Exposition von Proteinen auf der Oberfläche von *Escherichia coli* Zellen: mechanistische Betrachtung und biotechnologische Anwendung

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Wentzel
aus Hamburg

2003

D7

Referent:	PD Dr. Harald Kolmar
Korreferent:	PD Dr. Wilfried Kramer
Tag der mündlichen Prüfung:	7. Mai 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung und Zielsetzung 1

1.1 Die prokaryotische Zelle 2

1.2 Die Bakterienhülle 3

1.3 Gram-negative Bakterien 3

1.3.1 Aufbau der Bakterienhülle Gram-negativer Bakterien 3

1.3.2 Proteine der äußeren Membran 4

1.3.3 Export von Proteinen durch die äußere Membran 5

1.3.3.1 Enterohaemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) 5

1.3.3.2 Das EHEC Intimin *EaeA* 6

1.4 Oberflächenpräsentation von Proteinen und biotechnologische Anwendungen 8

1.4.1 Präsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakteriophagen (*phage display*) 10

1.4.2 Zelloberflächenpräsentation auf der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*yeast surface display*) 11

1.4.3 Ausschließliche *in vitro* Methoden der Genotyp-Phänotyp-Kopplung (*ribosome display* und *mRNA display*) 12

1.4.4 Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakterienzellen (*bacterial surface display*) 13

1.4.4.1 Porin vermittelte Exposition auf der Zelloberfläche 13

1.4.4.2 Exposition auf Flagellen/Fimbrien 14

1.4.4.3 Durch Autotransport-Proteine vermittelte Oberflächenexposition 14

1.4.4.4 *Ice nucleation protein* (INP) vermittelte Präsentation 15

1.4.4.5 Zelloberflächenpräsentation auf Gram-positiven Bakterien 15

1.5 Zielsetzung 16

2. Ergebnisse 17

2.1 Aufbau eines EHEC-Intimin basierten Präsentationsverfahrens 19

2.1.1 Konstruktion des Plasmids pASKInt100 20

2.1.2 Oberflächenexposition von Fusionsproteinen über das EHEC Intimin *EaeA* auf Zellen von *E. coli* K-12 21

2.1.3 Einfluss der Intimin-Produktion auf das klonale Wachstum und das individuelle Überleben der Zellen 23

2.1.4 Bestimmung und Regulation der Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle 25

2.1.5 Regulation der Nettoakkumulation von *Intimin'*-Fusionsprotein in der äußeren Membran von *E. coli* 27

2.1.5.1 Konstruktion des Plasmids pREP4-supE 28

2.1.5.2 Graduelle Induktion der Genexpression und Oberflächenpräsentation des Intimins 29

2.2 Zelloberflächenpräsentation strukturell unterschiedlicher Domänen durch *EaeA'* 30

2.2.1 Präsentation von REI_v auf Zellen von *E. coli* 30

2.2.1.1 Das Bence-Jones Protein REI_v 31

2.2.1.2 Klonierung des *REI*$_v$ Gens in pASKInt100 31
2.2.1.3 Präsentation von *REI*$_v$ durch Fusion an *EaeA'* 32
2.2.2 Präsentation von Interleukin 4 auf Zellen von *E. coli* 34
2.2.2.1 *Homo sapiens* Interleukin 4 34
2.2.2.2 Klonierung des Interleukin 4 Gens in pASKInt100 35
2.2.2.3 Präsentation von *Il-4* durch Fusion an *EaeA'* 36
2.2.3 Vergleich der Präsentation von *EETI-CK*^{send}, *REI*$_v$ und *Il-4* über das *EaeA'*-basierte Zelloberflächenpräsentationssystem 37
2.2.4 Präsentation von Calmodulin auf Zellen von *E. coli* 71-18P' 39
2.2.4.1 Calmodulin 39
2.2.4.2 Klonierung des Calmodulin-Gens in pASKInt100 40
2.2.4.3 Präsentation von Calmodulin durch Fusion mit *EaeA'* 41
2.2.5 Präsentation von *Streptomyces clavuligerus* β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*) auf Zellen von *E. coli* 71-18P' 43
2.2.5.1 Das *Streptomyces clavuligerus* β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*) 43
2.2.5.2 Klonierung des *BLIP*-Gens in pASKInt100 44
2.2.5.3 Präsentation von *BLIP* durch Fusion mit *EaeA'* 44
2.2.6 Präsentation von *E. coli TEM-1* β-Laktamase auf Zellen von 71-18 46
2.2.6.1 Die *TEM-1* β-Laktamase von *Escherichia coli* 46
2.2.6.2 Klonierung des *TEM-1* β-Laktamase-Gens in pASKInt100 47
2.2.6.3 Präsentation von *TEM-1* β-Laktamase durch Fusion mit *EaeA'* 47
2.2.6.4 Zufallsmutagenese zur Erzeugung und Präsentation von β-Laktamase-Varianten 48
2.2.7 Zur biotechnologischen Anwendung: Anreicherung das Sendai-Epitop präsentierender Zellen aus einem Klongemisch 50

