylenglykol.

2.2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA in präparativem Maßstab mit Hilfe des *JetStar-Kits* (Genomed)

Die Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde mit dem *JetStar*-Kit (Fa. Genomed) durchgeführt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und Aufreinigung über Anionenaustauschchromatographie.

Eine 50 ml Übernachtskultur in dYT mit Antibiotikum wurde abzentrifugiert (4 000 Upm, 10 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml E1-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 4 ml E2-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 4 ml E3-Puffer zugegeben und nochmals gemischt. Nach der Zentrifugation (4 000 Upm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand auf eine mit 10 ml E4-Puffer equilibrierte Säule aufgetragen. Beim Durchfluß durch die Säulenmatrix bindet die DNA an den Anionenaustauscher. Die Matrix wurde zweimal mit 10 ml E5-Puffer gewaschen und danach die Plasmid-DNA mit 5 ml E6-Puffer von der Säule eluiert. Die DNA wurde anschließend mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl TE Puffer aufgenommen.

2.2.1.11 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Sucrosegradienten-Dichtezentrifugation

Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz bei der Klonierung von molekularen Repertoires zu erzeugen, wurde der mit entsprechenden Restriktionsnukleasen gespaltene pCANTAB Vektor über einen Sucroседichtegradienten aufgereinigt.

Zur Herstellung des Sucrosegradienten wurden 10 ml Sucrosegradientenpuffer in 12 ml-Ultrazentrifugenröhrchen bei -20 °C eingefroren. Durch langsames Auftauen bei Raumtemperatur bildete sich ein Dichtegradient von 10 % bis 30 % (w/w) aus. Die in maximal 200 µl Endvolumen gelöste DNA wurde vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen und mit Paraffin überschichtet. Das Röhrchen wurde tariert und 21 h bei 15°C und 30000 Upm im Vakuum zentrifugiert (Kontron Centrikon® T1055 Ultrazentrifuge, TST41.14-Schwenkbecherrotor). Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen im Stativ befestigt und mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) ein Loch in den Boden des Röhrchens gestochen. Die Lösung ließ man in 20-25 Fraktionen mit jeweils ca. 500 µl austropfen, die auf einem Agarosegel analysiert wurden. Die Fraktionen mit der DNA gewünschter Länge wurden mit Ethanol gefällt und anschließend in 200 µl TE Puffer aufgenommen.

2.2.1.12 Bestimmung der Konzentration von DNA in wäßrigen Lösungen

Die Nukleinsäure-Konzentration einer wäßrigen Lösung wird durch Messung der Absorption einer entsprechenden Verdünnung bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die Probe wurde 100- bis 1000-fach in TE Puffer verdünnt und gegen TE Puffer in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm photometrisch gemessen (Kontron Zweistrahl-Spektralphotometer *Uvicon*® 930). Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml, 35 µg RNA/ml oder 33 µg ssDNA/ml. Durch zusätzliche Messung bei 280 nm *Wellenlänge* kann der Anteil der Verunreinigung mit Proteinen bestimmt werden. In proteinfreien Proben liegt der Quotient von OD_{260} / OD_{280} bei 2.

2.2.1.13 Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA

2.2.1.13.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Gleichzeitige Spaltungen mit mehreren Enzymen wurden unter den Pufferbedingungen durchgeführt, bei denen laut Hersteller die Endonukleasen mindestens 50 % bis 100 % Spaltaktivität besaßen oder im KGB Puffer. Präparative Spaltungen mit Enzymen mit unterschiedlichen

Reaktionsbedingungen wurden mit jedem Enzym separat durchgeführt, wobei nach jeder Spaltung der Reaktionsansatz mit Ethanol gefällt wurde.

Die DNA wurde für analytische Zwecke in der Regel in einer Endkonzentration des Spaltungsansatzes von 100 ng/μl mit 1 - 2 U Enzym/μg DNA für 1 h inkubiert. Längeren Inkubationszeiten wurde mit einer Verringerung der Enzymmenge begegnet. Die Präparative Spaltung erfolgte mit 2 U Enzym/μg DNA für 4-16 h.

2.2.1.13.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde mit drei- bis sechsfachen molaren Überschuß an DNA-Insertfragment gegenüber dem DNA-Vektorfragment durchgeführt. Verwendet wurde der T4 DNA-Ligase-Puffer mit 2-5 U T4 DNA-Ligase in einem Endvolumen von 20 μl. Die Reaktion erfolgte in der Regel über Nacht bei 15 °C. Der Ligationsansatz wurde vor einer Transformation von *E. coli*-Zellen mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.2.1.13.2.1 Ligation von DNA Fragmenten mit einer thermostabilen Ligase (Thompson & Weber, 1993)

Das *hisJ*-Genrepertoire sollte ursprünglich mittels Ligation aus insgesamt 32 Oligonukleotiden hergestellt werden. Alle inneren Oligonukleotide waren am 5'-Ende phosphoryliert. Durch eine Ligation bei einer höheren Temperatur mit einer thermostabilen Ligase sollte eine fehlerhafte Hybridisierung der Oligonukleotide vermieden werden. Um diese Methode zu optimieren, wurde zuerst versucht, aus ausschließlich nicht randomisierten Oligonukleotiden das *hisJ*-Gen herzustellen. Für die Ligation wurde ein Ansatz mit je 20 pmol von jedem Oligonukleotid in Wasser verwendet.

| Reaktionsschritte | Reaktionsbedingungen | | |
|---|--|---|---|
| | Versuch I | Versuch II | Versuch III |
| Denaturierung der Oligonukleotide | 95 °C 30s | 95 °C, 30s | 95 °C 30 s |
| Hybridisierung der Oligonukleotide | Abkühlung von 95 °C auf 65°C in 30 min | Abkühlung von 95 °C auf 65 °C in 5 min, anschließend 10 min 65 °C | Abkühlung von 95 °C auf 65 °C in 5 min, anschließend 10 min 65 °C |
| Zugabe von <i>Taq</i> -Ligase und <i>Taq</i> -Ligase Puffer | 40 U | 40 U | 40 U |
| Ligation der Oligonukleotide | 45 °C, 1 h | 55°C, 4 h | Abkühlung von 65 °C auf 55 °C in 4 h, anschließend 2 h 55 °C |

Tab. 1: Protokoll zum Assemblieren des *hisJ*-Gens über eine Ligation mit einer *Taq*-Ligase. Für die Ligation wurde ein Ansatz mit je 20 pmol von jedem Oligonukleotid in Wasser verwendet.

2.2.1.13.2.2 Ligasekettenreaktion (LCR) (Lottspeich, Zorbas 1998)

Bei der Ligasekettenreaktion wird nicht die eigentliche Zielsequenz vermehrt, sondern es kommt zu einer Amplifikation von je zwei miteinander ligierten Oligonukleotiden, die komplementär zu den ursprünglichen Strängen sind. Nach der initialen Denaturierung hybridisieren zwei direkt miteinander benachbarte Oligonukleotide, die dann durch eine thermostabile Ligase miteinander verknüpft werden. Diese bilden nun das Target für zwei komplementäre Oligonukleotide, die ebenfalls hybridisieren und mit der Ligase verknüpft werden. Mit jeder weiteren Runde verdoppelt sich theoretisch die Zahl der miteinander verknüpften Oligonukleotide. Analog zu einer PCR kommt es auch bei der LCR zu einer exponentiellen Amplifikation.

Die LCR wurde für die Assemblierung des *hisJ*-Gens verwendet. Dafür sollte zwei Unterfragmente des *hisJ*-Gens über eine LCR hergestellt werden. Für das Unterfragment II-LCR2 wurden jeweils 4 pmol der Oligos ek07 bis ek10 und ek23 bis ek25 und für das Fragment III-LCR2 die Oligos ek11 bis ek13, ek26 und ek27 zusammen mit der *Taq*-

Ligase (10 U) eingesetzt. Als Template diente der Vektor pCANTABhisj. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

92 °C 3 min;

60 °C 5 min;

30 Zyklen: 92 °C 45 s, 65° C 90 min;

92 °C 4 min;

60° C 15 min.

2.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988)

Bei der Polymerasekettenreaktion werden spezifische DNA-Fragmente *in vitro* enzymatisch amplifiziert. Mit dieser Methode ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine DNA-Matrize zu vervielfachen. Die doppelsträngige DNA-Matrize wird im ersten Schritt durch Erhitzen bei 95°C in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei Oligonukleotide (*primer*) an die Matrizen-DNA an (*primer annealing*) und flankieren die zu amplifizierenden komplementären Zielregionen. Die *primer* werden mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA bei hoher Temperatur verlängert (*primer extension*), um unspezifische Hybridisierung der *primer* an die Matrize zu verhindern. Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden *primer* flankierte DNA-Region akkumuliert.

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und des G/C-Gehaltes der verwendeten *primer* angepasst. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50-100 µl durchgeführt. Für die PCR wurden ca. 5 - 10 ng DNA als Matrize, jeweils 20 pmol eines *Primers*, 200 µM dNTP Reaktionsgemisch, 5 µl Polymerase-Puffer (10x) und 1 u kommerziell erworbene DNA-Polymerase bzw. 1 µl hauseigene *Taq*-Polymerase eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit 25 µl *Chill Out 14*[®] Flüssigwachs überschichtet.

Der Denaturierungsschritt erfolgte standardmäßig 30 s bei 95 °C und das *primer annealing* 30 s bei der für das jeweilige *Primer*-Paar charakteristischen *annealing* Temperatur. Die Elongationsreaktion (*primer extension*) wurde bei 72 °C für 30 s pro 1000 bp durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 20 und 30. Die Schmelztemperatur T_M eines Oligonukleotids wurde nach folgender empirischer Formel (1.1) berechnet, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) mit einbezieht:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n} \quad (1.1)$$

Die errechnete Temperatur lag in der Regel zwischen 47 °C und 60 °C. Die optimale *Annealing*-Temperatur T_A für eine Polymerasekettenreaktion wurde nach (1.2) bestimmt.

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^\circ\text{C} \quad (1.2)$$

T_{M1} und T_{M2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *primer*.

2.2.1.15 Kolonie-PCR

Mit einer modifizierten PCR können nach einer Transformation die Einzelklone auf das Vorhandensein des Plasmids mit einem definierten Fragment getestet werden indem man spezifische *primer* verwendet. Von den bewachsenen Agar-Platten wurden Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in PCR-Reaktionsgefäße mit jeweils 25 µl *Taq*-Reaktionspuffer übertragen. Mit den Kolonien wurde jeweils eine 2 ml Flüssigkultur über Nacht hergestellt. Zu den Zellen in den PCR-Reaktionsgefäßen wurde das Reaktionsmix zugegeben (20 pmol dNTPs, 20 pmol Primer und 1 µl hauseigene *Taq*-Polymerase) und die Zellen 5 min bei 95°C aufgeschlossen. Beim Nachweis des *hisJ*-Genes bzw. des Genrepertoires im pCANTAB-Vektor wurden die Primer HisJ-in und cantupABI verwendet. Für die Kolonie-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

5 min 95°C, 30 x (30 sek 95°C, 30 sek 55°C, 1 min 72°C).

2.2.1.16 DNA-Sequenzanalyse (Sanger, 1977)

2.2.1.16.1 Sequenzreaktion

Bei einer Sequenzreaktion handelt es sich um eine PCR, bei der es durch den Einbau von 2',3'-Didesoxyribonukleotiden zu einem Abbruch der Elongation eines DNA Stranges kommt. Es wurden jeweils vier getrennte Ansätze analysiert, bei denen den 3'-Desoxyribonukleotiden das entsprechende 2',3'-Didesoxyribonukleotid zugegeben war, so dass es statistisch an jeder Position des betreffenden Nukleotids zu einem Kettenabbruch kommen konnte. Die Produkte wurden gelelektrophoretisch mit einem Sequenzierautomaten aufgetrennt und das Bandenmuster analysiert.

Zum Sequenzieren von ds-DNA wurde der *Thermo-Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*[®] (Amersham Life Science) verwendet. Bei diesem Kit sind für jede Reaktion (A,C,G,T) die Stopmixe inklusive der Polymerase bereits gemischt. Thermosequenase[™] ist eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*, bei der der Phenylalanin-Rest an Position 667 gegen ein Tyrosin ausgetauscht ist. Dadurch wird eine Diskriminierung gegen 2'-3'-Didesoxynukleotide stark

herabgesetzt (Tabor, 1995). Bei der Sequenzreaktion wurden *Primer* verwendet, die am 5'-Ende mit einem Laserfarbstoff markiert waren. Fragmente, die während der Elektrophorese die Ebene des Scanners durchwanderten, konnten mit einer Laserdiode angeregt und mit einer auf die Mitte der ca. 0.2 mm dicken Gelmatrix fokussierten Fotodiode detektiert werden.

Aus 1-1,5 µg DNA und 6 pmol fluoreszenzmarkierter Primer wurde in einem Volumen von 24 µl gemischt. Aus diesem Gemisch wurden jeweils 6 µl in vier PCR-Reaktionsgefäße pipetiert und jeweils 2 µl A-,C-,G- bzw. T-Stopmix zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde jeweils mit einem Tropfen *Chill out 14*[®] Flüssigwachs überschichtet. Die PCR-Reaktion verlief unter in Tab. 2 aufgeführten Bedingungen.

| | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | 95 °C 2 min |
| 2 | 95 °C 20 s |
| 3 | <i>annealing</i> Temperatur, 30 s |
| 4 | 70 °C 30 s |
| 5 | 20 mal Schritte 2-4 |
| 6 | 95 °C 20 s |
| 7 | 70 °C 30 s |
| 8 | 10 mal Schritte 6-7 |

Tab. 2: Bedingungen für die Sequenase-Reaktion

Nach der Sequenzreaktion wurden je 6 µl Licor Farbmarder hinzugegeben und die Reaktion nach kurzem Erhitzen (~2 min. bei 95°C) direkt auf ein LICOR-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

2.2.1.16.2 Analyse der Sequenzreaktion mit dem Li-CORTM-DNA-Sequenzier

Für die DNA-Sequenzanalyse wurden in Abhängigkeit von der Größe der zu sequenzierenden DNA-Fragmente Polyacrylamidgele unterschiedlicher Länge verwendet. Sequenziert wurde auf einem LI-COR Model 4200L (LI-COR Inc.) [Middendorf, 1992]. Die verwendeten Gelzusammensetzungen und Laufbedingungen sind in Tabelle 3. zusammengefaßt.

| Gel | 41 cm Sequagel | 66 cm 4,3 % Long Range |
|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Geldicke | 0,25 mm | 0,25 mm |
| Harnstoff | - | 21g |
| 5x TBE | - | 10 ml |
| Wasser | - | 27 ml |
| Long Ranger | - | 4,3 ml |
| Sequagel [®] | 32 ml | - |
| Sequagel complete [®] | 8 ml | - |
| 10% APS | 300 µl | 350 µl |
| Spannung [V] | 1500 | 2200 |
| Strom [mA] | 37 | 37 |
| Leistung [W] | 50 | 50 |
| Temperatur [°C] | 50 | 45 |
| Frames | 25 | 35 |

Tab. 3: Zusammensetzung der Licor Gele und Laufbedingungen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem *BaseImage*TM Software Paket (Version 2.21, Li-COR[®])

2.2.1.17 Methoden zur *in vitro* Rekombination

2.2.1.17.1 Assemblieren des *hisJ*-Genrepertoires nach modifizierter Methode von Stemmer (Stemmer *et al.*, 1995)

Das *hisJ*-Gen wurde nach der Methode von Stemmer assembliert (Stemmer *et al.*, 1995). Dabei werden aus mehreren überlappenden Oligonukleotiden, die beide DNA Stränge kodieren, mit Hilfe einer DNA Polymerase zunehmend längere DNA Fragmente während der *primerless* PCR produziert. Das synthetische Gen wird in einer *primed* PCR mit entsprechenden Primern amplifiziert und dann in einen geeigneten Vektor kloniert.

Die *primerless* PCR wurde mit 5 randomisierten und 27 Originalsequenz-Oligos (je 2 pmol) und 1 U *Vent* Polymerase durchgeführt. Die PCR Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 55 Zyklen 94°C 30s, 47°C 30s, 72°C 30s. Nach der beendeten PCR wurden 1 µl des Ansatzes für die *primed* PCR eingesetzt. Es wurden zwei terminale Primer ek01 und ek32 sowie ein 1 µl hauseigene *Taq* Polymerase verwendet. Die PCR Bedingungen waren: 23 Zyklen 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 60s.

| Reaktionsschritt | Reaktionsbedingungen | |
|--|--|--|
| Primerless PCR | Oligonukleotide: ek1, ek3, ek4, ek6, ek8, ek9, ek11, ek12, ek14-ek32 (20 pmol/μl) | 0,1 μl |
| | Oligonukleotide: ek02 ek05 ek07 ek10 ek13 | je 2 pmol |
| | DNTPs (10 mM) | 2 μl |
| | 10 x <i>ThermoPol</i> Puffer | 5 μl |
| | <i>Vent</i> -Polymerase (1 U/ μl) | 1 μl |
| | H ₂ O | ad. 50 μl |
| | Programm: 5' bei 95 °C 45 Zyklen: 45'' bei 95 °C, 45'' bei 50 °C, 1'20'' bei 72 °C; 10' bei 72 °C | |
| | Primed PCR | DNA Template: Ansätze aus primerless PCR |
| dNTPs (10 mM) | | 2 μl |
| 5'-Primer ek01 (20 pmol/μl) | | 1 μl |
| 3'-Primer ek32 (20 pmol/μl) | | 1 μl |
| 1 M MgCl ₂ (20 mM) | | 2 μl |
| 10 x <i>Taq</i> -Puffer | | 10 μl |
| <i>Taq</i> -Polymerase (1 U/ μl) | | 1 μl |
| H ₂ O | | ad. 100 μl |
| Programm: 5' bei 95 °C 30 Zyklen: 45'' bei 95 °C, 45'' bei 57 °C, 1'40'' bei 72 °C; 10' bei 72 °C | | |

Tab. 4: Modifiziertes Protokoll zum Assemblieren des *hisJ*-Gens nach Stemmer (1995)

2.2.1.17.2 StEP-PCR (Zhao, 1995)

Die *in vitro* Rekombination nach der StEP Methode (Zhao, 1995) wurde verwendet, um die durchschnittliche Anzahl der Mutationen im sekundären *hisJ*-Genrepertoire zu erhöhen. In sehr kurzen Elongationszeiten unvollständige Genfragmente produziert, die während der PCR untereinander rekombinieren und schrittweise verlängert werden. Für die PCR wurde

die *Vent*-Polymerase verwendet, die eine *proofreading* Aktivität besitzt und deshalb langsamer als die *Taq*-Polymerase ist.

| | |
|-------------------------|---|
| DNA Template | 0,15 pmol |
| 5'-Primer EvaI | 60 pmol |
| 3'-Primer Bla_rechtsABI | 60 pmol |
| dNTPs | 20 nmol |
| 10 × ThermoPol Puffer | 10 µl |
| <i>Vent</i> -Polymerase | 1 U |
| Programm | 5 min bei 95 °C 95 Zyklen: 30 s bei 95 °C, 1 s bei 55 °C |

Tab. 5: Modifizierte Reaktionsbedingungen bei der *in vitro* Rekombination des *hisJ*-Repertoires nach der StEP Methode (Zhao, 1995).

2.2.1.18 Klonieren des *hisJ*-Genrepertoires

Um eine möglichst große Bibliothek an HisJ-Varianten zu erzeugen, wurden bei der Klonierung des das nach Stemmer synthetisierten *hisJ*-Genrepertoires spezielle Methoden verwendet.

2.2.1.18.1 Vorbereitung des Vektors und des Inserts

Um den Anteil des rückligierten Vektors nach einer Transformation bestimmen zu können, wurde in den pCANTAB-Vektor ein fremdes Insert einkloniert, der als Ausgangsvektor (pCANTABCal) für die Klonierung des Genrepertoires diente. In dieser Weise konnte nach der Klonierung des *hisJ*-Repertoires in einem PCR *Colony Screen* der Ampicillin resistenten Kolonien zwischen den Insert tragenden Klonen und den mit dem rückligierten Vektor differenziert werden.

Nach der Präparation mit dem *JetStar*-Kit und einer Phenol/Chloroform Extraktion wurden 100 µg des pCANTABCal Vektors jeweils über Nacht mit *KpnI* und *BglII* gespalten (2 U Enzym/µg DNA). Nach einer Chloroform Extraktion wurde der Vektor über einen Sucrosedichtegradienten aufgereinigt.

Das nach Stemmer hergestellte Genrepertoire wurde nach der *primed* PCR mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Spaltung mit *KpnI* und *BglII* erfolgte jeweils über Nacht. Das Genfragment wurde über ein 1%-iges Agarosegel mit dem *Nukleotrap* Kit aufgereinigt.

2.2.1.18.2 Ligation des hisJ-Genrepertoires mit dem pCANTAB-Vektor

3,6 µg des gespaltenen und aufgereinigten Vektors wurden mit 3,6 µg des Inserts in Wasser im Endvolumen von 216 µl gelöst. Die Lösung wurde 5 min bei 45°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt, um eventuell miteinander hybridisierte überlappende Enden des Vektors zu schmelzen. Anschließend wurden 24 µl T4 Ligase Puffer und 60 U T4 Ligase zugegeben und die Lösung auf 12 Ligationsansätze verteilt. Die Ligation erfolgte 16-26 h bei 15°C. Die Ligationsansätze wurden danach über Nacht mit Ethanol gefällt und anschließend in jeweils 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.1.18.3 Transformation des hisJ-Repertoires

Zur Herstellung von hochkompetenten Zellen zur Transformation der HisJ-Bibliothek wurden 400 ml SOB-Medium mit dem *E. coli* Stamm TG1 inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 - 0,5 geschüttelt. Die Zellen wurden in 50 ml Aliquots wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben aufbereitet, wobei die resuspendierten Zellen bei jedem Waschschrift vor dem Abzentrifugieren 1h auf Eis inkubiert wurden.

Nach der Elektroporation wurden sofort 800 µl SOC Medium in die Elektroporationsküvette hinzu pipetiert und die Zellsuspension in ein Reagenzglas gegeben. Die Küvette wurde noch zwei mal mit SOC ausgespült und die Zellen dann im Roller für 1h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf Agarplatten (150 x 20 mm) mit Ampicillin ausplattiert (1 ml Kultur pro Agar-Platte) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.18.4 Lagerung der transformierten Zellen

Die transformierten Zellen wurden von den Selektivplatten mit jeweils zweimal 2 ml dYT Nährmedium ausgewaschen. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Aliquots mit 10 % DMSO bei -80°C gelagert.

2.2.1.19 Selektion der rasterschubfreien Varianten aus dem primären hisJ-Repertoire auf Ampicillin-Medium

Die *E. coli* TG1 Zellen wurden wie unter 2.2.1.18.3 beschrieben mit dem pASKhisJ^{rep}Bla Plasmid transformiert. Nach der Elektroporation wurden zu 200 µl der Zellen 800 µl dYT Medium mit einer Anhydrotetracyclin Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben. Dadurch wurde der *tet*-Promotor induziert, der zur Ausbildung der Ampicillin-Resistenz führte. Zusätzlich zum *bla*-Gen enthielt das Plasmid das *cat*-Gen, das für die Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert. Für die Ausbildung der Antibiotika Resistenz

wurden die transformierten Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden sie auf SOC Agarplatten mit jeweils 100 µg/ml Ampicillin und Chloramphenicol ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Zellen von den Platten ausgewaschen und bei -70 °C gelagert (s. 2.2.1.18.4).

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Präparation der periplasmatischen Proteine aus *E. coli* im analytischen Maßstab

Die periplasmatischen Proteine aus *E. coli* wurden durch osmotischen Schock präpariert. (Neu und Heppel, 1965). Dazu wurden 2 ml 50 ml stationären Übernachtskultur (37 °C, 150 Upm) geerntet (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 300 µl Resuspendierungspuffer aufgenommen, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 100 µl Schockpuffer aufgenommen, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und abzentrifugiert (Hettich MikrorapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Der Überstand mit den periplasmatischen Proteinen wurde abgenommen und mittels PAGE analysiert.

2.2.2.2 Präparation der periplasmatischen Proteine aus *E. coli*

Eine 1 l Übernachtskultur von *E. coli* (37 °C, Wasserbad, 160 Upm) wurde bei einer OD₆₀₀ von >2,0 geerntet (Hettich Erntezentrifuge, 4000 Upm, 30 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 100 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen, in GSA Bechern bei 150 Upm resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 9000 Upm, 12 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 100 ml Schockpuffer versetzt, resuspendiert und in GSA Bechern bei 150 Upm inkubiert. Nach der Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 10000 Upm, 12 min, 4 °C) wurden die im Überstand befindlichen periplasmatischen Proteine mit Ammoniumsulfatfällung über Nacht gefällt (65g (NH₄)₂SO₄/100 ml, d.h. 90% gesättigte Ammoniumsulfatlösung).

Die gefällten Proteine wurden zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 12000 Upm, 45 min, 4 °C) und das Pellet in 15-20 ml TEA-Puffer pro 1 l Ausgangskultur aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile wurden erneut abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 15000 Upm, 30 min, 4 °C). Die erhaltenen periplasmatischen Proteine wurden zur affinitätschromatographischen Reinigung des Fusionsproteins an immobilisierten Metallionen (IMAC) eingesetzt.

2.2.2.3 Präparation eines Gesamtzellextraktes der löslichen Proteine aus *E. coli* im analytischen Maßstab

2 ml einer stationären Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes wurden geerntet (Hettich MikroRapidK, 12000 Upm, 5 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (100 µl, pH 7,0) aufgenommen und durch Ultraschall (3 x 8 sec bei 5 W Leistungsabgabe; Branson Sonifier, W-250 mit ½" Titan-Mikrospitze) aufgeschlossen. Diese Lösung wurde mit 100 µl Proteinprobenpuffer versetzt und nach Erhitzen auf 99 °C für 5 min zur PAGE eingesetzt.

2.2.2.4 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung

Die Proteinkonzentration einer wässrigen Proteinlösung wurde spektroskopisch bestimmt. Dafür wurde die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm (E_{280}). Aus der Anzahl seiner Tryptophan- und Tyrosinreste, sowie der Anzahl an Disulfidbrücken. Der molare Extinktionskoeffizient lässt sich durch folgende Gleichung berechnen (Pace *et al.*, 1995):

$$\varepsilon = 5500 \cdot (\Sigma \text{Trp}) + 1490 \cdot (\Sigma \text{Tyr}) + 125 \cdot (\Sigma \text{Cys}) \quad (2.1)$$

Demnach besitzt HisJ einen molaren Extinktionskoeffizienten von $17545 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($c = E_{280} / \varepsilon d$; mit d: Schichtdicke der Küvette, ε : molarer Extinktionskoeffizient) lässt sich die Proteinkonzentration ermitteln.

2.2.2.5 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden für analytische Zwecke unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (Dimension 100 x 60 x 0,75 mm) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dabei werden die Sekundär- und Tertiärstrukturelemente der Proteine aufgelöst. Es wurden ausschließlich 12,5 %-ige (v/v) SDS-Polyacrylamidgelen verwendet. Das Trenngel bestand aus 17,3 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (*Protogel*[®]), 13,5 ml Trenngelpuffer, 675 µl 20 % (w/v) SDS, 24,9 ml Wasser, 34 µl TEMED und 225 µl 25%-iger APS-Stammlösung. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen, in das die Kämme eingefügt wurden. Es bestand aus 4 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (*Protogel*[®]), 2,625 ml Sammelgel-puffer, 263 µl 20 % (w/v) SDS, 18,9 ml Wasser, 26 µl TEMED und 90 µl APS-Stammlösung. Die Elektrophorese erfolgte bei

konstanter Stromstärke von 15 mA und mit PAGE-Laufpuffer. Das Gel wurde anschließend entweder zum Transfer der Proteine auf Nitrozellulose verwendet oder mit *Coomassie brilliant blue R* gefärbt. Das Entfärben erfolgte durch Aufkochen des Gels in Wasser bei 900 W im Mikrowellenofen.

2.2.2.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western Blot)

Die Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden auf Nitrocellulose-Membranen (Towbin *et al.*, 1979) nach dem "*Semi-dry*"-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) transferiert durch eine Elektrophorese orthogonal zur Gelebene. Dazu wurden auf zwei Lagen Filterpapier (3 mm Filterpapier) die Nitrocellulose-Membran, das betreffende Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier gelegt. Die Komponenten wurden vorher mit Transferpuffer getränkt. Dieser Aufbau wurde zwischen zwei Graphitelektroden (LKB-Nova-Blot) gelegt und die Proteine elektrophoretisch (35 min, 13 V, ca. 4 mA/cm²) transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulose-Membran in 25 ml Ponceau-S-Lösung (Ponceau-S-Konzentrat 1:10 mit H₂O verdünnt) gefärbt. Die Membran wurde bis zur vollständigen Entfärbung mit PBS-Tween-Puffer gewaschen.

2.2.2.7 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit 20 ml Blocklösung für 30 min inkubiert und anschließend dreimal je 20 min mit PBS Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran in 10 ml verdünnter Antiserum- bzw. Antikörper-Lösung (beim anti-HisJ Serum 1 : 1000, beim anti-E Tag Antikörper 1 : 10000 in PBS-Puffer) 16 h bei RT leicht geschwenkt und anschließend dreimal je 20 min mit 20 ml PBS-*Tween*-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran 2 h mit 20 ml einer verdünnten Lösung eines alkalische Phosphatase-konjugierten Ziegen-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antiserums beim anti-HisJ Antikörper bzw. Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin-Antiserums (jeweils 1 : 10000 in PBS Puffer verdünnt) inkubiert, dreimal 30 min mit PBS-*Tween*-Puffer gewaschen und dreimal kurz mit deionisiertem Wasser geschwenkt um restliches *Tween* zu entfernen. Die Detektion der Proteine erfolgte in 12,5 ml Western-Blot-Reaktionspuffer bei Raumtemperatur. Nach Auftreten der spezifischen Färbung wurde die Reaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt.

2.2.3 Methoden zum Phage Display

2.2.3.1 Phage Display (Smith, 1985)

Beim *Phage Display* werden die rekombinanten Proteine auf der Oberfläche eines Phagen präsentiert. Aufgrund der relativ einfachen Handhabung und der genauen Kenntnis des Lebenszyklus und der Struktur der Phagenpartikel werden bei dieser Methode vorwiegend filamentöse Phagen wie M13 oder fd verwendet. Bei der Infektion von *E. coli* wird die virale Einzelstrang-DNA über den F-Pilus in die Zelle eingeschleust und in die doppelsträngige replikative Form überführt. Sie dient als Template für die Produktion weiterer Einzelstrang-DNA Moleküle sowie der viralen Proteine. Die Einzelstrang-DNA gelangt durch die innere Membran ins Periplasma, wo die Phagen-Hüllenproteine angereichert werden und eine Assemblierung der vollständigen Phagenpartikel stattfindet. Die Phagen passieren die Zellwand nach außen, ohne die Zelle zu zerstören. (Barbas, 2001). Für die Präsentation eines Proteins auf der Phagenoberfläche wird die DNA kodierende Sequenz zwischen die Signalsequenz und den N-Terminus eines Hüllenproteins (gpIII oder gpVIII) einkloniert, die nach der Sekretion proteolytisch abgespalten wird. Die Fusion mit dem gpIII Protein erlaubt die Präsentation größerer Proteine, allerdings wird die Infektiosität des Phagen verhindert, wenn alle gpIII Kopien als Fusionsproteine vorliegen (polyvalentes *Display*). Um das zu verhindern, wird die Proteinsequenz nicht in das Phagen genom einkloniert, sondern in eine Phasmid-DNA, die neben gpIII und gpIII Signalsequenz u. a. den M13 Replikationsursprung enthält. Zellen, die das Phasmid enthalten und mit dem Wildtyp-M13, dem sogenannten Helferphagen, infiziert werden, produzieren Phagen, die sowohl das Fusionsprotein als auch das Wildtyp-gpIII präsentieren (durchschnittlich ein gpIII Fusionsprotein pro Phagenpartikel), so dass die Infektiosität der Phagen erhalten bleibt (monovalentes *Display*, Hoess, 2001).

Für das *Phage Display* des Wildtyp-HisJ bzw. der HisJ-Bibliothek wurde der Phagenvektor pBANTAB5E verwendet (Pharmacia). Er enthält einen M13 Replikationsursprung, aber keine Gene, die für die Produktion des vollständigen Phagen notwendig sind. Aus diesem Grund müssen die mit dem Phasmid transformierten Zellen mit einem Helferphagen infiziert werden, dessen Genom für Proteine kodiert, die für die Replikation und Verpackung der einzelsträngigen Phasmid-DNA in die Phagenpartikel notwendig sind (Messing, 1991). Der Helferphage M13KO7 ist ein M13 Phagenderivat, das für die Präsentation des Rezeptorenrepertoires dienen sollte, enthält zusätzlich eine Kanamycinresistenz sowie den P15A-Replikationsursprung. Dadurch wurde die Replikationsinitiierungsfrequenz des Plasmids herabgesetzt. Die Infektion der Zellen mit dem Phagen erfolgt über die Interaktion des Phagenproteins gpIII mit dem F-Pilus. In Anwesenheit eines Phasmids mit dem M13 oder f1 Replikationsursprung, wird in den infizierten Zellen die einzelsträngige Phasmid-DNA bevorzugt in die Phagenhüllenproteine

verpackt und ins Medium sekretiert. Da das Phasmid pCANTAB5E eine Ampicillin-Resistenz vermittelt, können in einem Medium mit Amipicillin und Kanamycin die Zellen selektiert werden, die das Phasmid enthalten und mit dem M13KO7 infiziert wurden. Im Periplasma eines *E. coli* Suppressorstammes wird dann das Fusionsprotein produziert, das in die Proteinhülle der Phagen eingebaut wird. Die gebildeten Phagen enthalten insgesamt fünf Kopien des gpIII Proteins auf der Oberfläche, wobei ein Teil davon als Fusionsprotein vorliegt. Um die Infektiösität der Phagen zu sichern, müssen nicht fusionierte gpIII Kopien auf der Phagenoberflächen vorhanden sein (Vieira & Messing 1987).

Die Durchmusterung der Phagenbibliothek nach Varianten mit Affinität zu einem gewünschten Liganden beruht auf einem Anreicherungsprozeß, in dem Phagenpartikel mit einer niedrigen Affinität zum immobilisierten Liganden unter Erhalt der starken Binder ausgewaschen werden. Diese Methode wird „*Panning*“ genannt. Der Namen rührt von der Prozedur des Goldwaschens her, bei dem die Goldpartikel vom restlichen Flusssediment durch wiederholtes Schütteln abgetrennt werden. Die an den immobilisierten Liganden gebundenen Phagen werden durch einen pH-Schock, Proteolyse, chaotrope Salze oder durch Konkurrenz mit einem bestimmten Liganden eluiert. Die eluierten Phagen sind immer noch biologisch aktiv und können durch eine Reinfektion von *E. coli* F⁺ Zellen vermehrt werden (Abb. 7) (Collins 1997).

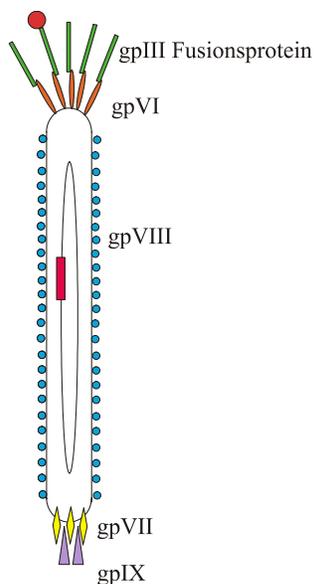


Abb. 6: Schematische Struktur eines M13 Phagenpartikels mit einem gpIII-Fusionsprotein bei monovalentem *Phage Display*.

2.2.3.2 Herstellung von Phagen durch Infektion des Phasmid tragenden TG1 Stammes mit dem Helferphagen M13KO7

Für die Präsentation eines Proteins auf der Oberfläche des M13 Phagen wird ein Phasmid tragender F⁺ *E. coli* Amber-Suppressorstamm wie TG1 mit dem Helferphagen M13KO7 infiziert.

M13KO7 enthält im Genom den Kanamycinresistenz-Marker und liefert bei der Infektion der Zellen die notwendige genetische Information für die Verpackung des pCANTABhisJ Phasmids, das für das HisJ-gpIII Fusionsprotein auf der Phagenoberfläche kodiert. Das pCANTABhisJ Phasmid vermittelt den Zellen eine Ampicillinresistenz.

Bei der Herstellung der HisJ-präsentierenden Phagen wurde der Phasmid tragende *E. coli* Stamm TG1 von einer M9-Minimalplatte oder aus einer DMSO Kultur in 3 ml dYT Medium mit Ampicillin inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ = 1 vermehrt. Die Zellen wurden dann mit ca. 2×10^{10} pfu (*plaque forming units*) M13KO7 Helferphagen versetzt und 1 h infiziert, wobei sie eine durch den Helferphagen vermittelte Kanamycinresistenz exprimierten. Die gesamte Kultur wurde danach in 100 ml dYT Medium mit Ampicillin und Kanamycin übertragen und 4,5 h bei 37°C geschüttelt. Dabei wurden Zellen selektiert, die das Phagemid enthielten und mit dem Helferphagen infiziert waren.

Für die Herstellung der Phagenbibliothek wurde die bei -80 °C eingefrorene Kultur der mit dem *hisJ*-Genrepertoire transformierten TG1 *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. 400 ml LB-*Amp* Medium wurden mit 500 µl der Kultur (ca. $1 \cdot 10^{11}$ lebende Zellen) angeimpft und ca. $1 \cdot 10^{13}$ pfu M13 Helferphagen zugegeben. Die Zellen wurden 1 h bei 37 °C geschüttelt, danach wurden 75 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Kultur ließ man 4,5 h bei 37°C weiter schütteln.

Die Phagen wurden anschließend durch zweimalige PEG Fällung einkonzentriert.

2.2.3.3 Einkonzentrieren der Phagen durch Fällung mit Polyethylenglycol

Die Zellen aus einer 100 ml Phagenkultur wurden für 20 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde mit 1/6 Vol. PEG/NaCl-Lösung versetzt, 1 h auf Eis inkubiert und die gefällten Phagen danach 30 min bei 4 °C und 15000 rpm abzentrifugiert. Das Phagenpellet, das restliche Zellen enthielt, wurde in 20 ml TES Puffer resuspendiert und die Zellen 10 min bei 4 °C und 12000 rpm abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Phagen wurden nochmals mit 1/5 Vol. PEG/NaCl 40 min gefällt und danach erneut 30 min bei 4 °C und 15000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml TES Puffer gelöst und die Zellen anschließend 10 min bei 4 °C und 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter (0,45 µm) filtriert und das Phagenkonzentrat mit 15 % Glycerin bei -20 °C gelagert.

Phagen, die im *Panning* gegen einen Liganden eingesetzt wurden, wurden vor der Lagerung über Nacht jeweils gegen 7 M Harnstofflösung und 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2, 200 mM NaCl, dialysiert. Dadurch sollten Rezeptoren auf der Phagenoberfläche durch das Denaturieren im Harnstoff Renaturieren im Phosphatpuffer von den eventuell gebundenen Liganden befreit werden.

2.2.3.4 Bestimmung der Phagenkonzentration durch Infektion des *E. coli* TG1 Stammes

Zur Bestimmung der pfu der Phagen wurde aus der Phagenstammlösung eine Verdünnungsreihe im dYT Medium gemacht. Zu 600 µl dYT wurden jeweils 200 µl einer Übernachtskultur des TG1 Stammes in M9 Flüssigmedium sowie 200 µl der entsprechenden Verdünnung der Phagen zugegeben. Die Kultur wurde 30 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert und danach 100 µl auf LB-*Amp* Festmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend die Kolonien gezählt.

2.2.3.5 Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche

Zum Nachweis des HisJ-gpIII Proteins auf der Phagenoberfläche wurden ca. 10^{11} pfu über einen Sucrosegradienten aufgereinigte Phagen auf 20 µl mit TE Puffer verdünnt bzw. in der *Speedvac* einkonzentriert und mit 10 µl Proteinauftragspuffer mit 1% Mercaptoethanol versetzt. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 95°C inkubiert. Nach der Abkühlung wurde die Probe auf ein 12,5 %-iges SDS Gel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine in einem Western Blot Verfahren auf die Nitrocellulosemembran transferiert und ein immunochemischer Nachweis mit einem anti-HisJ bzw. anti-E Tag spezifischen Antikörper durchgeführt.

2.2.3.6 Panning

Beim *Panning* werden Phagenpartikel, die Proteinvarianten auf der Oberfläche präsentieren, durch Infektion Phagemid-Bibliotheken enthaltender *E. coli* Zellen mit M13-Helferphagen produziert und mit dem immobilisierten Zielmolekül inkubiert. Die Partikel mit geringer Affinität fortgewaschen, die verbliebenen eluiert und die DNA durch Infektion frischer Bakterienzellen vermehrt. Die angereicherten Klone können dann für den nächsten Zyklus erneut infiziert werden (Abb. 7) (Collins, 1997).

Für jede *Panning* Runde wurden 4 Mikrotiter-*Wells* der CovaLink™ Platten verwendet, an die das Target-Molekül immobilisiert wurde (Biotin als EZ-Link™ Biotin PEO-LC-Amin

oder polyklonales anti-HisJ Serum). Es wurden jedes Mal zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $2 \cdot 10^{12}$ Phagen in 10 mM Natriumphosphatpuffer, 200 mM NaCl, pH 7,2 eingesetzt. In jedes *Well* wurden 300 μ l der Phagenlösung pipettiert, 60 min ohne Schütteln und 2 h mit Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurden die *Wells* zehnmal mit PBS *Tween* und zehnmal mit PBS Puffer gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden mit 100 μ l/*Well* Glycin/HCl Puffer, pH 2,2 eluiert. Die eluierte Phagenlösung wurde mit 24 μ l 2 N Tris-Base und die *Wells* mit Glycin/Tris/HCl Puffer, pH 7, neutralisiert. Zur Vermehrung der gebundenen Phagen wurde die gesamte neutralisierte Phagenlösung 30 min bei 37 °C mit 9,5 ml Zellkultur von *E. coli* TG1, OD₆₀₀ = 0,5 ohne Schütteln inkubiert. Parallel wurden die neutralisierten, leeren *Wells* mit je 300 μ l der TG1 Zellen OD₆₀₀ = 0,5 unter gleichen Bedingungen inkubiert. Dabei werden sie von evtl. stark bindenden Phagen infiziert, die durch den pH Schock nicht eluiert werden (*in situ* Infektion). Eine Verdünnungsreihe der infizierten Zellen wurde auf LB-*Amp* Agar-Medium ausplattiert, um die Anzahl der gebundenen Phagen zu bestimmen. Die restlichen Zellen wurden 15 min bei 4 °C und 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet ebenfalls auf LB- *Amp* Festmedium ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und die Zellen danach gewaschen.

Für die Reinfektion wurden 3 ml dYT-*Amp* Medium mit 200 μ l der Zellsuspension und 50 μ l M13 Helferphagen Lösung versetzt. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden je 1,5 ml der infizierten Kultur in 2 x 50 ml dYT-*KanAmp* (75 μ g/ml Kanamycin, 100 μ g/ml Ampicillin) überführt und 5,5 h bei 37 °C geschüttelt, da eine Inkubation über Nacht evtl. zu Deletionen im Phagengenom führen könnte. Die Phagen wurden danach der Vermehrung zweimal mit PEG/NaCl gefällt und in 1 ml TE Puffer aufgenommen. Phagen, die gegen Biotin durchmustert wurden, wurden anschließend jeweils über Nacht gegen 7M Harnstoff und 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 200 mM NaCl dialysiert. Durch die De- und Renaturierung werden die auf den Phagen präsentierten Rezeptoren von evtl. im Medium vorhandenen potentiellen Liganden.

Die so präparierten Phagen wurden für die nächste *Panning*-Runde eingesetzt. Die Vermehrung, Präparation und *Panning* der eluierten (schwache Binder) bzw. gebundenen, aber nicht eluierten Phagen (starke Binder) erfolgte beim *Panning* gegen das Biotin separat.

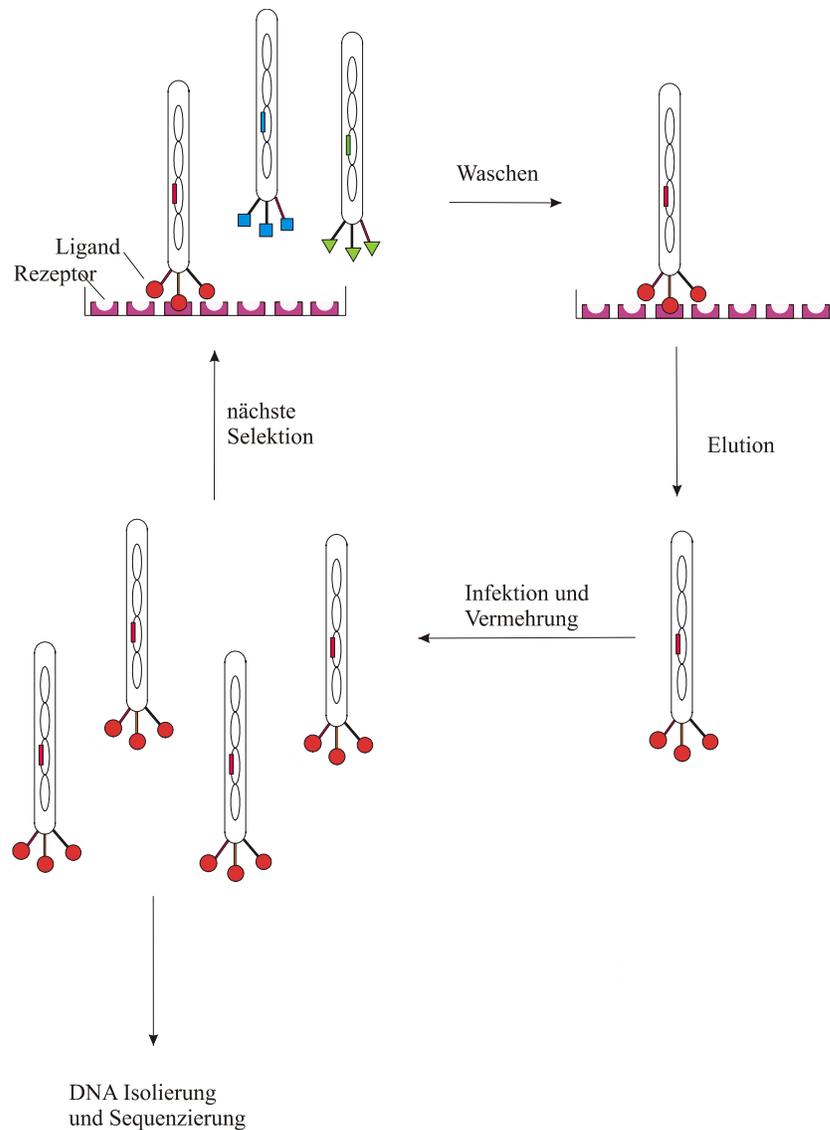


Abb. 7: Schematische Darstellung der *Panning*-Prozedur einer Phagenbibliothek. An einem immobilisierten Target-Molekül binden Phagen, die Proteinvarianten mit einer hohen Affinität zum Liganden besitzen. Die nicht bindenden Phagen werden ausgewaschen und die gebundenen z. B. durch eine drastische Veränderung des pH-Wertes eluiert. Mit der eluierten Phagen-Fraktion werden *E. coli* Zellen infiziert und durch Inkubation der Kultur bei 37 °C die Phagen vermehrt. Sie werden für die nächste *Panning*-Runde eingesetzt. Insgesamt werden vier bis fünf Runden *Panning* durchgeführt, wobei eine Anreicherung der gebundenen gegenüber den nicht gebundenen Phagen stattfinden sollte. Nachdem die bindenden Varianten selektiert wurden, wird die für das Protein kodierende DNA isoliert und sequenziert.

2.2.4 Chemische Methoden

2.2.4.1 Aktivierung der CovaLink™ Mikrotiterplatten und Kopplung von EZ-Link™ Biotin-PEO-LC-Amin

Die Polystyren Oberfläche der CovaLink™ Mikrotiterplatten trägt einen *Spacer* (ca. 16 Å) mit einer terminalen primären Aminogruppe, an die eine Carboxyl- bzw. eine weitere Aminogruppe angekoppelt werden kann. Die Beladung mit funktionellen Gruppen beträgt 0,45 nmol/*Well*, dies entspricht $1,5 \cdot 10^{14}$ /*Well*. Für die Kopplung zweier Aminogruppen miteinander muß die terminale Aminogruppe des *Spacers* mit Cyanurchlorid (**1**) aktiviert werden. Die Reaktion erfolgt nach dem Mechanismus einer nukleophilen aromatischen Substitution (Creighton, 1993).

30 µl einer 1,6 %-iger Lösung von Cyanurchlorid in Aceton wurden in 450 µl 0,1 M Kaliumphosphat Puffer (pH 7) gelöst. 100 µl der Lösung wurden in jedes *Well* pipettiert und 5 min bei RT inkubiert.

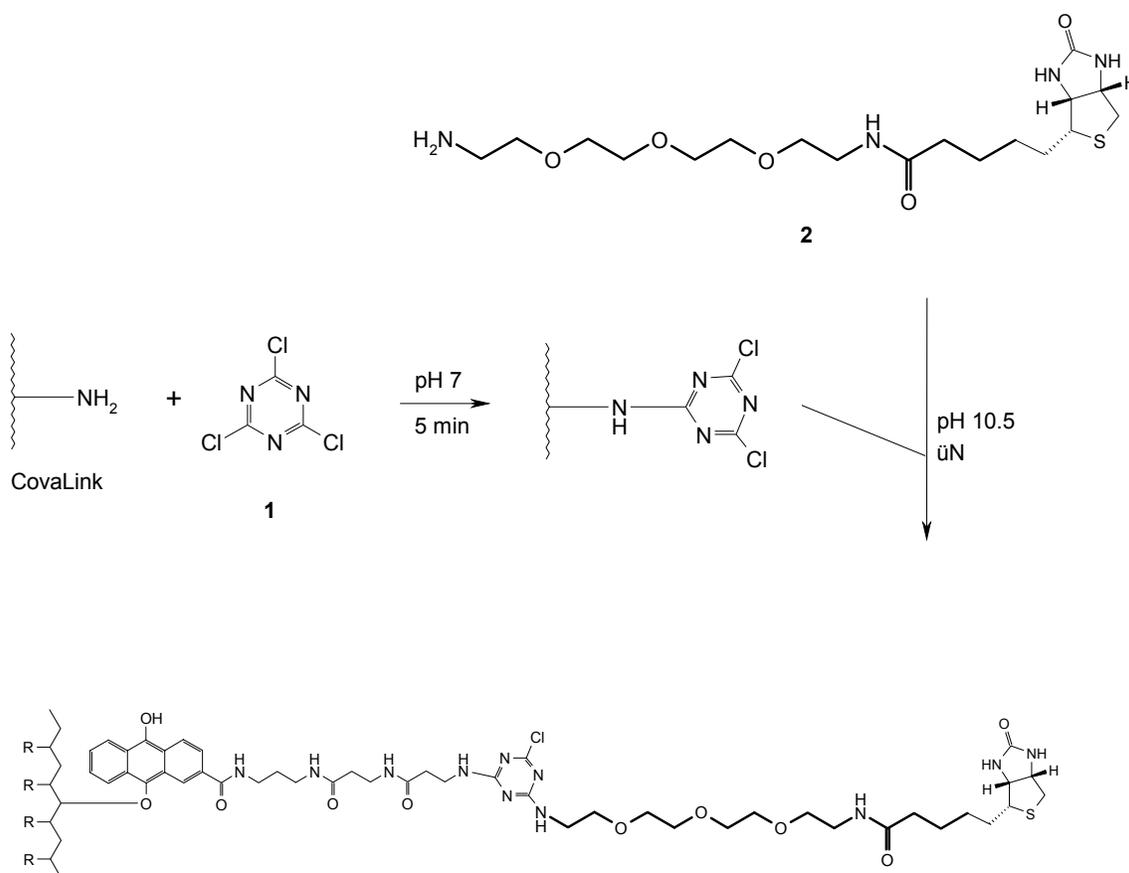


Abb. 8: Reaktionsweg der Kopplung von Biotin-PEO-LC-Amin (**2**) an die CovaLink™ Mikrotiterplatten.

Die mit Cyanurchlorid aktivierten CovaLink™ Platten wurden mit einer 10 µM Lösung EZ-Link™ Biotin PEO-LC-Amin in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 10,5 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (2,5 nmol Biotin/Well). Nach dreimaligem Waschen mit PBS Tween Puffer wurden die nicht umgesetzten aktivierten Aminogruppen des Spacers mit 3 % Perfect Block™ (Mobictec) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 10,5 geblockt (2 h, RT). Die Kopplung wurde immunochemisch mit alkalische Phosphatase konjugiertem Streptavidin nachgewiesen. Als Kontrolle diente ein *Well*, das nur mit Streptavidin-AP Konjugat inkubiert wurde. Die Probe ergab ein Signal mit $V_{\max} = 0,014$, wogegen bei der Kontrolle kein signifikantes Signal detektiert wurde ($V_{\max} = 0,001$).

2.2.4.2 Synthese, Aufreinigung und Analyse der randomisierten Oligonukleotide unter Verwendung von Trinukleotidphosphoramiditen

Die Oligonukleotide wurden nach der trägergebundenen β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Methode (Beaucage & Caruthers, 1981) auf einem vollautomatischen DNA-Synthesizer vom Typ Gene-Assembler-Plus (Pharmacia) synthetisiert. Die chemische DNA-Synthese verläuft im Gegensatz zur enzymatischen DNA-Synthese aufgrund der hohen Reaktivität der 5'-OH Gruppe normalerweise von 3'- in die 5'-Richtung. Die Matrize trägt das am 3'-Ende gekoppelte Nukleosid mit einer DMTr-geschützten 5'-OH Gruppe. Nach der Abspaltung der DMTr-Gruppe wird ein weiteres Nukleosid zugeführt, das am 3'-Ende eine Phosphoramidit-Funktion trägt (Brown 1991). Die Synthese wurde mit einem modifizierten DNA-Synthesizer mit vorgefertigten Mischungen von Trinukleotiden an einer Polystyrol-Matrix im 0,2 µmol Maßstab durchgeführt. Bei dem modifizierten DNA-Synthesizer handelte es sich um eine Kombination eines standardmässigen DNA-Synthesizers vom Typ *Gene Assembler Plus* (Pharmacia) mit einer HPLC Injektionsanlage vom Typ 2157 *Autosampler* (LK-Bromma). Diese Vorrichtung erlaubte eine direkte Kopplung eines Codon bzw. vorgefertigter Codonmischungen an gewünschten Positionen (Hartsch, 1998). Mit einem Durchflußphotometer wurde die Absorption im Eluat bei einer *Wellenlänge* von 436 nm gemessen, was die Detektion und Quantifizierung der abgespaltenen 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe während der Synthese erlaubte. Aus den Detritylierungswerten können die Kopplungseffizienzen der einzelnen Kopplungsschritte berechnet werden (Caruthers *et al.*, 1987). Die Kopplung wird durch Protonierung der N,N-Diisopropylamino-Gruppe mittels Tetrazol katalysiert, die in dieser Form als Abgangsgruppe fungiert. Die Bindung zwischen dem Phosphoratom und dem 5'-Sauerstoffatom des immobilisierten Nukleosides führt zur Bildung eines Dimers an der Festphase. Die nicht umgesetzten 5'-OH Gruppen werden durch die Umsetzung mit Acetanhydrid deaktiviert (*capping*). Nach der *capping*

Reaktion wird der dreiwertige Phosphitriester mit Iod und Wasserstoffperoxid zum stabileren Phosphattriester oxidiert und ein weiteres Nukleosid kann gekoppelt werden. Nach jedem Schritt wird die Matrix mit Dichlorethan gewaschen. Der *capping* Schritt verhindert bei einer fehlgeschlagenen Kopplung eines Bausteines die Kopplung des nächsten Nukleosides, so dass der Anteil der Sequenzen mit Einzelnukleotid-Deletionen reduziert wird (Brown 1991).

Bei der kombinatorischen Oligonukleotidsynthese werden an ausgewählten Positionen vorgefertigte Mischungen an Trinukleotidphosphoramiditen, die für bestimmte Aminosäuren codieren, eingesetzt. Die Behälter mit den einzelnen Nukleosiden, den Lösungsmitteln und den Reagenzien sind an den DNA-Synthesizer angeschlossen. Die Behälter mit den in Acetonitril gelösten Mischungen befinden sich in einem drehbaren Karussell, das ein Teil des *Autosamplers* ist. Mit Hilfe des HPLC-Injektionsapparates werden an bestimmten Positionen die Codonmischungen dem DNA-Synthesizer zugeführt. Der Verlauf der Synthese und die Oligonukleotidsequenz wird durch ein Syntheseprogramm gesteuert (Hartsch, 1998). Die monomeren Bausteine der DNA-Synthese werden als A, C, G bzw. T und die Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen als X gekennzeichnet. In dieser Weise ist die kombinatorische Synthese eines Genrepertoires kontrollierter Diversität möglich.

2.2.4.2.1 Handhabung von Trinukleotidphosphoramiditen zur Oligonukleotidsynthese

Die Trinukleotide (5'-DMTr-N*pN*pN*-3'-OH) sowie die Trinukleotidphosphoramidite wurden unter Schutzgas gelagert. Die Trinukleotidphosphoramidite bzw. die Mischung von Trinukleotidphosphoramiditen wurde zügig in trockenen 3 ml V-Vials (Wheaton, Millerville NJ) abgewogen und ggf. mit trockenen Acetonitril in Gegenwart von Molsieb gelöst. Es wurden ausschließlich trockene Lösungsmittel verwendet. Die Gefäße wurden vor dem Benutzen mindestens 1 h bei 200°C getrocknet und in einem Exsikkator unter Vakuum abgekühlt.

Die Endkonzentration betrug 0,1 M und noch Zur Synthese von Oligonukleotiden wurde das erforderliche Volumen unter Schutzgas in trockene Probengefäße (700 µl, V-Vials (Chromacol, Trumbull) für den Autosampler Typ 2157 überführt.

2.2.4.2.2 Phosphitylierung der Trinukleotide

Die β -Cyanoethyl-Phosphoramidite mit den Standard-Schutzgruppen trugen am 5'-Ende eine 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe und am 3'-Ende eine Phosphoramidit-Funktion, über die eine Kopplung mit einer freien 5'-OH Gruppe der an eine Festphase gekoppelten wachsenden Oligonukleotidkette möglich war. Diese Phosphoramidit-Funktion wurde in einer Reaktion mit 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphan eingeführt.

Dafür wurden 0,5 mmol des entsprechenden Trinukleotides (5'-DMTr-N*pN*pN*-3'-OH) durch Codestillation mit absolutem Acetonitril getrocknet und anschließend in 5 ml Dichlorethan gelöst. Zu dieser Lösung wurde dann unter Argon 255 µl trockenes N,N-Diisopropylethylamin (1,5 mmol, M_r 130,1 g/mol) und 220 µl 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphan (1 mmol, M_r 236,7 g/mol). Nach beendeter Reaktion (1,5 h, DC-Kontrolle) wurde 500 µl Ethanol zugegeben und mit 50 ml Dichlorethan verdünnt. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Produkt über Pentanfällung aufgereinigt. Man erhielt Ausbeuten von 90-98 %.

2.2.4.2.3 Bestimmung der Kopplungseffizienz von Trinukleotidphosphoramiditen

Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz von Trinukleotidphosphoramiditen bei der Synthese des Standardoligonukleotids 5'-TCXYZT-3' im Synthesemaßstab von 0,2 µmol wurden 50 µl gelöstes Trinukleotidphosphoramidit (0,1 M) über den angeschlossenen Autosampler Typ 2157 (LKB Bromma) im Standardsynthese Programm mit einer auf 15 min erhöhten Kopplungszeit zugeführt.

Von vorgefertigten äquimolaren Mischungen an Trinukleotidphosphoramiditen wurden bei weiteren Oligonukleotidsynthesen zur Erhöhung der Kopplungseffizienz über das Syntheseprogramm 02TH2X15 (Hartsch, 1998) zweimal nacheinander 50 µl (0,1 M) für je 15 min gekoppelt. Um Fehlsequenzen zu vermeiden, wurde eine doppelte *Capping*-Reaktion nach der Trinukleotidkopplung durch das Syntheseprogramm 02THC2X durchgeführt.

2.2.4.2.4 Vorbereitung der Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen für die Oligonukleotidsynthese

Die Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen für die Oligonukleotidsynthese enthielten für jede zu randomisierende Position 0,0825 µmol jedes Trinukleotidphosphoramidites, ausgenommen das Codon für Cystein (5'-DMTr-TpGpC-3'-phosphoramidit). 5'-DMTr-GpGpT-3'-phosphoramidit wurde aufgrund einer relativ niedriger Kopplungseffizienz (40 %) in einem zweifachen Überschuß gegenüber den restlichen Trinukleotiden (0,165 µmol) beigemischt. Es wurde ein Trinukleotid-Gemisch für 20 Ansätze vorbereitet. Dafür wurden die entsprechenden Mengen an Trinukleotidphosphoramidit gemischt und in einem Endvolumen von 4 ml in trockenem Acetonitril gelöst. Das ungelöste Material wurde durch Zugabe von max. 1,0 % (v/v) trockenen DMF in Lösung gebracht. Die Lösung wurde zu je 200 µl in trockenen Gefäßen (2 ml *crimp top vials*, Chromacol) aliquotiert und die

Mischungen bis zur Trockne unter Vakuum bei 40 °C eingeengt. Sie wurden anschließend über Nacht im Vakuum getrocknet und unter Argon bei –20 °C gelagert.

Von den Wildtypcodons eingesetzten Trinukleotidphosphoramiditen wurden jeweils 3,85 µmol in trockenen Probegefäßen abgewogen (2 ml *crimp top vials*, Chromacol) und unter Argon bei –20 °C gelagert.

Für die Synthese wurde eine 0,1 M Lösung vorgefertigt, für die 70 % reines Wildtypcodon und 30 % der Mischung aus 19 Codons (ausgenommen Cystein) eingesetzt wurden. Zur leichteren Handhabung verwendete man für jeden Ansatz die gleiche Trinukleotidmischung, so dass es sich in jeder vorgefertigten Probe 71,6 % Wildtypcodon befand. Dafür wurden die aliquotierten equimolaren Trinukleotidmischungen in 55 µmol trockenes Acetonitril gelöst und zu dem entsprechenden Wildtypcodon zugegeben. Die Lösung wurde in ein trockenes Gefäß (700 µl, V-Vials, Chromacol) überführt und mit Argon überschichtet. Das Gefäß wurde mit einer Kapsel verschlossen und für die Lösung sofort für die Synthese verwendet.

2.2.4.2.5 Synthese von 5'-phosphorylierten Oligonukleotiden

Zur Synthese wurden 0,1 M Lösungen von vorgefertigten Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen und eine 0,5 M H-Tetrazol-Lösung in trockenen Acetonitril als Aktivator-Lösung verwendet. Mit 1 % (w/v) Trichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan wurde detrityliert und die *Capping*-Reaktion mit einer Lösung aus gleichen Volumina einer 20 %-igen (v/v) N-Methylimidazol-Lösung in Acetonitril und 40 % (v/v) Lösung an Essigsäure-Anhydrid in Acetonitril. Zur Oxidation wurde eine Lösung aus Iod (0,25 % (w/v)), Wasser (30 % (v/v)) und Collidin (6 % (v/v)) in Acetonitril verwendet. Zum Herauswaschen der nicht wasserfreien Chemikalien wurde 1,2-Dichlorethan verwendet. Für die Synthese der Oligonukleotide wurde das Programm 02THC2X verwendet. Nach der Kopplung des letzten Nukleotides wurden die Säulen mit den auf der Festphase gebundenen, 5'-tritylierten Oligonukleotiden 5 min in einer Speedvac getrocknet und bei –20°C gelagert. Für die Phosphorylierung verwendete man das Phosphoramidit CPRII. Die Detritylierung, Aktivierung, *Capping*-Rektion und Oxidation wurden unter gleichen Bedingungen wie bei der Oligonukleotidsynthese durchgeführt, die Phosphitylierung erfolgte 6 min mit 0,1 M CPRII Lösung in trockenem Acetonitril. Die Säulen wurden danach 5 min in einer Speedvac getrocknet und für die weitere manuelle Aufarbeitung verwendet.

2.2.4.2.6 Abspaltung der Oligonukleotide von der Matrix und Entfernen der Schutzgruppen

Die auf der auf der Festphase gebundenen Oligonukleotide enthielten eine tritylierte 5'-Phosphatgruppe. Der Trityl-Rest war für die spätere Aufreinigung der Oligonukleotide mit der RP-HPLC notwendig. Die Oligonukleotide trugen außerdem die Basenschutzgruppen (s. 5.2.6) und die 2-Chlorphenylschutzgruppen an den internen Phosphatgruppen.

Die 2-Chlorphenyl-Schutzgruppen wurden mit der Oximat-Lösung (0,422 mmol *syn*-2-Nitrobenzaldoxim, 0,4 mmol 1,1,3,3-Tetramethylguanidin in 1 ml Dioxan : Wasser 1:1 (v/v)) abgespalten. Die zugegebene Menge richtete sich nach der Anzahl der Chlorphenyl-Schutzgruppen im Oligonukleotid. Für eine Schutzgruppe bei 0,2 µmol Synthesemaßstab wurden 5 µl Oximatlösung zugegeben. Das Support wurde mit der Oligonukleotidkette 26 h in der Oximatlösung bei RT inkubiert (Eckstein 1991, Gait 1984). Der Überstand wurde verworfen und das Support nach dem Waschen mit Dioxan/Wasser 1:1 14 h mit 25 %-iger Ammoniaklösung bei 55 °C inkubiert. Dabei wurden die Basenschutzgruppen abgespalten und das Oligonukleotid von der Matrix gelöst. Der Überstand wurde im Vakuum eingeeengt und das Oligonukleotid mit einer Saphadex Säule (NAP-5) vorgereinigt, die zuvor mit 1 % Ammoniak Lösung äquilibriert wurde. Die eluierten Fraktionen, die das Oligonukleotid enthielten wurden vereinigt und zur Trockne eingeeengt.

2.2.4.2.7 Aufreinigung von Oligonukleotiden mittels Reverse Phase-HPLC

Die Synthese der Oligonukleotide mit 5'-Dimethoxytritylschutzgruppe ermöglichte nach der Abspaltung der Basenschutzgruppen eine Reinigung des Oligonukleotids über eine C18 *Reversed Phase-HPLC*-Säule (Silica HD-SIL-18-5s-100, Nucleosil 100-5C18, Macherey Nagel) (Fritz *et al.*, 1978; Sonveaux, 1994). Zur präparativen Aufreinigung wurde das gesamte Rohprodukt in 500 µl HPLC-Startpuffer (90,5 % (v/v) TEAA-Puffer, 9,5 % (v/v) Acetonitril) gelöst, die Probe injiziert und mit einem linear ansteigenden Acetonitril-Gradienten bei einer Flußrate von 1 ml/min chromatographiert. Der Verlauf des Gradienten ist in Tab. 8 aufgeführt.

Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm verfolgt.

| t (min) | B % |
|---------|-----|
| 0 | 9,5 |
| 2 | 9,5 |
| 35 | 45 |
| 36 | 50 |
| 38 | 50 |
| 40 | 9,5 |

Tab. 6: Gradient bei der Aufreinigung der Oligonukleotide mittels RP-HPLC. B ist der prozentuale Anteil von Aceton im Laufmittel im Verlauf der Chromatographie

2.2.4.2.8 Detritylierung von Oligonukleotiden

Die gesammelte Fraktionen aus Reinigung mittels *Reversed Phase-HPLC* wurden in der *Speedvac* (SpeedVac Concentrator SVC 100H, Savant) zur Trockne eingengt. Zur Detritylierung wurden die Proben in 150 μl 80 % (v/v) Essigsäure gelöst und 15 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde anschließend lyophilisiert, in 300 μl H₂O gelöst und erneut unter Vakuum getrocknet. Nach Aufnahme in 500 μl H₂O wurde der abgespaltene Trityl-Rest durch dreimalige Extraktion mit je 500 μl Diethylether entfernt und die Probe lyophilisiert.

2.2.4.2.9 Analyse von Oligonukleotiden mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Oligonukleotide wurden in Polyacrylamidgelen (Dimension: 400 x 200 x 1,5 mm) mit TBE als Laufpuffer unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Gele enthielten 15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (Gewichtsverhältnis 19 : 1), 1 x TBE-Puffer und 7,7 M Harnstoff. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Leistungsaufnahme von 20-25 W durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/3 Vol. Formamidfarbmarker, 80 % (v/v) Formamid (in TBE-Puffer) versetzt, 3 min bei 90 °C denaturiert und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden im Gel durch UV-Schattierung auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ unter Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) detektiert.

2.2.5 Computergestützte Planung und Auswertung von Experimenten

Zur Analyse und Verarbeitung von DNA- und Protein-Sequenzdaten wurde das Programmpaket *UWGCG* (Devereux *et al.*, 1984) verwendet, das auf einer VAX 9000 Rechenanlage (Digital Equipment Corporation) installiert war. Strukturdaten von Proteinen wurden der *Brookhaven Protein Data Bank* (Bernstein *et al.*, 1977) entnommen. Für die graphische Darstellung und Modellierung von Proteinstrukturen wurde eine Indigo² Graphik Workstation mit XZ Graphik unter dem Betriebssystem IRIX 5.2 mit dem Programmpaket *InsightII* (Biosym).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Durch Randomisierung der Bindungstasche des Histidin-Bindeproteins HisJ sollte unter Einsatz bestimmter Codonmischungen ein Genrepertoire mit einer festgelegten Populationsstruktur synthetisiert werden. Das *hisJ*-Genrepertoire sollte aus mehreren, teilweise aus randomisierten Oligonukleotiden assembliert und als eine Klonbibliothek etabliert werden. Diese Populationsstruktur sollte durch Sequenzierung und statistische Analyse zufällig ausgewählter Klone charakterisiert werden. Das Rezeptorenrepertoire sollte mit Hilfe von *Phage Display* in einem Modellexperiment nach Varianten durchmustert werden, die einen niedermolekularen Liganden binden.

3.1 Kombinatorische Synthese des *hisJ*-Genrepertoires

3.1.1 Allgemeines und Planung der Synthese des Genrepertoires

3.1.1.1 Vorteile der codonweisen Mutagenese

Bei der Herstellung von Protein-Bibliotheken ist es von Vorteil, die theoretisch mögliche Anzahl der Klone auf die am besten geeigneten Varianten zu begrenzen. Dadurch kann bei der Transformation, die als ein limitierender Faktor für die Größe eines Repertoires angesehen werden kann, der Anteil der funktionsfähigen Proteine in der Bibliothek vergrößert werden. Durch die Auswahl bestimmter Positionen im Gen für die Mutagenese, die für die Aktivität des Proteins eine entscheidende Rolle spielen oder Ausschließen bestimmter Codons (z. B. Stop Codons oder Cysteine, die Faltung des Proteins negativ beeinflussen würden), kann die Mutagenese auf sinnvolle Bereiche und Codons beschränkt werden. Die Möglichkeit, Codonmischungen in einem beliebigen molaren Verhältnis einzusetzen, erlaubt eine vollständig kontrollierte Teilrandomisierung eines Gens. Durch eine kombinatorische Gensynthese unter Verwendung entsprechender Codonmischungen können unerwünschte Aminosäuren an bestimmten Positionen aus den Bibliotheken ausgeschlossen werden. Die Dotierung der Codonmischungen mit einem bestimmten Wildtypcodonanteil erlaubt die Kontrolle der Mutationsraten an bestimmten Positionen sowie der durchschnittlichen Anzahl der Mutationen.

Die Erzeugung des *hisJ*-Genrepertoires erfolgte durch eine kombinatorische Oligonukleotidsynthese nach der Trinukleotidphosphoramidit-Methode (Virnekäs *et al.*, 1994) unter Einsatz definierter, vorgefertigter Codonmischungen. Durch die Verwendung

eines definierten Wildtypcodon-Anteiles bei der Gensynthese sollte eine bestimmte Populationsstruktur geschaffen werden.

3.1.1.2 Beschreibung von Trinukleotid-Bausteinen für die kombinatorische DNA-Synthese

Für die vorliegende Arbeit wurden 19 Trinukleotidphosphoramidite verwendet, die aus einem Satz von 25 Trinukleotiden stammen. Dieser wurde von Frau Barbro Beijer (Heidelberg) im Auftrag synthetisiert und ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

1. Vollständigkeit in *sense*-Richtung (Vollständigkeit bedeutet mindestens ein Codon für jede der 20 Aminosäuren verfügbar);
2. Vollständigkeit in *antisense*-Richtung (Ausnahme: kein Codon für Isoleucin, s. u.);
3. Anpassung der *sense*-Codons an die *E. coli Codon Usage* für hochexprimierte Gene (Henaut & Danchin, 1996), vgl. Tab. 9, Klasse II;
4. Minimale Anzahl von lediglich zehn Dinukleotid-Vorstufen (vgl. Tab. 7).

Die zehn Dinukleotid-Vorstufen des Typs 1 (Abb. 9) wurden ausgehend von 5'-DMTr bzw. 3'-Levulinyl-geschützten Nukleosiden hergestellt. Sie konnten entweder in 5'- oder in 3'-Richtung verlängert werden (Zehl *et al.*, 1996). Aus diesen Dinukleotiden konnten auf diese Weise alle benötigten Trinukleotide synthetisiert werden. Die Umsetzung in 5'-Richtung erfolgte durch Abspaltung der DMTr-Gruppe vom Dinukleotid und Kopplung eines 5'-DMTr-geschützten Nukleosides an die entschützte 5'-OH Gruppe. Nach der Abspaltung der Lev-Gruppe erhielt man ein Trinukleotid des Typs 2. Um die Dinukleotide in 3'-Richtung zu verlängern, wurde das Dinukleotid nach einer Entschützung der 3'-OH Gruppe mit Hydrazin mit einem 3'-Levulinyl-geschützten Nukleosid umgesetzt (Abb. 9). Die Entschützung am 3'-Ende lieferte das Trinukleotid des Typs 3, das die gleiche Grundstruktur hat wie das des Typs 2, aber eine andere Reihenfolge der Nukleotide. Da die Reaktion in 5'-Richtung einfacher verlief, wurden die Trinukleotide, soweit möglich, auf diesem Weg hergestellt, andernfalls erfolgte die Synthese in 3'-Richtung. Die Dinukleotide und die Trinukleotide, die auf den unterschiedlichen Wegen synthetisiert wurden, sind in der Tabelle 7 zusammengestellt. Alle Nukleoside und Dinukleotide enthielten bei den Synthesen die Benzoyl- bzw. Isobutyryl-Basenschutzgruppen (s. Abb. 9, Legende) sowie 2-Chlorphenyl-Schutzgruppen an den Phosphatresten.

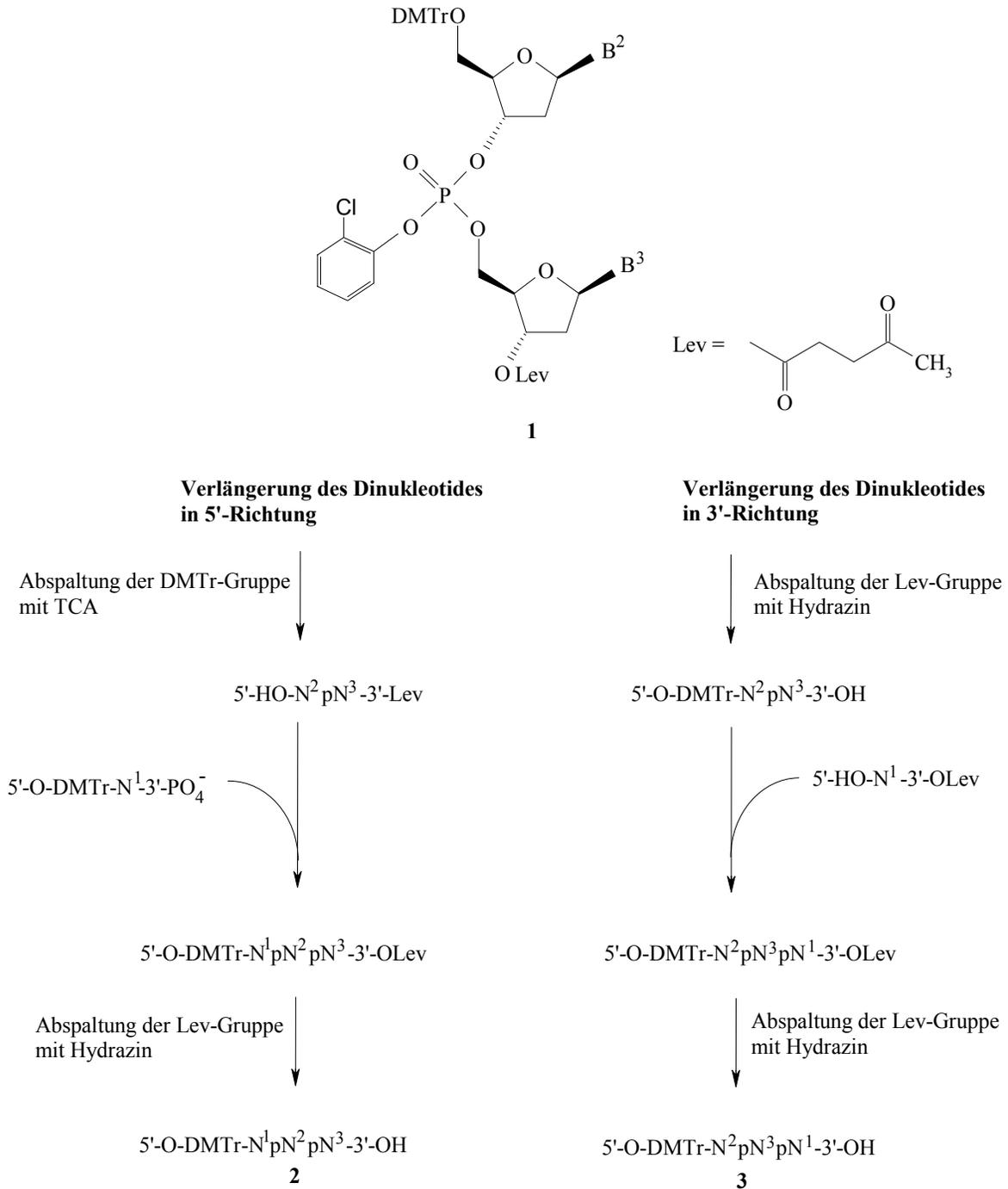


Abb. 9: Schematische Darstellung der Umsetzung von vollgeschützten Dinucleotiden (1) in 5'-Richtung oder in 3'-Richtung (Zehl *et al.*, 1996) zu Trinucleotiden (2). Alle Nucleoside, Di- und Trinucleotide enthielten die Standard-Basenschutzgruppen sowie die 2-Chlorophenyl-Phosphat-Schutzgruppen. N = A^{bz} (N6-Benzoyladenosen), C^{bz} (N4-Benzoylcytidin), G^{ibu} (N2-Isobutyrylguanosen) oder T (Thymin)

| Dinukleotid | Trinukleotide, die durch Verlängerung eines Dinukleotides in 5'-Richtung gewonnen wurden | Trinukleotide, die durch Verlängerung eines Dinukleotides in 3'-Richtung gewonnen wurden |
|-------------|--|--|
| AA | AAA GAA | (AAT) |
| TC | ATC TTC | |
| TG | ATG CTG | TGC TGG |
| AG | CAG | |
| AC | AAC CAC CAC TAC | AAC |
| CG | CCG | |
| GT | CGT GGT | GTA |
| CT | GCT TCT | |
| TT | GTT TTT | |
| CA | GCA CCA | CAT |

Tab. 7: Zusammenstellung der Trinukleotide, die in einer Reaktion 5'- bzw. 3'-Richtung aus den entsprechenden Dinukleotiden synthetisiert wurden (übernommen aus dem Syntheseprotokoll von Frau B. Beijer (Heidelberg)). Die meisten Trinukleotide wurden durch die Umsetzung der Dinukleotide in 5'-Richtung hergestellt, da die chemische Synthese auf diesem Weg einfacher war. Die Synthese des Trinukleotids AAT steht noch aus.

Die Trinukleotide trugen am 5'-Ende eine DMTr-Schutzgruppe, an internen Phosphorgruppen 2-Chlorphenyl-Schutzgruppen, Basenschutzgruppen und eine ungeschützte 3'-Hydroxyl-Gruppe, die in eine β -Cyanoethyl-Phosphoramidit-Funktion umgesetzt werden sollte (Abb. 10). Die Phosphoramidit-Gruppe zeichnet sich nach der Aktivierung mit einer schwachen Säure durch eine hohe Reaktivität aus (Beaucage &

Caruthers, 1981) und führt zu einer schnellen Verlängerung der Oligonukleotidkette bei der DNA Synthese.

Die 2-Chlorphenyl-Schutzgruppen sind im Vergleich mit den β -Cyanoethyl- bzw. Methyl-Schutzgruppen, die ebenfalls für die internen Phosphat-Funktionen der Trinukleotid-phosphoramidite verwendet wurden (Virnekäs, 1994; Lyttle, 1995), bei der chemischen Synthese und Aufreinigung stabiler sowie mit einer Oximat-Lösung leichter abspaltbar (Reese, 1978).

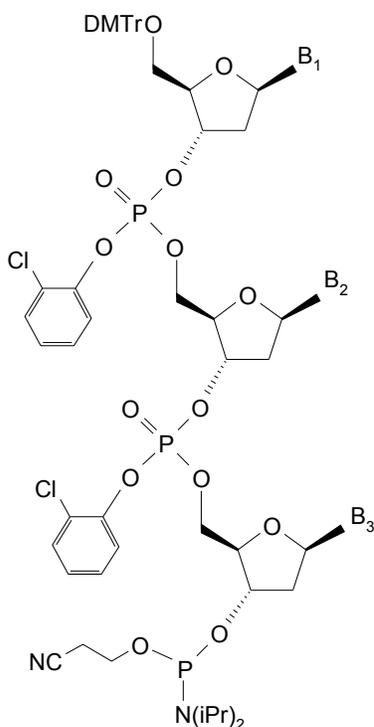


Abb. 10: Allgemeine Struktur eines Trinukleotidphosphoramidites

Den Kern des Trinukleotid-Satzes bildeten Trinukleotide, die bei der Synthese der randomisierten Oligonukleotide als kodierender DNA Strang gemäß der *Codon Usage* in *E. coli* (Henaut & Danchin, 1996) dem jeweils am häufigsten vertretenen Codon bei hochexprimierten Genen entsprachen (Tab. 8, mittelgrau unterlegt). Bei Verwendung desselben Satzes im nichtkodierenden DNA Strang sind manche Aminosäuren (Phenylalanin, Valin, Threonin und Arginin) durch mehr als ein Trinukleotid vertreten. Entsprechend gibt es notwendigerweise Aminosäuren, die überhaupt nicht vertreten sind. Daher wurden fünf weitere Trinukleotide, die im nichtkodierenden DNA Strang den fehlenden Aminosäuren entsprechen, hergestellt. Ein Trimer, das im nichtkodierenden

DNA Strang dem Isoleucin entspricht, war bei dem im Auftrag synthetisierten Satz von Trinukleotiden nicht vorhanden (Tab. 8, hellgrau unterlegt, in Klammern). Von den drei Trinukleotiden, die im (-)-Strang dem Isoleucin entsprechen (AAT, GAT und TAT) könnte nur AAT aus einem der Dinukleotide synthetisiert werden. Es könnte durch die Umsetzung des Dinukleotides AA mit geschütztem Thymidin in 3'-Richtung hergestellt werden. Das komplementäre Codon ATT ist nach der *Codon Usage* bei 33 % der hochexprimierten Genen vertreten.

Für das Arginin standen im nichtkodierenden Strang Trimere zur Verfügung, die nach der *Codon Usage* als Codons in hochexprimierten Genen selten repräsentiert sind (Häufigkeit bei hoch exprimierten Genen < 1 %).

| Trinukleotid | Zuordnung | |
|--------------|--------------------|-------------------------|
| | kodierender Strang | nichtkodierender Strang |
| AAA | Lys | Phe |
| AAC | Asn | Val |
| ACC | Thr | Gly |
| ATC | Ile | Asp |
| ATG | Met | His |
| CAG | Gln | Leu |
| CAC | His | Val |
| CCG | Pro | Arg* |
| CGT | Arg | Thr |
| CTG | Leu | Gln |
| GAA | Glu | Phe |
| GAC | Asp | Val |
| GCA | Ala | Cys |
| GGT | Gly | Thr |
| GTT | Val | Asn |
| TAC | Tyr | Val |
| TCT | Ser | Arg* |
| TGC | Cys | Ala |
| TGG | Trp | Pro |
| TTC | Phe | Glu |
| CAT | His | Met |
| CCA | Pro | Trp |
| GCT | Ala | Ser |
| GTA | Val | Tyr |
| TTT | Phe | Lys |
| (ATT) | Asn | Ile |

Tab. 8: Zusammenstellung der im Auftrag synthetisierten Trinukleotide und ihre Zuordnung im kodierenden bzw. nichtkodierenden DNA-Strang mit den entsprechenden Aminosäuren. Die Auswahl der Codons für die DNA Synthese richtete sich nach der *Codon Usage* von *E. coli* (Henaut & Danchin, 1996). Die mittelgrau unterlegten Trinukleotide gehören zu den häufig repräsentierten Codons (> 50 %) für die entsprechende Aminosäure (dunkelgrau unterlegt) bei hochexprimierten Genen und waren für die Synthese des kodierenden DNA Stranges vorgesehen. Die für die Synthese des *hisJ*-Genrepertoires eingesetzten Trinukleotide sind fett hervorgehoben. Phenylalanin, Valin, Threonin und Arginin sind bei der Verwendung der häufig repräsentierten Codons als Trimere im nichtkodierenden Strang durch mehrere Trinukleotide repräsentiert. Die Aminosäuren, die jeweils dem am besten translatierten Codon entsprechen, sind dunkelgrau unterlegt. Die hellgrau unterlegten Trimere repräsentieren im nichtkodierenden DNA Strang diejenigen Aminosäuren, die bei den häufig repräsentierten Codons als Trinukleotide des nichtkodierenden DNA Stranges (mittelgrau) nicht vertreten waren. Das Trinukleotid ATT war bei dem im Auftrag synthetisierten Trimeren-Satz nicht vorhanden und entspricht im nicht kodierenden DNA Strang dem Isoleucin.

* Das Arginin war im nichtkodierenden DNA Strang von Trinukleotiden repräsentiert, die nach der *Codon Usage* von *E. coli* bei hochexprimierten Genen als Codons relativ selten repräsentiert sind (Häufigkeit bei hoch exprimierten Genen < 1 %).

| Amino Acid | Codon | Class | | | Amino acid | Codon | Class | | |
|------------|-------|--------|--------|--------|------------|-------|-------|-------|-------|
| | | I | II | III | | | I | II | III |
| Phe | ttt | 55.09 | 29.08 | 67.14 | Leu | ctt | 9.70 | 5.56 | 19.00 |
| | ttc | 44.91 | 70.92 | 32.86 | | ctc | 10.40 | 8.03 | 9.04 |
| Leu | tta | 10.99 | 3.44 | 20.09 | | cta | 3.09 | 0.83 | 6.81 |
| | ttg | 13.02 | 5.47 | 15.05 | | ctg | 52.79 | 76.67 | 29.99 |
| Ser | tct | 13.26 | 32.41 | 19.63 | Pro | cct | 13.71 | 11.23 | 28.30 |
| | tcc | 15.02 | 26.56 | 11.34 | | ccc | 11.19 | 1.63 | 16.26 |
| | tca | 10.83 | 4.79 | 22.09 | | cca | 18.63 | 15.25 | 31.50 |
| | tcg | 16.88 | 7.39 | 10.60 | | ccg | 56.47 | 71.89 | 23.94 |
| Tyr | tat | 54.42 | 35.23 | 69.60 | His | cat | 56.80 | 29.77 | 61.69 |
| | tac | 45.58 | 64.77 | 30.40 | | cac | 43.20 | 70.23 | 38.31 |
| TER | taa | | | | Gln | caa | 33.40 | 18.65 | 37.06 |
| | tag | | | | | cag | 66.60 | 81.35 | 62.94 |
| Cys | tgt | 40.90 | 38.85 | 55.71 | Arg | cgt | 38.99 | 64.25 | 26.05 |
| | tgc | 59.10 | 61.15 | 44.29 | | cgc | 43.23 | 32.97 | 21.94 |
| TER | tga | | | | | cga | 5.52 | 1.07 | 12.80 |
| Trp | tgg | 100.00 | 100.00 | 100.00 | | cgg | 8.97 | 0.80 | 13.62 |
| Ile | att | 51.20 | 33.49 | 47.57 | Val | gtt | 23.74 | 39.77 | 34.33 |
| | atc | 44.37 | 65.94 | 26.65 | | gtc | 22.48 | 13.45 | 18.95 |
| | ata | 4.43 | 0.57 | 25.78 | | gta | 14.86 | 19.97 | 21.78 |
| Met | atg | 100.00 | 100.00 | 100.00 | | gtg | 38.92 | 26.81 | 24.94 |
| Thr | act | 14.85 | 29.08 | 26.83 | Ala | gct | 14.52 | 27.54 | 22.86 |
| | acc | 46.83 | 53.60 | 24.45 | | gcc | 27.62 | 16.14 | 23.67 |
| | aca | 10.52 | 4.67 | 27.93 | | gca | 19.63 | 24.01 | 31.27 |
| | acg | 27.81 | 12.65 | 20.80 | | gcg | 38.23 | 32.30 | 22.19 |
| Asn | aat | 40.87 | 17.25 | 64.06 | Asp | gat | 62.83 | 46.05 | 70.47 |
| | aac | 59.13 | 82.75 | 35.94 | | gac | 37.17 | 53.95 | 29.53 |
| Lys | aaa | 75.44 | 78.55 | 72.21 | Glu | gaa | 68.33 | 75.35 | 66.25 |
| | aag | 24.56 | 21.45 | 27.79 | | gag | 31.67 | 24.65 | 33.75 |
| Ser | agt | 13.96 | 4.52 | 18.73 | Gly | ggt | 32.91 | 50.84 | 31.79 |
| | agc | 30.04 | 24.33 | 17.61 | | ggc | 43.17 | 42.83 | 24.51 |
| Arg | aga | 1.75 | 0.62 | 15.63 | | gga | 9.19 | 1.97 | 24.75 |
| | agg | 1.54 | 0.29 | 9.96 | | ggg | 14.74 | 4.36 | 18.95 |

Tab. 9: Codon Usage bei drei Hauptklassen der *E. coli* Gene (übernommen aus: Henaut & Danchin, 1996). Klasse I: Gene, die an den meisten metabolischen Prozessen beteiligt sind. Klasse II: hochexprimierte Gene während des exponentiellen Wachstums. Klasse III: Gene, die am horizontalen Gentransfer teilnehmen.

3.1.1.3 Auswahl der zu mutagenisierenden Aminosäurepositionen und der Codons für die Mutagenese

Für die Generierung des Repertoires von Rezeptoren für niedermolekulare Liganden sollten die Aminosäuren randomisiert werden, die an der Bindung des L-Histidins in HisJ beteiligt sind (Y14, L52, S69, S70, L71, S72, R77, L117, T120, T121, Q122, D161 (Yao *et al.*, 1994)). Zusätzlich sollte die Position D11 randomisiert werden, die im LAOBP an der Bindung des Liganden beteiligt ist (Oh *et al.*, 1994, s. Abschnitt 1.4). Durch die Randomisierung dieser Reste wird die geometrische und die elektrische Natur der

Bindungstasche verändert und eine Basis für die Veränderung der Ligandenspezifität des Rezeptors geschaffen.

Bei der Synthese des *hisJ*-Genrepertoires sollten 19 Trinukleotide verwendet werden, die für unterschiedliche Aminosäuren kodieren (Tab. 8). Das Codon für Cystein sollte nicht eingesetzt werden, um unerwünschte Disulfidbrücken in HisJ-Mutanten zu vermeiden, die zu inkorrektur Faltung der Proteine führen könnten.

3.1.1.4 Planung der Assemblierung des randomisierten *hisJ*-Gens und definieren der Oligonukleotide

Das randomisierte *hisJ*-Gen sollte aus mehreren Oligonukleotiden assembliert werden. Sie wurden so definiert, dass der kodierende DNA Strang aus fünf randomisierten und 13 nicht randomisierten Oligonukleotiden und der nichtkodierende Strang aus 14 nicht randomisierten Oligonukleotiden ligiert werden sollte, wobei alle inneren Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert werden sollten. Die Oligonukleotide waren 16-64 Nukleotide lang und enthielten jeweils einen überlappenden Bereich von 15 Nukleotiden mit einem Oligonukleotid aus dem komplementären Strang. Nach der Hybridisierung der Oligonukleotide sollte ein doppelsträngiges DNA Fragment entstehen, bei dem Bereiche mit randomisierten Positionen des oberen Stranges als Einzelstrang-DNA vorliegen. Die Lücken im nichtkodierenden Strang sollten mit einer Polymerase aufgefüllt und die Phosphodiester-Bindungen mit einer DNA-Ligase gebildet werden (Abb. 11).

Die Verwendung der randomisierten Oligonukleotide nur im kodierenden DNA Strang hätte mehrere Vorteile. Auf diese Weise würde der Aufwand der Synthese des randomisierten nichtkodierenden DNA Stranges vermieden. Außerdem käme die genetische Information so ausschließlich von den randomisierten Positionen des kodierenden DNA Stranges.

Die Konstruktion des randomisierten *hisJ*-Gens über eine Ligation hätte gegenüber einer Amplifikation des Gens in einer PCR den Vorteil, dass eine unsymmetrische Amplifikation der Codons vermieden werden kann, die zu einer starken Überrepräsentation bestimmter Varianten führen könnte.

Während der Synthese des ganzen Gens über eine Ligation aus mehreren Oligonukleotiden kann es durch eine kompetitive Hybridisierung zu einem hohen Anteil von unerwünschten Produkten kommen. Dies wird durch die Hybridisierung der Oligonukleotide in Bereichen von partieller Homologie verursacht. Um das zu vermeiden wurden die Oligonukleotide, aus denen das ganze *hisJ*-Gen aufgebaut werden sollte, mit dem Computerprogramm *Primerfinder* unter www.eatworms.swmed.edu/~tim/primerfinder auf ihre Komplementarität getestet. Eine hohe Homologie in unerwünschten Bereichen, wurde reduziert, indem Mutationen so eingeführt wurden, dass auf der Proteinebene keine

Aminosäurenaustausche auftraten (stille Mutationen). Die Sequenzen der randomisierten Oligonukleotide sind in der Tab. 10 aufgeführt, wobei die Kleinbuchstaben die ausgetauschten Basen darstellen. Die vollständige Sequenz des *hisJ*-Gens mit den ausgetauschten Basen befindet im Abschnitt 5.2.2.

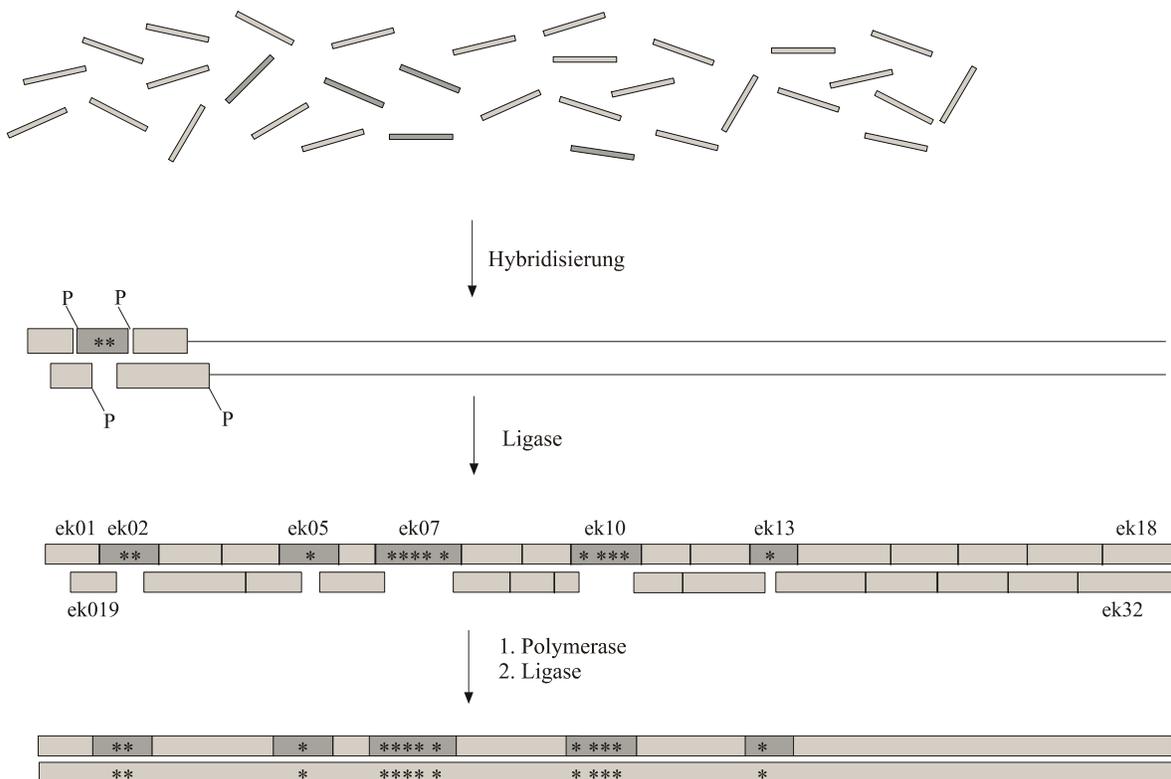


Abb. 11: Schematische Darstellung der Assemblierung des *hisJ*-Gens aus Oligonukleotiden über eine Ligation. Alle internen Oligonukleotide waren am 5'-Ende phosphoryliert und sollten nach der Hybridisierung ligiert werden. Die randomisierten Positionen (gekennzeichnet mit *) und die evtl. dazwischen liegenden kurzen nicht-randomisierten Bereiche lagen als Einzelstrang im kodierenden DNA Strang vor. Die Lücken sollten nach der Hybridisierung der Oligonukleotide mit einer DNA Polymerase aufgefüllt und die verbleibenden Phosphordiester-Bindungen anschließend mit Hilfe einer Ligase gebildet werden. Die randomisierten Oligonukleotide bzw. die Bereiche des kodierenden DNA Stranges mit der entsprechenden Sequenz sind dunkelgrau dargestellt.

| Oligonukleotid | Basensequenz | Länge (nt) |
|----------------|--|------------|
| ek02 | 5'-AGAACATCCGCATcGGTACCG ACCCGACCTATGC gCCATTTG AATCAAAAAA | 52 |
| ek05 | 5'-GTACGTTiGTCGAAAATCCG CTGGATGC gTTaATCCCGTC | 40 |
| ek07 | 5'-ATTGAcGCCATCATGT CTtTctCtgTCT ATTACGGAAAAA CGTCAGCAAGAAATAGCC | 57 |
| ek10 | 5'-AAACGgGTAGGCGT AfTGCAGGGCACCACCCAGGAGAC gT TCGGTAAT | 48 |
| ek13 | 5'-GTATTGATGCCGCGT TCCAGGA tGAGGTcGCTGCCAGCGA AGG | 43 |

Tab. 10: Basensequenz und Länge der randomisierten Oligonukleotide. Die randomisierten Positionen mit Wildtypcodon sind fett hervorgehoben, wiedergeben ist jeweils das Wildtypcodon. Die Kleinbuchstaben stellen die Basen dar, die sich von der Wildtyp *hisJ*-Sequenz unterscheiden.