3. Diskussion 53

4. Material 61

4.1 Stämme von *Escherichia coli* 61

4.2 Plasmide 62

4.3 Oligodesoxyribonukleotide 63

4.3.1 Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung 63
4.3.2 Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation mittels PCR 64

4.4 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker 64

4.4.1 DNA-Längenstandards 64
4.4.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine 65

4.5 Chemikalien 65

4.6 Enzyme und Proteine 67

4.7 Sonstige Materialien und Geräte 67

4.8 Zusammensetzung der Nährmedien 70

4.9 Lösungen und Puffer 70

4.10 Verwendete Computer-Software 74

5. Methoden 75

5.1 Handhabung von Bakterien 75

5.1.1 Lagerung von *Escherichia coli* 75
5.1.2 Vermehrung von *Escherichia coli* 75
5.1.3 Transformation von *Escherichia coli* 75

5.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden 76

5.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen 76
5.2.2 Reinigung und Präzipitation von Nukleinsäuren 76
5.2.2.1 Alkoholische Präzipitation von DNA 76
5.2.2.2 Extraktion von DNA in wässrigen Lösungen mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform 76
5.2.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren 77
5.2.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen 77
5.2.5 Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten mit Hilfe des *NucleotraPCR-Kits* (Macherey & Nagel) 77
5.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA 78
5.2.7 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen 78

5.3 Enzymatische Manipulation von DNA 78

5.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in *Escherichia coli* 78
5.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 79
5.3.3 Auffüllen überhängender DNA-Enden 80
5.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten 80
5.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 80
5.3.6 DNA-Sequenzbestimmung 81

5.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden 82

5.4.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung 82
5.4.2 Präparation von Proteinen der äußeren Membran von *Escherichia coli*-Zellen 83
5.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 83
5.4.3.1 Herstellung 12,5 % iger (v/v) Polyacrylamidgele 83
5.4.3.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 84
5.4.3.3 Entwicklung eines SDS-Polyacrylamidgels 84
5.4.4 Biochemischer Nachweis von β-Laktamase 84
5.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (*Western Blot*) 84

5.5 Zellbiologische Arbeitsmethoden 85

5.5.1 Induktion der Expression in Bakterienkulturen 85
5.5.2 Fluoreszenzmarkierung von *Escherichia coli* Zellen 85
5.5.3 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung von *Escherichia coli* Zellen 86

6. Zusammenfassung 87

7. Literatur 89

8. Anhang ____ *107*

8.1 Abkürzungen ____ **107**

8.2 Sequenzen ____ **110**

8.2.1 pASKInt100-P ____ 110

8.2.2 pREP4-supE ____ 119

8.3 Danksagung ____ **121**

8.4 Lebenslauf ____ **122**

1. Einführung und Zielsetzung

Wasser in seiner flüssigen Form, eine Quelle freier Energie und organische Substanzen, die zur Selbst-Assemblierung befähigt waren, stellten drei wichtige Grundvoraussetzungen für die Entstehung des Lebens auf der Erde dar (Monnard & Deamer, 2002). Flüssiges Wasser ist essentiell für alles heutige Leben, und es ist kaum vorstellbar, dass Leben ohne dessen Anwesenheit existieren kann. Die Sonne oder chemische Reaktionen unter der Erde oder unter Wasser kommen als mögliche Lieferanten freier Energie in Betracht, je nachdem ob das Leben auf oder unterhalb der Erdoberfläche entstanden ist. Zur spontanen Assemblierung befähigte Substanzen waren die notwendigen Bausteine für die Synthese von Polymeren und die Entstehung von Grenzstrukturen.

Der Kompartimentierung, der Eingrenzung chemischer Verbindungen hoher Konzentration und komplexer Struktur in einem abgeschlossenen Raum, kommt bei der Entstehung zellulären Lebens neben der Anwesenheit auf Katalyse basierter Stoffwechsel- und Polymerisationsreaktionen und der Befähigung zur Selbstreproduktion eine Schlüsselstellung zu (Fleischaker, 1990, Deamer *et al.*, 1994, Lazcano, 1994a,b, Deamer, 1997, Tawfik & Griffiths, 1998, Luisi *et al.*, 1999, Szostak *et al.*, 2001). Die damit verbundene Einschränkung der Bewegungsfreiheit von Molekülen entgegen dem allgegenwärtigen Bestreben nach Erhöhung des Entropiegehalts ist in sogenannten Biomembranen verwirklicht (Abb. 1).