3.1.1.5 Festlegung der Populationsstruktur: Theorie

Die HisJ-Bibliothek war zunächst für eine Durchmusterung nach Varianten vorgesehen, die Histidin-ähnliche Liganden binden sollten. Das Repertoire sollte daher so entwickelt werden, dass die einzelnen Vertreter genetisch nicht allzuweit vom Wildtyp entfernt sind. Als günstiger Nebeneffekt sinkt bei wenigen Mutationen die Gefahr einer falschen Faltung des Proteins.

Die Beschränkung auf wenige Austausche wurde durch zwei Maßnahmen verwirklicht:

1. Die zu mutagenisierenden Positionen wurden auf insgesamt 13 beschränkt. Diese wurden nach funktionaler Bedeutung aufgrund der Kristallstruktur des HisJ ausgewählt (Yao *et al.*, 1994). Außer den 12 Aminosäuren, die enge Kontakte mit dem Liganden ausüben (Tyr14, Leu52, Ser69, Ser70, Leu71, Ser72, Leu117, Thr120, Thr121, Gln122 und Asp161), sollte zusätzlich der Rest Asp11 randomisiert werden, der an der Bildung des Liganden bei LAOBP beteiligt ist (s. Abschnitt 1.3).
2. Diese 13 Codonpositionen wurden *partiell* randomisiert, so dass bei jedem einzelnen Molekül nur eine kleinere Anzahl von Austauschen verwirklicht wird. Diese Anzahl wurde willkürlich auf durchschnittlich vier festgelegt. Dies erreicht man, indem bei der Gensynthese eine definierte Mischung von Wildtypcodon und Fremdcodons an den zu randomisierenden Positionen verwendet wird (für experimentelle Details s. Abschnitt 3.1.1.6).

Es ergibt sich eine erwartete Verteilung der verschiedenen Mutantenklassen (mit 0 bis 13 Mutationen) um den Mittelwert vier nach Art einer Binomialverteilung (Sachs, 1983; s. Abschnitt 5.1, Gleichung 5.3). Diese ist in der Abbildung 12 wiedergegeben.

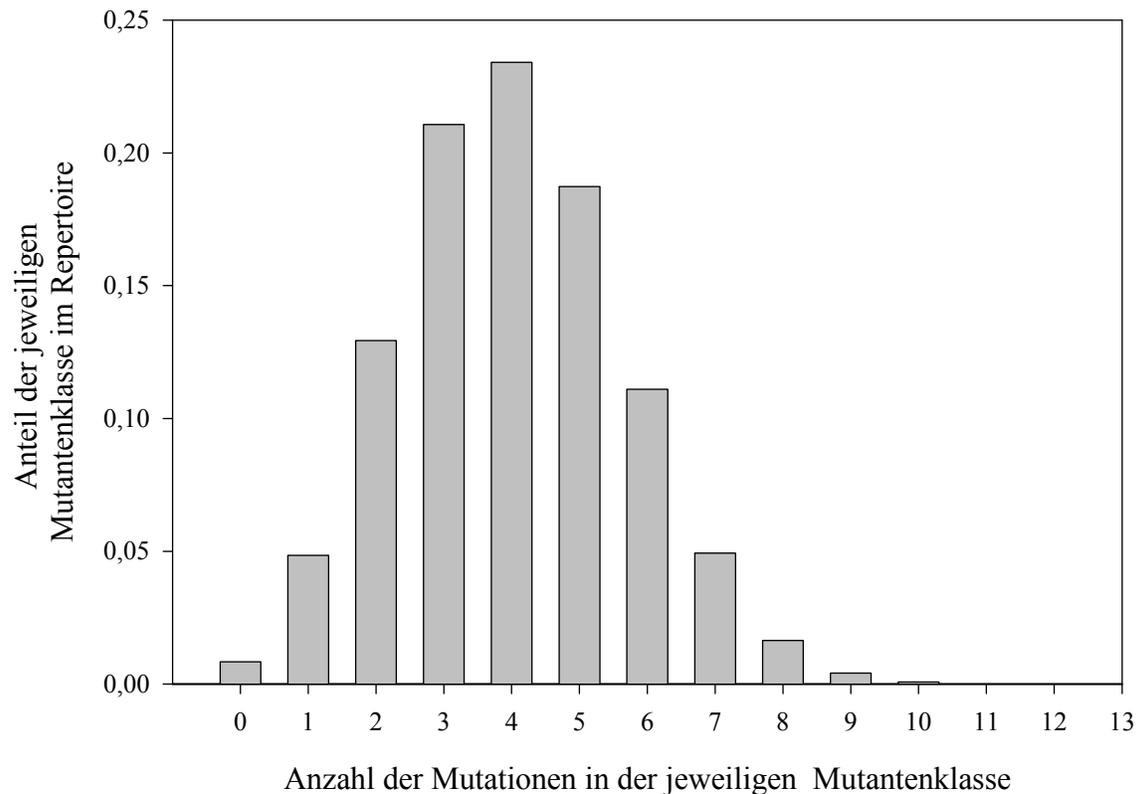


Abb. 12: Binomialverteilung für ein Repertoire mit einer durchschnittlichen Anzahl der Mutationen $\mu = 4$ und $n = 13$ randomisierten Positionen.

Für eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, mit der ein einzelner, spezieller Vertreter einer bestimmten Mutantenklasse in einem Repertoire gegebener Größe anzutreffen ist, ist zusätzlich der Umfang der Mutantenklasse zu betrachten, d. h. die Anzahl der individuellen molekularen Spezies, aus denen sich die Mutantenklasse zusammensetzt. Ergebnisse der entsprechenden Berechnungen sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

| [1] | [2] | [3] | [4] |
|-----|--------------------|---------------------|-----------------------|
| 0 | 0,0084 | 1 | 0,0084 |
| 1 | 0,0485 | 234 | $2,1 \cdot 10^{-4}$ |
| 2 | 0,1293 | $2,5 \cdot 10^4$ | $5,2 \cdot 10^{-6}$ |
| 3 | 0,2107 | $1,7 \cdot 10^6$ | $1,2 \cdot 10^{-7}$ |
| 4 | 0,2341 | $7,5 \cdot 10^7$ | $3,1 \cdot 10^{-9}$ |
| 5 | 0,1873 | $2,4 \cdot 10^9$ | $7,8 \cdot 10^{-11}$ |
| 6 | 0,1110 | $5,8 \cdot 10^{10}$ | $1,9 \cdot 10^{-12}$ |
| 7 | 0,0493 | $1,0 \cdot 10^{12}$ | $4,93 \cdot 10^{-14}$ |
| 8 | 0,0164 | $1,4 \cdot 10^{13}$ | $1,2 \cdot 10^{-15}$ |
| 9 | 0,0041 | $1,4 \cdot 10^{14}$ | $2,9 \cdot 10^{-17}$ |
| 10 | 0,0007 | $1,0 \cdot 10^{15}$ | $7,0 \cdot 10^{-19}$ |
| 11 | $<1 \cdot 10^{-4}$ | $5,0 \cdot 10^{15}$ | $<1 \cdot 10^{-20}$ |
| 12 | $<1 \cdot 10^{-4}$ | $1,5 \cdot 10^{16}$ | $<1 \cdot 10^{-20}$ |
| 13 | $<1 \cdot 10^{-4}$ | $2,0 \cdot 10^{16}$ | $<1 \cdot 10^{-20}$ |

Tab. 11: Berechnete Populationsstruktur mit einer durchschnittlichen Anzahl der Austausche $\mu = 4$ („vier aus dreizehn“).

[1]: Anzahl der Mutationen in der jeweiligen Mutantenklasse.

[2]: Erwarteter Anteil der jeweiligen Mutantenklasse am Repertoire (Binomialverteilung, Gleichung 5.3, Abschnitt 5.1), vgl. Abb. 12.

[3]: Umfang der jeweiligen Mutantenklasse, berechnet nach Gleichung 5.9 (Abschnitt 5.1) unter Berücksichtigung der Parameter $n = 13$ und $\mu = 4$.

[4]: Anteil einer individuellen molekularen Spezies aus der jeweiligen Klasse am Repertoire. Die Werte wurden durch Quotientenbildung (jeweilige Werte in Spalte 2 geteilt durch jeweilige Werte in Spalte 3) berechnet.

3.1.1.6 Festlegung der Populationsstruktur: praktische Erwägungen

Die Vorgabe für die Planung der Synthese des *hisJ*-Repertoires waren durchschnittlich vier Mutationen aus dreizehn randomisierten Positionen. Nach Gleichung 5.5 (s. Abschnitt 5.1) ergibt sich eine Austauschwahrscheinlichkeit pro Position $p = 0,3077$. Entsprechend müssten bei der Synthese an jeder randomisierten Position das jeweilige Wildtypcodon und die Fremdcodons im molaren Verhältnis 0,7 und 0,3 eingesetzt werden.

Zur bequemeren Handhabung wurde nicht für jedes einzelne Wildtypcodon eine eigene Fremdcodonmischung angesetzt, sondern eine allgemein verwendbare Mischung aus 19

Codons (Cystein wurde generell aus der Randomisierung rausgehalten, da es zu proteinchemischen Komplikationen führen kann). Des weiteren wurde das Codon GGT aus unten ausgeführten Gründen (Abschnitt 3.1.2.1.2) der ansonsten äquimolaren Mischung in der doppelten molaren Menge zugesetzt.

Dies bedeutet, dass bei der Synthese jeder einzelnen randomisierten Position 1/20 der Fremdcodonmischung zur Erhöhung des Anteils an Wildtypcodons beiträgt. Das molare Verhältnis von Fremdcodons zu Wildtypcodon sinkt dadurch auf 0,285:0,715. Daraus ergibt sich ein korrigierter Erwartungswert für die durchschnittliche Anzahl der Mutationen von 3,7.

3.1.2 Synthese der randomisierten Oligonukleotide

3.1.2.1 Vorbereitende Arbeiten

3.1.2.1.1 Phosphitylierung der Trinukleotide

Die im Auftrag synthetisierten 25 Trinukleotide (B. Beijer, Heidelberg), die für die kombinatorische Gensynthese eingesetzt werden sollten, trugen am 5'-Ende eine 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe und am 3'-Ende eine 3'-OH Gruppe. Bei der trägergebundenen Oligonukleotidsynthese erfolgt die Kopplung der Synthesebausteine standardmäßig nach der Phosphoramidit-Methode (Beaucage & Caruthers, 1981). Dabei werden Nukleoside oder Nukleotide über einer Phosphoramidit-Gruppe am 3'-Ende an eine 5'-OH Gruppe der an eine Festphase immobilisierte Oligonukleotidkette gekoppelt.

Die 25 Trinukleotide wurden in einer Reaktion mit 2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminochlorophosphan zu entsprechenden Phosphoramiditen umgesetzt (Abb. 13, 2.2.4.2.2).

Das Rohprodukt wurde über eine Pentanfällung aufgereinigt. Man erhielt Ausbeuten von 90-98 %. Die Bestimmung der Reinheit der Produkte erfolgte über ^{31}P -NMR Spektroskopie (NMR-Spektren s. 5.2.6). Bei ca. 150 ppm wurden in allen Spektren Signale detektiert, die der Phosphoramidit-Gruppe zugeordnet werden konnten. Die *Peaks*, die dem fünfwertigen Phosphor entsprechen, erschienen bei ca. - 8 ppm (Hesse, Meier, Zeeh 1991). Das Auftreten von jeweils mehreren Peaks deutete auf Spin-Spin Kopplungen zwischen dem dreiwertigen Phosphor und den Methylenprotonen der β -Cyanoethylgruppe hin sowie das Auftreten von diastereomeren Formen der Trinukleotidphosphoramidite. Die Signale bei ca. 0-20 ppm waren auf Verunreinigungen in den Proben zurückzuführen.

Die so erhaltenen 25 Trinukleotidphosphoramidite wurden auf die Kopplungsfähigkeit in einem weiteren Versuch getestet.

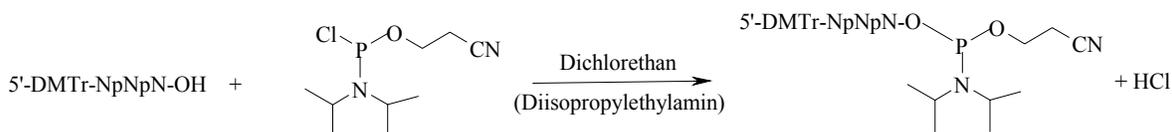


Abb. 13: Reaktionsweg der Phosphitylierung der Trinukleotide. Die Reaktion wurde in basischer Lösung durchgeführt. Das N,N-Diisopropylethylamin fungiert dabei als eine nicht nukleophile Base und deprotoniert die 3'-OH Gruppe des Trinukleotids. In einer Substitutionsreaktion wird das Chloratom durch den Trinukleotid-Rest ersetzt, und es entsteht ein Trinukleotidphosphoramidit-Molekül.

3.1.2.1.2 Bestimmung der Kopplungseffizienz der Trinukleotidphosphoramidite

Die gewünschte Populationsstruktur lässt sich mit den errechneten Anteilen von Wildtypcodon- und Fremdcodonmischung nur erreichen, wenn die Einbauraten gleich groß sind. Das gilt insbesondere für die Gleichgewichtung der verschiedenen Fremdcodons an jeder randomisierten Stelle. Da die Einbauraten der synthetisierten Trinukleotidphosphoramidite nicht bekannt waren, sollte im Vorversuch das Reaktionsverhalten der einzelnen Trimere analysiert werden. Die Einbauraten könnten durch die Synthese eines Standard-Hexameres (s. u.) mit einer 19-er Mischung aus äquimolaren Mengen entsprechender Codons sowie eine anschließende chromatographische Trennung und Quantifizieren der Syntheseprodukte bestimmt werden. Diese Methode ist aufwendig und eventuell wegen schlechter Trennbarkeit der Hexamere nicht machbar (Modellexperiment s. Zehl *et al.*, 1996).

Als Kompromiss sollte daher überprüft werden, ob alle 19 Trimere überhaupt kopplungsfähig sind und ob sie in ihrer Reaktivität grob vergleichbar sind. Dafür sollten mit einer früher beschriebenen Methode (Zehl *et al.*, 1996; Hartsch, 1998) einzelne Hexamere synthetisiert werden, die das jeweilige Trinukleotid enthielten. Dies würde den Verzicht auf kinetische Parameter bedeuten, da bei jeder Einzelsynthese das Trimer im hohen molaren Überschuss verwendet wird und deshalb auch ein kinetisch benachteiligtes Trimer quantitativen Umsatz erzielen kann.

Die groben Kopplungseffizienzen wurden für alle 25 synthetisierten Trinukleotidphosphoramidite bestimmt (s. 3.1.2.1.2). Dafür wurden Hexanukleotide des Typs 5'-TXYZTC, die das jeweilige Trinukleotid XYZ enthielten, synthetisiert und die Detritylierungswerte bei der Kopplung des jeweiligen Trinukleotides an die 5'-OH Gruppe eines Nukleotides ermittelt (genauere Vorgehensweise s. Legende, Abb. 14). Die

Kopplungszeit für die trimeren Bausteine wurde auf 15 min und die Kopplungszeit für die Monomeren auf 2 min festgelegt. Die Trinukleotide wurden im 25-fachen molaren Überschuß gegenüber dem ersten Nukleotid in trockenem Acetonitril angesetzt (2.2.4.2.3). Das Ergebnis des Versuchs ist in der Abb. 14 dargestellt.

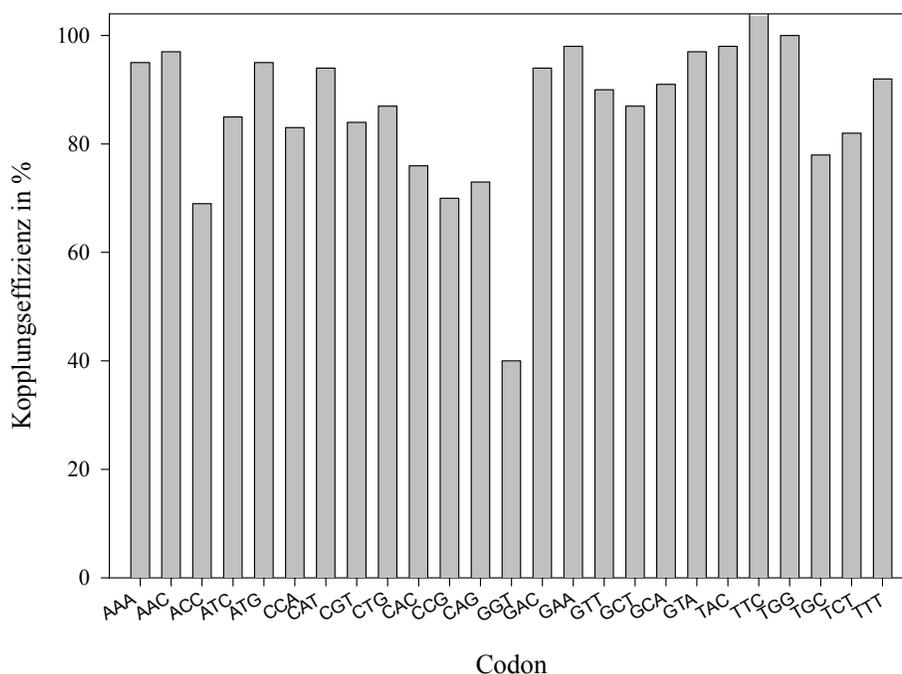


Abb. 14: Kopplungseffizienzen der einzelnen Trinukleotidphosphoramidite bei der Synthese der Hexanukleotide des Typs 5'-TXYZTC-3'. Die Synthese ging von einem trägergebundenen dC aus. Nach der Kopplung eines dT- β -Cyanophosphoramidites wurde das jeweilige Trinukleotidphosphoramidit an das immobilisierte Dinukleotid gekoppelt. Anschließend wurde ein dT- β -Cyanophosphoramidit gekoppelt und aus dem gemessenen Detritylierungswert ergab sich die Kopplungseffizienz des Trinukleotides.

Die meisten Trinukleotide zeigten Kopplungseffizienzen von 69-90 %, lediglich bei GGT lag die Kopplungseffizienz bei 40 %. Da dieses Experiment einmal durchgeführt wurde, könnte der deutlich schlechtere Wert für die Kopplungseffizienz des GGT Trimers ein Ausreißer sein.

Die relativ niedrigen Kopplungseffizienzen einiger Trinukleotide, besonders die des GGT, könnten u. a. durch seine besonders langsame Reaktionskinetik erklärt werden oder

dadurch, dass ein Teil der Trinukleotide in der Probe nicht kopplungsfähig war. Die Kopplungsausbeute dieser Trimere in der Mischung könnte in diesen Fällen durch die Verwendung eines größeren Anteils der reaktionsträgen Mischungskomponente verbessert werden. Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Kopplungseffizienz der Trinukleotide mit ihren Einbauraten korrespondiert. In einem früheren Modellexperiment wurde durch die Erhöhung des Anteiles eines reaktionsträgen Trinukleotides in einer Mischung entsprechend das Einbauverhältnis zugunsten dieses Trimers erhöht (Hartsch, 1998; Zehl *et al.*, 1996).

Eine andere mögliche Ursache für die niedrigen Kopplungseffizienzen könnten Verunreinigungen in der Stammprobe sein, die eine inhibierende Wirkung auf das Reaktionsverhalten der Trimere haben. In diesem Fall würde ein Überschuß des verunreinigten Trinukleotides in einer Codon-Mischung nicht nur keine Erhöhung seiner Repräsentanz im Repertoire bewirken, sondern die Kopplungseffizienz aller Trinukleotide gleichmäßig negativ beeinflussen. Als Konsequenz würde der Überschuß der verunreinigten Probe zu verringerten Mutationsraten führen.

Das Trinukleotid GGT wurde für die 19-er Codonmischungen im zweifachen molaren Überschuß gegenüber den restlichen einzelnen Trimeren angesetzt, die ihrerseits in äquimolaren Mengen vorlagen (s. Abschnitt 3.1.1.6). Man ging davon aus, dass selbst wenn in der GGT-Stammprobe inhibierende Kontaminationen enthalten wären und die Standardmischung zwei Moläquivalente des GGT enthielte, läge dieses Codon immer noch im Unterschuß gegenüber den allen restlichen Codons vor und die evtl. beigemischten Kontaminationen keinen wesentlichen Einfluß auf das Reaktionsverhalten aller Codons insgesamt hätten.

Durch die in dieser Weise bestimmten Kopplungseffizienzen konnte ein grober Einblick in das Reaktionsverhalten der einzelnen Trinukleotidphosphoramidite erhalten werden. Der Vorversuch zeigte, dass alle Trinukleotidphosphoramidite, die für die Synthese des *hisJ*-Genrepertoires eingesetzt werden sollten, kopplungsfähig waren.

Die in dieser Weise bestimmte Kopplungseffizienzen spiegeln nicht das Reaktionsverhalten der Trimere in einer Mischung mit anderen Komponenten wieder. Bei einer kombinatorischen DNA Synthese, bei der Trinukleotid-Mischungen eingesetzt werden, beeinflusst die Reaktionskinetik der einzelnen Reaktionskomponenten deren Kopplung an die wachsende Oligonukleotidkette. Die Reaktionskinetik der Trinukleotide hat somit Auswirkungen auf die Häufigkeit des Auftretens der entsprechenden Aminosäuren im Repertoire an einer bestimmten Position.

In der vorliegenden Arbeit konnten Rückschlüsse auf das Reaktionsverhalten der einzelnen Trimere in einer Mischung indirekt durch die Sequenzierung einer hinreichend großen Stichprobe von zufällig ausgewählten Klonen aus dem Repertoire gemacht werden (s. Abschnitt 3.1.4).

3.1.2.2 Synthese der randomisierten Oligonukleotide

3.1.2.2.1 Automatische Synthese und Charakterisierung der randomisierten Oligonukleotide (Zehl et al., 1996)

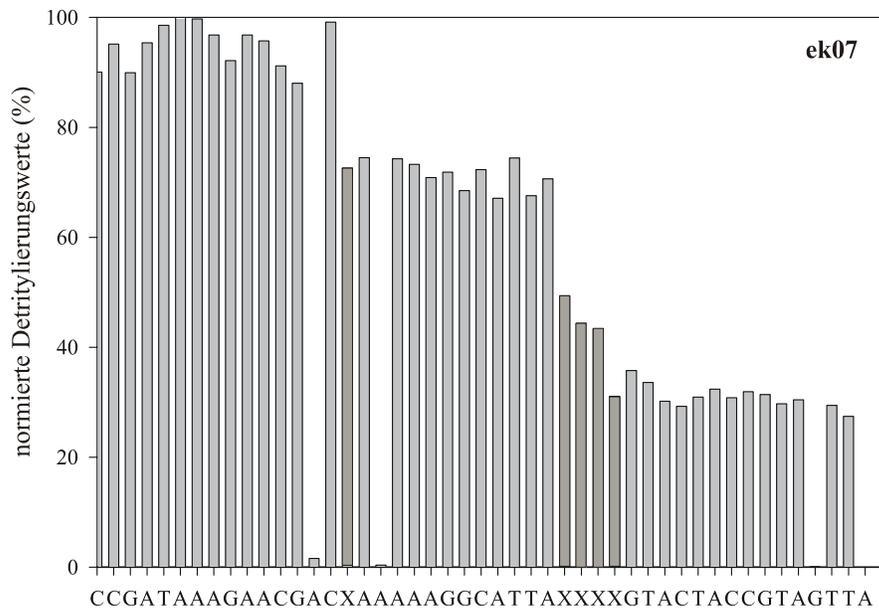
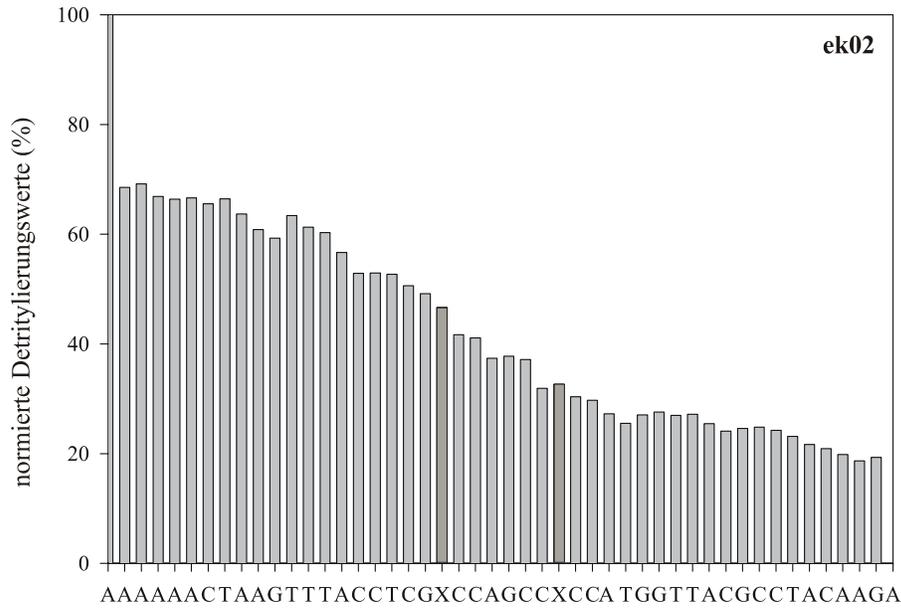
Durch die Verwendung an den zu randomisierenden Positionen einer Codonmischung mit einem molaren Verhältnis des Wilytypcodon- zum Fremdcodon-Anteil von 0,715:0,285 sollte sich im *hisJ*-Repertoire eine erwartete durchschnittliche Anzahl der Austausch von 3,7 aus 13 randomisierten Positionen ergeben (Begründung s. Abschnitt 3.1.1.6). Für das *hisJ*-Genrepertoire wurden fünf Oligonukleotide nach der Trinukleotidphosphoramidit-Methode (Virnekäs et al., 1994) synthetisiert, die insgesamt 13 randomisierte Positionen enthielten (Tab. 10): 12 Aminosäuren der Bindungstasche des Histidin-Bindeproteins (Tyr14, Leu52, Ser69, Ser70, Leu71, Ser72, Leu117, Thr120, Thr121, Gln122 und Asp161) und das Asp11, das im HisJ-verwandten LAO-Bindeprotein an der Bindung des Liganden beteiligt ist (s. 3.1.1.3).

Bei der Synthese der Oligonukleotide ek05 und ek13 wurde eine einmalige Injektion der Trinukleotidphosphoramidite (5 µmol) und eine einfache *Capping*-Reaktion verwendet. Bei der Kopplung der Trinukleotidphosphoramidite (X) wurde eine Senkung der normierten Detritylierungswerte um 24 bzw. 37 % verzeichnet (Abb. 15), was auf eine verminderte Kopplungseffizienz der Trimere im Vergleich mit den Mononukleosidamiditen zurückzuführen war. Der Anstieg des Detritylierungswertes um bis zu 15 % bei ek13 nach der Kopplung der Trinukleotide deutete auf eine unvollständige *Capping*-Reaktion hin. Da dies zu einer erhöhten Anzahl von Deletionen im Genrepertoire führen könnte, sollte bei weiteren Oligonukleotidsynthesen jeweils eine doppelte *Capping*-Reaktion verwendet werden. Um den Abfall der Detritylierungswerte bei der Kopplung der Trimere zu reduzieren und somit eine größere Ausbeute bei der Reaktion zu erzielen, sollten größere Mengen der Trimere für die Kopplung eingesetzt werden.

Bei der Synthese der Oligonukleotide ek02, ek07 und ek10 wurde ein Programm verwendet (02THC2X, s. 5.2.3), in dem die Injektion der Trinukleotidphosphoramidite zweimal nacheinander (jeweils 5 μmol) und anschließend eine doppelte *Capping*-Reaktion durchgeführt wurden (Hartsch, 1998). Dadurch sollte eine höhere Kopplungsausbeute der Trinukleotide erreicht und die Anzahl der Codondeletionen im Genrepertoire reduziert werden.

Der Abfall der Detritylierungswerte bei der Kopplung der Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen wurde bei der Verwendung einer größeren Menge der Reaktionskomponenten reduziert und betrug 0,7 bis 26 %. Die Einbrüche in den Detritylierungswerten bis auf 0-10 % waren auf eine fehlerhafte Detektion des Tritylrestes wegen Blasen in den Lösungsmitteln zurückzuführen.

Die Verwendung der doppelten *Capping*-Reaktion brachte eine deutliche Verbesserung der Ausbeute bei der Acetylierung der nicht umgesetzten 5'-Hydroxyfunktionen. Der Anstieg der Detritylierungswerte nach der zweifachen *Capping*-Reaktion bis maximal 4 % bei der Kopplung des nächsten Nukleosides war wesentlich kleiner als nach einer einfachen *Capping*-Reaktion bei der Synthese des Oligonukleotides ek13 (15 %).



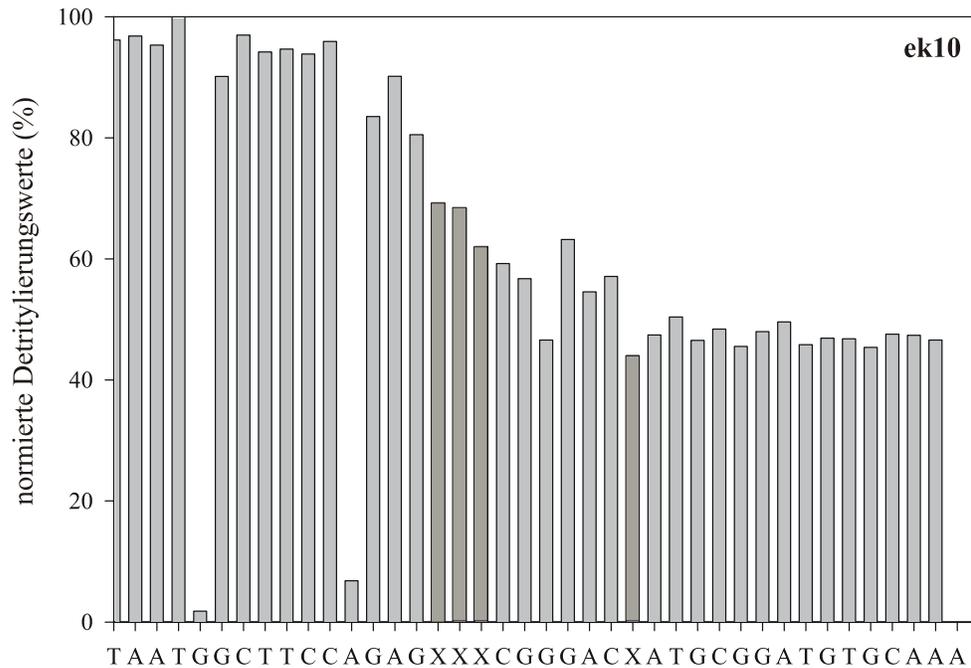


Abb. 16: Auftragung der normierten gemessenen Detritylierungswerte (normierte OD436) bei der Synthese der Oligonukleotide ek02 ek 07 und ek10 unter Verwendung einer zweifachen Injektion der Trinukleotidphosphoramidit-Mischung an der Position X und einer zweifachen *Capping*-Reaktion. Die Balken für die Detritylierungswerte bei der Kopplung der Trimeren-Mischungen sind dunkelgrau dargestellt.

3.1.2.2.2. Phosphorylierung und Aufreinigung der randomisierten Oligonukleotide

Die Synthese des randomisierten *hisJ*-Gens sollte ursprünglich über eine Ligation von mehreren Oligonukleotiden erfolgen (s. Abschnitt 3.1.1.4). Dabei wird die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH Gruppe an dem anderen DNA-Ende durch eine DNA-Ligase geschlossen. Die synthetisierten Oligonukleotide sollten für die Ligation am 5'-Ende phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung verlief am DNA-Synthesizer mit dem Phosphoramidit CPRII (*Chemical Phosphorylation Reagent II*) (Guzaev *et al.*, 1995). Diese Verbindung enthält einen DMTr Rest, der nach der Phosphorylierung erhalten blieb und eine Detektion der phosphorylierten Oligonukleotide während der Aufreinigung mittels RP-HPLC erlaubte.

Für die Reaktion wurden die Säulen mit den trägergebundenen Oligonukleotiden an den DNA-Synthesizer angeschlossen. Zuerst wurde die 5'-Tritylgruppe abgespalten und das Phosphoramidit mit Tetrazol aktiviert. Die Kopplung der Phosphoramidit-Gruppe dauerte 6 min. Anschließend erfolgte eine *Capping*-Reaktion und die Oxidation des dreiwertigen Phosphors mit Iod wie bei einer standardmäßigen Oligonukleotidsynthese.

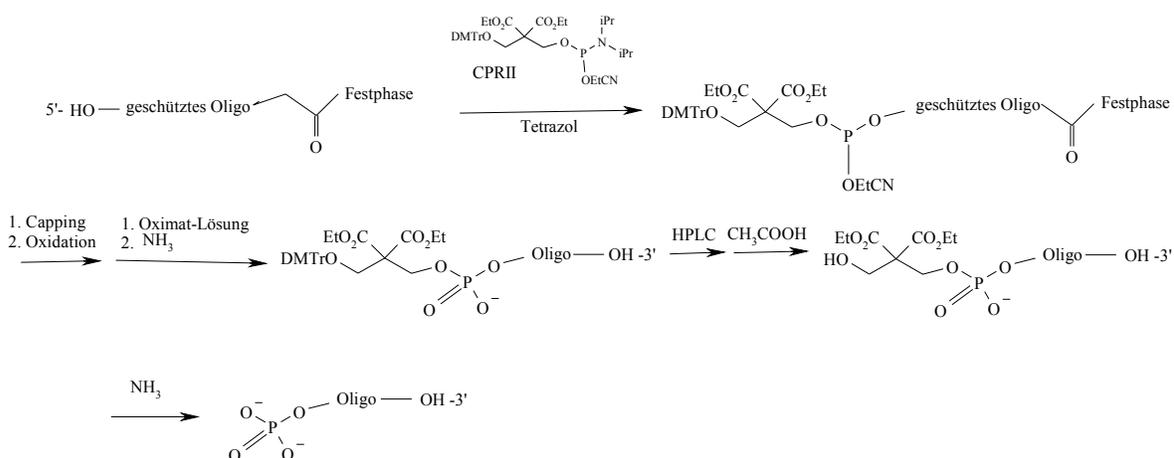


Abb. 17: Reaktionsfolge der Phosphorylierung der Oligonukleotide an der Festphase mit CPRII. Die Phosphorylierung wurde am DNA-Synthesizer durchgeführt. Nach der Abspaltung der Tritylgruppe folgte die Kopplung von CPRII, katalysiert durch Tetrazol. Nach der Capping-Reaktion und Oxidation wurde das Oligonukleotid mit der Oximat-Lösung und Ammoniak entschützt und von der Festphase abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte mittels RP-HPLC. Anschließend wurde das Produkt detrityliert und der CPRII-Rest mit Ammoniak abgespalten.

Um Nebenreaktionen während der DNA-Synthese zu vermeiden, waren die exocyclischen Aminogruppen des Adenins und Cytosins mit einer Benzoylgruppe und die des Guanins mit einer Isobutyrylgruppe geschützt. Die Phosphatgruppen trugen die 2-Chlorphenyl-Schutzgruppen, die leicht mit einer Oximat-Lösung entfernt werden könnten. Die Matrix mit der immobilisierten Oligonukleotid-Kette wurde 26 h mit der Oximat-Lösung inkubiert, deren Menge abhängig von der Anzahl der 2-Chlorphenyl-Gruppen im Oligonukleotid war (s. 2.2.4.2.6). Dabei kommt es gleichzeitig zur Spaltung der Succinat-Bindung, über die das Oligonukleotid an die Matrix gekoppelt ist (Sproat & Gait, 1984).

Für eine Schutzgruppe bei 0,2 μmol Synthesemaßstab wurden 5 μl Oximatlösung zugegeben. Die Matrix wurde mit der Oligonukleotidkette 26 h in der Oximatlösung bei

RT inkubiert. Der Überstand enthielt vernachlässigbar kleine Mengen vom Oligonukleotid. Zur Abspaltung der Oligonukleotid-Kette von der Festphase kam es erst nach der Behandlung mit 25 %-iger Ammoniaklösung für 14 h bei 55 °C. Dabei wurden gleichzeitig die Basenschutzgruppen abgespalten. Der Überstand wurde im Vakuum eingengt und die Oligonukleotide mit einer Sephadex-Säule (NAP-5) vorgereinigt. Die Fraktionen, die die DNA enthielten, wurden vereinigt und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in TEAA Puffer aufgelöst und das Oligonukleotid mittels einer C18 *Reverse Phase* HPLC Säule (Silica HD-SIL-18-5s-100, Nucleosil 100-5C18, Macherey Nagel) aufgereinigt (Fritz *et al.*, 1978) (2.2.4.2.7). Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm verfolgt (HPLC-Chromatogramme s. Abschnitt 5.2.6). Die Chromatogramme zeigte in den meisten Fällen zwei Hauptsignale, eins bei ca. 10 min (23 % Acetonitril) und ein weiteres bei ca. 20 min (32 % Acetonitril). Die entsprechenden Fraktionen wurden separat isoliert und lyophilisiert. Sie wurden mit einer 80 %-igen Essigsäure behandelt, um den Trityl-Rest abzuspalten, hydrophobe Verunreinigungen wurden mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde die Seitenkette des 5'-endständigen Phosphat-Restes mit einer 25 %-igen Ammoniak-Lösung eliminiert. Die Oligonukleotide wurden danach auf Polyacrylamidgelen (15 % Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 7,7 M Harnstoff, TBE-Puffer) mit TBE als Laufpuffer unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und analysiert (Abb. 18, 2.2.4.2.9). Die bei ca. 10 min bzw. 19 min eluierten HPLC Fraktionen zeigten bei der Gelelektrophorese ein identisches Laufverhalten. Dies geht vermutlich darauf zurück, dass während der Aufarbeitung der Oligonukleotide detritylierte Nebenprodukte entstanden waren, die andere Retentionszeiten als die DMTr-geschützte Oligonukleotide zeigten. Auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel wiesen sie dagegen aufgrund ähnlicher Molekulargewichte ein vergleichbares Laufverhalten auf. Da die geschützten Oligonukleotide einen stark hydrophoben, aromatischen Rest enthalten, sollten sie längere Retentionszeiten als die ungeschützten Oligos aufweisen und wurden deshalb für die weiteren Experimente eingesetzt.

Die Ausbeuten der phosphorylierten randomisierten Oligonukleotide mit den längeren Retentionszeiten betragen nach Entschützen und Aufreinigung mittels RP-HPLC und Polyacrylamid-Gelelektrophorese zwischen 0,2 bis 7,2 % und sind in Tab. 13 zusammengestellt.

| <i>Oligonukleotid</i> | <i>Ausbeute</i> | |
|-----------------------|-----------------|-------------|
| | <i>(%)</i> | <i>nmol</i> |
| ek02 | 0,5 | 1,02 |
| ek05 | 2,5 | 4,98 |
| ek07 | 0,3 | 0,56 |
| ek10 | 4,6 | 4,27 |
| ek13 | 7,2 | 14,41 |

Tab. 12: Ausbeuten bei der Synthese der phosphorylierten randomisierten Oligonukleotide nach Entschützen und Aufreinigung über RP-HPLC und Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

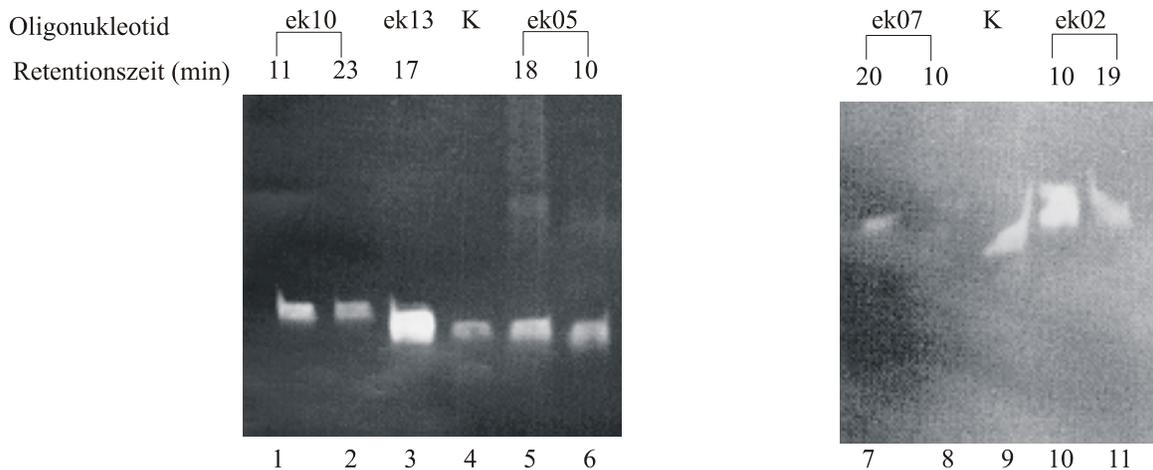


Abb. 18: Polyacrylamid-Gelanalyse der Oligonukleotide nach der RP-HPLC Aufreinigung und der Abspaltung der Dimethyltrityl-Gruppe. 1: ek10, 48 nt Länge, HPLC-Fraktion bei 11 min; 2: ek 10, 48 nt Länge, HPLC Fraktion bei 23 min; 3: ek13, 43 nt Länge, HPLC Fraktion bei 17 min; 4: Referenzoligonukleotid, 39 nt Länge (K); 5: ek 05, 40 nt Länge, HPLC Fraktion bei 18 min; 6: ek 05, 40 nt Länge, HPLC Fraktion bei 10 min; 7: ek 07, 57 nt Länge, HPLC Fraktion bei 20 min; 8: ek 07, 57 nt Länge, HPLC Fraktion bei 10 min; 9: Referenzoligonukleotid, 39 nt Länge (K); 11: ek 02, 52 nt Länge, HPLC Fraktion bei 10 min; 12: ek 02, 52 nt Länge, HPLC Fraktion bei 19 min.

3.1.3 Herstellung der Genbibliothek

3.1.3.1 Versuche zur Herstellung des *hisJ*-Genrepertoires durch Ligation

Das *hisJ*-Genrepertoire sollte ursprünglich aus 32 Oligonukleotiden, inklusive fünf randomisierte Oligonukleotide, durch Ligation zusammengefügt werden (s. Abschnitt 3.1.1.4). Bei den Versuchen, Genfragmente aus mehreren Oligonukleotiden mit der *Taq*-Ligase bei höheren Temperaturen (45-65 °C) zu ligieren, wurden keine Produkte der richtigen Länge erhalten, was auf eine unvollständige Ligation oder eine unspezifische Hybridisierung der Oligonukleotide hindeutete. Auch eine LCR (*ligase chain reaction*, Deng *et al.*, 1995) bei der Herstellung von Genfragmenten brachte entweder keine gewünschten Produkte oder nur sehr geringe Ausbeuten. Da die randomisierten Oligonukleotide in einer begrenzten Menge zur Verfügung standen, wurde das Gen über eine *primerless* PCR nach der Stemmer-Methode assembliert (Stemmer & Cramer, 1995).

3.1.3.2 Assemblieren des *hisJ*-Gens über *primerless* PCR (Stemmer & Cramer, 1995)

Das von Stemmer *et al.* 1994 entwickelte DNA *Shuffling* eignet sich für die Synthese langer DNA Sequenzen aus kurzen DNA-Fragmenten, die in einer partiellen DNase Spaltung generiert wurden (s. Abschnitt 1.2.1.2). Anstatt von Fragmenten aus einer DNase Spaltung können auch Oligonukleotide für die *primerless* PCR eingesetzt werden (Stemmer & Cramer, 1995). Durch die Verwendung randomisierter Oligonukleotide können in dieser Weise schnell und kostengünstig Genrepertoires mit langen DNA Sequenzen (bis zu 10 kb) konstruiert werden.

Die Bedingungen für die Synthese des *hisJ*-Gens wurden zuerst mit nicht randomisierten Oligonukleotiden optimiert (2.2.1.17.1). Die *primerless* PCR wurde mit 32 nicht randomisierten Oligos und der *Vent*-Polymerase durchgeführt. Die *annealing* Temperatur betrug 52 °C, und es wurden 55 Zyklen gefahren. Für die *primed* PCR wurden 1 µl *primerless* PCR-Ansatz als Matrizen-DNA, die flankierenden *Primer* 5'-ek01 und 3'-ek32 sowie die *Taq* Polymerase eingesetzt (Fa. Roche). Die *annealing* Temperatur betrug 60 °C und wurde so gewählt, dass relativ wenig unspezifische Produkte entstanden und eine gute Ausbeute erreicht wurde.

Für die Konstruktion des *hisJ*-Genrepertoires wurden 5 randomisierte und die restlichen 27 nicht randomisierten Oligonukleotide eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren die selben wie beim Optimierungsversuch (s. o.). Man erhielt Produkte der richtigen Größe, die mit

KpnI und *BglIII* gespalten und in den Phagenvektor pCANTAB5E (s. Abschnitt 3.2.1.1) einkloniert wurden (2.2.1.18).