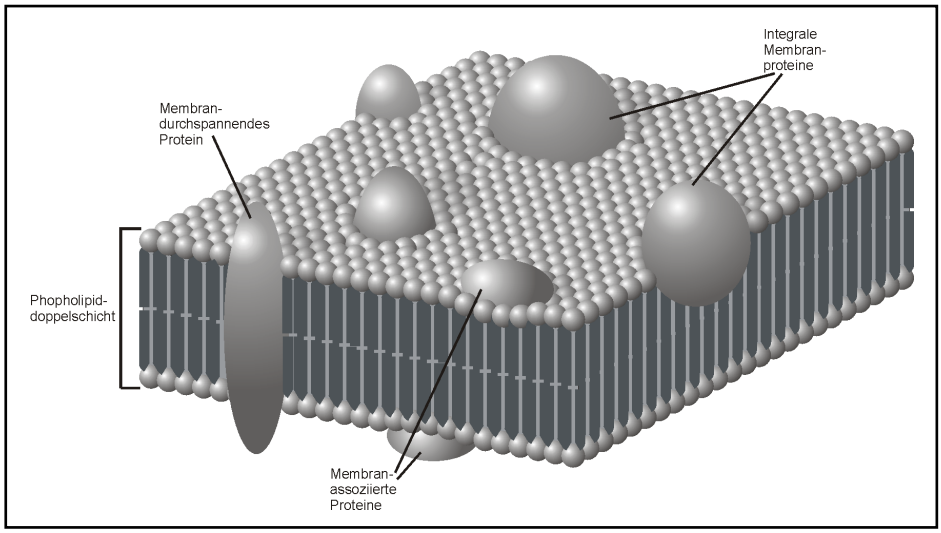


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Biomembran.

Biomembranen bestehen hauptsächlich aus einer von Phospholipiden gebildeten Doppelschicht mit hydrophiler Oberfläche und hydrophobem Inneren. Ihr Anteil an Proteinen kann in Abhängigkeit von der Funktion der Membran stark variieren. Man kann Membranproteine unterteilen in membranassoziierte und membrandurchspannende Einheiten, die nach dem von Singer und Nicholson vorgeschlagenen *„fluid-mosaic"* Modell in der Ebene der Membran frei beweglich sind (Singer & Nicholson, 1972, Saffman & Delbrück, 1975). Die Anwesenheit membrandurchspannender Proteine gewährleistet einen kontrollierten Stoffaustausch mit der umgebenden Umwelt zur Versorgung des eingeschlossenen, komplexen Netzwerkes katalytisch aktiver Komponenten im Inneren des

Kompartiments mit Substraten und Energie. Heute nehmen hochentwickelte Biomembranen selbst entscheidende Aufgaben in der Bindung und Transduktion von Energie sowie der Beherbergung komplexer Netzwerke katalytischer Reaktionen des zellulären Stoffwechsels wahr, als Ergebnis einer Entwicklung, die mit der Entstehung der Erde ihren Anfang nahm.

Das Alter der Erde wird auf etwa 4,5 Milliarden Jahre geschätzt und die Kondensation des ersten Ozeans liegt etwa 4,4 Milliarden Jahre zurück (Wilde *et al.*, 2001). Aus Daten der Bestimmung von Kohlenstoffisotopen in Schichten von Sedimentgestein mit einem Alter von ca. 3,8 Milliarden Jahren kann abgeleitet werden, dass das Leben auf dem Planeten und die biologische Fixierung von Kohlenstoffdioxid an diesem Ort und zu dieser Zeit seinen Anfang nahm (Mojzsis *et al.*, 1996, Rosing, 1999, Nisbet & Sleep, 2001, Ueno *et al.*, 2002). Die ältesten Stromatolite lassen sich auf eine Zeit vor 3,5 Milliarden Jahren datieren, erbaut aus Ablagerungen photosynthetisch aktiver Mikroorganismen, die den heutigen Prokaryonten ähnlich waren (Walter 1983, Nisbet & Sleep, 2001). Die Erfolgsgeschichte dieses Organismenreichs seit dieser Zeit sucht aus heutiger Sicht in der Geschichte der Natur ihresgleichen. Zu dem Zeitpunkt, als die erste eukaryotisch organisierte Zelle vor etwa 1,5 Milliarden Jahren entstand (Javaux *et al.*, 2001), war die Entwicklung der Prokaryoten schon so weit fortgeschritten, dass bereits eine Aufspaltung des Reichs Monera in die Unterreiche der Eubakterien und Archaeen stattgefunden hatte (Whittaker & Margulis, 1978). Zu diesem Zeitpunkt waren zahllose Arten prokaryotischer Mikroorganismen in unterschiedlichsten Habitaten der Erde angesiedelt.