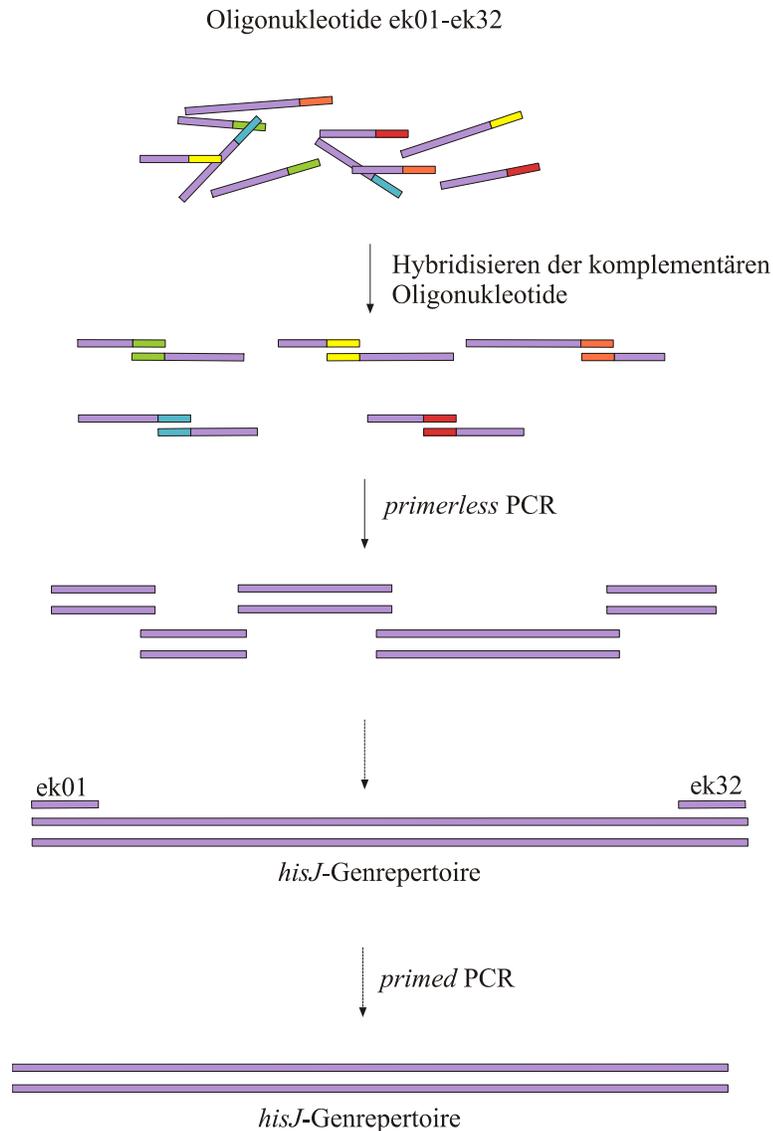


Abb. 19: Schematische Darstellung der Synthese des *hisJ*-Genrepertoires nach Stemmer (Stemmer *et al.*, 1995). Für die *primerless* PCR wurden fünf randomisierte und 28 nicht randomisierte Oligonukleotide eingesetzt. Dabei kam es zur Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide, die durch eine *Vent*-Polymerase verlängert wurden. In folgenden Zyklen wurden zunehmend längere Oligonukleotide produziert. In einer anschließenden *primed* PCR mit flankierenden Primern ek01 und ek32 wurde das PCR-Produkt reamplifiziert.

3.1.3.3 Etablierung des *hisJ*-Genrepertoires als Klonbibliothek durch Transformation

Die Größe einer Peptidbibliothek ist durch die Effizienz der Ligation und Transformation limitiert. Bei der Ligation spielt besonders die Reinheit des Vektorfragmentes eine große Rolle. Um die positiven Klone von den Religanden in einer Kolonie-PCR unterscheiden zu können, wurde für die Klonierung ein Vektor verwendet, in dem zuvor das *hisJ*-Gen (774 bp) über die entsprechenden Schnittstellen gegen ein Insert der Länge 300 bp (Calmodulin) ausgetauscht wurde. So konnte man mit einem Vektor- und einem *hisJ*-spezifischen *Primer* den Hintergrund der Ligation bestimmen, indem Einzelklone aus einer Transformation in einer Kolonie-PCR untersucht wurden (2.2.1.15).

Nach der Präparation wurde der Vektor mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.2.1.6) und über Nacht jeweils mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BglII* gespalten, um den Anteil der Religation zu minimieren (2.2.1.13.1). Die Enzyme wurden anschließend mit Phenol/Chloroform entfernt und das Vektorfragment über einen Sucrosedichtegradienten aufgereinigt (2.2.1.11). Für die Ligation, die 20-24 h bei 15 °C erfolgte, wurden insgesamt jeweils 6 µg des Insert- und 6 µg des Vektorfragmentes eingesetzt (2.2.1.18.2). Vor der Zugabe der Ligase wurden die Ligationsansätze für 5 min bei 45 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt, um eventuell in Bereichen partieller Homologie hybridisierte überlappende Enden des Vektor- bzw. Insertfragmentes zu schmelzen. Beim Abkühlen sollten komplementäre Überhänge bevorzugt miteinander hybridisieren. Die Ligationsansätze wurden über Nacht mit Ethanol gefällt.

Die Elektroporation wurde mit frisch vorbereiteten *E. coli* TG1 Zellen durchgeführt (2.2.1.18.3). In 20 Transformationsansätzen erhielt man insgesamt $4,3 \cdot 10^7$ ampicillinresistente Transformanten, von denen 10 % einen Vektor ohne das *hisJ*-Insertfragment besaßen. Man erhielt demnach $3,9 \cdot 10^7$ inserttragende positive Klone.

Die *E. coli* Zellen wurden von den Agarplatten ausgewaschen, mit 10 % DMSO versetzt und bei -70 °C gelagert.

3.1.4 DNA-Sequenzanalyse und statistische Datenanalyse des *hisJ*-Genrepertoires

3.1.4.1 Vergleich der erwarteten mit den experimentellen Werten

Aus dem nach der Trinukleotidphosphoramidit-Methode (Virnekäs *et al.*, 1994) synthetisierten *hisJ*-Genrepertoire wurden insgesamt 103 zufällig ausgewählte Klone sequenziert. Diese bildeten eine Grundlage für die statistische Analyse im folgenden Abschnitt.

Bei 10,6 % der ausgewerteten Klone wurden keine Deletionen oder Insertionen gefunden. 22 % der Klone enthielten $3n$ ($n = 1, 2, 3, \dots$) Deletionen, die nicht zur Verschiebung des Leserahmens führten. An den randomisierten Positionen wurden bei den ausgewerteten Klonen insgesamt 69 Deletionen gefunden, die bis zu neun direkt miteinander benachbarte Nukleotide betrafen. Die randomisierten Oligonukleotide enthielten 47 Deletionen, wobei es sich hauptsächlich um Einzelnukleotiddeletionen handelte. Bei den kommerziell synthetisierten Oligonukleotiden wurden insgesamt 64 Deletionen gefunden, von denen 54 ebenfalls Einzelnukleotiddeletionen waren (Tab. 15). Dabei wurden Bereiche am Anfang und am Ende des Gens, die unlesbare Sequenzen aus der DNA-Sequenzierung enthielten nicht berücksichtigt. Die Anzahl der eventuell vorhandenen Deletionen in diesen Bereichen ist vernachlässigbar, da sich die meisten Deletionen in randomisierten Oligonukleotiden befanden.

Die ausgewerteten Klone enthielten außerdem 11 Insertionen innerhalb des Gens und an den randomisierten Positionen 7 Codons, die bei der Synthese nicht eingesetzt wurden. Sie wurden bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Rasterschubmutationen im Genrepertoire resultierten wahrscheinlich zum Teil aus Kontaminationen der Trinukleotide mit Mono- und Dinukleotiden. Die Synthese der Trinukleotidphosphoramidite ging von Mononukleosid- über Dinukleotidphosphoramidite als Zwischenprodukte aus. Es wäre möglich, dass bei der Reinigung der Produkte eine unvollständige Abtrennung der Edukte bzw. Zwischenprodukte stattgefunden hat. Bei den Deletionen an den randomisierten Stellen handelte es sich bei 17 % der Klone um Dinukleotid- und bei 9 % um Einzelnukleotiddeletionen.

Bei der Synthese des Repertoires wurde an jeder randomisierten Position ein Gemisch aus Wildtypcodon und 19-er Codonmischung (alle natürlichen Aminosäuren, ausgenommen Cystein) im molaren Verhältnis 0,7:0,3. In der 19-er Mischung lagen 18 Codons in äquimolaren Mengen vor (s. Abschnitt 3.1.1.6). Das GGT wies im Vorversuch eine ca. zweifach niedrigere Kopplungseffizienz als die anderen Trinukleotide auf und wurde im zweifachen molaren Überschuss eingesetzt. Demnach betrug der genaue Wildtypcodon-Anteil (q) an jeder Position 0,715. Bei 13 randomisierten Positionen und einer Mutationsrate (p) von 0,285, die dem molaren Anteil der Fremdcodons in der Mischung entspricht, ergab sich eine Binomialverteilung mit zwei häufigsten Mutantenklassen: eine mit einem Molenbruch von 0,231 der Klone und drei Mutationen und eine mit einem Molenbruch von 0,230 und vier Mutationen und einer Gensequenz. Die Mutantenklasse mit zwei Mutationen umfasste bei der Binomialverteilung einen Molenbruch von 0,158 der Klone. Bei den ausgewerteten Klonen war die Mutantenklasse mit zwei Austauschen bei einem molaren Anteil von 0,35 aller ausgewerteten Klone am häufigsten vertreten.

Mit 0,165 lag die durchschnittliche Mutationsrate pro Position (\bar{p}_{exp}) ebenfalls niedriger als der theoretischer Wert von 0,285 (Abb. 20). Die experimentell bestimmte durchschnittliche Anzahl der Mutationen im *hisJ*-Repertoire μ_{exp} lag bei 2,1 und der theoretische Wert μ für 13 Positionen mit einer Mutationsrate von 0,285 betrug 3,7. Damit lag der experimentelle Durchschnittswert fast um die Hälfte niedriger als die erwartete durchschnittliche Anzahl der Mutationen im Repertoire. Die Zusammenstellung der charakteristischen Daten für das *hisJ*-Repertoires befindet sich in der Tab. 13, die Berechnung der Werte s. Abschnitt 5.1.

| Beschreibung | Wert |
|---|------------------|
| Anteil des Wildtypcodons in einer Codonmischung (q) | 0,715 |
| Anteil der Fremdcodons in einer Codonmischung bzw. erwartete Mutationsrate an einer bestimmten Position (p) | 0,285 |
| Experimentelle durchschnittliche Mutationsrate im Repertoire (\bar{p}_{exp}) | 0,165 |
| Theoretische durchschnittliche Anzahl der Mutationen im theoretischen Repertoire (μ) | 3,7 |
| Experimentelle durchschnittliche Anzahl der Mutationen im Repertoire (μ_{exp}) | 2,1 |
| Erwartete durchschnittliche Häufigkeit der Codons im Repertoire | 0,185 |
| Durchschnittliche Häufigkeit der Codons im experimentellen Repertoire | 0,116 |
| Anzahl der Fremdcodons in einer Trinukleotid-Mischung (x) | 18 |
| Größe des Repertoires (N_R) | $3,9 \cdot 10^7$ |

Tab. 13: Zusammenstellung der charakteristischen erwarteten und experimentellen Werte für das *hisJ*-Repertoire unter Einbeziehung von 103 zufällig ausgewählten Klonen aus dem *hisJ*-Repertoire.

Die Binomialverteilung für 13 Positionen mit einer Mutationsrate von 0,285 verläuft flacher als die experimentelle Verteilung der Codonaustauschhäufigkeiten im *hisJ*-Repertoire. Das Maximum der experimentellen Auftragung liegt bei zwei

Codonaustauschen pro Gensequenz und beträgt 0,35. Dagegen beläuft sich das Maximum bei 3 Mutationen im der Binomialverteilung auf 0,231.

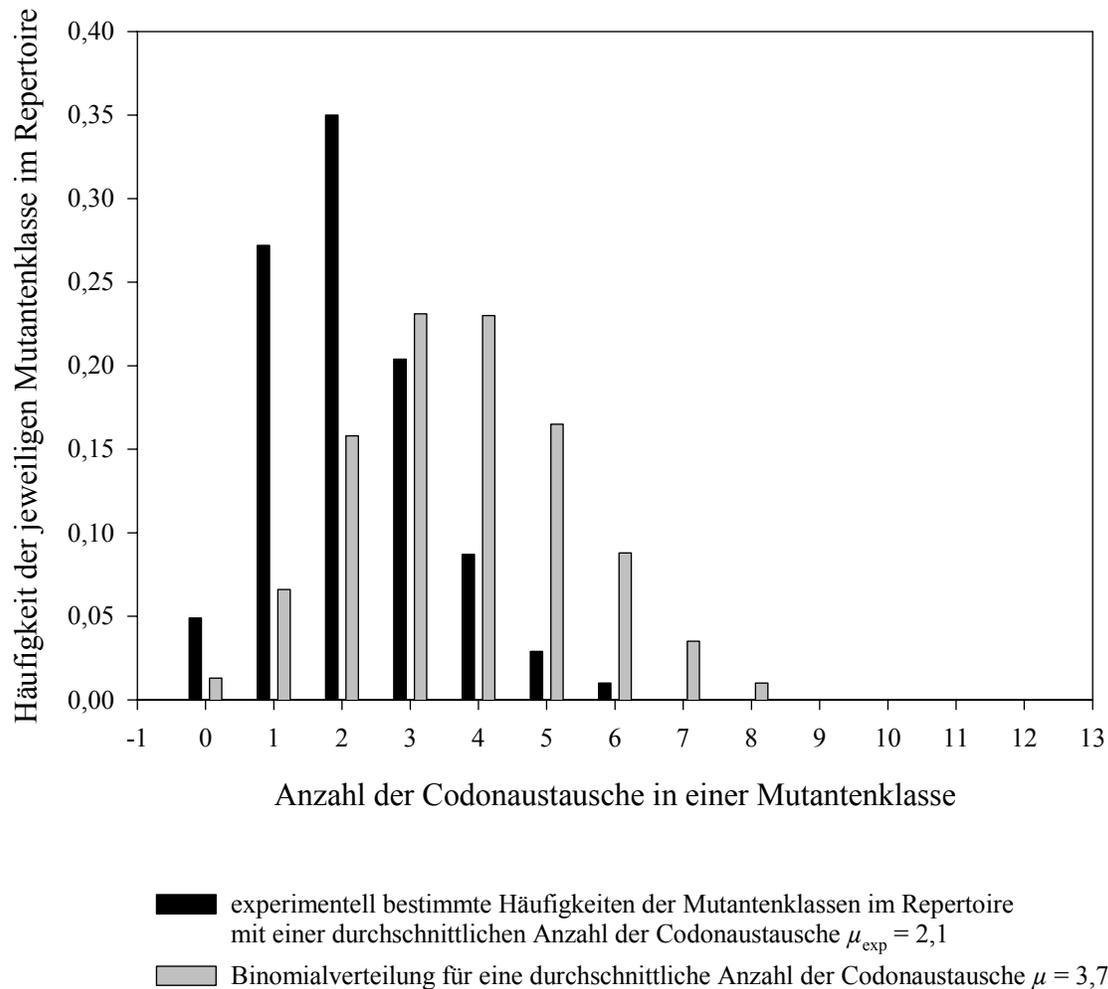


Abb. 20: Vergleich der experimentell bestimmten Häufigkeiten des Auftretens der jeweiligen Mutantenklassen im *hisJ*-Repertoire (schwarze Balken) mit der Binomialverteilung für die erwartete durchschnittliche Anzahl der Codonaustausche $\mu = 3,7$ (graue Balken). Die Häufigkeiten der Mutantenklassen wurden für 103 zufällig ausgewählte Klone bestimmt. Die experimentell bestimmte durchschnittliche Anzahl der Codonaustausche beträgt $\mu_{\text{exp}} = 2,1$ mit einer durchschnittlichen Mutationsrate $\bar{p}_{\text{exp}} = 0,165$. Die Binomialverteilung wurde für eine Mutationsrate $p = 0,285$ pro Position in einem Repertoire mit 13 randomisierten Positionen berechnet.

Die experimentelle Verteilung der Codonaustauschhäufigkeiten unterscheidet sich nicht signifikant von einer Binomialverteilung mit einer durchschnittlichen Mutationshäufigkeit von 2,1. Dies spricht dafür, dass die Austausche an den randomisierten Positionen unabhängig voneinander stattfanden. Die theoretische Mutationsrate in einem experimentellen Repertoire ist gleich der experimentellen Mutationsrate und beträgt 0,165 (Gleichung 5.7). Das Maximum beträgt für das Histogramm 0,29 und für die experimentelle Auftragung 0,35 (Abb. 21). Die erwarteten charakteristischen Größen für die jeweiligen Mutantenklassen im experimentellen Repertoire sind in der Tabelle 14 zusammengestellt.

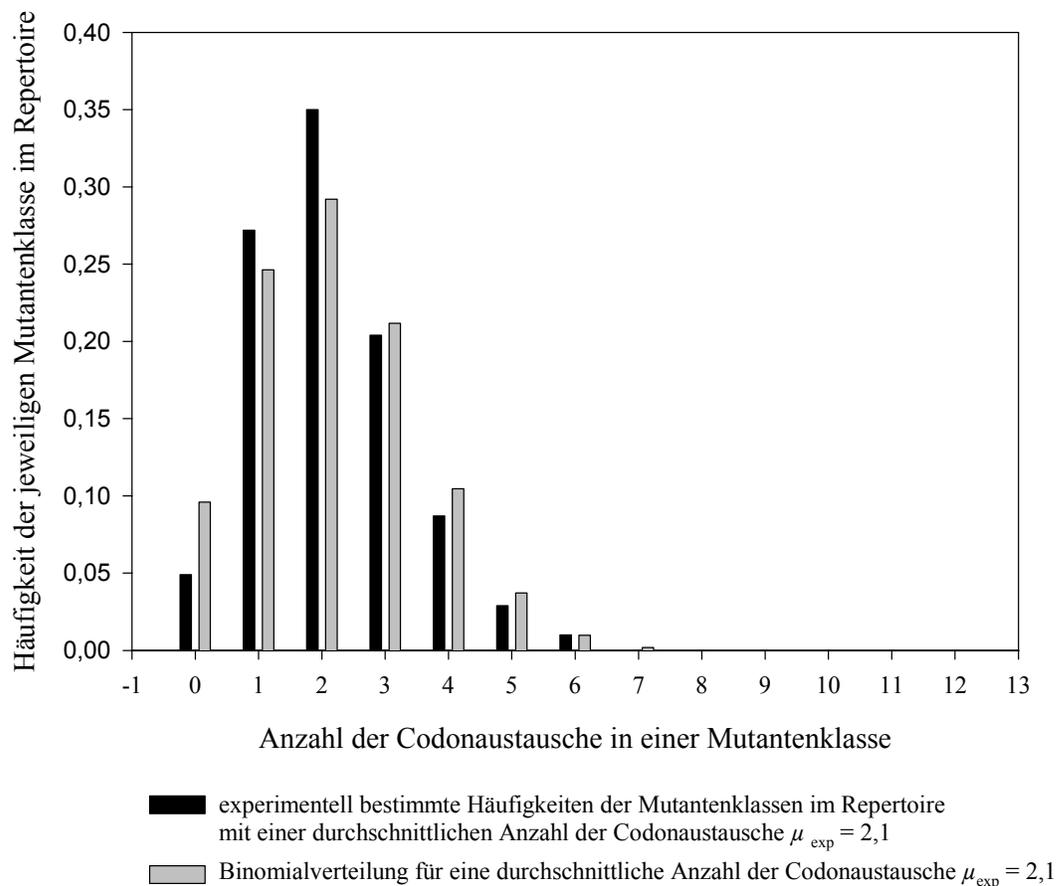


Abb. 21: Vergleich der experimentell bestimmten Häufigkeiten des Auftretens der jeweiligen Mutantenklassen im *hisJ*-Repertoire (schwarze Balken) mit der Binomialverteilung für die experimentell bestimmte durchschnittliche Anzahl der Codonaustausche $\mu_{\text{exp}} = 2,1$ (graue Balken). Die Häufigkeiten der Mutantenklassen wurden für 103 zufällig ausgewählte Klone bestimmt. Die experimentell bestimmte durchschnittliche Anzahl der Codonaustausche beträgt $\mu = 2,1$ mit einer durchschnittlichen Mutationsrate $\bar{p} = 0,165$. Die Binomialverteilung wurde für eine Mutationsrate $p = 0,165$ pro Position in einem Repertoire mit 13 randomisierten Positionen berechnet.

| [1] | [2] | [3] | [4] | [5] |
|-----|-----------------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 0,0959 | 1 | 0,0959 | $3,7 \cdot 10^5$ |
| 1 | 0,2464 | 234 | 0,0011 | $4,3 \cdot 10^4$ |
| 2 | 0,2921 | $2,5 \cdot 10^4$ | $1,2 \cdot 10^{-5}$ | 46,8 |
| 3 | 0,2117 | $1,7 \cdot 10^6$ | $1,2 \cdot 10^{-7}$ | 0,468 |
| 4 | 0,1046 | $7,5 \cdot 10^7$ | $1,4 \cdot 10^{-9}$ | $5,5 \cdot 10^{-3}$ |
| 5 | 0,0372 | $2,4 \cdot 10^9$ | $1,5 \cdot 10^{-11}$ | $5,9 \cdot 10^{-5}$ |
| 6 | $9,8 \cdot 10^{-3}$ | $5,8 \cdot 10^{10}$ | $1,7 \cdot 10^{-13}$ | $6,6 \cdot 10^{-7}$ |
| 7 | $1,9 \cdot 10^{-3}$ | $1,0 \cdot 10^{12}$ | $1,9 \cdot 10^{-15}$ | $7,4 \cdot 10^{-9}$ |
| 8 | $3,0 \cdot 10^{-4}$ | $1,4 \cdot 10^{13}$ | $2,1 \cdot 10^{-17}$ | $8,2 \cdot 10^{-11}$ |
| 9 | $3,0 \cdot 10^{-5}$ | $1,4 \cdot 10^{14}$ | $2,1 \cdot 10^{-19}$ | $8,2 \cdot 10^{-13}$ |
| 10 | $< 1,0 \cdot 10^{-5}$ | $1,0 \cdot 10^{15}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-20}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-14}$ |
| 11 | $< 1,0 \cdot 10^{-5}$ | $5,0 \cdot 10^{15}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-20}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-14}$ |
| 12 | $< 1,0 \cdot 10^{-5}$ | $1,5 \cdot 10^{16}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-20}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-14}$ |
| 13 | $< 1,0 \cdot 10^{-5}$ | $2,0 \cdot 10^{16}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-20}$ | $< 1,0 \cdot 10^{-14}$ |

Tab. 14: Berechnete Populationsstruktur mit einer durchschnittlichen Anzahl der Mutationen $\mu = 2,1$.

[1]: Anzahl der Mutationen in der jeweiligen Mutantenklasse.

[2]: Erwarteter Anteil der jeweiligen Mutantenklasse am experimentellen Repertoire (Binomialverteilung, Gleichung 5.3, Abschnitt 5.1), unter Berücksichtigung von Parametern $n = 13$ und $\mu = 2,1$, vgl. Abb. 21, graue Balken.

[3]: Umfang der Klasse unter Berücksichtigung von Parametern $n = 13$ und $x = 18$, Gleichung 5.9.

[4]: Erwarteter Anteil einer individuellen molekularen Spezies aus der jeweiligen Klasse am experimentellen Repertoire ([2]:[3]).

[5]: Erwartete Häufigkeit des Auftretens einer individuellen molekularen Spezies aus der jeweiligen Klasse im experimentellen Repertoire ([4]· Anzahl unabhängiger Klone kompletter Länge ($3,7 \cdot 10^6$)).

Die durchschnittliche Häufigkeit der Codons im Repertoire betrug bei durchschnittlich 11,6 Austauschen von 103 sequenzierten Klonen 0,112. Da einige Codons an den randomisierten Positionen ein- bis dreimal als Wildtypcodons auftreten, ist ihre erwartete Häufigkeit als „neue“ Codons im Repertoire kleiner als die derjenigen Trimere, die an entsprechenden Positionen im Wildtyp *hisJ* nicht vorhanden sind. Die erwarteten Häufigkeiten für die Codons, die überhaupt nicht, ein-, zwei- oder dreimal im *hisJ*-Repertoire als Wildtypcodons auftreten, sind in der Tab. 15 zusammengestellt. Daraus ergibt sich für alle Trinukleotide eine durchschnittliche Häufigkeit von 0,185, die genauso

wie die theoretische durchschnittliche Anzahl der Mutationen und die Mutationsraten ca. doppelt so hoch ist wie die experimentell bestimmten Werte.

| Anzahl der randomisierten Positionen, an den das jeweilige Codon als Wildtypcodon auftritt | Codons | Erwartete Häufigkeit im <i>hisJ</i> -Repertoire |
|--|--|---|
| 0 | AAA, AAC, ATC, ATG, CAC, CCG, GAA, GCT, GGT, GTT, TGG, TTC | 0,195 |
| 1 | CAG, CGT, TAC | 0,180 |
| 2 | ACC, GAC | 0,165 |
| 3 | CTG, TCT | 0,150 |

Tab. 15: Erwartete Häufigkeiten der Codons im *hisJ*-Repertoire unter Berücksichtigung Anzahl der randomisierten Positionen, an den das jeweilige Codon als Wildtypcodon auftritt. Berechnung der Werte s. Abschnitt 5.1.

Die Ursache für die verminderten experimentellen Daten im Vergleich mit den theoretischen Werten könnte darin liegen, dass die vorgefertigten Trinukleotidphosphoramidit-Mischungen mehrere Wochen vor der DNA-Synthese hergestellt und anschließend gelagert wurden. Die Wildtypcodons wurden dagegen ohne Vorbehandlung für die Synthese direkt eingesetzt. Während der Lagerung kam es möglicherweise teilweise zum Zerfall der Trinukleotidphosphoramidite, so dass bei der Synthese bevorzugt das Wildtypcodon an den randomisierten Positionen eingebaut wurde. Ebenfalls könnten Verunreinigungen, die in einem oder mehreren Trinukleotid-Proben vorhanden waren, die teilweise zur Zersetzung der Mischungskomponenten während der Vorbereitung der Mischungen bzw. Lagerung geführt haben (s. 3.1.4). Diese Verunreinigungen könnten den Einbau aller Trimere in der Mischung gleichmäßig hindern. Dieser Fall ist näher unter (3.1.4.2) erläutert.

3.1.4.2 Vergleich der Kopplungseffizienzen der Trinukleotidphosphoramidite mit den Häufigkeiten der entsprechenden Codons

Die meisten Trinukleotidphosphoramidite zeigten im Vorversuch ähnliche Kopplungseffizienzen (s. 3.1.2.1.2). Sie betragen 69-104 % bezogen auf den Detritylierungswert des vorherigen Nukleotides (Abb. 14). Das Trimer GGT wies mit 40 % die niedrigste Kopplungseffizienz auf. Die Codonhäufigkeiten zeichneten sich dagegen durch eine vergleichsweise eher unsymmetrische Verteilung aus (Abb. 22). Das häufigste Codon TTC wurde bei 31 von 103 sequenzierten Klonen gefunden, das am seltensten repräsentierte Codon CCG war zweimal bei den ausgewerteten Klonen vorhanden. Die anderen Codons waren 7 bis 20 Mal im entsprechenden Teil des Genrepertoires vertreten.

Am häufigsten waren bei den ausgewerteten Klonen Trimere repräsentiert, die kein Guanin enthielten. Die Häufigkeiten dieser Codons korrelierten meistens mit ihren relativ hohen Kopplungseffizienzen: Z. B. wies TTC mit einer normierten Kopplungseffizienz von 1 die größte absolute Häufigkeit von 31 aus 103 Klonen auf. Etwas weniger ausgeprägte Relationen beobachtete man bei AAC, ACC, ATC, CAC, TAC und TCT. Die Thymidinreichen Codons zeigen allgemein gute Kopplungseffizienzen, gefolgt von Adeninreichen Codons. Frühere Arbeiten zeigten, dass T-reiche Trinukleotidphosphoramidite bessere Kopplungseffizienzen und höhere Einbauraten als T-freie Codons zeigen (Hartsch, 1998; Zehl, 1996). Da die Thyminreste keine Schutzgruppen während der Trinukleotidsynthese enthalten, lassen sich die Codons mit hohem T-Anteil leichter herstellen und aufreinigen. Auch während der kombinatorischen DNA Synthese bleiben die Thyminreste ungeschützt. Da sie außerdem relativ klein sind, haben die T-reichen Trinukleotide kinetische Vorteile gegenüber den anderen Codons. Die T-reichen Trinukleotidphosphoramidite, die für die Synthese des *hisJ*-Genrepertoires eingesetzt wurden (TTT, TTC, TCT, GTT), zeigten in einer Mischung mit anderen Trinukleotiden relativ hohe Einbauraten. Dies spiegelte sich in der Überrepräsentierung dieser Codons im Repertoire wieder (11 bis 31 mal bei 103 sequenzierten Klonen). Sie wiesen ebenfalls in einem Vorversuch relativ hohe Kopplungseffizienzen (zwischen 0,79 und 1) auf. Diese Werten liefern allerdings keine Informationen über die Reaktionskinetik der Trinukleotide, da bei der Bestimmung der Kopplungseffizienzen ein 50-facher molarer Überschuß am jeweiligen Trinukleotidphosphoramidit gegenüber dem Reaktionspartner verwendet wurde.

Die Guaninreichen Codons zeigten dagegen relativ starke Abweichungen zwischen ihren Häufigkeiten und Kopplungseffizienzen. Die Ursachen dafür könnten in der langsamen Kinetik der G-reichen Trinukleotide liegen, die bei beim Überschuß die Kopplungseffizienzen der Trimere nicht wesentlich beeinflußt, während sie in einer Mischung mit anderen Trimeren durch die reaktiveren Codons kompetitiert werden. Die

Häufigkeit der meisten G-haltigen Codons im Repertoire war relativ niedrig bei relativ guten Kopplungseffizienzen, wie z. B. bei TGG (normierte Kopplungseffizienz: 0,96, absolute Häufigkeit: 5), CCG (normierte Kopplungseffizienz: 0,67, absolute Häufigkeit: 2) oder ATG (normierte Kopplungseffizienz: 0,91, absolute Häufigkeit: 7).

Das Trinukleotid GGT zeigte im Vorversuch eine normierte Kopplungseffizienz von 0,38, die etwa zweimal kleiner war, als die Kopplungseffizienzen der restlichen Trinukleotidphosphoramidite. Die Reaktionsträgheit des Trinukleotides GGT könnte folgende Ursachen haben (s. 3.1.2.1.2): 1) langsame Reaktionskinetik; 2) schnelle Reaktionskinetik, aber nur ein kleiner Anteil am aktiven Trimer; 3) inhibierende Verunreinigungen in der Probe.

Bei Erhöhung des GGT-Anteiles in der Trimeren-Mischung könnte beim Vorliegen der Fälle 1 oder 2 der Einbau des Codons bei der kombinatorischen DNA Synthese verbessert und somit seine Repräsentanz im Repertoire vergrößert werden. Bei der Anwesenheit inhibierender Verunreinigungen in der Probe würde ein Überschuß von GGT keinen Einfluß auf die relative Häufigkeit des Codons im Repertoire haben, könnte aber die Repräsentanz aller Codons herabsetzen. Das Trinukleotid GGT wurde für die kombinatorische Oligonukleotidsynthese im zweifachen molaren Überschuß gegenüber den einzelnen restlichen Codons in der 19-er Trimeren Mischung eingesetzt. Es war bei 5 von 103 sequenzierten Klonen repräsentiert, und seine Häufigkeit lag damit deutlich unter dem Durchschnitt von etwa 11 bei 103 Klonen. GGT gehörte neben CCG (Häufigkeit 2 von 103) und TGG (Häufigkeit 5 von 103) zu den drei am seltensten vertretenen Codons. Die Verwendung eines Überschusses dieses Trimers bei der Synthese des Genrepertoires brachte keine signifikante Erhöhung der Repräsentanz des Codons gegenüber den anderen Trimere. Dies würde dafür sprechen, dass die Probe mit GGT zusätzlich Verunreinigungen enthält, die eine inhibierende Wirkung auf das Reaktionsverhalten des Trimers haben. Ein weiteres Argument dafür wäre, dass die Repräsentanz aller Codons im Repertoire kleiner als erwartet war (0,116 statt erwartete 0,185).

Der Vergleich zwischen den relativen Häufigkeiten (unter Berücksichtigung der Anzahl der randomisierten Positionen im *hisJ*-Repertoire, an den das jeweilige Codon als Wildtypcodon auftritt) der Codons und ihren Kopplungseffizienzen der Wildtypcodons ist in der Abb. 22 dargestellt.

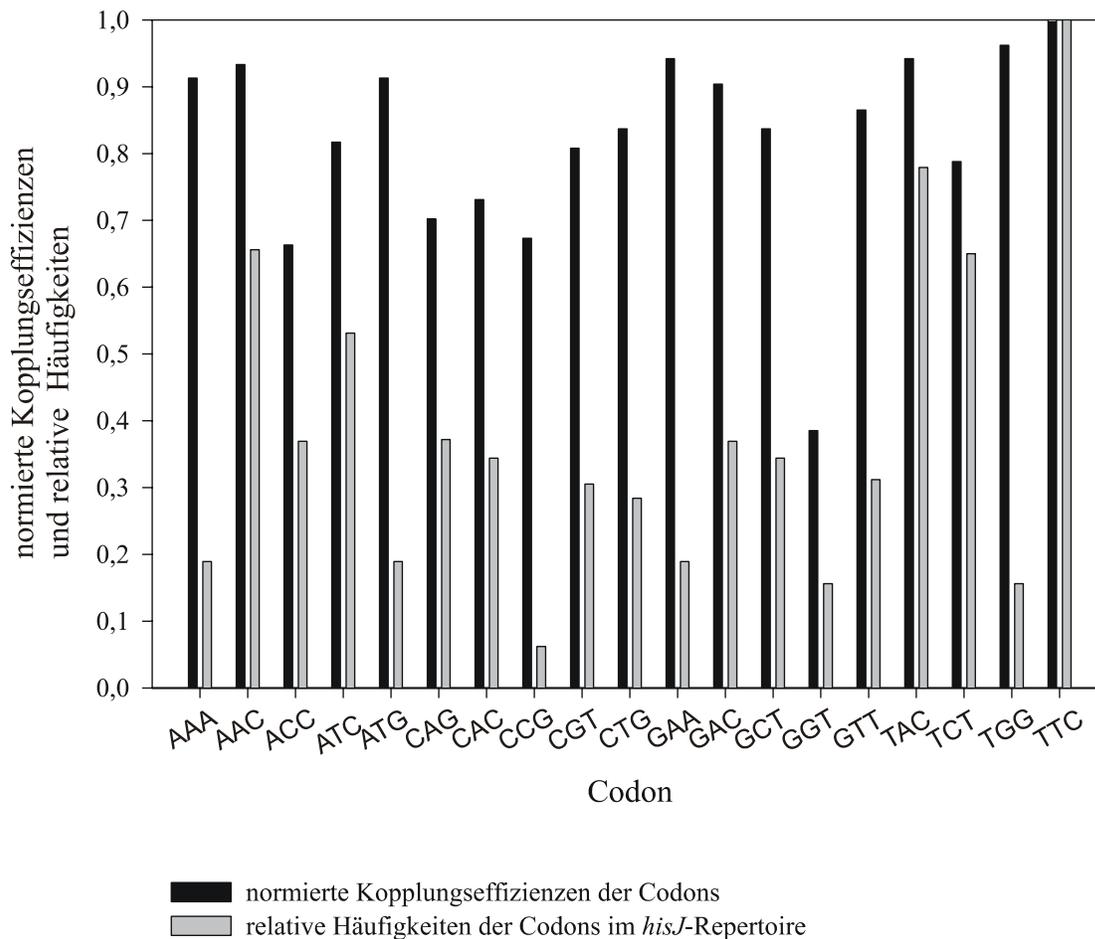


Abb. 22: Vergleich der normierten Kopplungseffizienzen der einzelnen Trinukleotidphosphoramidite mit den relativen Häufigkeiten der entsprechenden Codons im *hisJ*-Repertoire. Die Bestimmung der Häufigkeiten der Codons erfolgte mit 103 zufällig ausgewählten Klonen. Die Wildtypcodons an den randomisierten Positionen wurden dabei nicht berücksichtigt. Bei der Berechnung der relativen Häufigkeiten wurden die absoluten Werte für die Trinukleotide durch die jeweils zur Verfügung stehende Anzahl der randomisierten Positionen dividiert und normiert. Das am häufigsten repräsentierte Codon TTC (Phenylalanin) war bei 32 von 103 ausgewerteten Klonen vertreten.

3.1.4.3 Zusammenhang zwischen den Kopplungseffizienzen der Trinukleotid-phosphoramidite mit den Mutationsraten

Bei den 13 randomisierten Positionen war die Häufigkeit der Austausche mit 0,24 an der Position 52 am größten und mit 0,05 am niedrigsten an der Position 14. Die Unterschiede in den Mutationsraten an den randomisierten Positionen könnten z. T. in den unterschiedlichen Kopplungseffizienzen der Wildtypcodons liegen. T-reiche Codons zeigen normalerweise relativ hohe Kopplungseffizienzen. Zum Beispiel könnte die niedrige Mutationsrate an der Position # 14 an der relativ hohen normierten Kopplungseffizienz des Wildtypcodons TAC (0,94) liegen, was auf die Benachteiligung der restlichen Codons bei der Oligonukleotidsynthese zurückgeführt werden kann. Auch die Positionen # 69, 70 und 72, die jeweils das T-reiche Wildtypcodon TCT als enthalten, zeigten relativ niedrige Mutationsraten von 0,78 bis 0,11. Die Positionen # 120 und 121 mit dem Wildtypcodon ACC, das die zweit niedrigste Kopplungseffizienz von allen eingesetzten Codons zeigte (0,67), wies dagegen eine relativ hohe Mutationsrate von 0,20 bzw. 0,22 auf. Die Positionen # 52 und 117 mit den zwei höchsten Mutationsraten (0,24 und 0,23) enthielten allerdings als Wildtypcodon CTG, das eine relativ hohe Kopplungseffizienz von 84 % zeigte. Die Konkurrenz dieses Trimers durch andere Codons könnte wegen des Guanins am 3'-Terminus an seiner relativ schlechten Kinetik liegen. Auch andere Positionen, mit G-haltigen Wildtypcodons, wie # 11 (GAC), # 71 (CTG) und # 77 (CGT), weisen überdurchschnittliche Mutationsraten auf. Eine Ausnahme ist die Position # 161 mit GAC als Wildtypcodon und einer Mutationsrate von 0,13 (Abb. 23).

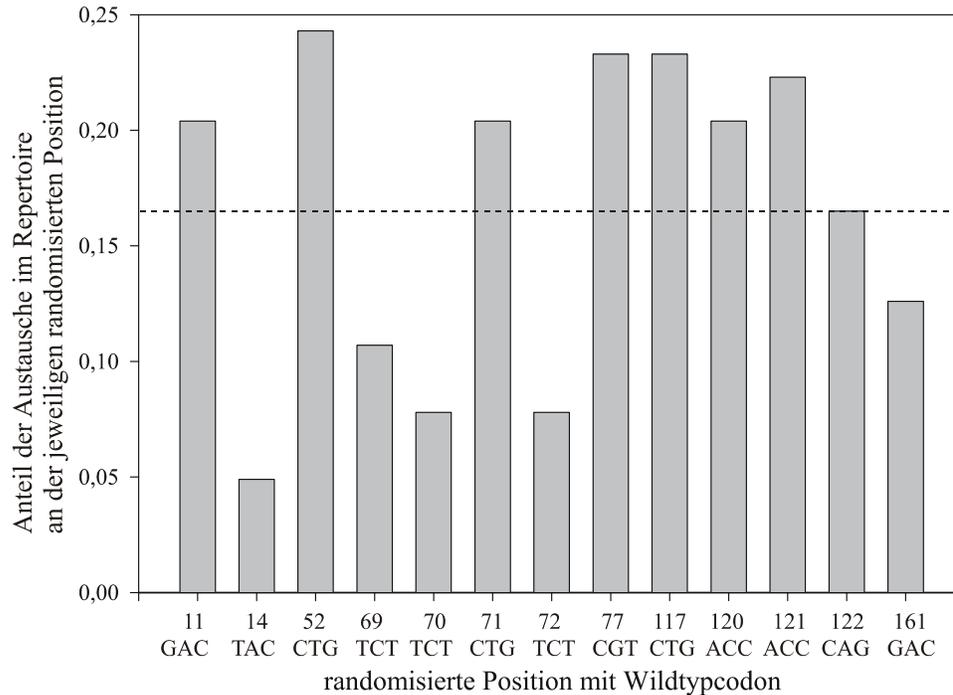


Abb. 23: Auftragung der experimentell bestimmten Mutationsraten bei 103 zufällig ausgewählten Klonen an einzelnen randomisierten Positionen im *hisJ*-Genrepertoire. Die gestrichelte Linie bedeutet die experimentell bestimmte durchschnittliche Mutationsrate von 0,165.

3.1.4.4 Verteilung der Deletionen im *hisJ*-Repertoire

Die meisten Deletionen befanden sich im Bereich des Oligonukleotides ek07 (47 % der ausgewerteten Klone) mit 57 nt Länge und fünf randomisierten Positionen. Davon enthielten 40 % der Klone Deletionen an den randomisierten Stellen. Somit ergab sich im Oligo ek07 eine Häufigkeit der 1n-, 2n-, bzw. 3n-Deletionen von 8 % pro Position. Vier randomisierte Stelle waren direkt miteinander benachbart. Die Kopplung der Trinukleotide in diesem Bereich war mit einer relativ starken Senkung der Kopplungseffizienz verbunden (30-55 %, Abb. 16). Da die relativ langsam reagierenden Trinukleotidphosphoramidite direkt miteinander benachbart waren, konnte eine eventuell unvollständige *Capping-Reaktion* nicht detektiert werden. In Verbindung mit schlechten Kopplungseffizienzen der Trinukleotide an benachbarten Positionen führte dies wahrscheinlich zur Entstehung besonders vieler Deletionen im Oligonukleotid ek07.

Das Oligonukleotid ek02 enthielt die meisten Deletionen außerhalb der randomisierten Positionen. Sie wurden bei 18 % der ausgewerteten Klone gefunden, und mit 52 nt machte das 0,4 % Deletionen pro Position aus. Dieser Wert war mehr als dreimal höher als derjenige für die anderen randomisierten Oligos. Wie man der Abb. 16 entnehmen kann, verlief die Synthese des Oligonukleotides mit einer relativ niedrigen Ausbeute (28,8 % Gesamtausbeute). Man verzeichnete eine schnelle Abnahme der Kopplungseffizienz während der Synthese. Als zusätzlicher Faktor verursachte eine nicht vollständige *Capping-Reaktion* nach jedem Kopplungsschritt insgesamt eine erhöhte Deletionsrate.

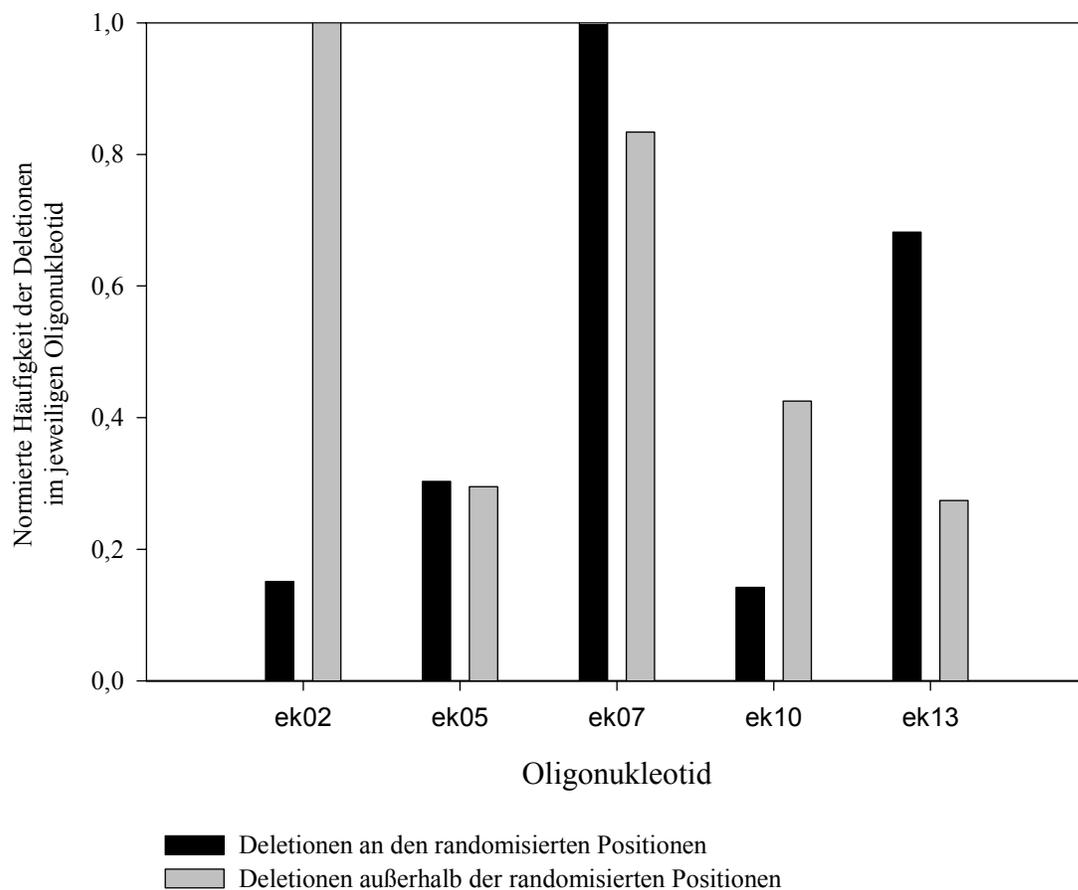


Abb. 24: Darstellung der normierten Häufigkeiten der Deletionen in den randomisierten Oligonukleotiden. Die schwarzen Balken repräsentieren die Deletionen an den randomisierten Positionen, die grauen im nicht randomisierten Bereich. Die Werte für die Deletionen an den randomisierten Positionen ergaben sich nach der Quotientenbildung der absoluten Werte durch die Anzahl der randomisierten Nukleotide. Die Werte für die Deletionen außerhalb der randomisierten Positionen ergaben sich nach der Quotientenbildung der absoluten Werte durch die Anzahl der nicht randomisierten Nukleotide. Alle wurden normiert und beziehen sich vollständig sequenzierte Klone.

| Längen der Deletionen im <i>hisJ</i> -Repertoire | Anzahl der Deletionen an randomisierten Positionen | Anzahl der Deletionen außerhalb der randomisierten Positionen in Random-Oligos | Anzahl der Deletionen außerhalb der randomisierten Oligos | Summe der Deletionen einer bestimmten Länge |
|--|--|--|---|---|
| 1n | 6 | 42 | 54 | 102 |
| 2n | 13 | 3 | 8 | 24 |
| 3n | 43 | 1 | 1 | 45 |
| 4n | 1 | 0 | 1 | 2 |
| 5n | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 6n | 3 | 0 | 0 | 3 |
| 7n | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8n | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 9n | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Summe der Deletionen in der jeweiligen Oligo-Sorte | 69 | 47 | 64 | 180 |

Tab. 16: Verteilung der Deletionslängen bei 103 zufällig ausgewählten Klonen aus dem *hisJ*-Repertoire

3.2. Versuche zur Isolation einer Variante mit veränderten Bindungseigenschaften aus der HisJ-Bibliothek mittels *Phage Display*

In einem Modellexperiment sollten aus der HisJ-Bibliothek Varianten mit einer veränderten und im voraus bestimmten Ligandenspezifität selektiert werden. Dabei sollte der Ligand bestimmte Voraussetzungen erfüllen, die sich aus der experimentell bestimmten Populationsstruktur des *hisJ*-Repertoires ergeben (s. u.). Die Sequenzanalyse des *hisJ*-Genrepertoires ergab kleinere Werte für die durchschnittliche Anzahl der Mutationen als erwartet (2,1 statt 3,7) und 90 % der Klone mit Deletionen. Das führt dazu, dass nur die Mutantenklassen 1 und 2 vollständig vertreten sind (s. Tab. 13, Spalte 5). Für die individuellen Spezies mit vier Mutationen in einer Gensequenz ergab sich eine erwartete Häufigkeit von 0,55 % im experimentellen Repertoire. Für alle höheren Mutantenklassen ist der Anteil der Spezies für praktische Zwecke vernachlässigbar klein. Somit ist die Wahrscheinlichkeit relativ gering, aus dem hergestellten Repertoire solche Varianten zu isolieren, die einen Hamming-Abstand größer als 2 von der Ausgangssequenz haben (Gabarro-Arpa *et al.*, 2000). Dies schränkt die Wahl der Modellliganden auf solche ein, die sich nicht drastisch von Histidin unterscheiden.

Als Ligand für das Modellexperiment kam das D-Biotin in Frage, das wie Histidin ein relativ kleines Molekül ist und außerdem technische Vorteile bietet (s. Abschnitt 3.2.3).

Für die Durchmusterung der HisJ-Bibliothek nach Varianten mit erhöhter Affinität zu Biotin sollte die HisJ-Bibliothek auf M13-Phagen präsentiert werden und mittels *Pannig* die gewünschten Varianten isoliert werden. Dafür wurden zuerst Vorexperimente, zu denen die Konstruktion eines geeigneten Vektors und Optimierungsversuche gehören, durchgeführt.

3.2.1 Vorversuche zum *Phage Display* der HisJ-Bibliothek

3.2.1.1 Konstruktion des Phagenvektors pCANTABhisJ

Als Präsentationsvektor für die HisJ-Bibliothek wurde der pCANTAB5E verwendet, der in linearisierter Form kommerziell erhältlich ist (Pharmacia). Die Klonierung wurde zuerst mit dem *hisJ*-Wildtypgen durchgeführt.

Das Genfragment sollte an den N-Terminus des Gen III inkloniert werden. Da der Vektor eine unvollständige *gIII*-Signalsequenz enthielt, wurde das fehlende Fragment (Aminosäuresequenz ProAlaMetAla) eingeführt, um das Fusionsproteins im Periplasma zu exprimieren.