1.1 Die prokaryotische Zelle

Prokaryoten unterscheiden sich von allen anderen Ausprägungen organismischen Lebens vor allem durch das Fehlen eines Zellkerns und anderer Membran-basierter Organellen. Auf der Grundlage vergleichender Sequenzanalyse ribosomaler mRNAs und der Gene ribosomaler Proteine kann eine Unterteilung des Reichs der Prokaryoten in die Zweige der Eubakterien und Archaeen getroffen werden (Woese *et al.*, 1990, Lecompte *et al.*, 2002). Die Taxonomie der Prokaryoten ist aufgrund immer neuer Sequenzinformation bis heute im Fluss, auch der ständig stattfindende laterale Gentransfer sogar zwischen nur wenig verwandten Arten erschwert häufig eine endgültige Zuordnung (Wolf *et al.*, 2002). Wissenschaftliche Klassifizierungen können deshalb meist nur auf der Grundlage phänotypischer Ausprägungen aber auch genetischer Analysen wie dem Vergleich ribosomaler RNAs vorgenommen werden. Zur Unterscheidung von Eubakterien und Archaeen kann zum Beispiel das Fehlen von Peptidoglycan in der Zellwand von Archaeen herangezogen werden. Weiter besitzen Archaeen verzweigte Lipidreste, die mit den Glyzerinmolekülen in der Membran verethert sind (Woese *et al.*, 1978). Die so beschaffenen Membranen ermöglichen diesen Organismen durch die auf diese Weise erreichte Stabilität ihrer Hüllen auch unter extremen Umweltbedingungen zu überleben.

Prokaryotische Zellen haben in der Regel ein Volumen zwischen 0,02 μm^3 bei einigen Mykoplasmen, den kleinsten bekannten Bakterien, und über 400 μm^3 (Koch, 1996). Ihre Zellmorphologie kann von Art zu Art von rund über stäbchenförmig bis hin zu spiralig oder Komma-förmig variieren. Auch können Bakterien in unterschiedlich angeordneten

Verbünden von mehreren Zellen auftreten. Zudem sind die Beweglichkeit durch Flagellen und das Vorhandensein von Fimbrien oder Pili sowie die Bildung von Glykokalyx oder Sporen wichtige bakterielle Klassifizierungsmerkmale (Schlegel, 1992). Die Varianz prokaryotischer Zellformen wird von der Vielfalt evolvierter Stoffwechselwege weit überschritten. Bakterien sind an allen Stoffkreisläufen maßgeblich beteiligt und werden vom Menschen seit jeher in den vielfältigsten Anwendungsbereichen kultiviert und eingesetzt (Schlegel, 1992).

1.2 Die Bakterienhülle

Ein sehr wichtiges Klassifizierungsmerkmal innerhalb des Bakterienreichs ist das Auftreten einer Zellwand sowie deren Beschaffenheit. Die Zellwand determiniert die Form einer Bakterienzelle entscheidend und bildet eine elastische Barriere gegenüber der die Zelle umgebenden Umwelt. Sie gewährleistet die Integrität der Zelle selbst bei großem osmotischen Stress und ist ferner Träger von Zellorganellen wie z.B. den Flagellen (Schlegel, 1992). Die Zellwand von Eubakterien besteht größtenteils aus Peptidoglycan, dessen Grundgerüst aus den Zuckern N-Acetylglukosamin (NAG) und N-Acetylmuraminsäure (NAM) besteht. Dieses Zucker-Rückgrat ist mit kurzen Aminosäureketten quervernetzt (Rogers, 1974, van Heijenoort, 2001). Die Anfärbung der Zellwand im Zuge der Gram-Färbung (Gram, 1884) macht diese Methode zu dem wichtigsten Klassifizierungsmittel innerhalb der Eubakterien. Man unterscheidet nach der Anfärbbarkeit der Zellwand mit Kristall-Violett oder Safranin Gram-positive von Gram-negativen Arten. Gram-positive Bakterien besitzen demnach eine wesentlich mächtigere Zellwand aus Peptidoglycan als Gram-negative Arten (Abbildung 2). Auch das Auftreten von Teichonsäure zur Verbindung mehrerer Peptidoglycanlagen ist charakteristisch für Gram-positive Zellen (Lambert *et al.*, 1977, Baddiley, 1989).

1.3 Gram-negative Bakterien

1.3.1 Aufbau der Bakterienhülle Gram-negativer Bakterien

Gram-negative Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* besitzen anstelle einer dicken Zellwand eine zweite, äußere Zellmembran. Die Hülle dieser Arten zeigt somit einen deutlich komplexeren Aufbau als die Gram-positiver Bakterien (Abb. 2). Außerhalb der das Zellinnere begrenzenden Zytoplasmamembran erstreckt sich eine offene Struktur, der periplasmatische Raum. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich eine dünne Lage aus Peptidoglycan, der Murein-Sacculus, gefolgt von der in ihrer Ausgestaltung sich von der Zytoplasmamembran deutlich unterscheidenden äußeren Membran. Der Murein-Sacculus ist eine hochmolekulare Struktur, die durch Transpeptidierung und Transglycosylierung von Murein (Peptidoglycan) entsteht (Holtje, 1998). Mit dieser Schicht kovalent verbunden ist das Braun'sche Lipoprotein, welches diese Schicht mit der äußeren Membran fest verbindet (Braun & Rehn, 1969, Braun, 1975). Die beiden Seiten der äußeren Membran sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Neben Lipiden und Proteinen, welche zum Teil die Membran durchspannen, befindet sich auf der Außenseite ein von Art zu Art unterschiedlich großer Anteil verschiedener Lipopolysaccharide, welche das O-Antigen beinhalten, das im Falle

einer Infektion mit einem Gram-negativen Bakterium Hauptangriffspunkt für die Immunantwort ist (Reeves, 1995).

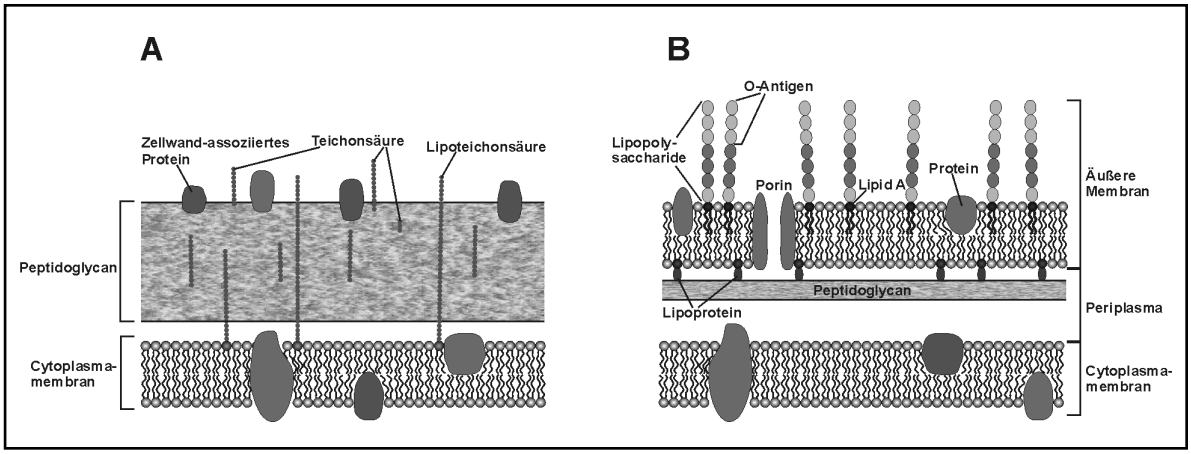


Abbildung 2: Schematische Darstellung prokaryotischer Zellhüllen. (A) Gram-positive Bakterien, (B) Gram-negative Bakterien

1.3.2 Proteine der äußeren Membran

Ein Anteil von etwa 50 % der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien besteht aus Protein, entweder in Form von Lipoproteinen, die aminoterminal mit den Membranlipiden verknüpft sind, oder als integrale Membranproteine, die die äußere Membran durchspannen. In *E. coli* wurden bisher mehr als ein Dutzend unterschiedliche Lipoproteine identifiziert (Blattner *et al.*, 1997). Die Anzahl unterschiedlicher Transmembranproteine übersteigt diese Zahl noch. Einige dieser integralen Proteine wie *OmpA* (Chai & Foulds, 1977) und die wichtigsten Porine (Nikaido & Vaara, 1985, Schirmer, 1998) werden in hoher Kopienzahl auf der Oberfläche exponiert und sorgen so für eine begrenzte Durchlässigkeit der Membran. Die Synthese weiterer Membranproteine kann unter bestimmten Bedingungen stark induziert werden. Dazu zählen die Porine *PhoE* (Overbeeke & Lugtenberg, 1980) und *LamB* Luckey & Nikaido, 1980a,b), die *TonB* abhängigen Rezeptorproteine *FhuA* (Coulton *et al.*, 1986) und *FepA* (Pugsley & Reeves, 1976, 1977), die Komponenten vielfältiger Proteinexport Systeme, den sogenannten Autotransportern (Henderson & Nataro, 2001), die Sekretionssyteme I, II und III [ABC Transporter (Fath & Kolter, 1993), Komponenten des sognannten *general secretion pathway* (Pugsley, 1993, Sandkvist, 2001) und der Typ III Sekretionsapparat (Galan & Collmer, 1999, Hueck, 1998)], Proteine, die an der Biogenese von Flagellen und Pili beteiligt sind und Enzyme wie die *OmpT* Protease (Mangel *et al.*, 1994) und die Phospholipase A (Dekker, 2000). Viele Proteine der äußeren Membran wurden zunächst aufgrund ihrer Interaktion mit Bakteriophagen oder Bakteriozinen beschrieben, noch bevor ihre natürliche Funktion bekannt wurde. So wurde *FhuA* alias *TonA* als für die Infektion mit dem Phagen T1 notwendig beschrieben (T-one protein A), das Maltoporin *LamB* trägt seine Rezeptoreigenschaft für den Phagen λ noch heute im Namen (Koebnik *et al.*, 2000).