Da die Ligation des *hisJ*-Genfragmentes über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* erfolglos war, wurde ein Polylinker (39 bp), der die Restriktionsstellen *SallI* und *BglII* enthielt, mit dem Vektor ligiert (2.2.1.13.2).

Nach der Klonierung des *hisJ*-Gens über die Schnittstellen *SallI* und *BglII* wurde in den pCANTAB5E die fehlende Signalsequenz eingeführt. Dafür wurde aus dem Vektor pCANTABSallhisJ mit *HindIII* und *KpnI* ein Fragment entfernt (2.2.1.13.1, 2.2.1.8), das die unvollständige Signalsequenz und ca. 30 Basenpaare des *hisJ*-Gens enthielt. Die Sequenz wurde durch ein Fragment ersetzt, das die vollständige Signalsequenz und die ausgeschnittene *hisJ*-Sequenz enthielt.

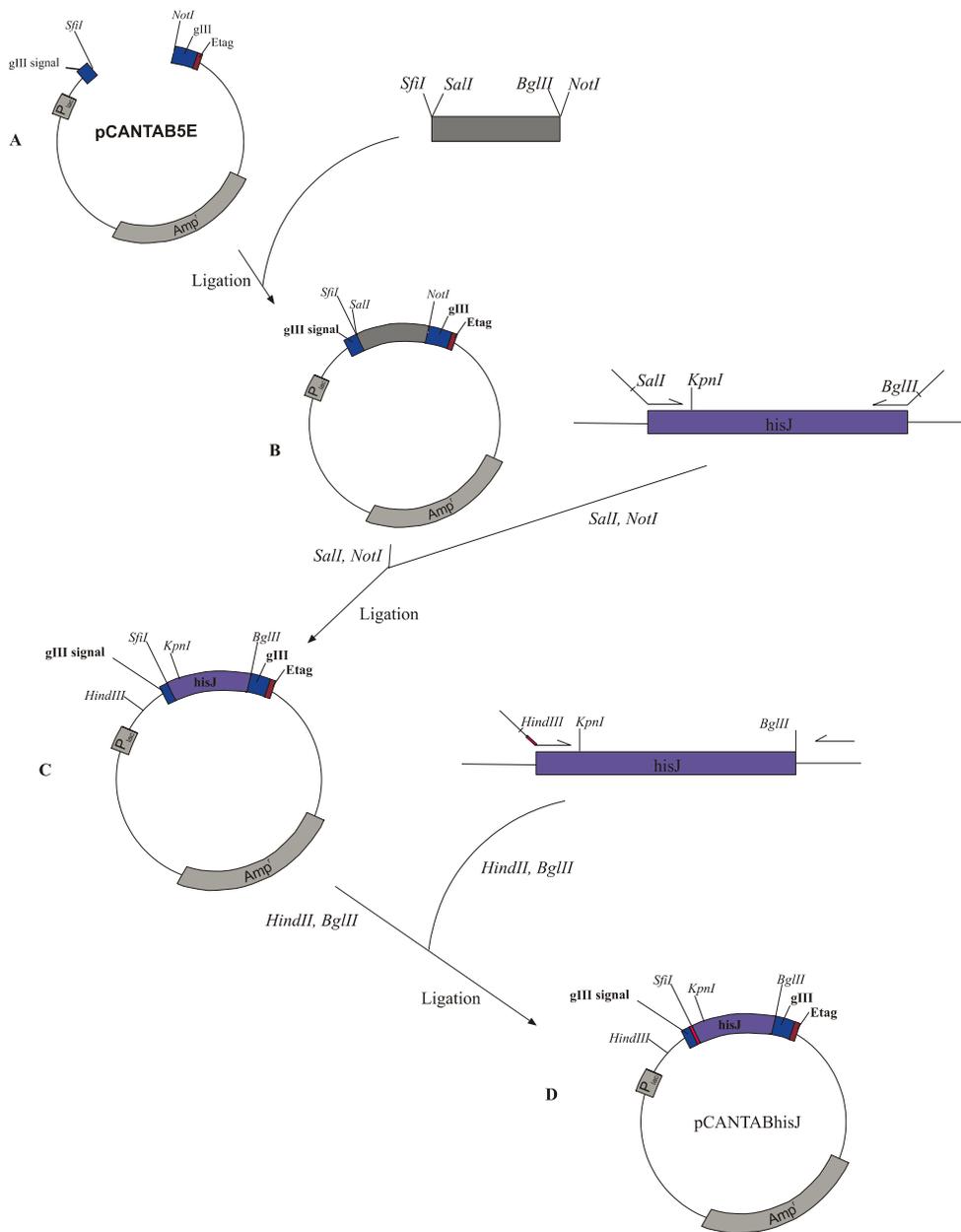


Abb. 25: Schema zur Klonierung des *hisJ*-Gens und zur Einführung der fehlenden *gIII* Signalsequenz in den Phagenvektor pCANTAB5E. In den pCANTAB5E Vektor, der in linearisierter Form kommerziell erwerblich ist (A), wurden durch Ligation eines Polylinkers die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *BglII* eingeführt (B). Das *hisJ*-Gen wurde mit diesen Restriktionsschnittstellen amplifiziert, mit *SalI* und *BglII* gespalten und in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespaltenes, aufgereinigtes Vektorfragment einkloniert (C). Die fehlende *gIII* Signalsequenz (MetAla) wurde in einer PCR mit dem 5'-cant-ma-us Primer an den Aminoterminus des *hisJ*-Gens eingeführt. Die Klonierung in den Vektor erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BglII*. In dieser Weise wurde ein Phagenvektor konstruiert, der das *hisJ*-Gen mit einer C-ständigen *gIII*-Sequenz und einer aminoterminalen *gIII*-Signalsequenz enthält.

3.2.1.2 Expression des löslichen Histidin-Bindeprotein in einem Nicht-Suppressor *E. coli* Stamm BL21

Das Assemblieren der Phagenproteine und der Phagen-DNA zu vollständigen Phagenpartikeln findet im Periplasma statt. Die aminoternale *gIII*-Signalsequenz befördert das Protein in den periplasmatischen Raum. Sie wird nach der Translokation durch die Signalpeptidase abgespalten (Vieira & Messing, 1987).

Im Phagenvektor pCANTABhisJ ist das *hisJ*-Gen mit der aminoterminalen gpIII-Signalsequenz lokalisiert. Am C-Terminus befindet sich das Etag, das *amber* Stopcodon und das Gen III. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle des *lacZ* Promotors. In einem *E. coli* Nicht-Suppressorstamm BL21 wird das Stopcodon durch die Terminationsfaktoren erkannt und das HisJ nach der Induktion mit IPTG in löslicher Form ins Periplasma sekretiert. Das Etag dient der immunochemischen Detektion des löslichen bzw. des Fusionsproteins mit einem anti-Etag spezifischen Antikörper (Messing, 1991).

Das lösliche Histidin-Bindeprotein wurde im Periplasma des Nicht-Suppressorstammes BL21 immunochemisch mit einem anti-Etag und einem anti-HisJ Antikörper nachgewiesen (2.2.2.6). Eine Flüssigkultur der mit dem Vektor pCANTABhisJ transformierten BL21 Zellen wurde bei einer $OD_{600} = 0,5$ mit IPTG induziert und danach jede Stunde 10 ml Kultur abgenommen. Als Kontrolle wurde parallel der nichttransformierte Stamm parallel kultiviert. Von allen Proben wurde ein periplasmatischer Extrakt präpariert (2.2.2.1) und die Proteine immunochemisch mit dem anti-HisJ bzw. anti-Etag spezifischen Antikörper auf einer Nitrocellulosemembran detektiert. Beim Nachweis mit dem anti-HisJ Antikörper wurden bei den induzierten Proben zwei intensive Banden detektiert, die dem HisJ bzw. HisJ-Etag Protein zugeordnet werden konnten. Die Detektion mit dem anti-Etag Antikörper ergab bei den Proben nach der Induktion mit IPTG jeweils eine intensive Bande, die der Größe des HisJ-Etag Proteins entsprach ($M_r = 28400$, Wolf *et al.*, 1995 und Pope, 1996). Allerdings zeigte der Periplasmaextrakt des nichttransformierten Stammes, der als Kontrolle diente, ebenso eine Bande mit $M_r = \text{ca. } 30000$, die auf unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers zurückgeführt werden konnte.

Dieser Nachweis zeigte, dass in einem *E. coli* Nicht-Suppressorstamm wie BL21 durch die Anwesenheit des *amber* Stopcodons die Translation des HisJ-Etag Proteins terminiert wird und die durch gpIII-Signalsequenz vermittelte Translokation des Proteins ins Periplasma stattfindet.

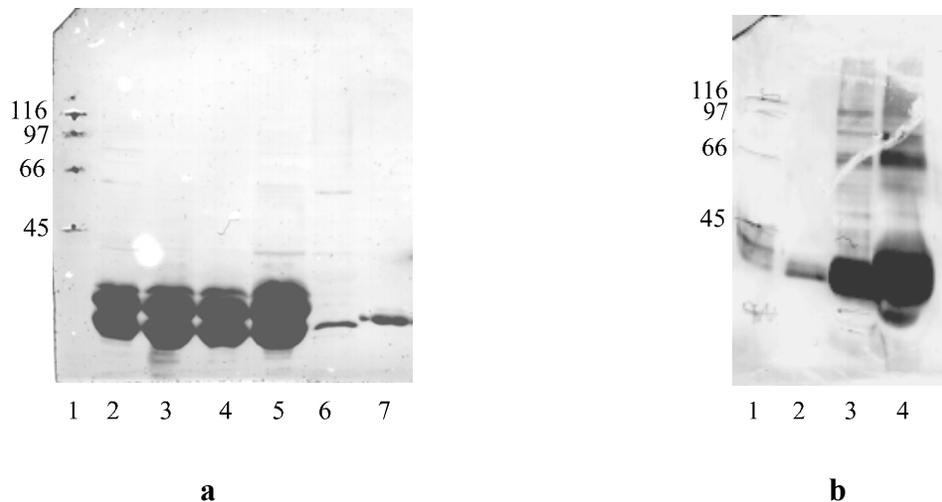


Abb. 26: Immunochemischer Nachweis von HisJ im Periplasma des *E. coli* BL21 Stammes. a) Nachweis mit einem HisJ-spezifischen Antikörper; 1: *High Range Molecular Marker*; 2-5: periplasmatischer Extrakt aus dem mit pCANTABhisJ transformierten BL21 Stamm 1. bis 4. Stunde nach Induktion; 6: periplasmatischer Extrakt aus dem nichttransformierten BL21; 7: HisJ-6H; b) Nachweis mit einem anti-Etag Antikörper; 1: *High Range Molecular Marker*; 2: periplasmatischer Extrakt aus dem nichttransformierten BL21; 3: periplasmatischer Extrakt aus dem mit pCANTABhisJ transformierten BL21 Stamm, 1. Stunde nach Induktion; 4: periplasmatischer Extrakt aus dem mit pCANTABhisJ transformierten BL21 Stamm, 4. Stunde nach Induktion. Relative Molmasse der Proteine: M_r (HisJ) = 27 000, M_r (Etag) = 1 400.

3.2.1.3 Expression des HisJ-gpIII Fusionsproteins im Periplasma eines *E. coli* Suppressorstammes TG1

Für das *Phage Display* sollte das HisJ als Fusionsprotein mit gpIII auf der Oberfläche des Phagen präsentiert werden. Das Fusionsprotein wird in einem *amber* Suppressor Stamm wie *E. coli* TG1 gebildet, der eine Mutation im Anticodon der Glutamin-tRNA enthält. Dadurch sind die Erkennungseigenschaften der tRNA so verändert, dass das Stopcodon als Glutamin abgelesen wird. Da die Suppression des *amber* Stopcodons im TG1 Stamm mit ca. 20 %-iger Effizienz erfolgt, wird neben dem HisJ-gpIII Fusionsprotein das lösliche Protein gebildet (Hoogenboom *et al.*, 1991).

Das HisJ-gpIII Fusionsproteins wurde im Periplasma der *E. coli* TG1 Zellen immunochemisch mit dem anti-HisJ und dem anti-Etag-Antikörper nachgewiesen (2.2.2.6). Nach der Induktion der Flüssigkultur mit IPTG bei $OD_{600} = 0,5$ wurden jede Stunde Proben genommen und ein periplasmatischer Extrakt präpariert (2.2.2.1).

Aufgrund einer Glycin-reichen Region im gpIII Protein wurde auf der Nitrocellulosemembran eine Verschiebung der mit dem Fusionsprotein korrespondierenden

Banden um ca. 20 000 zum höheren Molekulargewicht beobachtet (van Wezenbeek *et al.*, 1980). Die relative Molmasse des HisJ-gpIII Fusionsproteins beträgt 73 000 (Wolf *et al.*, 1995 und Pope *et al.*, 1996), auf der Nitrocellulosemembran wurde eine Bande bei ca. 90000 detektiert.

Bei einem immunochemischen Nachweis mit einem anti-HisJ spezifischen Antikörper wurden auf der Nitrocellulosemembran Banden detektiert, die dem HisJ-gpIII Fusionsprotein entsprachen ($M_r = \text{ca. } 90\,000$ unter Berücksichtigung der Bandenverschiebung) sowie dem löslichen HisJ und HisJ-Etag Protein ($M_r = 27\,000$ bzw. $M_r = 28\,400$). Unterhalb der Bande bei $M_r = \text{ca. } 90000$ wurden Spuren eines proteolytischen Abbaus des Fusionsproteins gefunden (Banden bei $M_r = \text{ca. } 50\,000$ bis $70\,000$), die im Verlauf der Inkubation intensiver wurden.

Mit dem anti-Etag Antikörper wurde das lösliche HisJ-Etag Protein ($M_r = 28\,400$) und das HisJ-gpIII-Fusionsprotein detektiert. Außerdem fand man Banden, die ebenso wie beim Nachweis mit dem anti-HisJ Antikörper, für einen proteolytischen Abbau der Proteine sprachen. Möglicherweise wurde gpIII Signalsequenz nicht vollständig, bzw. unspezifisch durch die Signalpeptidase gespalten, wodurch mehrere Banden im Western Blot zu sehen waren.

Der Intensität der Banden nach betrug das Verhältnis des gebildeten Fusionsproteins zu löslichem Protein etwa 1:1. Laut Literatur sollte dieses Verhältnis ca. 1:5 betragen (Hoogenboom *et al.*, 1991), allerdings deutete das Ergebnis des Experiments darauf hin, dass die Suppression des *amber* Stop Codons im TG1 Stamm im größeren Ausmaß stattfindet als erwartet. Es wäre auch möglich, dass der Transport des Fusionsproteins ins Periplasma leichter verläuft als der des löslichen Histidin-Bindeproteins.

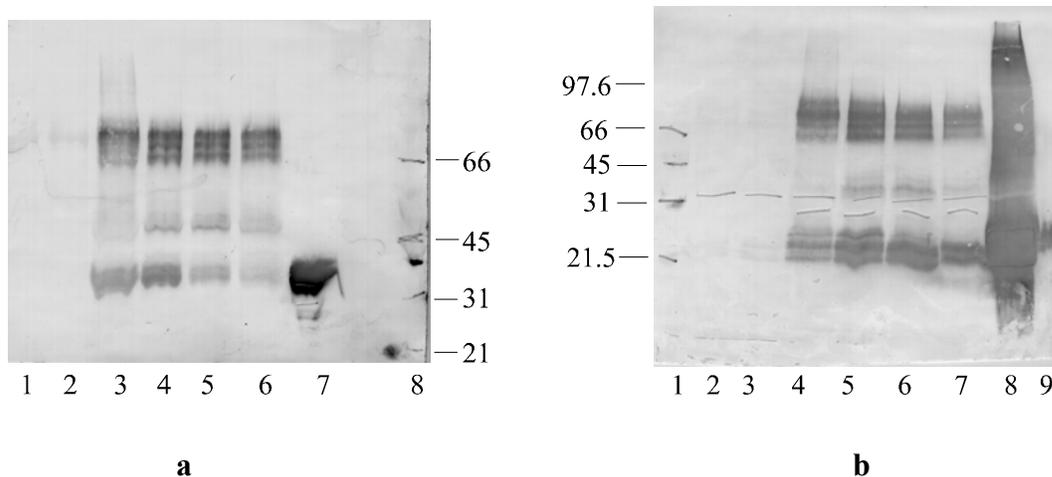


Abb. 27: Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Proteins im Periplasma des *E. coli* TG1 Stammes. **a)** Nachweis mit einem anti-E Antikörper; 1: Periplasmtischer Extrakt aus dem Wildtyp *E. coli* TG1; 2: Mit pCANTABhisJ transformierter *E. coli* TG1 Stamm vor der Induktion, periplasmatischer Extrakt; 3-6: 1. bis 4. Stunde nach der Induktion; 7: Periplasmatischer Extrakt des mit pCANTABhisJ transformierten *E. coli* BL21 Stammes; 8: *Low Range Molecular Marker*; **b)** Nachweis mit einem anti-HisJ spezifischen Antikörper; 1: *Low Range Molecular Marker*; 2: Periplasmatischer Extrakt aus dem Wildtyp *E. coli* TG1; 3: Mit pCANTABhisJ transformierter *E. coli* TG1 Stamm vor der Induktion, periplasmatischer Extrakt; 4-7: 1. bis 4. Stunde nach Induktion; 8: periplasmatischer Extrakt des *E. coli* BL21 Stammes; 9: HisJ-6H. Relative Molmassen der Proteine: M_r (HisJ) = 27 000 (Wolf *et al.*, 1995); M_r (Etag) = 1 400; M_r (gpIII-Signalsequenz) = 3 400, M_r (gpIII) = 46 000 (Pope *et al.*, 1996).

3.2.1.4 Expression des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Oberfläche des M13 Phagen

Die Präsentation des Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche wurde zunächst mit dem Wildtyp HisJ optimiert. Zur Herstellung der Phagen mit dem HisJ-gpIII Fusionsprotein wurden die mit dem Phagenvektor pCANTABhisJ transformierten *E. coli* TG1 Zellen im dYT/*Amp* Medium bis zu einer $OD_{600} = ca. 0,1$ vermehrt und dann 1 h mit den M13KO7 Phagen infiziert (2.2.3.2). Dabei wurden den Ampicillin-resistenten Zellen zusätzlich die Kanamycinresistenz vermittelt. Die Phagen wurden weitere 4,5 h im Ampicillin und Kanamycin enthaltenden Medium vermehrt. Die im Medium angereicherten Phagen wurden durch Fällung mit PEG einkonzentriert (s. 2.2.3.3) und durch eine Sucrosedichtegradienten Zentrifugation aufgereinigt (s. 2.2.1.11). Dadurch sollten die Phagen von den löslichen Fusionsproteinen aus dem Medium abgetrennt werden. Nach der Zentrifugation wurden die Fraktionen vereinigt und die Phagen durch eine PEG Fällung einkonzentriert (s. 2.2.3.3).

3.2.1.4.1 Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche

Das HisJ-gpIII Fusionsprotein wurde immunochemisch mit einem anti-HisJ Antikörper nachgewiesen (s. 2.2.2.6). Dafür wurden HisJ-Phagen verwendet, die über einen Sucrosegradienten aufgereinigt worden waren. Dadurch sollte lösliches HisJ-gpIII Fusionsprotein aus der Phagenlösung entfernt werden.

Auf der Nitrocellulosemembran wurde eine Bande detektiert, die mit einer Größe von $M_r = \text{ca. } 90\,000$ (unter Berücksichtigung der gpIII-Verschiebung) dem HisJ-gpIII Fusionsprotein entspricht (s. 3.2.1.3). Somit wurde gezeigt, dass das HisJ auf der Oberfläche des M13 als Fusion mit gpIII präsentiert wurde und eine Basis für die Präsentation des Rezeptorenrepertoires auf der Phagenoberfläche geschaffen wurde. Bemerkenswert war, dass die Bande bei einer Phagenmenge zwischen 1×10^{11} und 5×10^{11} pfu zu sehen war. Mit 1×10^{12} pfu wurde keine Bande detektiert, sondern eine schmierige Spur. Wahrscheinlich stört eine Überladung des Polyacrylamid-Gels mit den Phagen das Laufverhalten der Proteine, was zu unscharfen Banden führt. Außerdem wurde eine verschmierte Bande bei den Hirudin-Phagen zu sehen, die auf unspezifische Wechselwirkungen mit dem Serum hindeutete.

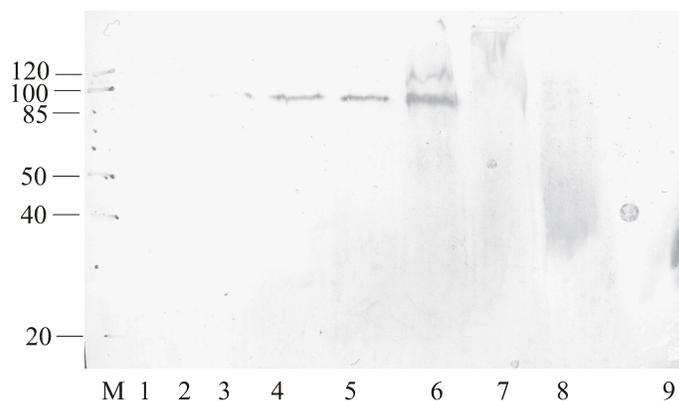


Abb. 28: Immunochemischer Nachweis des HisJ-gpIII Fusionsproteins auf der Phagenoberfläche mit dem polyklonalen anti-HisJ Serum (Verdünnung 1:1000). 1: 1×10^{10} pfu HisJ-Phagen; 2: 2×10^{10} pfu HisJ-Phagen; 3: 5×10^{10} pfu HisJ-Phagen; 4: 1×10^{11} pfu HisJ-Phagen; 5: 2×10^{11} pfu HisJ-Phagen; 6: 5×10^{11} pfu HisJ-Phagen; 7: 1×10^{12} pfu HisJ-Phagen; 8: 1×10^{11} pfu Hirudin-Phagen; 9: HisJ-6His.

3.2.1.4.2 Versuch zur Anreicherung der HisJ-Phagen aus einem Phagengemisch durch Panning gegen das polyklonale anti-HisJ-Serum

Die Präsentation des Fusionsproteins auf den Phagen sollte ferner in einem *Panning*-Experiment gegen das polyklonale anti-HisJ Serum nachgewiesen werden (s. 2.2.3.6).

Das auf der Phagenoberfläche präsentierte Genprodukt sollte der Wechselwirkung mit einem potentiellen Zielmolekül zugänglich sein. Dieser Fall sollte in mehreren Runden von Selektionsprozessen eine Isolierung von Varianten mit erhöhten Affinitäten zum Liganden erlauben. Im *Panning* der HisJ-Phagen als Mischung mit Kontrollphagen gegen das polyklonale anti-HisJ Serum sollte getestet werden, ob das HisJ als Fusionsprotein mit gpIII vom Serum erkannt wird. Aus einer Phagenmischung aus HisJ- und Hirudin-Phagen im Verhältnis 1:1000 sollten die ersteren in einem *Panning*-Experiment gegen das polyklonale anti-HisJ Serum im Fall einer erfolgreichen Oberflächenpräsentation angereichert werden.

Die Phagenmischung wurde in jeder Runde in einem *Immunotube* (Nunc), das zuvor mit dem 1:600 verdünnten Serum beschichtet wurde, 2 h inkubiert. Um die gebundenen Phagen zu eluieren, wurde das Röhrchen nach dem Auswaschen mit PBS und PBS *Tween* einem pH-Schock ausgesetzt (Glycin/HCl Puffer mit pH 2,2, s. Abschnitt 2.2.2.9). Die Reinfektion der Zellen mit den eluierten Phagen dauerte 5,5 h. Anschließend wurden die Phagen über eine PEG Fällung einkonzentriert (2.2.3.3). Für jede *Panning*-Runde wurden $1 \cdot 10^{12}$ bzw. $2 \cdot 10^{12}$ Phagen eingesetzt. Nach vier Runden wurde keine signifikante Anreicherung der eluierten Phagen festgestellt.

Das *Panning*-Experiment wurde mit einer Verdünnung des Serums 1:60 wiederholt. Das Verhältnis der eluierten zu den gebundenen Phagen war in diesem Fall in jeder *Panning*-Runde zwei- bis sechsmal größer als bei der 1:600 Verdünnung, allerdings blieb er von der ersten bis zur vierten *Panning*-Runde konstant (Tab. 17).

Die HisJ-Phagen konnten möglicherweise deshalb aus einer Phagenmischung im *Panning* gegen das polyklonale anti-HisJ Serum nicht angereichert werden, weil der Erkennungsbereich des HisJ vom Serum durch die Fusion mit gpIII nicht mehr zugänglich war. Wahrscheinlicher ist es aber, dass das anti-HisJ Serums eine ungenügende Spezifität besitzt, um die HisJ-Phagen aus einem Phagengemisch zu selektieren, da bei einer größeren Serumkonzentration in jeder Runde *Panning* mehr Phagen eluiert wurden. Dies wurde dadurch bestätigt, dass beim immunochemischen Nachweis der HisJ-Phagen (s. 3.2.1.4.1) mit dem Serum unspezifische Banden bei den Hirudin-Phagen detektiert wurden.

| Panning Runde | Verdünnung des Serums 1: 600 | | | Verdünnung des Serums 1: 60 | | |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| | <i>Input (pfu)</i> | <i>Output (pfu)</i> | <i>Input (pfu)/ Output (pfu)</i> | <i>Input (pfu)</i> | <i>Output (pfu)</i> | <i>Input (pfu)/ Output (pfu)</i> |
| 1 | $2 \cdot 10^{12}$ | $6,5 \cdot 10^5$ | $3,2 \cdot 10^{-7}$ | $2 \cdot 10^{12}$ | $1,0 \cdot 10^6$ | $5,0 \cdot 10^{-7}$ |
| 2 | $1 \cdot 10^{12}$ | $4,5 \cdot 10^5$ | $4,5 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{12}$ | $9,8 \cdot 10^5$ | $9,8 \cdot 10^{-7}$ |
| 3 | $2 \cdot 10^{12}$ | $2,6 \cdot 10^4$ | $1,3 \cdot 10^{-7}$ | $2 \cdot 10^{12}$ | $1,6 \cdot 10^6$ | $8,4 \cdot 10^{-7}$ |
| 4 | $2 \cdot 10^{12}$ | $3,2 \cdot 10^8$ | $1,6 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{12}$ | $7,8 \cdot 10^5$ | $7,8 \cdot 10^{-7}$ |

Tab. 17: Anreicherungsversuche der HisJ-Phagen gegenüber der Hirudinphagen in einem Panning-Experiment gegen das polyklonale anti-HisJ Serum unterschiedlicher Konzentrationen. Um die Präsentation des HisJ auf der Phagenoberfläche zu testen, wurde ein Panning-Versuch durchgeführt, bei dem eine Mischung aus Hirudin-Phagen und HisJ-Phagen in einem Verhältnis 1: 1000 für die erste Runde Panning gegen das polyklonale anti-HisJ-Serum eingesetzt wurden. Es wurden zwei Panning-Experimente durchgeführt, bei den die Polystyrenoberfläche der Immunotubes mit einer Serum-Verdünnung 1 : 600 bzw. 1 : 60 inkubiert wurde.

3.2.2. Präsentation der HisJ-Bibliothek auf den M13 Phagen

Für die Durchmusterung der HisJ-Bibliothek nach Varianten, die einen niedermolekularen Liganden binden, wurde das Repertoire als ein Fusionsprotein mit dem gpIII Protein auf der Oberfläche der M13 Phagen präsentiert. Die bei -80 °C eingefrorene Kultur der mit dem *hisJ*-Genrepertoire transformierten TG1 *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 400 μl LB-Amp Medium wurde mit 500 μl der Kultur (ca. $1 \cdot 10^{11}$ lebende Zellen) angeimpft und mit ca. $1 \cdot 10^{13}$ pfu M13 Helferphagen infiziert. Nach 2 h wurden 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zugegeben, um die infizierten Zellen zu selektieren. Die Vermehrung der Phagen erfolgte über Nacht bei 37 °C . Die Phagen wurden anschließend zweimal mit PEG/NaCl gefällt (2.2.1.22) und in 2 ml TE aufgenommen. Man erhielt ca. $3 \cdot 10^{11}$ pfu/ml Kultur.

Um die eventuelle Besetzung der Rezeptoren mit den Komponenten des Mediums zu vermeiden, wurden die Phagen über Nacht gegen 7 M Harnstoff dialysiert. Dabei sollten die Rezeptoren denaturieren und gebundene Moleküle freigesetzt werden. Die Renaturierung erfolgte durch Dialyse über Nacht gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,7. Die Phagen wurden anschließend mit 15 % Glycerol versetzt und bei -20 °C gelagert. Eine Test-Infektion der TG1 Zellen zeigte, dass die De- und Renaturierung der Phagen keinen wesentliche Einfluß auf ihre Infektiosität hatte.

Das Fusionsprotein des Genrepertoires (*hisJ^{rep}*) mit dem Phagenprotein gpIII wurde immunochemisch im Western Blot mit dem polyklonalen anti-HisJ Serum nachgewiesen. Dafür wurden die über einen Sucrosegradienten aufgereinigten Phagen mit 1/5 Vol. *Lysis Mix* 20 min bei 70 °C inkubiert. Man beobachtete auf der Nitrocellulosemembran bei ca. 100 kDa eine Bande, die dem Fusionsprotein mit der relativen Molekularmasse von 72000

entsprach, wenn man die Verschiebung der Banden um ca. 20 kDa in Richtung des höheren Molekulargewichtes berücksichtigt. Diese Verschiebung war wahrscheinlich auf einen Glycin-reichen Bereich zwischen den Domänen des Proteins zurückzuführen (van Wezenbeek *et al.*, 1980). Die schwache Intensität der Bande geht darauf zurück, dass die Phagenbibliothek nur 10 % Varianten enthält, die frei von Rasterschubmutationen und Stop Codons sind. Aus diesem Nachweis folgt, dass die HisJ-Bibliothek als Fusionsprotein mit gpIII auf der Oberfläche des M13 Phagen präsentiert wurde. Die stellte eine Grundlage für die Durchmusterung der Bibliothek nach gewünschten HisJ-Varianten dar.

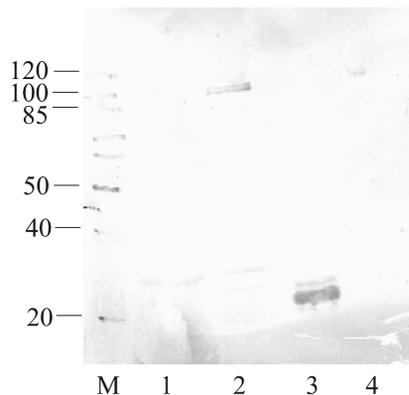


Abb. 29: Immunochemischer Nachweis des HisJ^{rep}-gpIII Fusionsproteins der Phagenbibliothek. 1: Hirudin-Phagen, $1 \cdot 10^{11}$ pfu; 2: HisJ^{L52F}-Phagen, $1 \cdot 10^{11}$ pfu; 3: HisJ-6H; 4: HisJ^{rep}-Phagen, $1 \cdot 10^{12}$ pfu.

3.2.3 Durchmusterung des HisJ-Repertoires nach Varianten mit erhöhter Affinität zum D-Biotin

Die Präsentation des Rezeptorenrepertoires als Fusionsprotein mit gpIII auf der Phagenoberfläche, die immunochemisch mit einem anti-HisJ Serum nachgewiesen wurde (s. Abschnitt 3.2.2), war eine Ausgangsvoraussetzung für das *Panning*-Experiment. Für die Durchmusterung der HisJ-Bibliothek mittels *Phage Display* nach Varianten, die einen niedermolekularen Liganden binden, sollte das Targetmolekül über ein genügend langes Linkermolekül (mind. 30 Å) auf eine Festphase gebunden werden. Dadurch könnten die sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und der Oberfläche während der *Panning*-Prozedur vermieden werden.

Da das Wildtyp-HisJ ein Rezeptormolekül für einen niedermolekularen Liganden ist, sollte für die Durchmusterung der Bibliothek ebenfalls ein kleines Molekül als Zielstruktur dienen. Dafür war D-Biotin vorgesehen, da es den praktischen Vorteil besitzt, dass es als ein

Derivat mit einem relativ langen, hydrophilen Linker (23 Å) kommerziell erhältlich ist. Dieses Molekül besitzt eine terminale, primäre Aminogruppe, die an eine andere, aktivierte Aminogruppe gekoppelt werden kann. Das Biotinderivat EZ-LinkTMNHS-LC-LC-Biotin (Pierce) wurde auf Mikrotiterplatten immobilisiert, die mit einem *Spacer*-Molekül auf der Polystyrenoberfläche kommerziell erworben wurden (CovaLinkTM-Mikrotiterplatten, Nunc). Dieses Molekül trägt eine terminale, primäre Aminogruppe an die nach der Aktivierung mit Trichlorazin eine weitere Aminogruppe gekoppelt werden kann. Durch die Kopplung von EZ-LinkTMNHS-LC-LC-Biotin an die Aminogruppe der CovaLinkTM-Mikrotiterplatten wurde somit ein genügend großer Abstand zwischen dem Liganden und der Festphase (ca. 38 Å) sicher gestellt. Die Kopplung an die Festphase kann aus diesem Grund auf einem einfachen Weg erfolgen, und man kann sie direkt immunochemisch mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat nachweisen.

Die Kopplung des Biotin-Derivates wurde wie im Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Die Detektion erfolgte in einem ELISA *Reader* durch die Umsetzung von *para*-Nitrophosphat durch die alkalische Phosphatase. Eine Negativkontrolle mit einem nicht aktivierten *Well* ergab kein signifikantes Signal ($V_{\max} = 0,001$), während es beim *Well* mit dem gekoppelten Biotin-Derivat zu einer deutlichen Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit $V_{\max} = 0,014$ von kam.

Für jede *Panning*-Runde gegen das immobilisierte D-Biotin wurden zwischen $5 \cdot 10^{11}$ und $2 \cdot 10^{12}$ Phagen in 10 mM Natriumphosphatpuffer, 200 mM NaCl, pH 7,2 eingesetzt (2.2.3.6). Nach der Inkubation der Phagen mit dem Liganden und dem Auswaschen der ungebundenen Phagen wurden die Mikrotiter-*Wells* 10 min mit einem Glycin/HCl Puffer mit pH 2,2 inkubiert. Dabei sollten die Varianten mit einer relativ niedrigen Affinität zum D-Biotin unter den denaturierenden Bedingungen von dem Liganden gelöst werden (E), und die starken Binder (IS) bleiben u. U. an der Festphase gebunden. Die Reinfektion und Vermehrung der starken bzw. schwachen Binder wurde separat durchgeführt, damit die Rezeptorvarianten einem stärkeren Selektionsdruck unterworfen werden. Die Reinfektion und Phagenvermehrung dauerte insgesamt 5,5 h, da die Phagenproduktion nach 4,5-5 h ihr Maximum erreicht und Deletionen im Phagen genom durch eine längere Inkubation vermieden werden sollten (Barbas, 2001).

Die Phagen wurden nach der Vermehrung durch eine zweimalige Fällung mit PEG/NaCl aufgereinigt in 1 ml TE Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Phagenlösung über Nacht gegen 7 M Harnstoff dialysiert und durch die Denaturierung der Rezeptoren die evtl. gebundenen niedermolekularen Mediumkomponenten entfernt. Die Renaturierung erfolgte durch die Dialyse über Nacht gegen 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit 200 mM NaCl.

Die so präparierten Phagen wurden für die nächste *Panning*-Runde eingesetzt. Es wurden insgesamt 6 bzw. 5 Runden *Panning* durchgeführt, wobei man bei den schwachen Bindern (E) keine Anreicherung feststellen konnte, und bei den starken Bindern (IS) eine 1000-

fache Anreicherung von der dritten zur vierten Runde zu verzeichnen war. Die Anzahl der gebundenen IS Phagen blieb dagegen bis zur sechsten Runde konstant.

| Panning Runde | IS | | | E | | |
|------------------|-------------------|------------------|------------------------------|-------------------|------------------|------------------------------|
| | Input (pfu) | Output (pfu) | Input (pfu)/ Output (pfu) | Input (pfu) | Output (pfu) | Input (pfu)/ Output (pfu) |
| 1 | $1 \cdot 10^{12}$ | $9,6 \cdot 10^4$ | $9,6 \cdot 10^{-8}$ | $1 \cdot 10^{12}$ | $2,2 \cdot 10^5$ | $2,2 \cdot 10^{-7}$ |
| 2 | $1 \cdot 10^{12}$ | $2,4 \cdot 10^5$ | $2,4 \cdot 10^{-7}$ | $1 \cdot 10^{12}$ | $1,7 \cdot 10^5$ | $1,7 \cdot 10^{-7}$ |
| 3 | $5 \cdot 10^{11}$ | $6 \cdot 10^4$ | $1,2 \cdot 10^{-7}$ | $5 \cdot 10^{11}$ | $2 \cdot 10^6$ | $4 \cdot 10^{-6}$ |
| 4 | $2 \cdot 10^{12}$ | $2,4 \cdot 10^8$ | $1,2 \cdot 10^{-4}$ | $2 \cdot 10^{12}$ | $2 \cdot 10^5$ | $1 \cdot 10^{-7}$ |
| 5 | $2 \cdot 10^{12}$ | $2,4 \cdot 10^7$ | $1,2 \cdot 10^{-5}$ | $2 \cdot 10^{12}$ | $1 \cdot 10^6$ | $5 \cdot 10^{-7}$ |
| 6 | $1 \cdot 10^{12}$ | $1,4 \cdot 10^8$ | $1,4 \cdot 10^{-4}$ | | | |

Tab. 18. Ergebnisse des Pannings der HisJ-Phagenbibliothek gegen D-Biotin. Die bei der ersten *Panning*-Runde eingesetzte Phagenbibliothek mit $1 \cdot 10^{12}$ wurde mit dem auf CovaLink™ Mikrotiterplatten gekoppelten D-Biotin inkubiert. Danach wurden die nicht bindenden Phagen ausgewaschen und die schwach bindenden bei pH 2,2 eluiert. Mit den evtl. stark bindenden Phagen, die sich nicht unter sauren Bedingungen eluieren ließen, wurden durch Zugabe in die Mikrotiter-*Wells* einer TG1 Kultur die Zellen *in situ* infiziert. Beim *Panning* wurden die bei eluierten Phagen (E) und die nicht eluierbaren Phagen (IS) separat vermehrt und durchmustert.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Anzahl der IS-Phagen von der vierten bis zur sechsten *Panning*-Runde konstant blieb wäre, dass aus räumlichen Gründen eine maximale Anzahl der gebundenen Phagen erreicht wurde.

Um die Ligandenspezifität der Phagen zu testen, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem die Phagen aus der dritten *Panning* Runde gegen das Biotin mit unterschiedlichen Mengen des immobilisierten Liganden inkubiert wurden. Dafür wurden insgesamt sieben CovaLink™ Mikrotiter-*Wells* mit Chlortriazin aktiviert und mit unterschiedliche Mengen des EZ-Link™ NHS-LC-LC-Biotins an die Oberfläche gekoppelt. Ausgehend von einem zehnfachen molaren Überschuß des Biotin-Derivates gegenüber der Beladung der Mikrotiter-*Wells* wurde eine Verdünnungsreihe in 1:5 Schritten hergestellt und mit den *Wells* inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein nicht aktiviertes, mit Biotin unbeladenes *Well*. Nach dem Blocken mit PerfectBlock™ wurden die *Wells* mit den Phagen 3 h aus der dritten *Panning*-Runde gegen Biotin inkubiert. Die schwach bindenden Phagen wurden mit Glycin/HCl Puffer, pH 2,2, eluiert und mit den nicht eluierten Phagen *E. coli* TG1 Zellen in den Mikrotiter-*Wells* infiziert. Die infizierten Zellen wurden auf Selektiv-Agar ausplattiert und die Kolonien am nächsten Tag gezählt. In den *Wells*, die mit der

Verdünnungsreihe der Liganden inkubiert wurden, wurden zwischen $6,3 \cdot 10^4$ bis $2,5 \cdot 10^5$ Zellen infiziert, aber man konnte keine signifikante Abhängigkeit der Anzahl der gebundenen Phagen von der Konzentration des gebundenen Liganden feststellen (Tab. 19). Die Negativkontrolle zeigte mit $2,7 \cdot 10^4$ pfu eine leicht verringerte Anzahl der gebundenen Phagen. Bei Phagen, die spezifisch einen Liganden binden, würde man eine Abnahme der Anzahl der gebundenen Phagen erwarten, die mit der abnehmenden Ligandenkonzentration korreliert.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die 1000-fache Anreicherung der Phagen von der dritten bis zur vierten Runde beim *Panning* der Phagenbibliothek gegen das Biotin nicht Liganden spezifisch war.

| Well # | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| 1. Aktivierung der CovaLink™ Mikrotiter-Wells mit Chlortriazin | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 2. Inkubation mit EZ-Link™NHS-LC-LC-Biotin (nmol/Well) | 4,5 | 0,9 | 0,18 | 0,036 | $7,2 \cdot 10^{-3}$ | $1,44 \cdot 10^{-3}$ | $2,88 \cdot 10^{-4}$ | - |
| 3. Blocken 4. Inkubation mit Phagen 5. Waschen 6. Eluieren mit Glycin/HCl, pH 2,2 7. Reinfektion <i>in situ</i> | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pfu | $2,5 \cdot 10^5$ | $1,3 \cdot 10^5$ | $6,3 \cdot 10^4$ | $1,5 \cdot 10^5$ | $1,6 \cdot 10^5$ | $1,6 \cdot 10^5$ | $1,9 \cdot 10^5$ | $2,7 \cdot 10^4$ |

Tab. 19: Untersuchung der Ligandenspezifität der Phagen aus der 3. *Panning*-Runde der HisJ-Bibliothek gegen D-Biotin mittels Inkubation mit unterschiedlichen Mengen des immobilisierten D-Biotins. Die Phagen wurden mit 0-4,5 nmol auf CovaLink™ immobilisiertem D-Biotin inkubiert. Die Wells wurden danach gewaschen und die Phagen bei pH 2,2 eluiert. Anschließend wurde durch eine Reinfektion der TG1 Zellen *in situ* die Anzahl der gebundenen, nicht eluierten Phagen bestimmt.

Die Ursache dafür, dass beim *Panning* der HisJ-Phagenbibliothek keine HisJ-Varianten selektiert wurden, die das D-Biotin spezifisch binden, könnte in der Anwesenheit von Abbruchfragmenten auf Proteinebene liegen, die durch Rasterschubmutationen im Gen verursacht waren. Durch die Anwesenheit von zufälligen Deletionen im *hisJ*-Genrepertoire

resultieren Rasterschubmutationen, die bei der Proteinsynthese zu einer falschen Aminosäuresequenz und zum Abbruch der Peptidkette an einer ungewünschten Stelle führen. Die so entstandenen Peptidketten liegen ungefaltet vor und exponieren dadurch hydrophobe Bereiche, die zu Wechselwirkungen mit anderen hydrophoben Strukturelementen neigen. Sie würden in dieser Weise die spezifischen Rezeptor-Ligand Interaktionen unterdrücken.

Ein anderer Grund, warum keine bindenden Varianten im HisJ-Repertoire gefunden wurden, könnte eine ungenügende Diversität der Rezeptoren-Bibliothek sein. Die strukturelle Verwandtschaft des D-Biotin zum natürlichen Liganden – dem L-Histidin – könnte zu gering sein, um aus einem Repertoire mit ca. $4 \cdot 10^7$ Klonen, von denen die am häufigsten repräsentierte Mutantenklasse (35 % der Klone) lediglich zwei Aminosäureaustausche enthält, Varianten mit einer genügend hohen Affinität zum Liganden anzureichern.

3.2.4 Verbesserung der Qualität des HisJ-Rezeptorenrepertoires

Gemäß der statistischen Auswertung des *hisJ*-Repertoires enthielten ca. 10 % der Klone keine Deletionen. Eine Verbesserung der Qualität des Repertoires könnte durch die Selektion rasterschubfreier Varianten erreicht werden. Dabei würden partiell und vollständig ungefaltete Fragmente entfallen, die Deletionen auf der DNA Ebene enthalten und unspezifische Wechselwirkungen mit dem Liganden, Polystyrenoerfläche und Blockproteinen machen.

Durch zusätzliche Vergrößerung der Diversität des Genrepertoires, würde die Wahrscheinlichkeit steigen, eine bindende Variante aus dem Repertoire zu selektieren.

Die Entfernung der Varianten mit Rasterschubmutationen aus dem HisJ-Repertoire könnte in einem *Panning* der Phagenbibliothek gegen das polyklonale anti-HisJ Serum erreicht werden, wobei die Abbruchfragmente vom Serum nicht erkannt und in mehreren Runden *Panning* entfernt würden. Dadurch sollten Varianten angereichert werden, die mindestens einen Erkennungsbereich für das anti-HisJ Serum enthalten.

Eine zweite Möglichkeit, Proteinvarianten mit Stop Codons aus dem Repertoire zu entfernen, besteht durch eine Selektion auf Basis von Antibiotika-Resistenz. Dafür sollte die HisJ-Bibliothek als Fusionsprotein mit β -Lactamase im Periplasma von *E. coli* produziert werden und die Varianten mit Deletionen, die zu Rasterschubmutationen führen, auf Ampicillin-Festmedium selektiert werden. Das Fusionsprotein kann nur dann gebildet werden, wenn das *bla*-Gen einen fehlerfreien Leseraster enthält. Treten im *hisJ*-Gen Deletionen auf, kann es zur Verschiebung des Leserasters bzw. zur Entstehung von Stop Codons kommen, so dass die Expression des *hisJ-bla* Fusionsgens verhindert wird. Ampicillinresistente Transformanten sollten daher durchgehende ORFs (*open reading frames*) enthalten.

3.2.4.1 Anreicherungsversuche von rasterschubfreien HisJ-Varianten durch Panning der Phagenbibliothek gegen das anti-HisJ Serum

Das *Panning* der Phagenbibliothek wurde in einem mit dem anti-HisJ Serum beschichteten Polystyren-*Immunotube*, Fa. Nunc, durchgeführt (2.2.3.6). Für jede *Panning*-Runde wurden insgesamt $1 \cdot 10^{12}$ Phagen im PBS Puffer eingesetzt. Die Inkubation der Phagen mit dem Serum erfolgte 2 h bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurden die Phagen mit Glycin/HCl Puffer, pH 2,2 eluiert und das Eluat mit 2 N Tris-Base neutralisiert. Mit den eluierten sowie den im Röhrchen verbliebenen Phagen wurden TG1 Zellen infiziert, auf Selektiv-Agar ausplattiert und am nächsten Tag der Phagentiter durch Auszählen der Kolonien bestimmt. Nach der ersten *Panning*-Runde wurde aus Einzelkolonien Plasmid-DNA präpariert und sequenziert. Bei 6 von 13 Klonen wurden keine Rasterschubmutationen gefunden, darunter ein Klon mit einer Codondeletion. Mit 46 % war der Anteil der *frameshift* freien Varianten im HisJ-Repertoire nach der ersten *Panning*-Runde viermal größer als vor dem *Panning*.

Nach der zweiten *Panning*-Runde sank der Anteil der rasterschubfreien Mutanten auf 11 %. Bei einem von neun sequenzierten Klonen wurden keine Rasterschubmutationen gefunden (Tab. 18).

Der im Vergleich zu unselektierten Klonen vergrößerte Anteil von *frameshift*-freien Varianten nach der ersten Runde konnte zufällig bedingt sein, was eine scheinbare Abreicherung dieser Klone nach der zweiten *Panning*-Runde zufolge hatte.

Eine andere Erklärung dieses Phänomens könnte in einer *in vivo* Selektion der Varianten mit Rasterschubmutationen liegen. Da das Phagenprotein gpIII leicht toxisch auf die Zellen wirkt (Messing, 1991), haben die mit dem Genrepertoire transformierten Zellen dann einen Wachstumsvorteil, wenn das Gen Rasterschubmutationen enthält und das HisJ^{rep}-gpIII Protein nicht gebildet wird.

Aufgrund der geringen Spezifität des polyklonalen anti-HisJ Serums (s. 3.2.1.4.1) scheint es außerdem schwierig zu sein, aus einem HisJ-Repertoire die Varianten zu selektieren, die keine Rasterschubmutationen enthalten, so dass ein andere Selektionssystem verwendet werden sollte.

3.2.4.2 Selektion von Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen durch β -Lactamase vermittelte Resistenz

Die HisJ-Varianten mit Rasterschubmutationen könnten aus dem Repertoire durch eine Selektion von rasterschubfreien Ampicillin resistenten Mutanten entfernt werden. Die HisJ-Bibliothek sollte mit β -Lactamase fusioniert werden, wodurch nur *frameshift*-freie Varianten ein Fusionsprotein bilden, die dann auf Ampicillin-Agar selektiert werden

können. Mit dieser Methode würden allerdings nicht nur deletionsfreie Varianten selektiert werden, sondern auch diejenigen mit insgesamt 3 N Deletionen im *hisJ*-Gen (wobei N = 1, 2, 3, ...), da dadurch keine Rasterschubmutationen im *bla*-Gen resultieren würden. Betreffen die 3 N Deletionen keine Codons, sondern Einzel- bzw. Dinukleotide, so entsteht im Bereich zwischen zwei Deletionen eine Leserasterverschiebung. Diese führt entweder zur Entstehung von einem Stop Codon oder einer neuen Aminosäuresequenz. Die frühzeitig terminierten Varianten entfallen allerdings bei der Selektion, übrig bleiben neben den Varianten ohne Rasterschubmutationen die mit der veränderten Aminosäuresequenz. Das in dieser Weise hergestelltes sekundäres *hisJ*-Repertoire müsste somit einen Anteil von Proteinen umfassen, die aufgrund von Einzel- und Dinukleotiddeletionen einen Bereich mit Leserasterverschiebung enthalten, was zum Verlust der Proteinfunktion bzw. zu einer inkorrekten Faltung führt, je größer dieser Bereich ist. Andererseits steigt mit der Länge einer Aminosäuresequenz die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Stop Codons in diesem Bereich, was zum Ausselektieren dieser Varianten aus dem Repertoire führt. Da die drei Stop Codons (TAA, TAG und TGA) ca. 5 % aller Codons ausmachen, beträgt die Wahrscheinlichkeit, eins von den drei Stop Codons in einer Sequenz nicht anzutreffen $(0,95)^x$, wobei x die Länge der Aminosäuresequenz darstellt. Eine Variante mit einer Einzelnukleotiddeletion an der ersten Position und einer Dinukleotiddeletion an den zwei letzten Positionen im *hisJ*-Gen, was zu einer Leserasterverschiebung innerhalb des ganzen Gens führt, ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,001 % im Repertoire anzutreffen (mit x = 237). Bei Leserasterverschiebung innerhalb von 100 Aminosäuren steigt die Wahrscheinlichkeit auf 0,6 % und bei 20 Aminosäuren sind es 36 %. Demnach wäre es zu erwarten, dass in einer HisJ-Bibliothek nach einer Selektion durch β -Lactamase vermittelte Antibiotikaresistenz neben rasterschubfreien Varianten solche beinhaltet sind, die vor allem kurze Bereiche mit Leserasterverschiebung enthalten und deren Proteinfunktion nicht wesentlich beeinträchtigt ist.

Zur Entwicklung dieses Systems wurde das *hisJ*-Genrepertoire mit der pIII Signalsequenz in den pASKBla Vektor an den Aminoterminus des β -Lactamase-Gens einkloniert. Die Signalsequenz gewährleistet die Translokation der Polypeptidkette ins Periplasma, und der *tet*-Promotor reguliert die Transkription des Fusionsproteins. Der Vektor enthält zusätzlich ein Chloramphenicol-Acetyltransferase Gen, das die Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt. Eine Selektion auf Ampicillin-Medium durch die Bildung des HisJ- β -Lactamase Fusionsproteins setzt eine korrekte Faltung des Fusionsproteins im Periplasma voraus. Dieses System wurde zuerst mit dem Wildtyp-HisJ getestet.

3.2.4.2.1 Konstruktion des Vektors pASKHisJBla

Als Ausgangsvektor für die Klonierung des *hisJ-bla* Fusionsgens diente der pASKIntBla Vektor, der ein Intimin-Gen am Aminoterminus des *bla*-Gens enthielt. Die Intimin-

Sequenz wurde durch die Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *SmaI* entfernt (2.2.1.13.1) und das Vektorfragment über ein Agarosegel mit dem Nukleotrap-Kit aufgereinigt (2.2.1.8). Das *hisJ*-Gen wurde aus Vektor pCANTABhisJ mit der vorgeschalteten gpIII-Signalsequenz und den Restriktionsstellen *XbaI* und *SmaI* amplifiziert (2.2.1.14). Dafür wurden die Primer 5'-Ask-hisJup und 3'-HisJlowSfi-Sma verwendet. Das amplifizierte Gen enthielt am 5'-Ende der Signalsequenz die Restriktionsschnittstelle *XbaI*, die durch den 5'-Primer eingeführt wurde und am 5'-Ende des *hisJ*-Gens die Restriktionsschnittstelle *SfiI*, die von der Matrize amplifiziert wurde. Am 3'-Ende wurde eine zweite *SfiI* Sequenz und eine *SmaI* Restriktionsstelle eingeführt (Abb. 30). Die zweite *SfiI* Schnittstelle sollte eine einfachere Klonierung der Gensequenz mit nur einem Restriktionsenzym erlauben. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *SmaI* gespalten (2.2.1.13.1), über ein Agarosegel mit dem Nukleotrap-Kit aufgereinigt (2.2.1.8) und mit dem Vektorfragment ligiert (2.2.1.13.2) (Abb. 30). Nach der Elektroporation (2.2.1.3) wurden die transformierten TG1 *E. coli* Zellen in dYT mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin inkubiert, um den *tet*-Promotor zu induzieren und die Produktion des HisJ-Bla Fusionsproteins einzuleiten. Während einer einstündigen Inkubation mit Anhydrotetracyclin sollten die Zellen eine Resistenz gegen Ampicillin und zusätzlich eine gegen Chloramphenicol, die auf dem Plasmid kodiert ist, entwickeln. Die Selektion der Klone mit dem Fusionsprotein erfolgte auf SOC Festmedium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden zwei Klone gepickt, daraus die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab bei beiden Klonen das gewünschte Konstrukt, das die *hisJ*-Sequenz mit dem am 3'-Ende darauffolgenden *bla*-Gen enthielt und die 5'-endständige gpIII-Signalsequenz. Das *hisJ*-Gen war am 3'- und am 5'-Ende jeweils von einer *SfiI*-Restriktionsstelle flankiert, was eine Entfernung des Gens aus dem Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym erlaubte.

Nachdem eine Selektion des HisJ-β-Lactamase Konstruktes aufgrund der dadurch vermittelten Resistenz gegen Ampicillin nachgewiesen wurde, sollte die primäre HisJ-Bibliothek mit der β-Lactamase fusioniert werden und durch die dadurch vermittelte Ampicillin-Resistenz ein sekundäres *hisJ*-Genrepertoire hergestellt werden, das keine Rasterschubmutationen enthält.

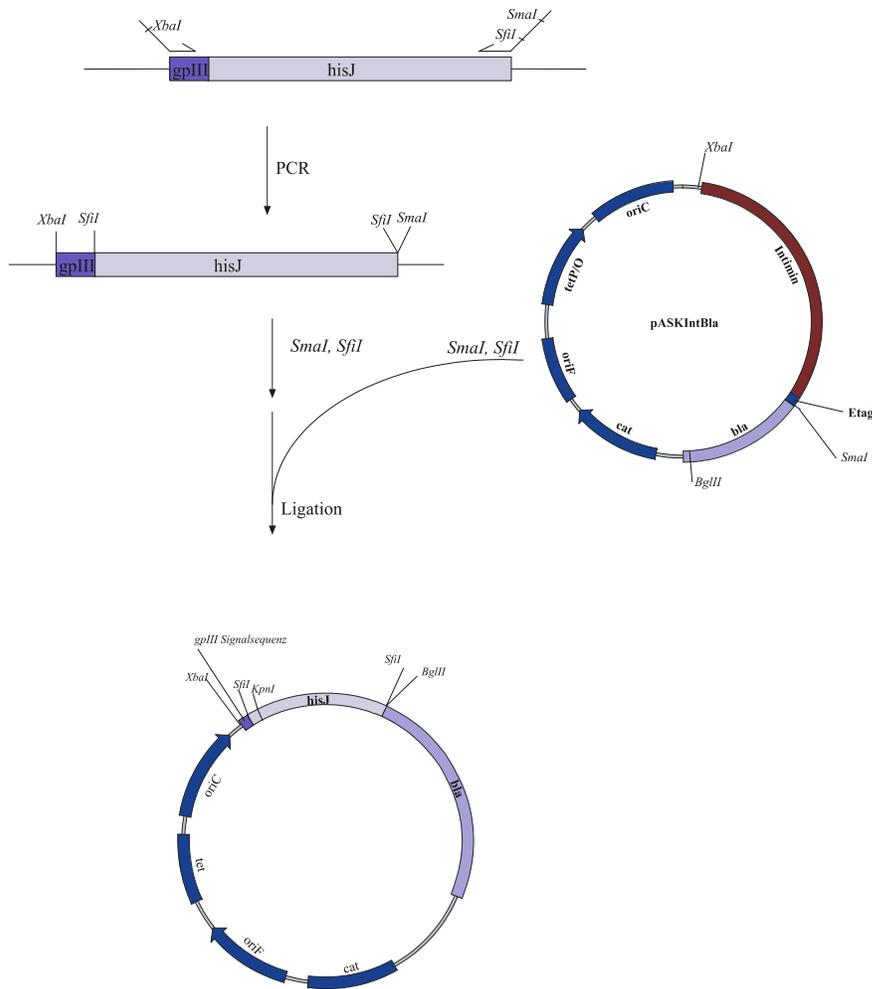


Abb. 30: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pASKhisJBla zur Verbesserung der Qualität des *hisJ*-Repertoires mittels β -Lactamase vermittelter Antibiotika-Resistenz. Als Ausgangsvektor diente der pASKIntBla, in den über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SmaI* das *hisJ*-Fragment mit der gpIII-Signalsequenz und zwei *SfiI*-Schnittstellen ligiert wurde.

3.2.4.2.2 Selektion der *HisJ*-Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen aus dem primären *hisJ*-Repertoire aufgrund vermittelter Ampicillin-Resistenz

Für die Klonierung der *hisJ*-Genrepertoires wurde der Vektor pASKHisFBla verwendet, in den zuvor das *hisF*-Gen mit der gpIII Signalsequenz und den zwei *SfiI* Restriktionsstellen an den Aminoterminus des *bla*-Gens inkloniert wurde. So konnte man in einer Kolonie-PCR (2.2.1.15) nach der Klonierung des *hisJ*-Repertoires die Klone mit dem gewünschten Insert von den mit dem religierten Vektor unterscheiden. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *SfiI* über Nacht gespalten (2 U Enzym/ μ g DNA). Danach wurde

nochmals *SfiI* zugegeben (1 U Enzym/ μg DNA) und weitere 3 h inkubiert. Der gespaltene Vektor wurde über eine Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt (2.2.1.11). Das *hisJ*-Genrepertoire wurde vom Plasmid pCANTABhis^{Bib} mit der *Taq*-Polymerase (Roche) amplifiziert. Die PCR wurde mit einem *hisJ*-spezifischen 3'-Primer hisJSfi_up und einem 5'-Primer durchgeführt, der keine Homologie mit der *hisJ*-Sequenz, sondern mit dem 5'-endständigen Fragment aus der gpIII Signalsequenz besaß (5'-gpIII_{down}). Die *annealing* Temperatur betrug 60 °C. Das PCR-Produkt aus zehn Reaktionsansätzen wurde mit 10 U des Restriktionsenzym *SfiI* über Nacht gespalten. Die Aufreinigung erfolgte über ein 1 %-iges Agarosegel mit dem Nukleotrap-KitTM (2.2.1.8). Nach der Ligation des Inserts mit dem Vektorfragment und Transformation von *E. coli* TG1 (2.2.1.18.2 und 2.2.1.18.3) wurden die transformierten Zellen mit Anhydrotetracyclin inkubiert (s. 2.2.1.19) und auf SOC/Amp/Cm/Atc Agarplatten ausplattiert. Man erhielt $8 \cdot 10^7$ Transformanten, die das gewünschte Insertfragment besaßen. Eine Sequenzanalyse von 13 zufällig ausgewählten Klonen ergab in allen Fällen vollständige offene Leserahmen. Ein Klon (BibSel2-1) enthielt eine Dinukleotiddeletion (Position 281 und 282) sowie eine 1n Deletion auf der Position 312, so dass eine Rasterverschiebung innerhalb eines Bereiches von neun Aminosäureresten und insgesamt eine Codondeletion stattfand. Bei drei anderen Klonen (BibSel7, BibSel21, BibSel22) wurde jeweils eine Codondeletion an den randomisierten Positionen gefunden (Tab. 20). Somit enthielt das sekundäre *hisj*-Repertoire nach der Sequenzanalyse 69,2 % deletionsfreie und 100 % Klone mit offenen Leserahmen. Das gleiche Repertoire enthielt vor der Selektion 10,6 % deletionsfreie und 32,6 % *frameshift*-freie Klone.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die durch β -Lactamase vermittelte Antibiotikaresistenz zu Selektion von Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen führt, wobei neben deletionsfreien Variante auch diejenigen mit Codon- bzw. 3 N-deletionen bzw. selektiert werden. Die auf diese Weise hergestellte HisJ-Bibliothek enthält gemäß der Sequenzanalyse nur Varianten mit durchgehenden offenen Leserahmen. Somit ist die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Selektion einer Variante mit gewünschten Eigenschaften größer als bei der primären HisJ-Bibliothek, die ca. 90 % Deletionen enthält.

| Variante | Austausche | Deletionen |
|------------|---------------------------------|------------|
| BibSel5 | T121K | - |
| BibSel7 | L71K L117Y T121F Q122N | 3n |
| BibSel2-1 | L52I | 2n 1n |
| BibSel2-5 | S70G | - |
| BibSel2-7 | L117T | - |
| BibSel2-11 | L71F | - |
| BibSel2-13 | S69F T120I | - |
| BibSel2-14 | L52V L71Q S72K | - |
| BibSel2-17 | L117V | - |
| BibSel2-19 | S70A S72D T121G | - |
| BibSel2-21 | S72P | 3n |
| BibSel2-22 | T121Y | 3n |
| BibSel2-24 | S72I L117A Q122G | - |

Tab. 20: Sequenzanalyse des *hisJ*-Repertoires nach der Selektion auf dem Ampicillin und Chloramphenicol enthaltenden Medium.

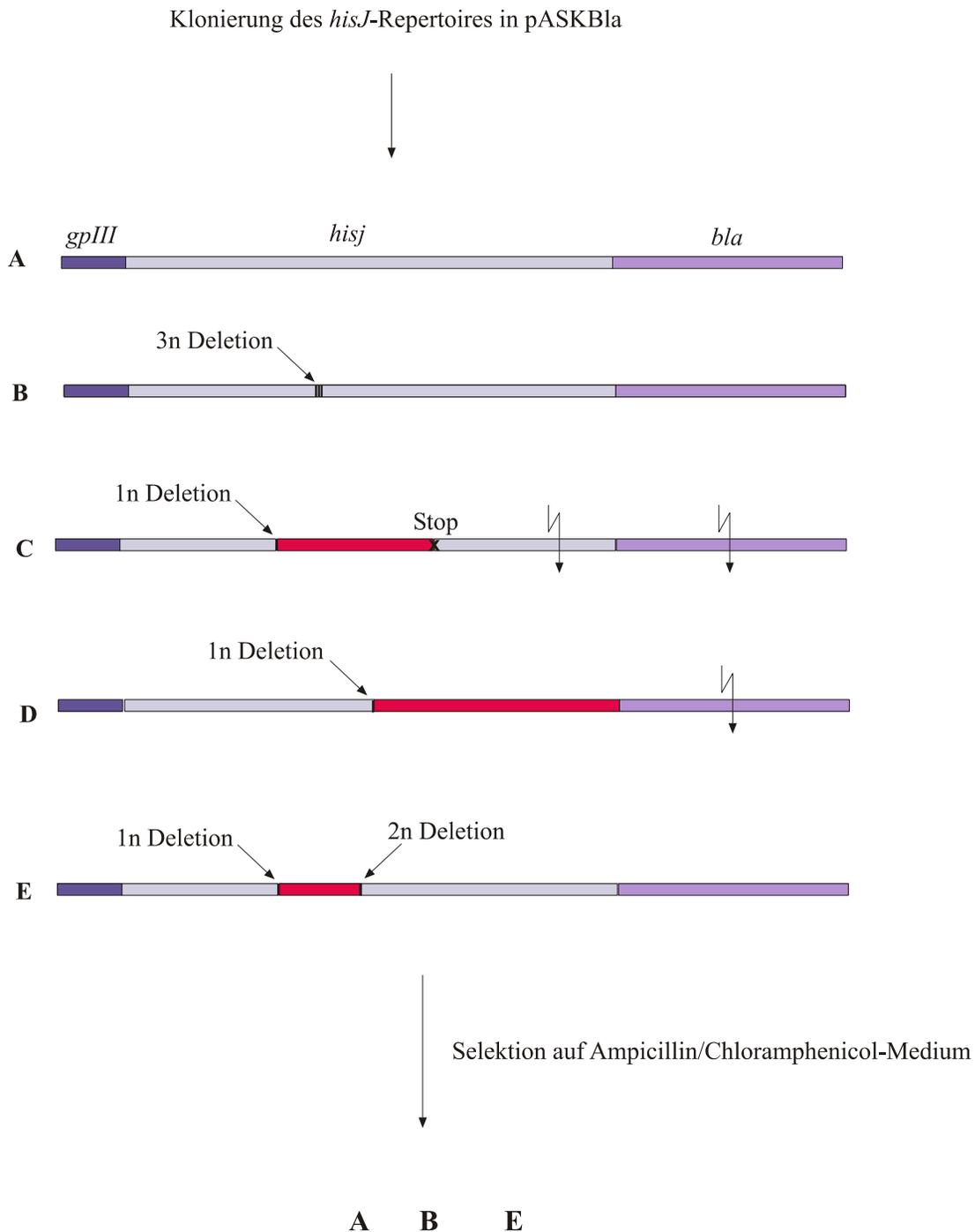


Abb. 31: Schematische Darstellung des Systems zur Selektion Varianten mit vollständigen offenen Leserahmen aus dem *hisJ*-Genrepertoire. Das Repertoire wurde mit der *gpIII*-Signalsequenz an den N-Terminus des *bla*-Gens in den pASKBla-Vektor kloniert. *hisJ*-Varianten mit offenen Leserahmen (A, B und E) werden im Periplasma von *E. coli* als Fusion mit β -Lactamase produziert, wodurch sie eine Resistenz gegen Ampicillin erhalten. Da der Vektor zusätzlich ein *cat*-Gen enthält, können sie auf einem Amp/Cm Medium selektiert werden.

3.2.5 Versuch zur Verbesserung der Diversität des hisJ-Genrepertoires durch *in vitro* Rekombination

Die Sequenzanalyse des primären *hisJ*-Genrepertoires ergab eine durchschnittliche Häufigkeit von zwei Austauschungen in einer Gensequenz, die fast zweimal niedriger war als der erwartete Wert von 3,7. Beim Modellexperiment zur Durchmusterung der Bibliothek nach Biotin bindenden Rezeptoren konnten keine gewünschten Varianten spezifisch angereichert werden, da das D-Biotin wahrscheinlich strukturell zu weit entfernt vom D-Histidin als natürlichen Liganden ist. Es schien naheliegend, dass das Repertoire entweder nicht groß genug ist bzw. dass die Klone eine ungenügende Anzahl der Mutationen enthalten. Da die Anzahl der Klone nach einer Transformation maximal 10^9 beträgt, konnte die Größe des Repertoires nicht durch eine erneute Transformation wesentlich vergrößert werden. Daher wurde es versucht, durch *in vitro* Rekombination der Gensequenzen die Diversität des Repertoires zu verbessern.

Für die *in vitro* Rekombination standen das DNA-*Shuffling* (Stemmer, 1994, s. Abschnitt 1.2.1.2) oder die StEP-Methode (*staggered extension process*) (Zhao, 1998) zur Auswahl. Bei der letzten Methode wird ein Gen nicht wie beim DNA-*Shuffling* aus kürzeren Genfragmenten reassembliert, sondern werden in einer PCR durch die Verwendung von extrem kurzen *annealing* und Elongationszeiten zunehmend längere DNA Fragmente produziert, die mit unterschiedlichen DNA Matrizen hybridisieren können. Dabei kann dass es allerdings trotz sehr kurzen *annealing* und Elongationszeiten zur Amplifikation des ganzen Gens in einem Zyklus kommen. Die Zeiten müssten also so gewählt werden, dass die Polymerase relativ kurze DNA Fragmente produziert und eine Rekombination stattfinden kann. Da diese Methode technisch einfacher als DNA-*Shuffling* ist, wurde sie für die weiteren Experimente verwendet.

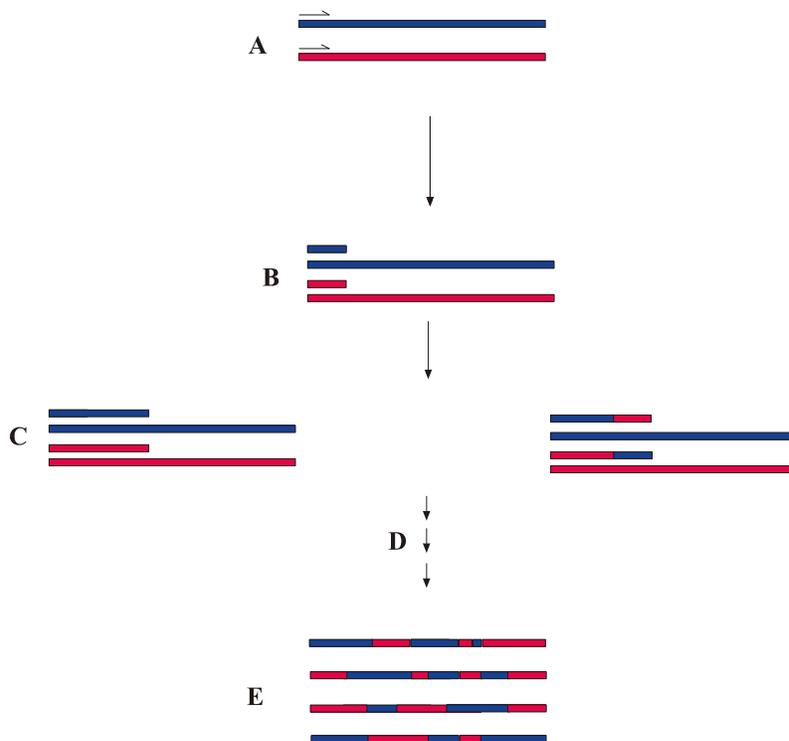


Abb. 32: Schematische Darstellung der *in vitro* Rekombination nach der StEP Methode (Zhao, 1998).

A: An die denaturierte Matrizen-DNA hybridisieren die *Primer*. B: In einem sehr kurzen Polymerase katalysierten *Primer*-Elongationszeiten entstehen kurze DNA-Fragmente. C: In einem weiteren StEP-Zyklus hybridisieren zufälligerweise an unterschiedliche DNA-Matrizen und werden weiter verlängert. D: Dieser Prozess wird so lange wiederholt, bis vollständige Gensequenzen entstehen. E: Produkte werden gereinigt und ggf. in einer PCR mit flankierenden Primern reamplifiziert.

3.2.5.1 Optimierung der StEP-Methode

Durch die Verwendung einer relativ langsamen Polymerase (einer mit *proofreading* Aktivität), z. B. *Vent*-Polymerase, können die Elongationsschritte kontrolliert werden (Ninkovic, 2001). Die *Vent*-Polymerase besitzt bei 72 °C eine maximale Elongationsrate von 1000 nt/min und eine Prozessivität von 7 nt/Initiation. Im Vergleich dazu beträgt die maximale Elongationsrate der *Taq*-Polymerase 4000 nt/min und die Prozessivität 40 nt/Initiation (Kong, 1993). Mit der *Vent*-Polymerase und Primern, die direkt an den Enden des *hisJ*-Gens (713 bp) liegen, beträgt die theoretische Elongationszeit des gesamten Gens 42 s. Während der StEP-PCR muß berücksichtigt werden, dass die Polymerase nicht nur bei ihrem Temperaturoptimum aktiv ist, sondern auch während des Aufheizungs- und Abkühlungsvorganges.

Die StEP Methode zur Erhöhung der Diversität des *hisJ*-Repertoires wurde durch die Wahl geeigneter technischer Parameter optimiert. Um den Anteil der rekombinanten

Gensequenzen unter den gewünschten Bedingungen bestimmen zu können wurde zuerst eine StEP-PCR mit zwei *hisJ*-Varianten durchgeführt, die sich in mindestens einer Punktmutation am Anfang und am Ende des Gens unterschieden. Die dafür verwendeten Varianten stammten aus dem sequenzierten primären *hisJ*-Repertoire. Die Mutante ass13x enthielt die Mutationen D11F, D161N und E188D. Sie wurde mit der Variante ass181x den Mutationen S69I, T121W und D161N rekombiniert. Die Denaturierungszeit bei der StEP-PCR betrug 30 s und der Elongationsschritt dauerte 1 s bei 55 °C. Für die PCR wurde ein Gerät mit minimalen Abkühlungs- und Aufheizungszeiten gewählt (Biometra, UnoII). Die Abkühlung von 95 °C auf 55 °C und die Aufheizung von 55 °C auf 95 °C dauerte insgesamt 37 s. Es wurden insgesamt 96 Zyklen mit jeweils 30 pmol der flankierenden Primern 5'-EvaI und 3'-EvaII und jeweils 0,15 pmol Matrize-DNA durchgeführt (2.2.1.17.2). Das PCR Produkt wurde mit *KpnI* und *BglII* gespalten und mit einem entsprechenden pCANTAB5E Vektorfragment ligiert. Nach der Transformation wurden Einzelklone gepickt, die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert.

Bei vier sequenzierten Klonen wurde eine Sequenz gefunden, bei der keine Rekombination stattgefunden hat (STEP1). Die restlichen drei Sequenzen wiesen eine Kombination von Mutationen der beiden *hisJ*-Varianten ass13x und ass181x, die als DNA-Matrize für die *in vitro* Rekombination dienten (Tab. 21), wobei bei den Varianten Step2 und Step4 mindestens einmal und bei der Variante Step3 mindestens zweimal eine Rekombination stattgefunden haben musste. Diesen Ergebnissen zufolge schien die StEP-Methode geeignet zu sein, um eine Erhöhung der Diversität des *hisJ*-Repertoires zu erreichen.

| rekombinante Variante | DNA-Matrize mit entsprechenden Mutationen | | | |
|-----------------------|---|-------|---------|-------|
| | ass13x | | ass181x | |
| | D11F | E188D | S69I | T121W |
| Step1 | - | - | + | + |
| Step2 | + | - | - | - |
| Step3 | + | + | - | + |
| Step4 | - | + | - | - |

Tab. 21: Ergebnisse der Sequenzierung von vier Klonen aus der *in vitro* Rekombination nach der StEP Methode mit ass13x und ass181x als Matrizen-DNA. Die *HisJ*-Variante ass13x enthielt die Mutationen D11F und E188D und die Variante ass181x die Mutationen S69I und T121W. Mit „+“, sind bei den sequenzierten Klonen die entsprechenden Mutationen gekennzeichnet, die von der Matrizen-DNA stammen.

3.2.5.2 *In vitro* Rekombination des *hisJ*-Genrepertoires nach der StEP Methode (Zhao *et al.*, 1998)

Die durchschnittliche Anzahl der Mutationen im *hisJ*-Genrepertoire sollte nach der StEP-Methode unter den optimierten Bedingungen (s. 3.2.5.1) erhöht werden.

Für die StEP-PCR wurden 0,15 pmol des Plasmids pASKhisJ^{rep}Bla als Matrizen-DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde unter mit den Primern 5'-EvaI und 3'-Bla_rechtsABI durchgeführt. Das PCR Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BglII* gespalten und mit dem Vektorfragment ligiert. Die Transformation von *E. coli* TG1 Zellen ergab $6 \cdot 10^6$ Ampicillin resistente Transformanten.

Drei von 16 zufällig ausgewählten Klonen enthielten die maximale Anzahl von drei Codonaustauschen in der Gensequenz. Die am häufigsten repräsentierte Mutantenklasse (6 Klone) enthielt zwei Codonaustausche im Gen. Vier Klone enthielten einen und bei drei wurden keine Austausche gefunden (Tab. 22).

| Variante | Austausche | Deletionen | Variante | Austausche | Deletionen |
|------------|-----------------------|---------------|------------|-----------------------|---------------|
| BibSel2-1 | L71H Q122A | 3n | BibSel2-12 | L52F S70N Q122T | $2 \times 3n$ |
| BibSel2-2 | - | $2 \times 3n$ | BibSel2-13 | S69Q L71E | - |
| BibSel2-5 | L52P S72F T120V | | BibSel2-14 | L71E S72F | - |
| BibSel2-6 | S70I S72T | 3n | BibSel2-15 | L52Q | - |
| BibSel2-7 | - | 3n | BibSel2-16 | D11M | - |
| BibSel2-8 | L52A S70M L71G | | BibSel2-18 | D11F D161H | - |
| BibSel2-9 | - | - | BibSel2-19 | D161H | - |
| BibSel2-11 | L71S | - | BibSel2-20 | S70R T121S | $2 \times 3n$ |

Tab. 22: Ergebnisse der DNA-Sequenzanalyse von 13 Klonen aus der *in vitro* Rekombination des *hisJ*-Genrepertoires nach der StEP-Methode (Zhao *et al.*, 1998) zur Erhöhung der Diversität des Repertoires.

Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass die StEP-PCR des *hisJ*-Repertoires zu keiner signifikanten Erhöhung der Anzahl der Mutationen pro Gensequenz geführt hatte. Wahrscheinlich war teilweise durch die Rekombination der Mutanten mit den Wildtypsequenzen die Diversität des Repertoires erhalten geblieben. Bei Anwesenheit zahlreicher Gensequenzen sind die Verhältnisse bei der *in vitro* Rekombination komplex und es bedarf weiterer Optimierungsversuche, um die gewünschte Populationsstruktur zu erhalten.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Durch partielle, codonweise Mutagenese des Histidin-Bindeprotein-Gens *hisJ* aus *E. coli* wurde nach der Trinukleotidphosphoramidit-Methode ein Genrepertoire kontrollierter Komplexität chemisch synthetisiert. Dafür wurden 13 Positionen randomisiert, die an der Bindung des Liganden in HisJ bzw. dem homologen LAOBP beteiligt sind. Nicht alle 13 Positionen wurden gleichzeitig mutagenisiert, sondern durch Berücksichtigung berechneter Parameter und Verwendung entsprechender Codonmischungen eine bestimmte Populationsstruktur geschaffen.

Die im Auftrag synthetisierten Trinukleotide, die für die kombinatorische DNA-Synthese eingesetzt werden sollten, wurden zu Trinukleotidphosphoramiditen umgesetzt und vor der DNA-Synthese auf ihre Kopplungsfähigkeiten untersucht. Alle Trimere waren kopplungsfähig und zeigten bis auf GGT, das eine ca. zweifach schlechtere Kopplungsausbeute aufwies, eine vergleichbare Kopplungseffizienz von 69-104 %.

Für die Synthese des Genrepertoires wurden an jeder randomisierten Position Mischungen mit einer nach der Binomialverteilung errechneten Zusammensetzung für eine durchschnittliche Anzahl der Mutationen im Repertoire von 3,7 eingesetzt. Demnach enthielt jede Mischung einen molaren Anteil von 0,285 der Fremdcodonmischung aus 18 Aminosäuren (20 natürliche Aminosäuren, ausgenommen Wildtypcodon und Cystein) und einen Wildtypcodonanteil von 0,715. Die erwartete Mutationsrate betrug somit 0,285.

Für das Genrepertoire wurden fünf Oligonukleotide synthetisiert, die insgesamt 13 randomisierte Positionen enthielten. Für die Assemblierung des randomisierten *hisJ*-Gens wurden zusätzlich 27 nicht randomisierte, kommerziell synthetisierte Oligonukleotide verwendet. Das Gen wurde aus diesen Oligonukleotiden nach der Stemmer-Methode (Stemmer *et al.*, 1995) über eine *primerless* PCR und eine anschließende *primed* PCR assembliert.

Nach der Transformation wurde eine Bibliothek mit $3,9 \cdot 10^7$ unabhängigen Klonen erhalten. Daraus wurden 103 zufällig ausgewählte Klone sequenziert und statistisch analysiert.

Der experimentelle Durchschnittswert für die Anzahl der Mutationen im Repertoire betrug 2,1 und die experimentelle Mutationsrate 0,165. Die kleiner als erwarteten experimentellen Werte waren wahrscheinlich auf das Reaktionsverhalten der Trinukleotidphosphoramidite zurückzuführen.

Die experimentelle Verteilung der Repräsentanz der jeweiligen Mutantenklassen im Repertoire unterschied sich nicht signifikant von der Binomialverteilung mit einem Durchschnittswert von 2,1. Dies deutete darauf hin, dass die Austausche im Repertoire unabhängig voneinander stattfanden.

Die Häufigkeiten der einzelnen Codons wiesen z. T. relativ große Unterschiede untereinander auf. Am häufigsten waren bei den ausgewerteten Klonen Guanin-freie Codons repräsentiert. Ihre Häufigkeiten korrelierten meistens mit den Kopplungseffizienzen. Im Gegensatz dazu zeigten die Guanin-reichen Codons, die relativ selten repräsentiert waren, in der Regel starke Abweichungen zwischen ihren Häufigkeiten und Kopplungseffizienzen.

Ebenso waren die Mutationsraten an den randomisierten Positionen unsymmetrisch verteilt. Die Unterschiede in den Mutationsraten könnten z. T. an den unterschiedlichen Kopplungseffizienzen der entsprechenden Wildtypcodons liegen.

In einem Modellexperiment wurde das Rezeptorenrepertoire als Fusionsprotein mit dem Phagenprotein gpIII auf der Oberfläche von M13 Phagen präsentiert, um als Ausgangspunkt für die Selektion einer Biotin-bindenden Variante zu dienen. Im *Panning* der Phagenbibliothek gegen den Liganden konnte keine spezifische Anreicherung der Phagen beobachtet werden. Dies wurde auf den relativ niedrigen Anteil an deletionsfreien Sequenzen im Genrepertoire (11,6 %) und insgesamt kleineren Werten für die durchschnittliche Anzahl der Mutationen als erwartet (2,1 statt 3,7) zurückgeführt.

Um die Anzahl der Deletionen im Repertoire zu reduzieren, wurde das randomisierte *hisJ*-Gen als Fusion mit dem β -Lactamasegen im Periplasma von *E. coli* exprimiert. In Ampicillin-Medium wurden auf diese Weise nur die Varianten selektiert, die als Fusion mit β -Lactamase vorliegen und keine Rasterschubmutationen enthielten. Nach der Transformation von *E. coli* wurden $1 \cdot 10^8$ Ampicillin resistente Klone erhalten. Von 13 zufällig ausgewählten Klonen enthielten alle durchgehende Leserahmen.

5. ANHANG

5.1 Mathematischer Anhang

Anzahl der Kombinationen von n Elementen der Ordnung k

1. ohne Wiederholung und ohne Berücksichtigung der Anordnung

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!} \quad 5.1$$

2. mit Wiederholung und mit Berücksichtigung der Anordnung

$$n^k \quad 5.2$$

Binomialverteilung

$$P_{n,p}(m) = \binom{n}{m} p^m q^{n-m} = \frac{n!}{m!(n-m)!} p^m q^{n-m} \quad 5.3$$

$$p = 1 - q \quad 5.4$$

$$\text{Mittelwert: } \mu = np \quad 5.5$$

| | |
|-----|--|
| n | Anzahl der randomisierten Positionen insgesamt (hier: $n = 13$) |
| m | Anzahl der Mutationen in einer Mutantenklasse (hier: $m = 0, 1, 2, \dots, 13$) |
| P | Anteil der jeweiligen Mutationsklasse (Gene mit $m = 0, 1, 2, \dots, 13$ Mutationen) am Repertoire |
| p | Anteil der Fremdcodons in einer Codonmischung bzw. Mutationsrate an einer bestimmten Position |
| q | Anteil des Wildtypcodons in einer Codonmischung ($q = 1 - p$) |

Berechnung der durchschnittlichen experimentellen Mutationsrate im *hisJ*-Repertoire \bar{p}_{exp}

$$\bar{p}_{\text{exp}} = \frac{\sum \text{Austausche}}{n \cdot k} \quad 5.6$$

p_{exp} experimentell bestimmter Anteil der Austausche an einer bestimmten
 k Anzahl der ausgewerteten Klone (hier: $k = 103$)
 Position

Durchschnittliche Anzahl der Mutationen im Repertoire (experimentell) μ_{exp}

$$\mu_{\text{exp}} = n \cdot \bar{p}_{\text{exp}} \quad 5.7$$

$$n = 13$$

$$\bar{p}_{\text{exp}} = 0,165$$

Erwartete durchschnittliche Anzahl der Mutationen im theoretischen Repertoire μ_{theor}

$$\mu_{\text{theor}} = n \cdot p_{\text{theor}} \quad 5.8$$

$$n = 13$$

$$p_{\text{theor}} = 0,285$$

Umfang der jeweiligen Mutantenklasse (N_i):

$$N_i = \binom{n}{k} \cdot x^m = \frac{n!}{m!(n-m)!} x^m \quad 5.9$$

$n = 13$ Anzahl der randomisierten Positionen insgesamt

$m = 0-13$ Anzahl der Mutationen in einer Mutantenklasse

$x = 18$ Anzahl der Fremdcodons

Erwartete Größe der jeweiligen Mutantenklasse (N_m) im experimentellen Repertoire:

$$N_{m,th} = P_{th} \cdot N_R \quad 5.10$$

$N_R = 3,9 \cdot 10^7$ Größe des *hisJ*-Repertoires

Erwartete Häufigkeit jedes Codons, das im *hisJ*-Repertoire an den randomisierten Positionen nicht als Wildtypcodon auftritt:

$$1,5 \% \cdot 13 = 19,5 \%$$

Gilt für: AAA, AAC, ATC, ATG, CAC, CCG, GAA, GCT, GGT, GTT, TGG und TTC.

Erwartete Häufigkeit jedes Codons, das im *hisJ*-Repertoire an den randomisierten Positionen einmal als Wildtypcodon auftritt:

$$1,5 \% \cdot 12 = 18 \%$$

Gilt für: CAG, CGT und TAC.

Erwartete Häufigkeit jedes Codons, das im *hisJ*-Repertoire an den randomisierten Positionen zweimal als Wildtypcodon auftritt:

$$1,5 \% \cdot 11 = 16,5 \%$$

Gilt für: ACC und GAC.

Erwartete Häufigkeit jedes Codons, das im *hisJ*-Repertoire an den randomisierten Positionen dreimal als Wildtypcodon auftritt:

$$1,5 \% \cdot 10 = 15 \%$$

Gilt für: CTG und TCT.

5.2 Molekularbiologischer und chemischer Anhang

5.2.1 Nukleotidsequenzen des *hisJ*-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des *HisJ* im Einbuchstaben-Code

```

gcgattccgcagaaacatccgcacatcggtaccgacccgacctatgcgccatttgaatcaaaa
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
cgctaaggcgtcttgtaggcgtagccatggctgggctggatacgcggtaaacttagtttt

a   A   I   P   Q   N   I   R   I   G   T   D   P   T   Y   A   P   F   E   S   K   -

aattcacaaggcgaactggttggcttcgatatcgatctggcaaaggaattatgcaaacgc
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
ttaagtgttccgcttgaccaaccgaagctatagctagaccgtttccttaatacgttttgcg

a   N   S   Q   G   E   L   V   G   F   D   I   D   L   A   K   E   L   C   K   R   -

atcaatacgcfaatgtacgtttgtcgaaaatccgctggatgcgttaatcccgtccttaaaa
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
tagttatgcggttacatgcaaacagcttttagggcgacctacgcaattagggcaggaatttt

a   I   N   T   Q   C   T   F   V   E   N   P   L   D   A   L   I   P   S   L   K   -

gccaagaagattgacgccatcatgtcatcgctttccattacggaaaaacgtcagcaagaa
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
cgcttcttctaactgcggtagtacagtagcgaaaggtaatgcctttttgcagtcgttctt

a   A   K   K   I   D   A   I   M   S   S   L   S   I   T   E   K   R   Q   Q   E   -

atagccttcaccgacaaactgtacgctgccgattctcgtttgggtgggcgaaaaattct
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
tatcggaagtggctgtttgacatgcgacggctaagagcaaaccaccaccgctttttaaga

a   I   A   F   T   D   K   L   Y   A   A   D   S   R   L   V   V   A   K   N   S   -

gacattcagccgacagtcgagtcgctgaaaggcaaacgggtaggcgtattgcagggcacc
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
ctgtaagtcggctgtcagctcagcgactttccgtttgcccatccgcataacgtcccgtgg

a   D   I   Q   P   T   V   E   S   L   K   G   K   R   V   G   V   L   Q   G   T   -

```

```
accaggagacgttcggtaatgaacattgggcacccaaaaggcattgaaatcgtctcgtat
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
tgggtcctctgcaagccattacttgtaaccctgggttttccgtaacttttagcagagcata
a   T Q E T F G N E H W A P K G I E I V S Y -

caggggcaggacaacattttattctgacctgactgccggacgtattgatgccgcgttccag
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
gtccccgtcctggttgtaaataagactggactgacggcctgcataactacggcgcaaggctc
a   Q G Q D N I Y S D L T A G R I D A A F Q -

gatgaggctcgtgccagcgaaggtttctcaaacaacctgtcggtaaagattacaaattc
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ctactccagcgcaggtcgtcttccaaaggagtttggttgacagccatttctaagtttaag
a   D E V A A S E G F L K Q P V G K D Y K F -

ggtggcccgtctgttaaagatgaaaaactgtttggcgtagggaccggcatgggcctgcgt
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ccaccggggcagacaatttctactttttgacaaaaccgcatccctggccgtaccgggacgca
a   G G P S V K D E K L F G V G T G M G L R -

aaagaagataacgaactgcgcgaagcactgaacaaagcctttgccgaaatgcgcgctgac
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
tttcttctattgcttgacgcgcttcgtgacttgtttcggaaacggctttacgcgcgactg
a   K E D N E L R E A L N K A F A E M R A D -

ggtacttacgagaaattagcgaaaaagtacttcgattttgatgtttatggtggc
661 -----+-----+-----+-----+-----+----- 714
ccatgaatgctctttaatcgctttttcatgaagctaaaactacaaataaccaccg
a   G T Y E K L A K K Y F D F D V Y G G -
```

5.2.2 Nukleotidsequenz des synthetischen hisJ-Gens und die daraus abgeleitete Peptidsequenz des HisJ im Einbuchstaben-Code *

```

GCGATTCCGCAGAACATCCGCATcGGTACCGACCCGACCTATGCgCCATTTGAATCAAAA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 60
CGCTAAGGCGTCTTGTAGGCGTAgCCATGGCTGGGCTGGATACGcGGTAAACTTAGTTTT

a   A   I   P   Q   N   I   R   I   G   T   D   P   T   Y   A   P   F   E   S   K   -

AATTCACAAGGCGAACTGGTTGGCTTcGATATCGAtCTGGCAAAGGAATTATGcAAACGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 120
TTAAGTGTTCCGCTTGACCAACCGAAgCTATAGCTaGACCGTTTCCTTAATACgTTTGCG

a   N   S   Q   G   E   L   V   G   F   D   I   D   L   A   K   E   L   C   K   R   -

ATCAATACGCAATGTACGTTtGTCGAAAATCCGCTGGATGCgTTaATCCCGTCCTTAAAA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 180
TAGTTATGCGTTACATGCAAaCAGCTTTTAGGCGACCTACGcAAtTAGGGCAGGAATTTT

a   I   N   T   Q   C   T   F   V   E   N   P   L   D   A   L   I   P   S   L   K   -

GCGAAGAAGATTGAcGCCATCATGTCTtTCTcTgTCTATTACGGAAAACGTCAGCAAGAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 240
CGCTTCTTCTAACTgCGGTAGTACAGaAGaGagAGaTAATGCCTTTTTTGcAGTCGTTCTT

a   A   K   K   I   D   A   I   M   S   S   L   S   I   T   E   K   R   Q   Q   E   -

ATAGCCTTcACCGAcAAACTGTACGCTGCCGATTCCCGTTTGGTGGTgGCGAAAAATTCT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 300
TATCGGAAgTGGCTgTTTGACATGCGACGGCTAAGGGCAAACCACCAcCGCTTTTTAAGA

a   I   A   F   T   D   K   L   Y   A   A   D   S   R   L   V   V   A   K   N   S   -

GAcATCtAGCCGACAGTCGAGTCgCTGAAAGGCAAACGgGTAGGCGTAtTGCAGGGCACC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 360
CTgTAGaTCGGCTGTCAGCTCAGcGACTTTCCGTTTGCcCATCCGCATGACGTCCCGTGG

a   D   I   Q   P   T   V   E   S   L   K   G   K   R   V   G   V   L   Q   G   T   -

CCCAGGGAGACgTTCGGTAATGAACATTGGGCACCAAAAGGCATTGAAATCGTCTCGTAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 420
TGGGTCCTCTGcAAGCCATTACTTGTAACCCGTGGTTTTCCGTAACCTTTAGCAGAGCATA

a   T   Q   E   T   F   G   N   E   H   W   A   P   K   G   I   E   I   V   S   Y   -

CAGGGGCAGGACAACATTTATTCTGACCTGACTGCCGGACGTATTGATGCCGCGTTCCAG

```

```

421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 480
      GTCCCCGTCCTGTTGTAAATAAGACTGGACTGACGGCCTGCATAACTACGGCGCAAGGTC
a      Q G Q D N I Y S D L T A G R I D A A F Q -

      GAtGAGGTcGCTGCCAGCGAAGGTTTCCTCAAACAaCCTGTCCGGTAAAGATTACAAATTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 540
      CTGCTCCAgCGACGGTCGCTTCCAAAGGAGTTTGTtGGACAGCCATTTCTAATGTTTAAG
a      D E V A A S E G F L K Q P V G K D Y K F -

      GGTGGCCCGTCTGTAAAGATGAAAACTGTTTGGCGTAGGGACCGGCATGGGCCTGCGT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 600
      CCACCGGGCAGACAATTTCTACTTTTTGACAAACCGCATCCCTGGCCGTACCCGGACGCA
a      G G P S V K D E K L F G V G T G M G L R -

      AAAGAAGATAACGAACTGCGCGAAGCACTGAACAAAGCCTTTGCCGAAATGCGCGCTGAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 660
      TTTCTTCTATTGCTTGACGCGCTTCGTGACTTGTTTTCGGAAACGGCTTTACGCGCGACTG
a      K E D N E L R E A L N K A F A E M R A D -

      GGTACTTACGAGAAATTAGCGAAAAAGTACTTCGATTTTGATGTTTATGGTGCC
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 714
      CCATGAATGCTCTTTAATCGCTTTTTTCATGAAGCTAAAACCTACAAATACCACCG
a      G T Y E K L A K K Y F D F D V Y G G -

```

* Randomisierte Positionen sind fett hervorgehoben

5.2.3 Programm zur Kopplung von Trinukleotidphosphoramiditen bei zweimaliger Injektion und doppelter Capping-Reaktion (Hartsch, 1998)

Methoden File: 02THC2X
 Amidit-Volumen: 2×50µl
 Kopplungszeit: 2×15 min
 Cycle Time: 38,25 min

| | Time | Function | Value |
|----|-------|-------------|-------|
| 1 | 0,20 | VALVE POS. | 2,1 |
| 2 | 0,80 | VALVE POS. | 2,3 |
| 3 | 1,00 | INTEGRATE | 0 |
| 4 | 1,80 | ml/min | 0 |
| 5 | 1,80 | VALVE POS. | 1,8 |
| 6 | 1,85 | ml/min | 1,85 |
| 7 | 1,95 | ml/min | 0 |
| 8 | 1,95 | PORT SET | 2,1 |
| 9 | 2,00 | PORT SET | 2,0 |
| 10 | 3,30 | VALVE POS. | 1,6 |
| 11 | 3,30 | ml/min | 1,0 |
| 12 | 3,70 | ml/min | 0 |
| 13 | 3,70 | VALVE POS. | 1,8 |
| 14 | 3,75 | ml/min | 1,0 |
| 15 | 3,85 | ml/min | 0 |
| 16 | 3,85 | VALVE POS. | 1,1 |
| 17 | 3,90 | ml/min | 1,0 |
| 18 | 4,00 | ml/min | 0 |
| 19 | 4,00 | Loop times | 7 |
| 20 | 4,00 | Step valve | 3 |
| 21 | 4,00 | End of loop | |
| 22 | 4,00 | ml/min | 2,5 |
| 23 | 19,05 | ml/min | 0 |
| 24 | 19,05 | Step valve | 3 |
| 25 | 19,05 | VALVE POS. | 1,8 |
| 26 | 19,10 | ml/min | ,01 |
| 27 | 19,20 | ml/min | 0 |
| 28 | 19,20 | PORT SET | 2,1 |
| 29 | 19,25 | PORT SET | 2,0 |

| | | | |
|----|-------|-------------|-----|
| 30 | 20,55 | VALVE POS. | 1,6 |
| 31 | 20,55 | ml/min | 1,0 |
| 32 | 20,95 | ml/min | 0 |
| 33 | 20,95 | VALVE POS. | 1,8 |
| 34 | 21,00 | ml/min | 1,0 |
| 35 | 21,10 | ml/min | 0 |
| 36 | 21,10 | VALVE POS. | 1,1 |
| 37 | 21,15 | ml/min | 1,0 |
| 38 | 21,25 | ml/min | 0 |
| 39 | 21,25 | Loop times | 7 |
| 40 | 21,25 | Step valve | 3 |
| 41 | 21,25 | End of loop | |
| 42 | 21,30 | ml/min | 2,5 |
| 43 | 36,30 | ml/min | 0 |
| 44 | 36,30 | Step valve | 3 |
| 45 | 36,35 | ml/min | 2,5 |
| 46 | 36,65 | ml/min | 1,0 |
| 47 | 36,65 | VALVE POS. | 2,5 |
| 48 | 36,75 | VALVE POS. | 2,6 |
| 49 | 36,85 | VALVE POS. | 2,3 |
| 50 | 36,85 | ml/min | 2,5 |
| 51 | 37,15 | ml/min | 1,0 |
| 52 | 37,15 | VALVE POS. | 2,5 |
| 53 | 37,25 | VALVE POS. | 2,6 |
| 54 | 37,35 | VALVE POS. | 2,3 |
| 55 | 37,65 | ml/min | 2,5 |
| 56 | 37,75 | VALVE POS. | 2,4 |
| 57 | 38,25 | VALVE POS. | 2,3 |
| 58 | 38,25 | ml/min | 0 |
| 59 | 38,25 | Loop times | 7 |
| 60 | 38,25 | Step valve | 3 |
| 61 | 38,25 | End of loop | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|----|---|----|----|---|----|---|----|----|----|----|----|----|------------|
| | Austausche pro Position* | 21 | 5 | 25 | 11 | 8 | 21 | 8 | 24 | 24 | 21 | 23 | 17 | 13 | 221 |
|--|-----------------------------|----|---|----|----|---|----|---|----|----|----|----|----|----|------------|