In den vergangenen Jahren wurden mehr und mehr Strukturen von Proteinen der äußeren Membran aufgeklärt (u. a. *OmpA*: Pautsch & Schulz, 1998, *OmpX*: Vogt & Schulz 1999, *OmpF*: Cowan *et al.*, 1992, *OMPLA*: Snijder *et al.*, 1999, *ScrY*: Forst *et al.*, 1998, *LamB*: Schirmer *et al.*, 1995, *FhuA*: Ferguson *et al.*, 1998, Locher *et al.*, 1998, *FepA*: Buchanan *et al.*,

1999, *OmpT*: Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001, *OpcA*: Prince *et al.*, 2002). Demnach besteht die Faltung aller bekannten, die äußere Membran durchspannenden Proteine aus β-Fass Strukturen, während α-Helix-Bündel Strukturen ausschließlich in Proteinen der Zytoplasmamembran vorkommen. Allgemein wird angenommen, dass dieser Befund auf die Biogenese der Proteine der äußeren Membran zurückzuführen ist. Deren Polypeptidketten müssen die Zytoplasmamembran durchqueren und würden dort inserieren, wenn sie zu hydrophobe Eigenschaften aufwiesen (Koebnik *et al.*, 2000).

1.3.3 Export von Proteinen durch die äußere Membran

Alle Proteine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien werden im Zytoplasma synthetisiert. Der Weg, auf dem diese Proteine in die äußere Membran gelangen, ist im Vergleich zur mittlerweile gut verstandenen Translokation durch und Integration in die Zytoplasmamembran bis heute nur wenig verstanden. Insbesondere die Frage, wie bei Proteinen der äußeren Membran, die ihrerseits Domänen nach außen exponieren, diese durch die Membran transloziert werden, ist nur wenig untersucht.

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Frage des Translokationsmechnismus durch die äußere Membran Gram-negativer Bakterien am Beispiel des Intiminproteins aus pathogenen *Escherichia coli* paradigmatisch zu beleuchten und die daraus gewonnenen Erkenntnisse in biotechnologische Anwendungen umzusetzen.

1.3.3.1 Enterohaemorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)

Escherichia coli ist das wohl am besten untersuchte Gram-negative Bakterium. Neben seiner natürlichen endosymbiontischen Funktion beim Menschen besitzt es ein vielfältiges Anwendungsspektrum in der molekular- und mikrobiologischen sowie medizinischen Forschung. Während die hier vorkommenden und verwendeten Stämme von *E. coli* keine krankheitserregenden Eigenschaften aufweisen, gibt es solche, deren Infektion schwere pathologische Effekte hervorrufen kann. Man unterscheidet hier nach ihren Eigenschaften und hevorgerufenen Krankheitsbildern u.a. EPEC (*enteropathogenic E. coli*), EHEC (*enterohemorhagic E. coli*), ETEC (*enterotoxigenic E. coli*), EAEC (*enteroaggregative E. coli*), DAEC (*diffuse adherent E. coli*), EIEC (*enteroinvasive E. coli*), CDEC (*cell-detaching E. coli*) [alle Auslöser von Durchfallerkrankungen, Nataro & Kaper, 1998] sowie auch NMEC (*neonatal meningitis E. coli*, Bingen *et al.*, 1997) und UPEC (*uropathogenic E. coli*, Foxman *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000).

Enterohaemorrhagische *E. coli* (EHEC) sind eine der wichtigsten Arten in der Nahrung vorkommender Krankheitserreger mit sporadischer aber auch teilweise epidemischer Verbreitung und mindestens 20.000 Infektionen jährlich allein in den USA (Nataro & Kaper, 1998). Das Bakterium besiedelt und schädigt im Verlauf der Infektion das Dickdarmepithel mit systemischem Krankheitsbild wie dem einer hämolytischen Urämie (HUS), hämolytischer Anämie, Thrombozytopänie und Nierenversagen (Karmali, 1989). Der am häufigsten auftretende Serotyp O157:H7 wird allgemein als der virulenteste angesehen.