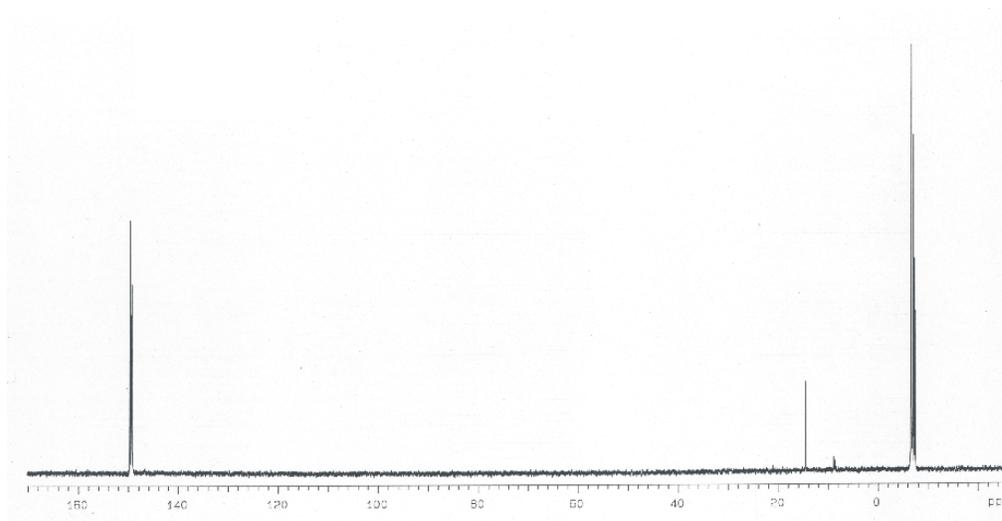
*Ausgenommen nicht eingesetzte Codons

Kursiv: Bei der Oligonukleotidsynthese nicht eingesetzte Codons

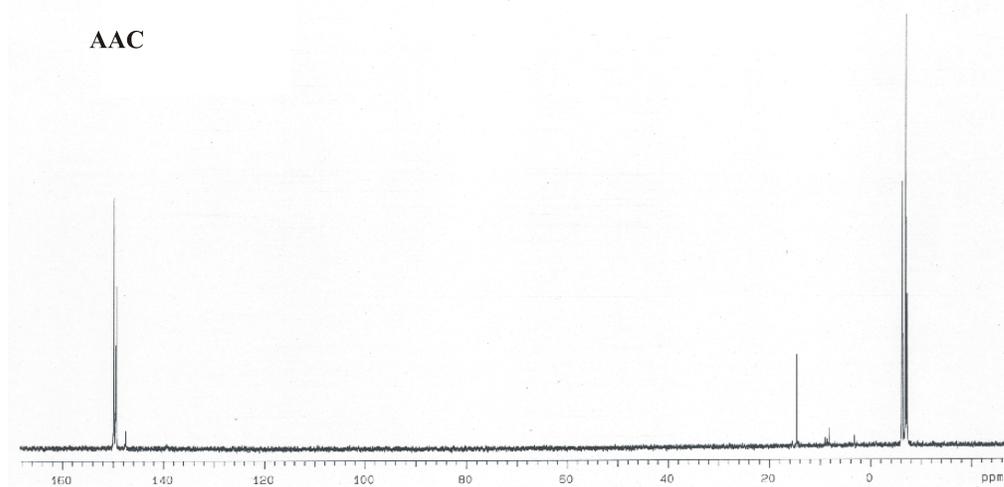
5.2.5 ^{31}P -NMR Spektren der Trinukleotidphosphoramidite des Typs 5'-DMTrO-dN¹pdN²pdN³-p(OEt)(NiPr)₂

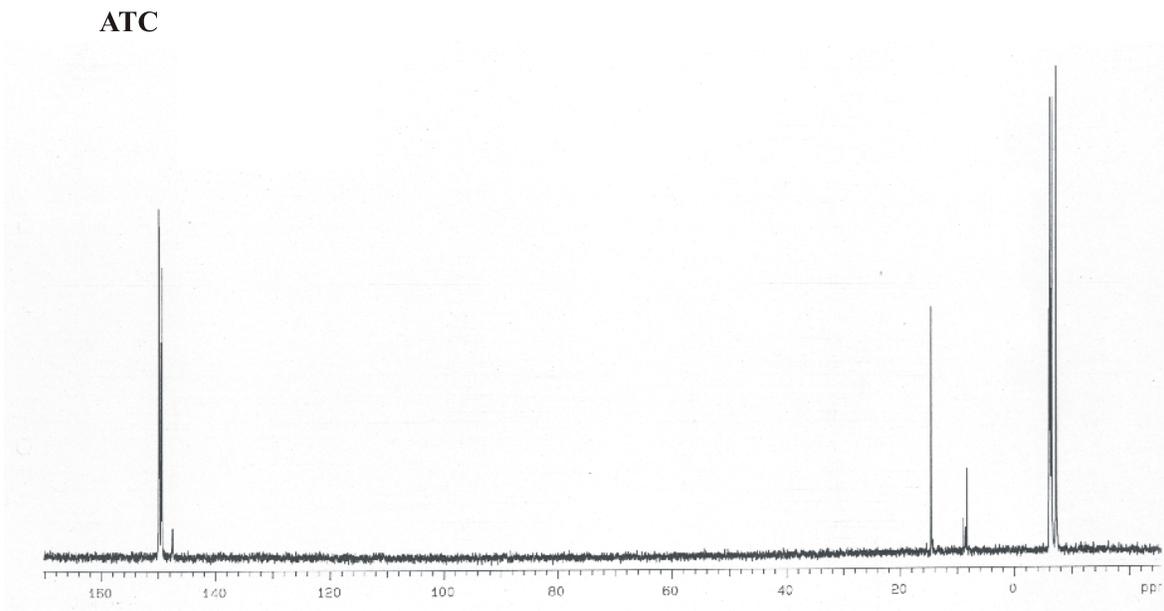
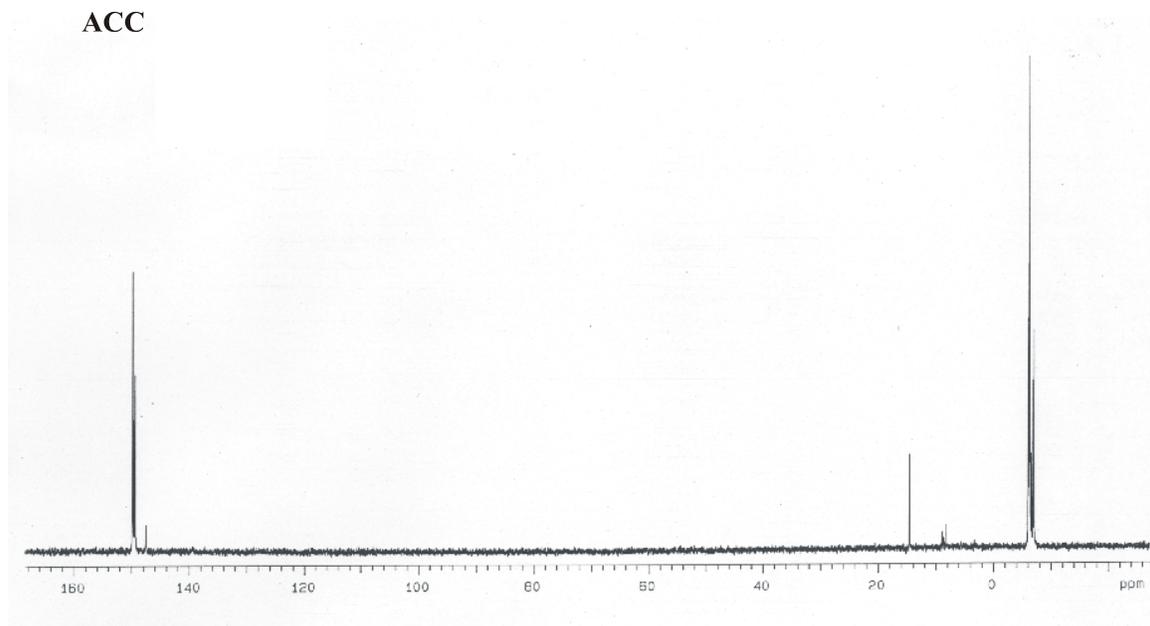
N = A^{bz} (N6-Benzoyladenosen), C^{bz} (N4-Benzoylcytidin), G^{ibu} (N2-Isobutyrylguanosen) oder T (Thymidin)

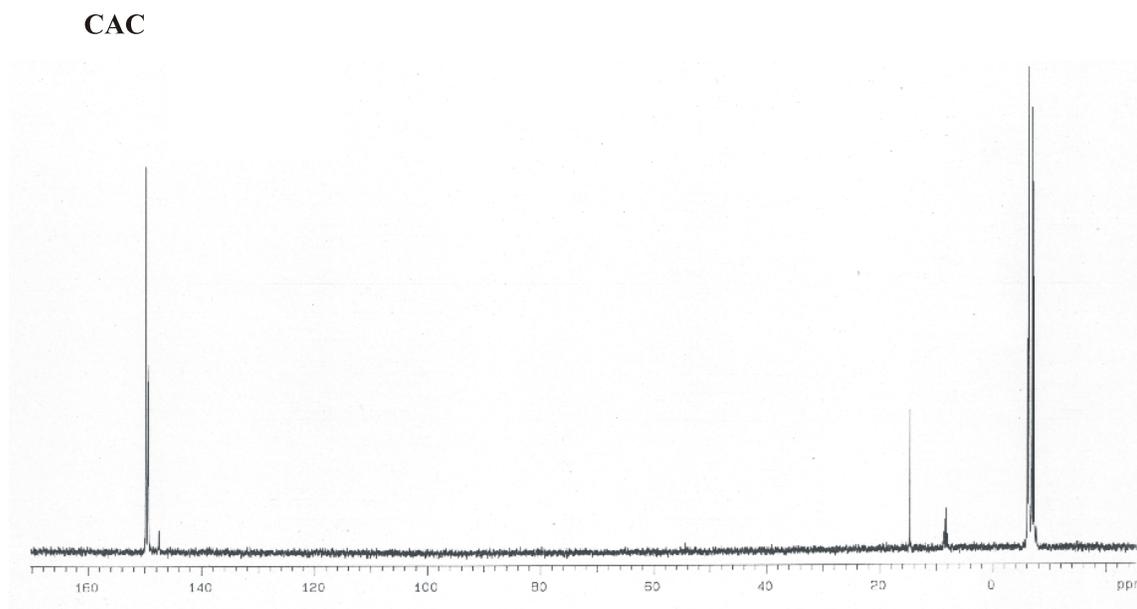
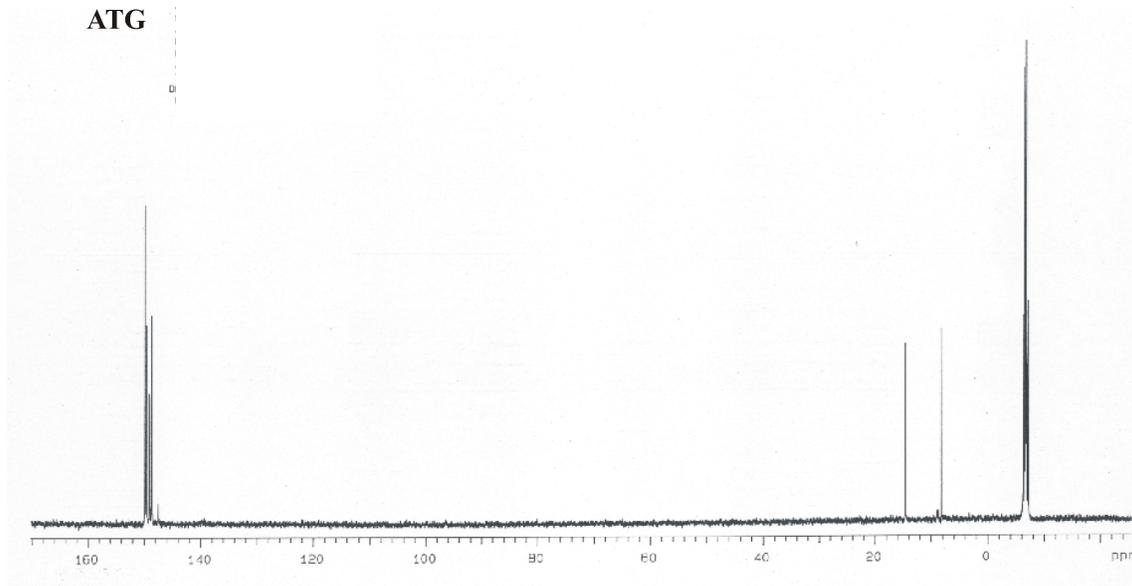
AAA

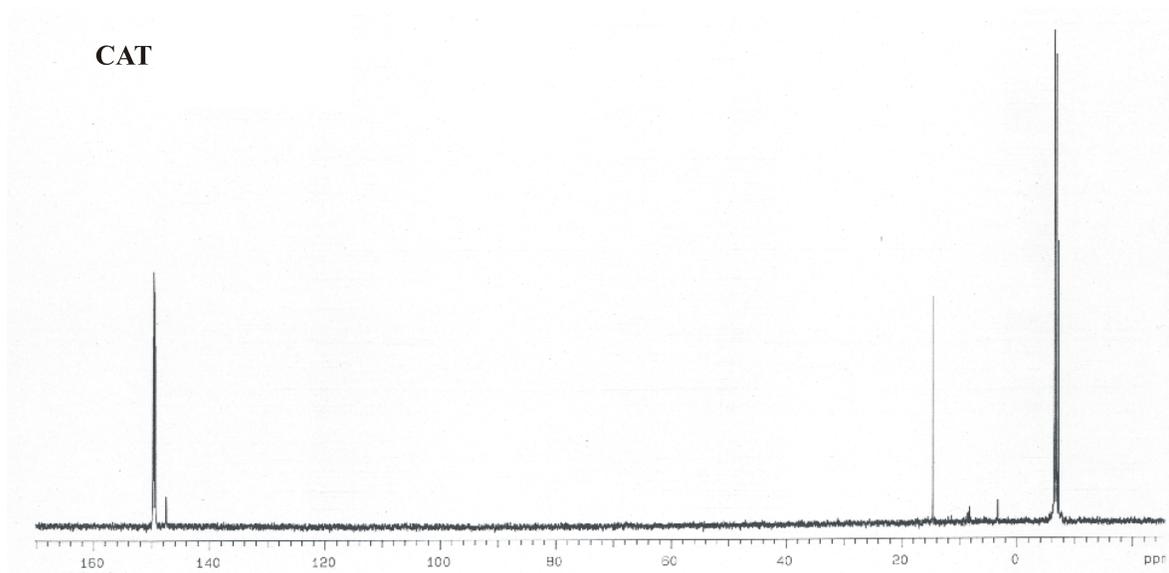
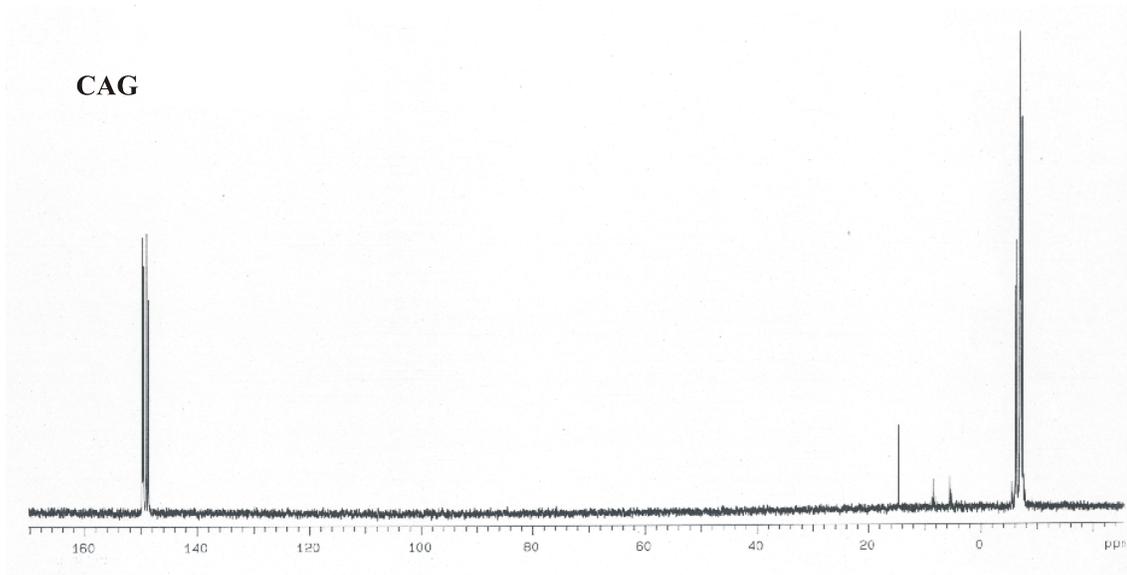


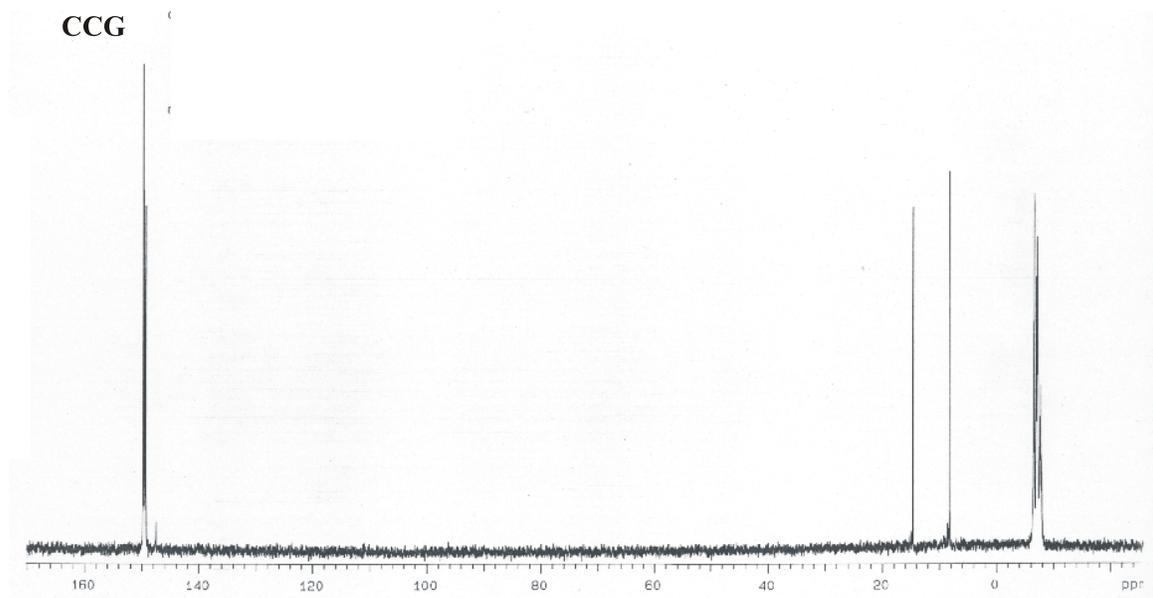
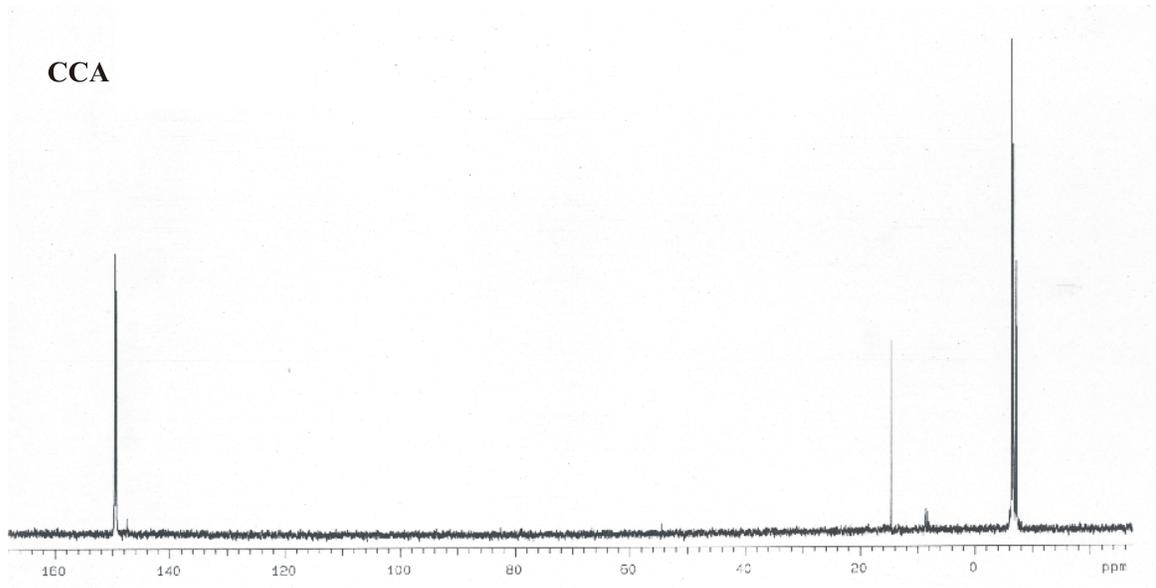
AAC

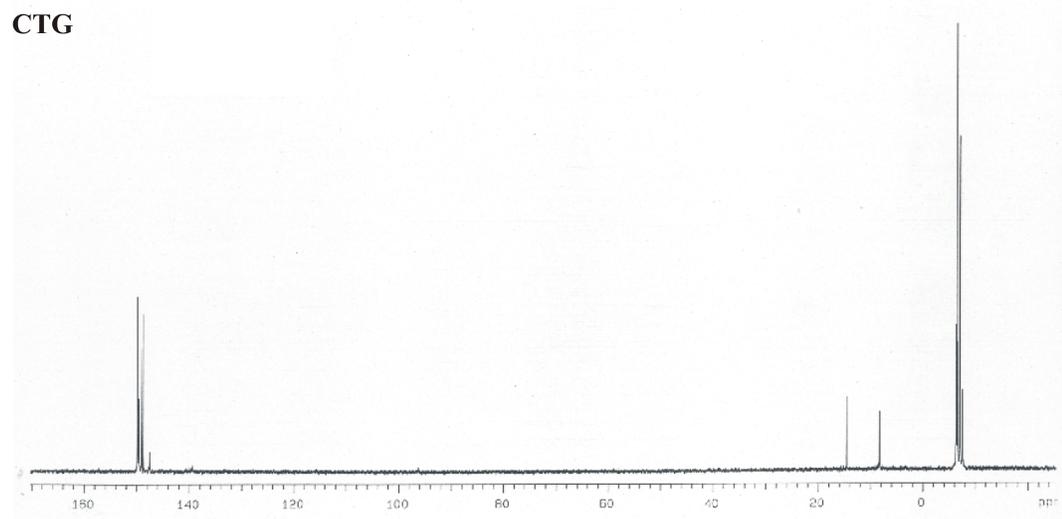
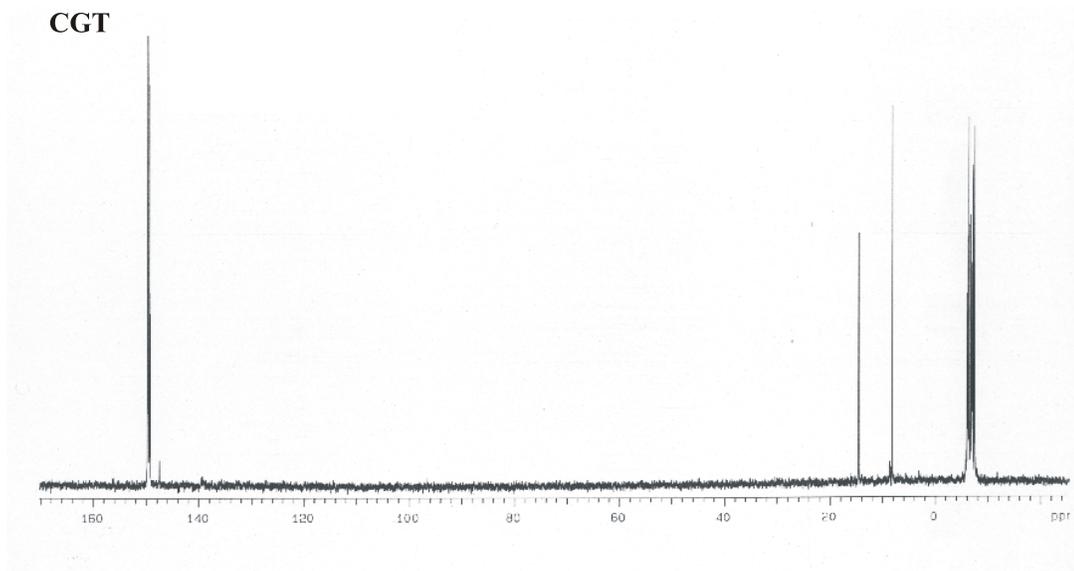


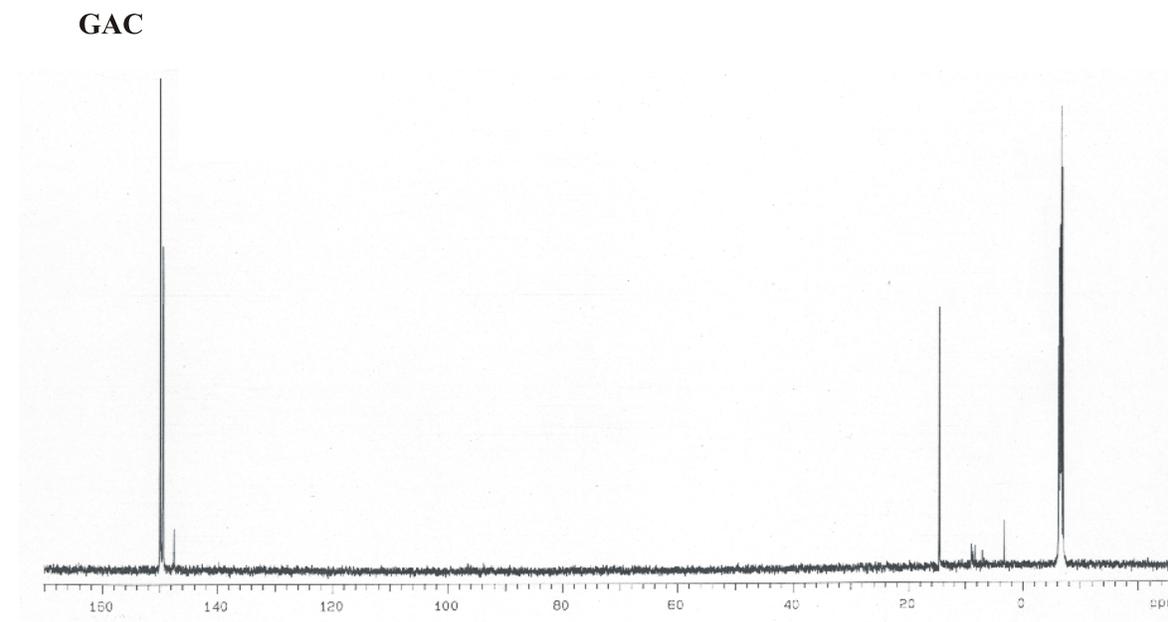
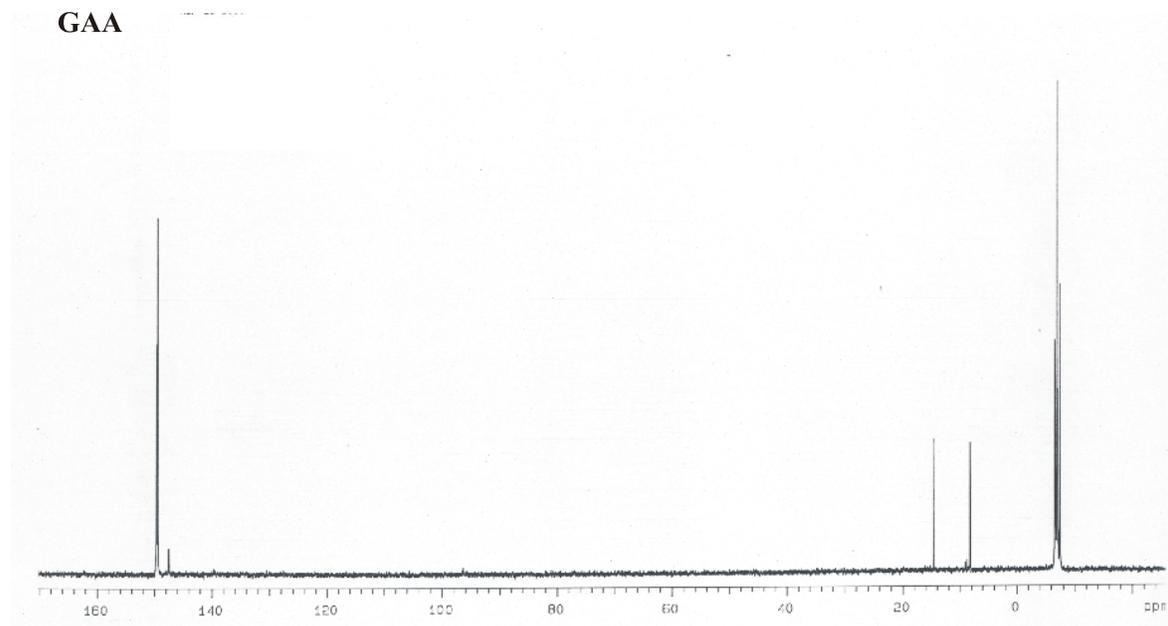


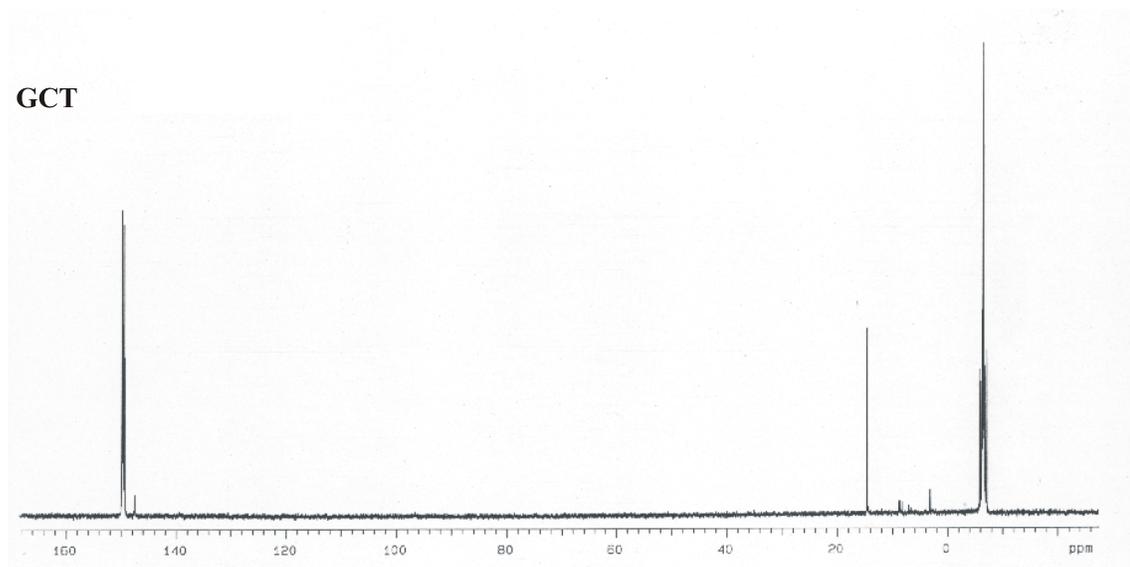
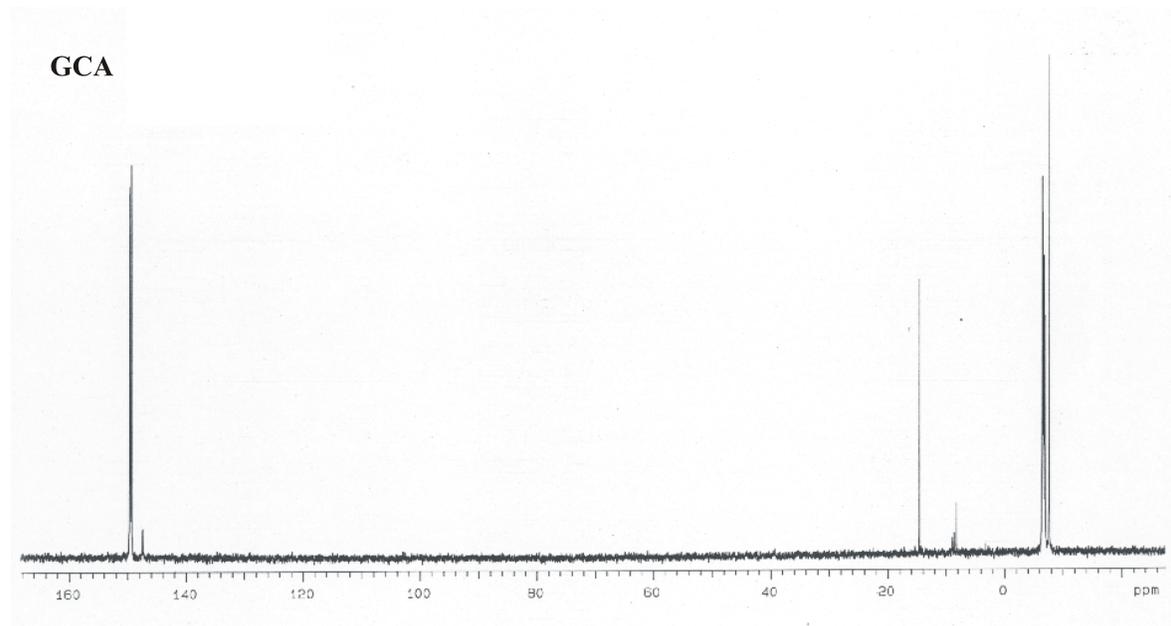


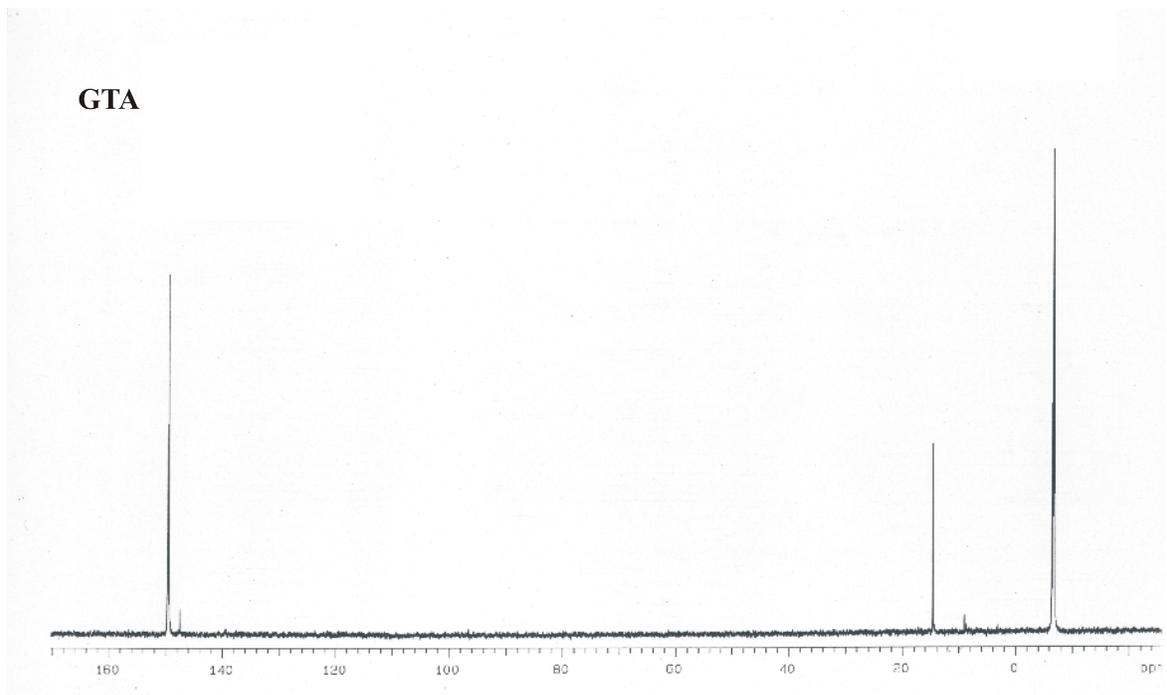
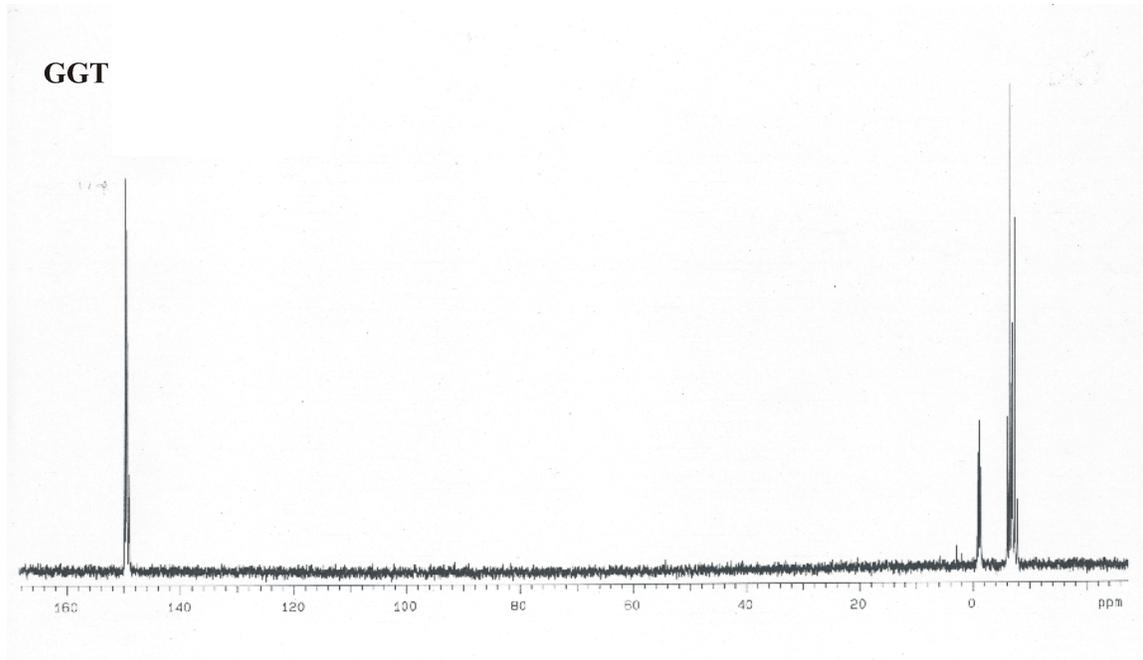


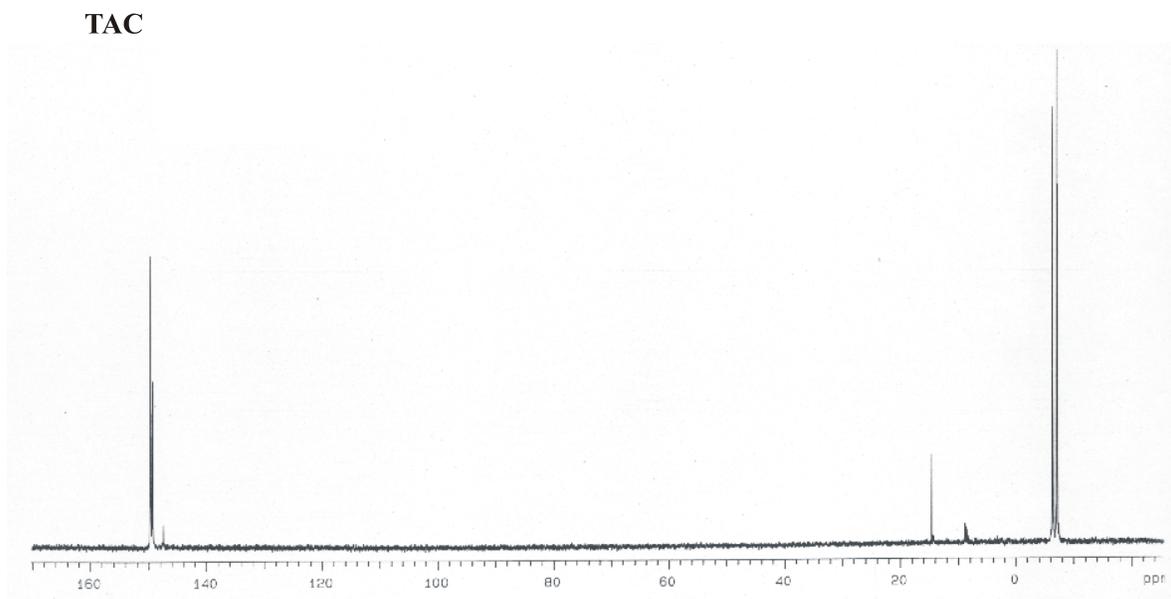
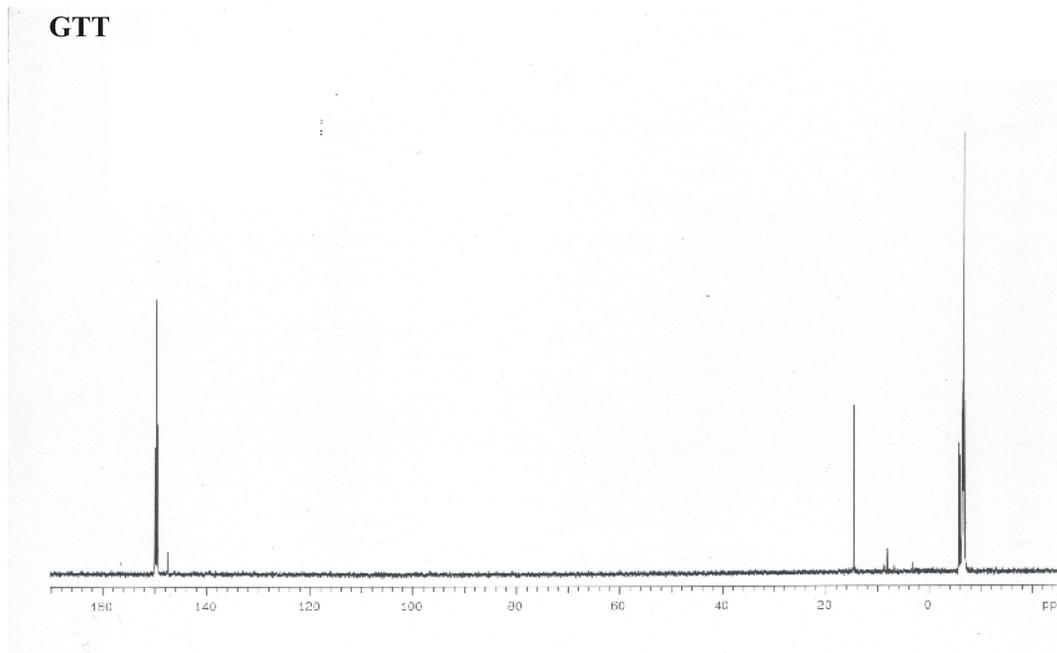


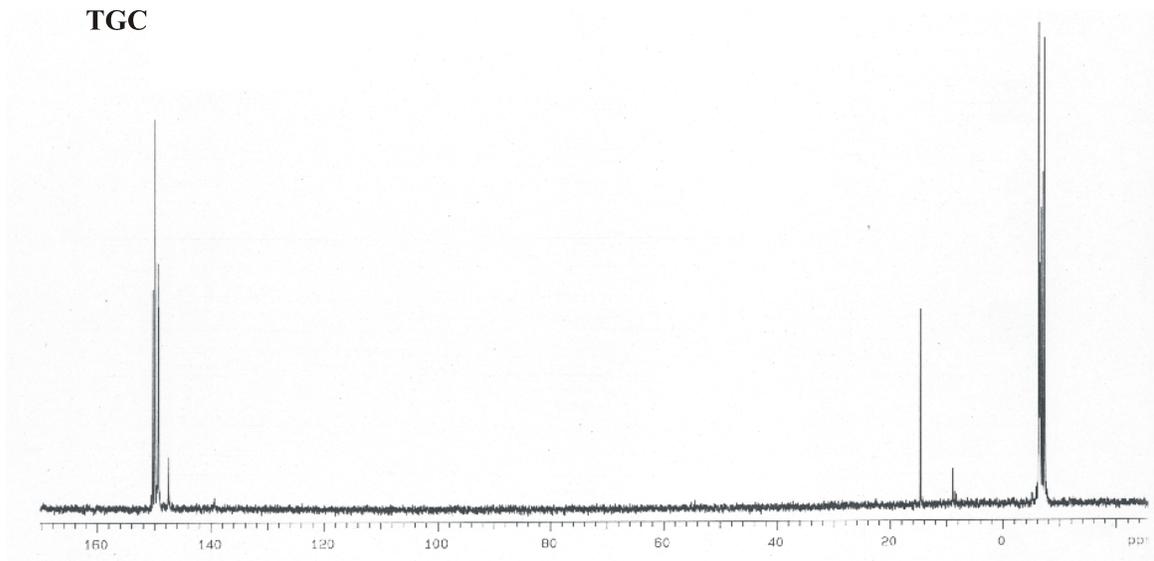
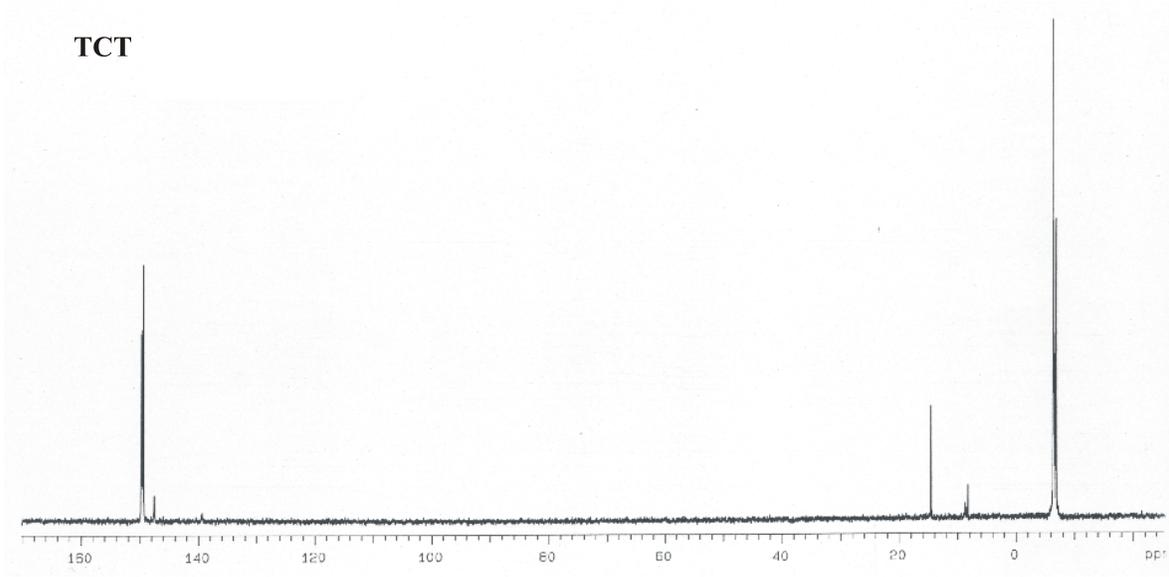