Der initiale Schritt der EHEC Infektion ist die Anheftung des Pathogens an das Darmepithel. Im weiteren Verlauf exprimiert das Bakterium Shiga-ähnliche Toxine (Stx-

Toxine), welche die genannten Krankheitsbilder hervorrufen. Die Anheftung von EHEC Zellen an das Epithel geht mit drastischen Veränderungen der Morphologie der Wirtszellen einher. Die Mikrovilli werden lokal zurückgebildet und es kommt zur Ausbildung filamentösen Actins, dessen Polymer einen quasi Sockel unter der Bakterienzelle formt, auf diesem die Zelle emporgehoben wird. Die so gebildete Struktur wird als A/E Lesion bezeichnet (*attaching and effacing lesion*; Staley *et al.*, 1969, Ulshen & Rollo, 1980, Moon *et al.*, 1983) und wird auch von anderen Pathogenen hervorgerufen (EPEC: Frankel *et al.*, 1998; *Citrobacter rodentium*: Schauer & Falkow, 1993). Die Bildung der A/E Lesion ist das Ergebnis einer komplexen Interaktion zwischen dem Bakterium und der befallenen Zelle. Wie viele andere pathogene Bakterien kodieren EHEC für eine Typ III Sekretions-Maschinerie, mit der eine Reihe bakterieller Effektormoleküle in letztere eingeschleust werden und dort eine spezifische Antwort auslösen (Hueck, 1998). Es wird von einem Drei-Schritt-Mechanismus ausgegangen (Donnenberg & Kaper, 1992): Nach einer lockeren Anheftung des Bakteriums werden über die Typ III Maschinerie Effektormoleküle in die Wirtszelle injiziert, und auf diesem Wege wird dort die soeben beschriebene Veränderung der Epithelzelle hervorgerufen (Donnenberg & Kaper, 1991, Foubister *et al.*, 1994a,b, Ismaili *et al.*, 1995, Kenny & Finlay 1995, Jarvis & Kaper 1996, Wolff *et al.*, 1998). Letztendlich kommt es zur dichten und festen Anheftung des Pathogens an die Epithelzellmembran (Knutton *et al.*, 1989). Sowohl die sezernierten Effektormoleküle als auch die Proteine des Typ III Sekretionsapparates sind auf einer 35 kb umfassenden Pathogenitätsinsel zusammengefasst (Jarvis *et al.*, 1995, Kenny & Finlay, 1995, McDaniel & Kaper, 1997, Perna *et al.*, 1998).

1.3.3.2 Das EHEC Intimin *EaeA*

Ebenfalls ausgehend von dieser Pathogenitätsinsel wird das für die Virulenz der EHEC Zellen notwendige äußere Membranprotein Intimin, kodiert durch das *eaeA* Gen, exprimiert (Jerse *et al.*, 1990, Beebakhee *et al.*, 1992, Yu & Kaper, 1992, Tzipori *et al.*, 1995). EHEC Mutanten, die kein Intimin exprimieren, sind nach wie vor in der Lage, in den Stoffwechsel der Wirtszelle einzugreifen. Die Fähigkeit der festen Anheftung an das Epithel und die Auslösung der Actin-Kondensation haben diese Zellen jedoch verloren (Donnenberg & Kaper, 1991, Rosenshine *et al.*, 1992, 1996a,b, Louie *et al.* 1993). Die feste Anheftung der EPEC Bakterienzellen an die Wirtszelle basiert auf der Interaktion von Intimin mit dem *Tir* (*translocated intimin receptor*) Protein. *Tir* ist wie Intimin ein bakteriell kodiertes Protein, welches nach dem initialen Kontakt zwischen Pathogen und Wirt auf dem Wege der Typ III Sekretion transloziert wird (Kenny *et al.*, 1997). In EHEC wird dem *EspE* Protein eine mit dem *Tir* aus EPEC vergleichbare Rolle zugesprochen. In den Wirtszellen vorgelegtes *Tir* führt zur festen Anhefung von Zellen sowohl von EPEC als auch von EHEC (Rosenshine *et al.*, 1996b, Liu *et al.*, 1999a). *Tir* ist sowohl carboxyterminal als auch aminoterminal in der Wirtsmembran verankert (Hartland *et al.*, 1999).

Die Struktur von Iniminen ist am besten am Beispiel der EPEC Intimins untersucht. Intimin besitzt eine aminoterminale bakterielle Membrananker domäne und carboxyterminale Domänen, welche für dessen Bindung von *Tir* nötig sind (Liu *et al.*, 1999b). Im Jahr 2000 ist es Strynadka und Mitarbeiter gelungen, die Struktur des Intimin-*Tir* Komplexes zu lösen (Luo *et al.*, 2000).