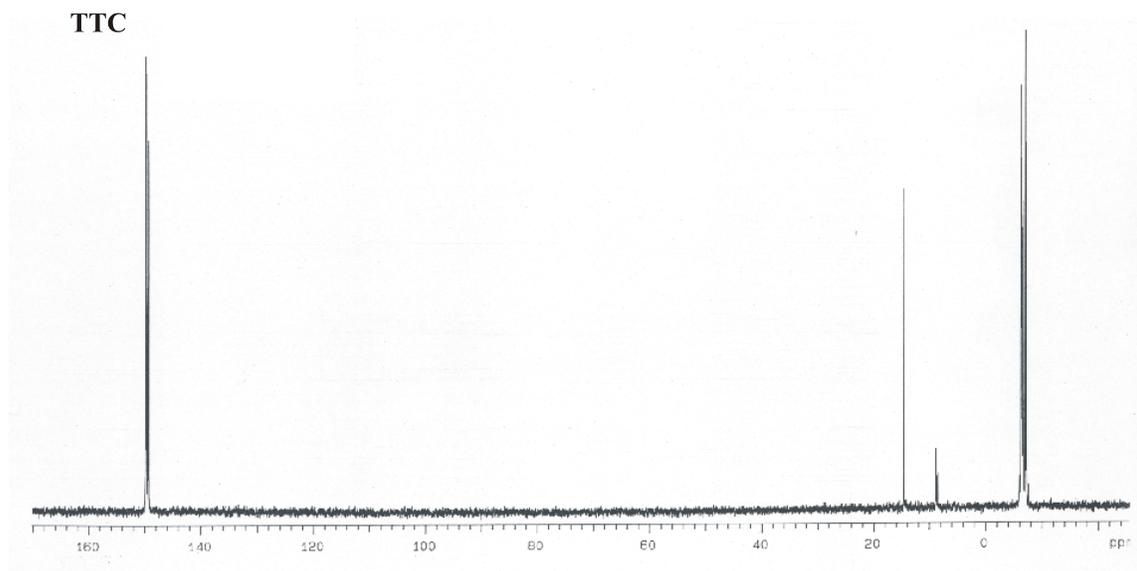
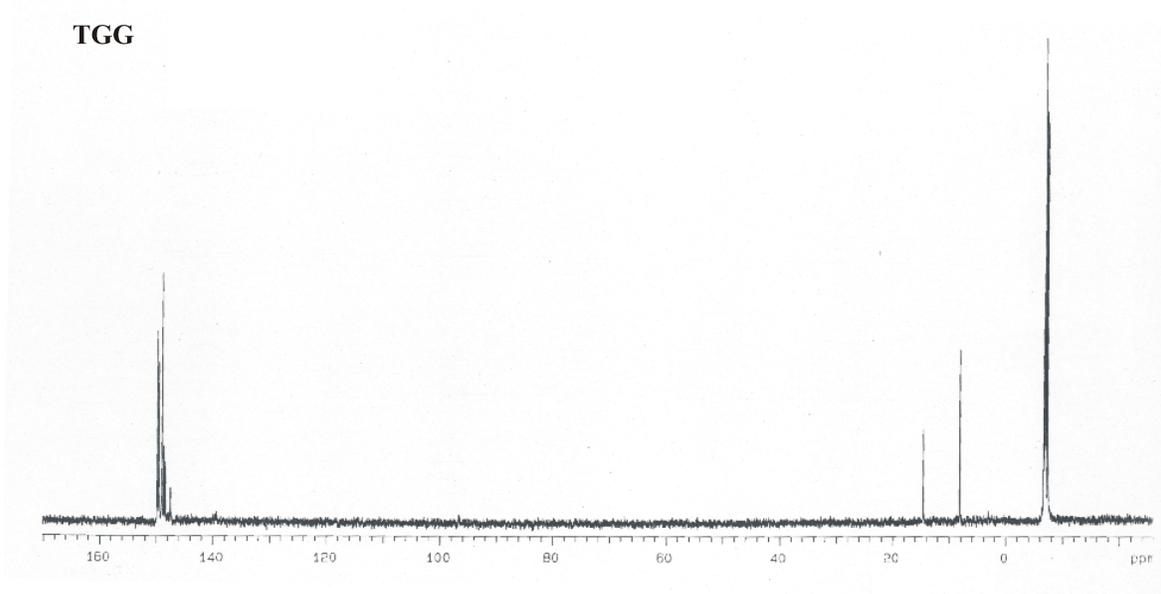


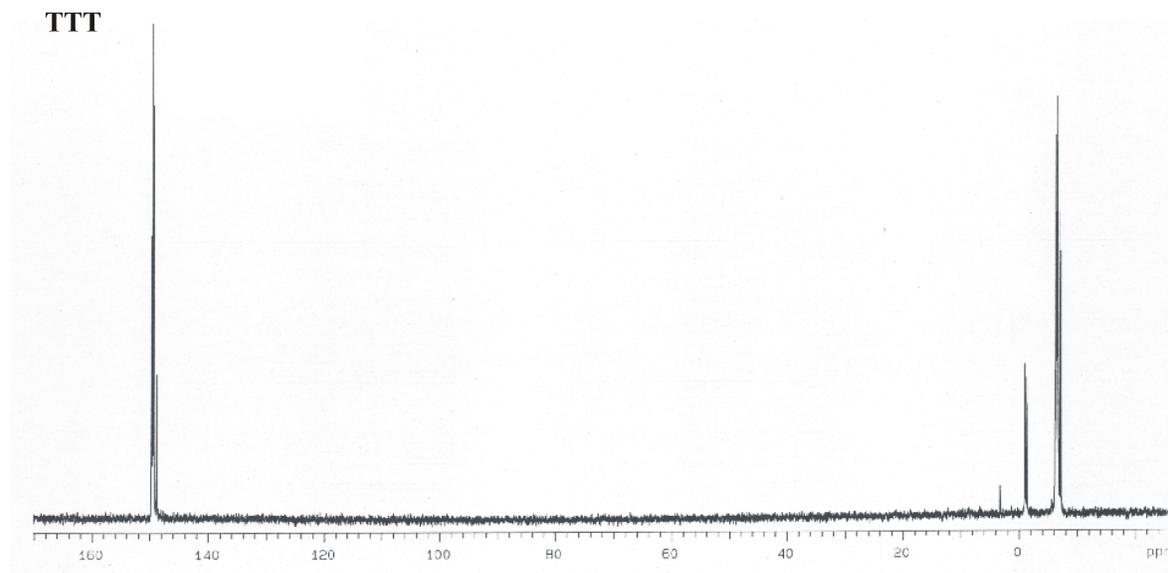




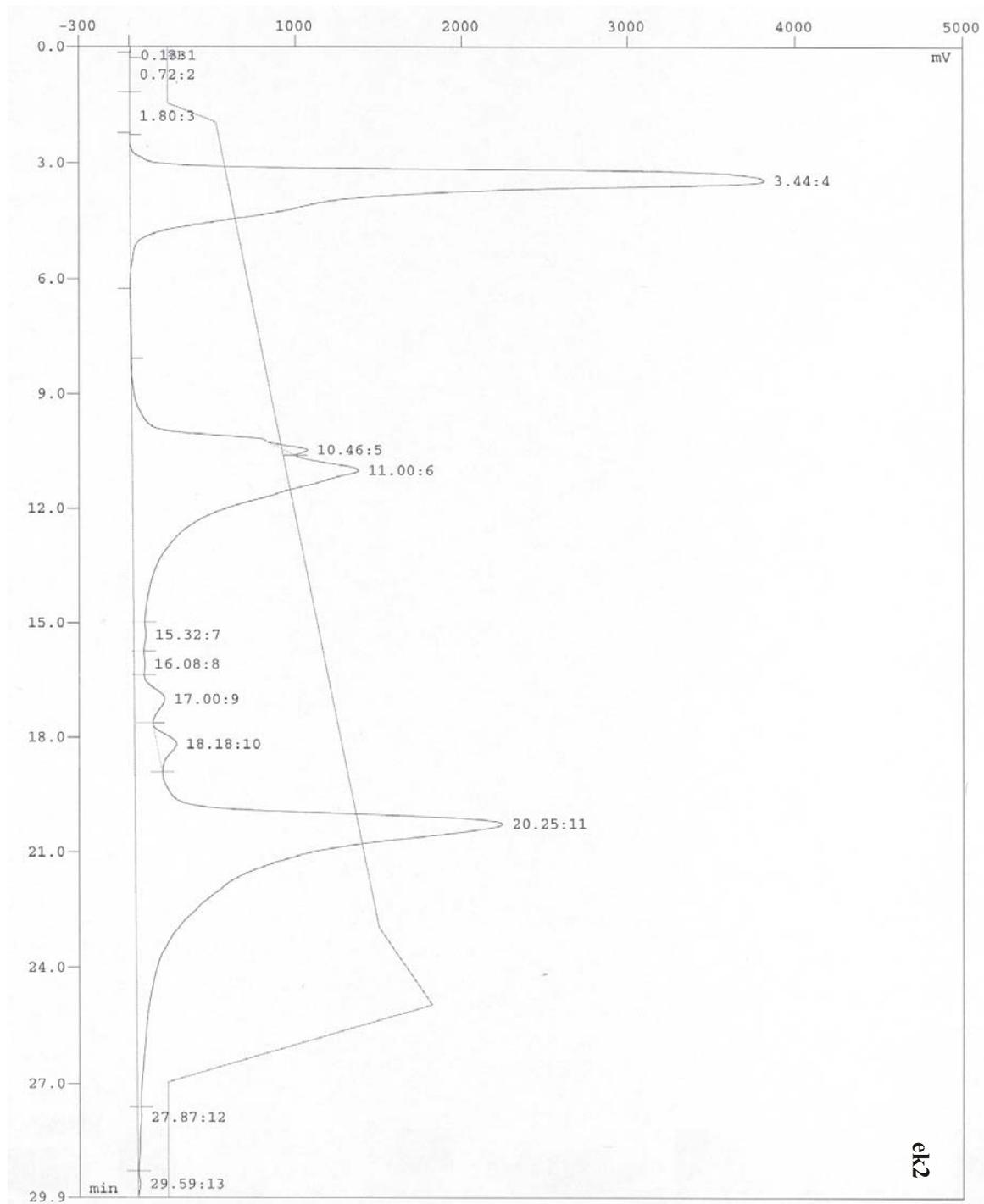


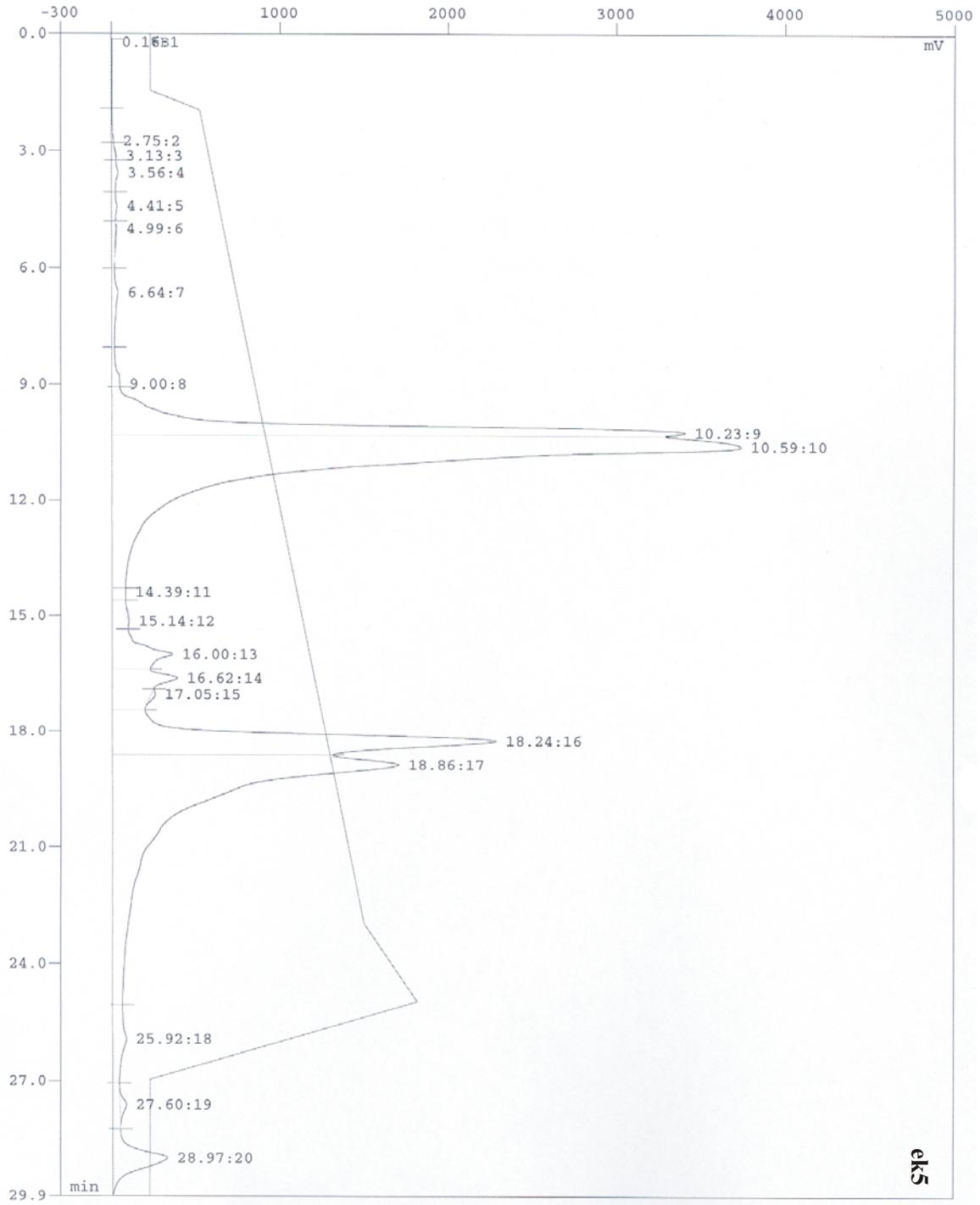


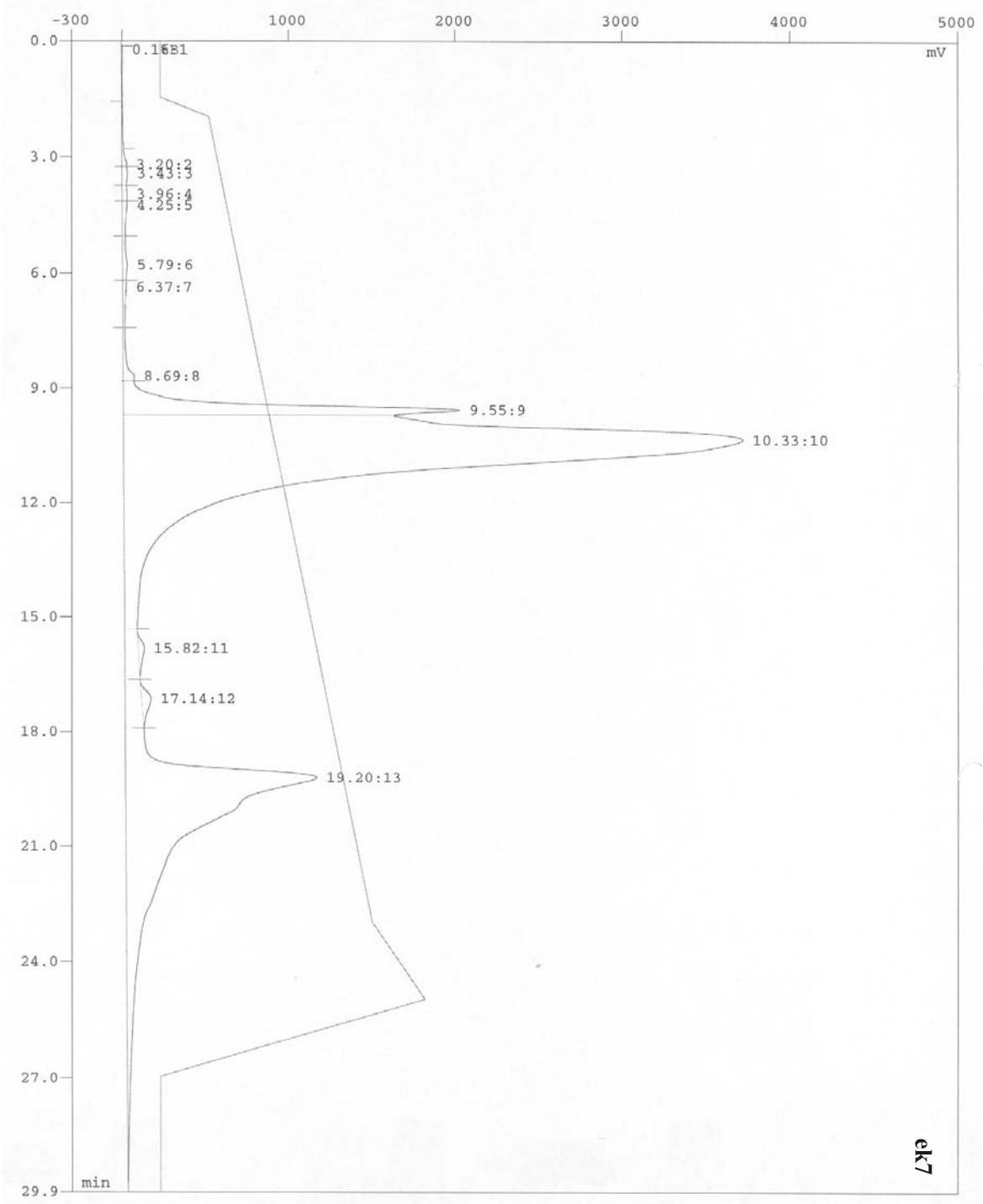


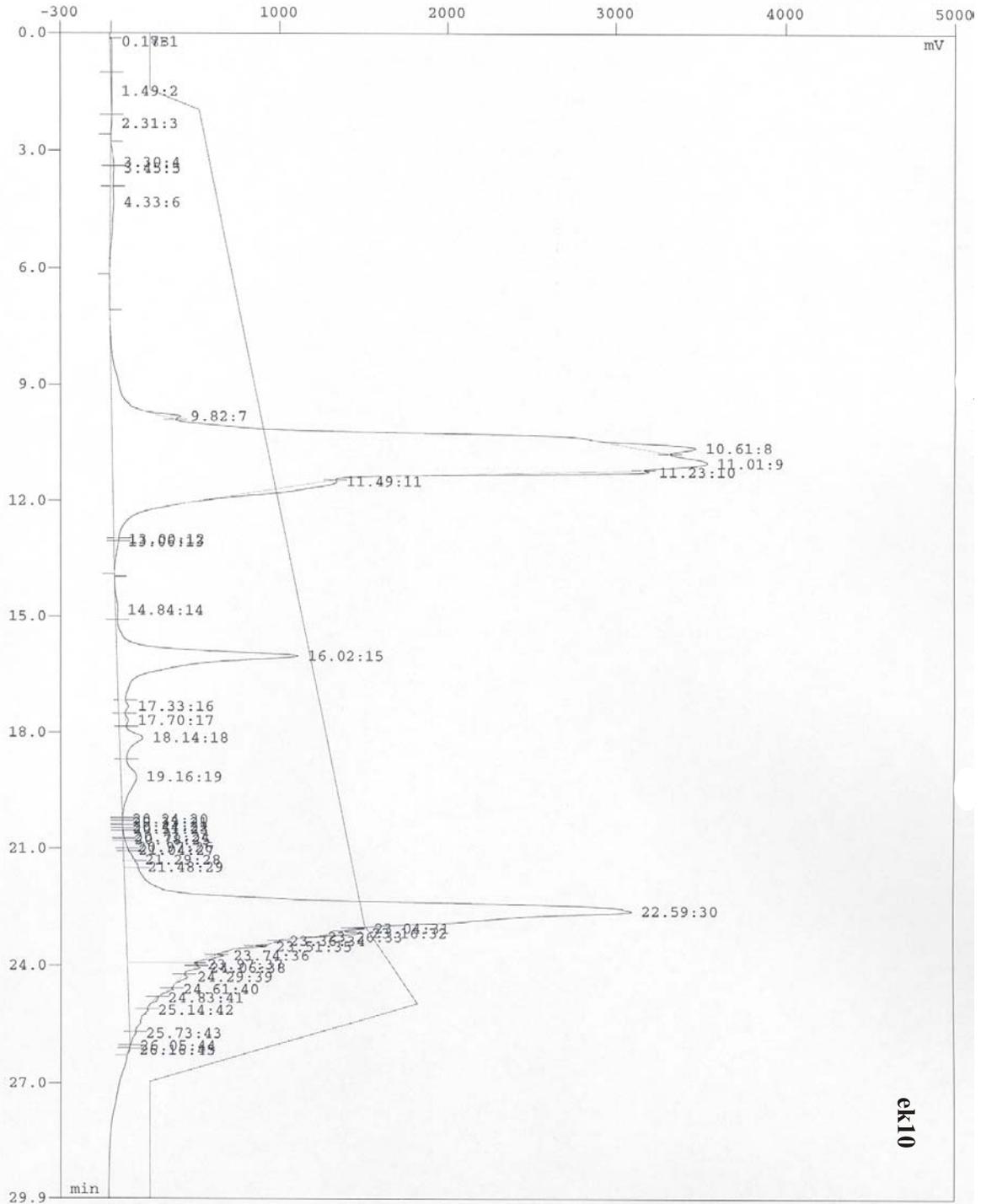


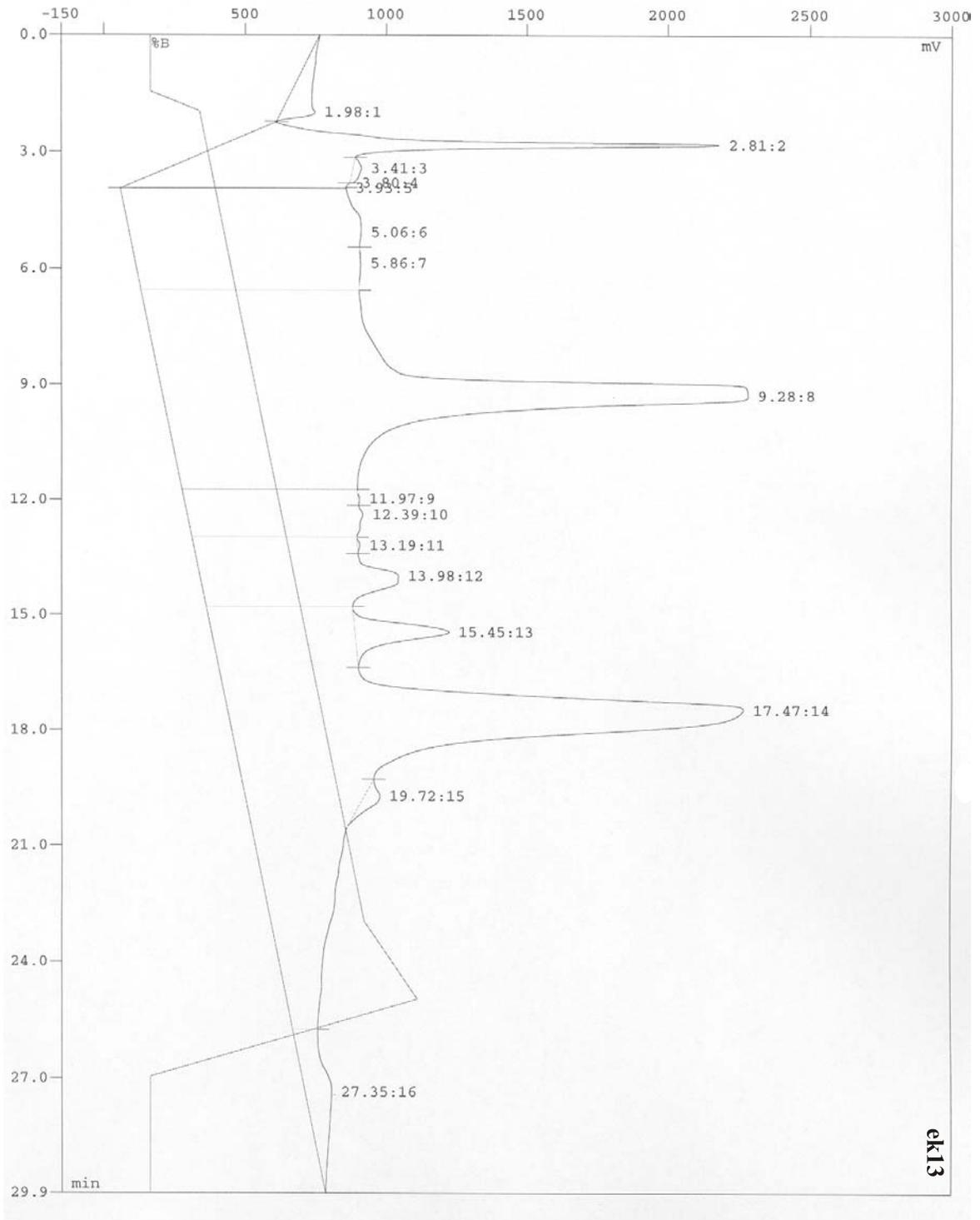
5.2.6 RP-HPLC Spektren der Aufreinigung der randomisierten Oligonukleotide ek02, ek05, ek07, ek10 und ek13











5.2.7 CD-ROM mit DNA-Sequenzen

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Dreibuchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie die benutzten Abkürzungen für Nukleinsäure-Bausteine und alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liébecq, 1978).

| | |
|----------------|---|
| Å: | Angström, Längenmaß (10^{-10} m) |
| Abb.: | Abbildung |
| Amp: | Ampicillin |
| AP: | alkalische Phosphatase |
| APS: | Ammoniumperoxodisulfat |
| <i>argT</i> : | Gen für das Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein |
| aTc: | Anhydrotracyclin |
| BCIP: | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (<i>p</i> -Toluidinsalz) |
| <i>bla</i> : | Gen für β -Lactamase aus <i>E. coli</i> |
| bp: | Basenpaare |
| BSA: | Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin |
| bzw.: | beziehungsweise |
| <i>cat</i> : | Gen für Chloramphenicolacetyltransferase |
| CPRII: | <i>Chemical Phosphorylation Reagent II</i> |
| Cm: | Chloramphenicol |
| Da: | Dalton |
| ddNTP: | Dideoxynucleosidtriphosphat |
| DIPEA: | Diisopropylethylamin |
| DMSO: | Dimethylsulfoxid |
| DMTr: | Dimethyltrityl |
| dNTP: | Deoxynucleosidtriphosphat |
| dsDNA: | Doppelsträngige DNA |
| DTT: | Dithiothreitol |
| E: | Extinktion |
| (E): | schwach bindende Phagen |
| ϵ_x : | molarer Extinktionskoeffizient bei x nm |
| ed.: | Editor |
| EDTA: | Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium Salz |
| ELISA: | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay</i> |
| Et: | Ethyl- |
| F_x : | Fluoreszenz (relative Einheiten) bei x nm |

| | |
|------------------------------|---|
| f1: | Replikationsursprung des Phagen f1 |
| fdT: | Transkriptionsterminatoren des Phagen f1 |
| gp: | Genprodukt |
| h: | <i>hour</i> (Stunde) |
| HisJ: | Histidin-Bindeprotein (Wildtyp) |
| HisJ ^{rep} : | HisJ-Bibliothek |
| <i>hisJ</i> : | Gen für das Histidin-Bindeprotein (Wildtyp) |
| <i>hisJ</i> ^{rep} : | <i>hisJ</i> -Genrepertoire |
| HPLC: | <i>high pressure liquid chromatography</i> |
| IMAC: | <i>Immobilized Metal Ion Chromtography</i> |
| IPTG: | Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid |
| (IS) | stark bindende Phagen |
| LAOBP: | Lysin-, Arginin-, Ornithin-Bindeprotein |
| <i>kan</i> : | Gen für die Aminoglycosid-3' Phosphotransferase |
| kb: | Kilobasenpaare |
| K _d : | Affinitätskonstante (M) der Rezeptor-Ligandenwechselwirkung |
| l: | Liter |
| λ : | Wellenlänge (nm) |
| λ_{ex} : | Anregungswellenlänge (nm) |
| LAOBP: | Lysin-/Arginin-/Ornithin-Bindeprotein |
| <i>lacZ</i> : | Gen für die β -Galaktosidase |
| LCR: | <i>ligase chain reaction</i> |
| M: | Molar |
| μ : | Mikro (10^{-6}) |
| min: | Minute |
| M _r : | Relative Molmasse |
| n: | Nukleotid (soweit nichts anderes angegeben) |
| NBT: | 4-Nitrotetrazoliumchloridblau |
| O.D. _x : | Optische Dichte bei x nm |
| ORF: | open reading frame, offener Leserahmen |
| ori: | <i>Origin of replication</i> , Replikationsursprung |
| p. a.: | Pro analysis, zur Analyse |
| PAA: | Polyacrylamid |
| PAGE: | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS: | Phosphate buffer saline, Phosphat gepufferte Saline |
| PCR: | Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion |
| pfu: | <i>plaque forming units</i> |
| RP: | <i>reverse phase</i> |
| RT: | Raumtemperatur |

| | |
|--------------|---|
| ssDNA: | Einzelstrang-DNA |
| SDS: | Sodiumdodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat |
| StEP | <i>staggered extension process</i> |
| Tab.: | Tabelle |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TE: | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED: | N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin |
| Tris: | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| U: | <i>unit</i> , Einheit |
| Upm: | Umdrehungen pro Minute |
| u.U: | unter Umständen |
| UV: | Ultraviolett |
| V_{\max} : | Reaktionsgeschwindigkeit |
| v/v: | Volumen pro Volumen |
| Vol.: | Volumen |
| w/v: | Gewicht pro Volumen |
| z. B.: | zum Beispiel |

7. LITERATUR

- AGARWAL, K.L., BUCHI, H., CARUTHERS, M.H., GUPTA, N., KHORANA, H.G., KLEPPE, K., KUMAR, A., OHTSUKA, E., RAJBHANDARY, U.L., VAN DE SANDE, J.H., SGARAMELLA, V., WEBER, H., YAMADA, T. (1970). Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature* 227,27-34.
- BARBAS, C. F., BURTON, D. R., SCOTT, J. K., SILVERMAN, G. J. (2001). *Phage Display. A Laboratory Manual*, A2.10, Cold Spring Harbor, New York.
- BENSON, D. E., HADDY, A. E. & HELLINGA, H. W. (2002) Converting a maltose receptor into a nascent binuclear oxygenase by computational design. *Biochemistry* 41, 3262-3267.
- BERNSTEIN, F. C., KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., MEYER, E. F., BRICE, M. D., RODGERS, J. R., KENNARD, O., SHIMANOUCI, T. & TASUMI, M. (1977) The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112, 535-542
- BEAUCAGE, S. L., & CARUTHERS, M. H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidite: a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-1862
- BERNSTEIN, F. C., KOETZLE, T. F., WILLIAMS, G. J. B., MEYER, E. F., BRICE, M. D., RODGERS, J. R., KENNARD, O., SHIMANOUCI, T. & TASUMI, M. (1977) The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *J. Mol. Biol.* 112, 535-542
- BISHOP, A. *et al.* (2000) Unnatural ligands for engineered proteins: new tools for chemical genetics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 577-606
- BOLON, D. L. & MAYO, S. L. (2001) Enzyme-like proteins by computational design. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98, 14274-14279
- BROWN, T. & BROWN, D. J. S. (1991) Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, in: *Oligonucleotides and analogues* (Eckstein, F., Hrsg.) 1-23, IRL Press, New York.
- CADWELL, R.C. & JOYCE, G.F. (1992) *PCR Methods Appl.* 2, 28-33.
- CARUTHERS, M. H., BARONE, A. D., BEAUCAGE, S. L., DODDS, D. R., FISHER, E. F., MCBRIDE, L. J., MATTEUCCI, M., STABINSKY, Z. & TANG, J.-Y. (1987) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method in *Methods of enzymology Vol. 154* (Wu, R. & Grossmann, L. ed.) 287-313, Academic Press, San Diego.

- CARUTHERS, M. H., BEATON, G., WU, J. V. & WIESELER, W. (1992) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides and deoxyoligonucleotide analogs, in *Methods of enzymology Vol. 211* (Lilley, D.M.J. & Dahlberg, J. E. ed.) 3-20, Academic Press, San Diego.
- CLIMIE, S., RUIZ-PEREZ, L., GONZALEZ-PACANOWSKA, D., PRAPUNWATTANA, P., CHO, S. W., STROUD, R., SANTI, D. V. (1990) SATURATION site-directed mutagenesis of thymidylate synthase. *J. Biol. Chem.* 265, 18776-9.
- COLLINS, J. (1997) Annual reports in combinatorial chemistry and molecular diversity (Moos, W. H. *et al.*, Hrsg.), ESCOM, Leiden, 210 ff.
- COX, E. C. (1976) Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* 1976, 135-56.
- CREIGHTON, T.E. (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W. H. Freeman and Company, New York, 6 ff.
- CRICK, F. H. C., BARNETT, L., BRENNER, S. & WATTS-TOBIN, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins, *Nature* 192, 1227-1232.
- DAVIS, J.H., SZOSTAK, J.W. (2002) Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,11616-21
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P. & SMITHIES, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programmes for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- DOWER, W. J., MILLER, J. F., RAGSDALE, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-45.
- FRITZ, H.-J., BELAGAJE, R., BROWN, E. L., FRITZ, R. H., JONES, R. A., LEES, R. G. & KHORANA, H. G. (1978) High pressure liquid chromatography in polynucleotide synthesis. *Biochemistry* 17, 1257-1267.
- GABARRO-ARPA, J., REVILLA, R. (2000) Clustering of a molecular dynamics trajectory with a Hamming distance. *Comput Chem.* 24, 693-8.
- GEORGIU, G., STATHOPOULOS, C., DAUGHERTY, P. S., NAYAK, A. R., IVERSON, B. L. & CURTIS, R. (1997). Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the Screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnol.* 15, 29-34.
- GLASER, S., YELTON, D., HUSE, W. D. (1992) Antibody engineering by codon-based mutagenesis in a filamentous phage vector system. *J. Immunol.* 149, 3903-3913.
- GREENER, A., CALLAHAN, M., JERPSETH, B. (1997) An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Mol Biotechnol.* 7, 189-95.
- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HARRIS, J. L., & CRAIK, C. S. (1998) Engineering enzyme specificity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 127-132.

- HARTSCH, T.** (1998) Kombinatorische, codonweise Strukturgen-synthese zur Gewinnung einer konformationell stabilisierten, disulfidfreien Variante der menschlichen Immunglobulin-domäne REI_v. Promotionsschrift, Universität Göttingen.
- HASTY, J., MCMILLEN, D. & COLLINS, J. J.** (2002) Engineered gene circuits. *Nature* 420, 224-230.
- HELLINGA, H. W. & MARVIN, J. S.** (1998) Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends in Biotechnol.* 16, 183-189.
- HENAUT, A. & DANCHIN, A.** (1996) Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences, or *E. coli* in silico in: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C. ed.) 2047-2066, ASM Press, Washington DC.
- HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B.** (1991) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 193-197, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- HOESS, R. H.** (2001) Protein design and phage display, *Chem. Rev.* 101, 3205-3218
- HOOGENBOOM H. R., GRIFFITHS A. D., JOHNSON K. S., CHISWELL D. J., HUDSON P., WINTER G.** (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acids Res.* 19, 4133-7.
- KHORANA, H. G., TENER, G. M., MOFFATT, J. G., POL, E. H.** (1956) A new approach to synthesis of polynucleotides. *Chem. and Ind.*, London, 1523.
- KNAPPIK, A., GE, L., HONEGGER, A., PACK, P., FISCHER, M., WELLNHOFER, G., HOESS, A., WÖLLE, J., PLÜCKTHUN, A., VIRNEKÄS, B.** (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides, *J. Mol. Biol.* 296, 57-86.
- KOH, J. T.** (2002) Engineering selectivity and discrimination into ligand-proteins interfaces. *Chem. Biol.* 9, 17-23.
- KONG, H., KUCERA, R. B., & JACK, W. E.** (1993) Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement and exonuclease activities, *J. Biol. Chem.* 268, 1965-1975.
- KYHSE-ANDERSEN, J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.
- LIÉBECQ, C., ed.** (1978) *Biochemical nomenclature and related documents*, International Union for Biochemistry, The Biochemical Society, London.
- LOOGER, L. L., DWYER, M. A., SMITH, J. J. & HELLINGA, H. W.** (2003) Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature* 423, 185-190.
- DE LORIMIER, R. M. et al.** (2002) Design, construction and analysis of a family biosensors. *Protein Sci.* 11, 2655-2675.

- LYTTLE, M. H., NAPOLITANO, E. W., CALIO, B. L. & KAUVAR, L. M. (1995) Mutagenesis using Trinucleotide b-cyanoethyl phosphoramidites. *Biotechniques* 19, 274-280.
- MAIER, N. M., FRANCO, P., LINDNER, W. (2001) Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. *J Chromatogr. A* 906, 3-33.
- MATTHEAKIS, L.C., BHATT, R.R., DOVER, W. J. (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9022-9026.
- MESSING, J. (1991) Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene* 100, 3-12.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 35-350.
- NEU, H. C. & HEPPEL, L. A. (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroblasts, *J. Biol. Chem.* 240, 3685-3692.
- NEUNER, P., CORTESE, R., MONACI, P. (1998) Codon-based mutagenesis using dimer-phosphoramidites. *Nucl. Acids Res.* 26, 1223-1227.
- NIRENBERG, M. (1973) The genetic code, aus: Nobel Lectures: Physiology of Medicine (1963-1970), New York (Elvesier), 372-395.
- NINKOVIC, M., DIETRICH, R., ARAL, G., SCHWIENHORST, A. (2001). High-fidelity in vitro recombination using a proofreading polymerase. *BioTechniques* 30, 530-536.
- MCNULTY *et al.* (2003) Protein Expression and Purification 27, 365-374.
- OH, B. H., PANDIT, J., KANG, C. H., NIKAIDO, K., GOKCEN, S., AMES, G. F., KIM, S. H. (1993) Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J Biol Chem* 268, 11348-11255.
- OH, B.-H., KANG, C.-H., DE BONDT, H., KIM, S.-H., NIKAIDO, K., JOSHI, A. K. & AMES, G. F.-L. (1994a) The bacterial periplasmic histidine-binding protein, *J. Biol. Chem.* 269, 4135-4143.
- OH, B. H., AMES, G. F., KIM, S. H. (1994b) Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J Biol Chem* 269 pp. 26323-26330.
- ONO, A., MATSUDA, A., ZHAO, J., SANTI, D. V. (1995) The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis, *Nucleic Acids Res.* 23, 4677-82.
- PABO, C. O. (1983) Designing proteins and peptides. *Nature* 301, 200.
- PACE, C.N, LAURENTS DV. (1989) A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry* 28, 2520-5.
- POPE, A. R., EMBLETON, M. J., MERNAUGH, R. (1996) Construction and use of antibody gene repertoires, in: *Antibody engineering: a practical approach* (McCafferty, J., Hoogenboom, H. R., Chiswell, D. J., ed.), 1-40, Oxford University Press, Oxford.

- RADMAN, M.** (1980) *Progress in environmental mutagenesis*, Alecivic, M. (Ed.), 121-130. Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- REESE, C. B. & RICHARD, C.** (1978) *Tetrahedron Lett.*, 45, 4443-4446.
- ROBERTS, R.W. & SZOSTAK, J.W.** (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 12297-12302.
- SACHS, L.** (1983) *Angewandte Statistik*, 127-138, Springer Verlag, Berlin.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G.T, MULLIS, K. B., ERLICH, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-91.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, A.9, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON A. R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- SCHEUERMANN, R. TAM, S., BURGERS, P. M. J., LU, C. & ECHOLS, H.** (1983) Identification of the epsilon-subunit of Escherichia coli DNA polymerase III holoenzyme as the dnaQ gene product: a fidelity subunit for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7085-7089.
- SCHMIDT-DANNERT, C., UMENO, D., ARNOLD, F. H.** (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* 18,750-3.
- SCHOMBURG, D.** (1990) Computer aided design: methods and applications, in *Advances in Protein Design* (Blöcker, H., Collins, J., Schmid, R. und Schomburg, D., ed.) 201, VCH Weinheim.
- SCHULTZ, S. C., RICHARDS, J. H.** (1986) Site-saturation studies of beta-lactamase: production and characterization of mutant beta-lactamases with all possible amino acid substitutions at residue 71, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1588-92.
- SKERRA, A.** (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135.
- SMITH, G. P.** (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the viron surface. *Science* 228, 1315.
- SONVEAUX, E.** (1994) Analysis and purification of synthetic oligonucleotides by high performance liquid chromatography, in *Methods in Molecular Biology* 26, (Agrawal, S. ed.) 1-68, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- SPROAT, B. & GAIT, M. J.** (1984) Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphotriester method, in: *Oligonucleotide synthesis - a practical approach* (Gait, M. J. ed.) 83-115, IRL Press, Oxford.
- STEMMER, W.P.C., CRAMERI, A., HA, K.D., BRENNAN, M.B., HEYNEKER, H.L.** (1995). Single step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers oligonucleotides. *Gene* 164, 49-53.

- STEMMER, W.P.C.** (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751.
- STEMMER, W.P.C.** (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391.
- TABOR, S., RICHARDSON, C. C.** (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**, 6339-43.
- THOMPSON, L. D. & WEBER, P. C.** (1993) Construction and expression of a synthetic streptavidin-encoding gene in *Escherichia coli*, *Gene* **136**, 243-246.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- ULMER, K. M.** (1983) Protein Engineering. *Science*, **219**, 666-671.
- VAN WEZENBEEK, P. M., HULSEBOS, T. J., SCHOENMAKERS, J. G** (1980) Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd. *Gene* **11**, 129-48.
- VIEIRA, J. & MESSING, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- VIRNEKÄS, B., GE, L., PLÜCKTHUN, A., SCHNEIDER, K. C., WELLNHOFER, G. & MORONEY, S. E.** (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucl. Acids Res.* **22**, 5600-5607.
- WATSON, J. D., CRICK, F. H. C** (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **171**, 737.
- WITTMANN, J.** (2002) Gezielte Modifikation sowie Analyse der Bindungseigenschaften des Histidin-Bindeproteins aus *Escherichia coli* und des GCN4-Leucinzipper aus *Saccharomyces cerevisiae*, Promotionsschrift, Universität Göttingen.
- WELLS, J. A., VASSER, M., POWERS, D. B.** (1985) Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* **34**, 315-23.
- WOLF, A., KAI, C. L., KIRSCH, J. F. & AMES, G. F.-L.** (1996) Ligand-dependent conformational plasticity of the periplasmic histidine-binding protein HisJ, *J. Biol. Chem.* **35**, 21243-21250.
- WOLF, A., SHAW, E. W., OH, B.-H., DE BONDT, H., JOSHI, A. K. & AMES, G. F.-L.** (1995) Structure/function analysis of the periplasmic histidine-binding protein, *J. Biol. Chem.* **270**, 16097-16106.
- YAO, N., TRAKHANOV, S. & QUIOCHO, F. A.** (1994) Refined 1.89 Å structure of the histidine-binding protein complexed with histidine and its relationship with many other active transport/chemosensory proteins, *Biochemistry* **33**, 4769-4779.

-
- ZEHL, A., STARKE, A., CECH, D., HARTSCH, T., MERKL, R., FRITZ, H.-J.** (1996) Efficient und flexible access to fully protectet trinucleotides suitable for DNA synthesis by automated phosphoramidite chemistry. *Chem. Commun.*, 2677-2678.
- ZHAO, H., GIVER, L., SHAO, Z., AFFHOLTER, J.A., ARNOLD, F.H.** (1998). Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nature Biotech.* **16**, 258-261.

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. H.-J. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas, seine stetige Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und für die Durchsicht des Manuskriptes der vorliegenden Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Schwienhorst danke ich für die Übernahme des Korreferates und die nützlichen Tipps zu meinem Projekt.

Auch den anderen „Chefs“: Susanne Behrens, Wilfried Kramer, Harald Kolmar danke für die Ratschläge, die zum Gelingen der Experimente beigetragen haben.

Dr. Brian Sproat danke ich für die Unterstützung bei der Synthese der Oligonukleotide.

Bei allen, die in die chemischen Synthesen des Linkers involviert waren, Prof. Sabine Müller, Dr. Rüdiger Welz, Dr. Richard Middleton, Dipl. Ing. Daniel Riestler, möchte ich mich für ihre Mühe und Geduld bedanken.

Den Massenspektroskopie- und NMR-Abteilungen der Organischen sowie Anorganischen Chemie NMR danke ich für die Aufnahme der Spektren.

Marita Kalck danke ich nicht nur für die Erledigung der administrativen Angelegenheiten, sondern auch für die Versorgung mit Büromaterial und Trostbonbons sowie für wertvolle Kleidungstipps.

Bei Olaf Waase und Patrick Regin bedanke ich mich für die Lösung technischer Probleme.

Rainer Merkl, Jarek Sobkowiak und Gerrit Hennecke danke ich für die Hilfe bei Soft- und Hardware Problemen.

Für die tägliche Unterstützung der Laborarbeit mit wichtigem „Kleinkram“ bedanke ich mich bei Marlies Bartels, Angelika Löfflers und Elisabeth Schafflik.

Meinen ehemaligen und derzeitigen Laborgenossen/innen (Christiane Meyer, Arne Zibat, Arne Müller, Roland Meister, Pia Meier, Corinna Capellaro, Julia Wittmann, Stina Schiller, Christiane Preiß) möchte ich mich herzlich für die Unterhaltung bedanken. Pia Meier danke ich für die Laborarbeiten zu meinem Projekt. Stina danke ich besonders für ihre Erzählgeschichten und die wöchentlichen Klo-Comics.

Dem Rest der Abteilung danke ich für die lustigen Momente beim Mittagessen, Kaffeetrinken, auf dem Flur, auf der Feuertreppe, im Seminarraum, etc.

Dem „alten“ und dem „neuen“ Kicker-Team sei Dank für die Dienstagabende im Crossroads.

Julia Wittmann, Maike Claussen und Harald Müller danke ich für die biologischen Exkursionen und für die Klärung der botanischen und zoologischen Fragen.

Meinen langjährigen Freunden, besonders Ewa, Leo, Roland, Tanja, Giorgio und Peter danke ich für jede Minute, die wir zusammen, beim Rotwein oder auch ohne, zusammen verbracht haben. Ewa danke ich für die gemeinsame Bewältigung der Sonntagsdepressionen. Peter möchte ich für „all die Jahre“ danken.

Basia, Waldek, Laura, Adam und Maja danke ich, dass sie mich in ihre Familie aufgenommen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Harald. Ich danke ihm für alles, besonders für sein Vertrauen, Verständnis, Toleranz und für die Nr. 1. Außerdem für die finanzielle Unterstützung und für die Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit.

Bei meiner Familie möchte ich mich dafür bedanken, dass sie immer zu mir gehalten hat und nie genauer nachgefragt hat, was ich im Labor mache. Meinen Eltern danke ich außerdem für die finanzielle Hilfe mit der sie mir jeder Zeit zur Seite stehen.

LEBENS LAUF

von Eva Kansy, geboren am 17 März 1970 in Malapane, Polen.

Schulbildung

1977–1985 Volksschule in Antonia, Polen
1985–1989 Allgemeinbildendes Gymnasium in Malapane, Polen
Abschluß: polnische Allgemeine Hochschulreife

Weiterer Lebensweg

06.1989 Einreise in die Bundesrepublik Deutschland als Spätaussiedlerin
11.1989–08.1990 Teilnahme am Deutsch-Intensivsprachkurs der GFBA e.V., Hannover;
Stipendiatin der Otto-Benecke-Stiftung
01.1991–12.1991 Sonderlehrgang zur Erlangung der deutschen Hochschulreife,
Göttingen.

Studium und Promotion

04.1992–02.1998 Studiengang Chemie (Diplom) an der Georg-August Universität in
Göttingen.

Prüfungen:

29.06.1995 Diplomvorprüfung
04.02.1998 Diplomprüfung

Diplomarbeit: am Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen unter Leitung von
Priv.-Doz. J. Rohr, Titel: „Mikrobielle Transformationen zur Untersuchung der
Substratflexibilität von Glycosyltransferasen und Oxidoreduktasen“.

Seit 1998 Promotion in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative
Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter
Leitung von Prof. Dr. H.-J. Fritz.