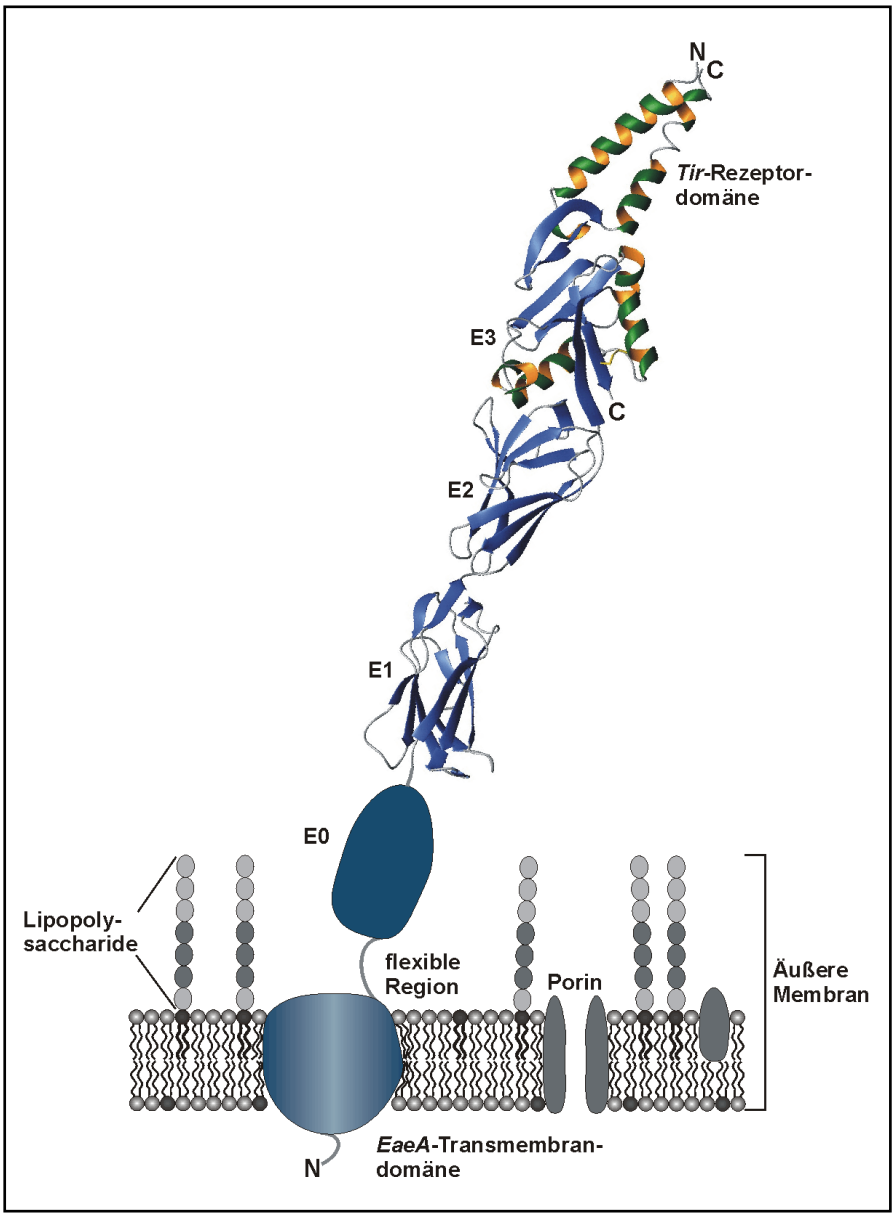


Abbildung 3: Membraninsertion des *EaeA*-Proteins (Intimin) enteropathogener *Escherichia coli* (EPEC) und dessen Interaktion mit dem relevanten Bereich des *Tir*-Rezeptors. Dargestellt ist die äußere Bakterienmembran. Die vier extrazellulären Domänen E0, E1, E2 und E3 sind über eine flexible Region mit der aminoterminalen Transmembrandomäne verbunden, die in der äußeren Membran inseriert (Luo *et al.*, 2000). Die schematische Darstellung der Struktur der Domänen E1, E2 und E3 sowie des *Tir*-Bereichs wurde erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1F02, Luo *et al.*, 2000.

Die Struktur bei 1,9 Å Auflösung umfasst die drei carboxyterminalen Domänen des Moleküls (E1: Aminosäuren #658 bis #751, E2: Aminosäuren #752 bis #841, E3: Aminosäuren #842 bis #939). Die Domänen E1 und E2 zeigen eine Immunglobulin-ähnliche Struktur ausschließlich aus β-Strängen bestehend, E3 weist eine Typ C Lektin-ähnliche Struktur auf. Von den Autoren wird auf der Basis von Sequenzvergleichen und der bekannten Struktur des β_1 Integrin bindenden Invasins aus *Yersinia pseudotuberculosis* (Hamburger *et al.*, 1999) eine weitere Immunglobulin-ähnliche Domäne aminoterminal der drei benannten postuliert. Diese Domäne E0 umfasst demnach die Aminosäuren #559 bis

#657, die Aminosäuren #1 bis #539 bilden den Membrananker, welcher 33 % Sequenzidentität zu den aminoterminalen 489 Aminosäuren von Invasin aufweist. Die vier carboxyterminalen Domänen bilden nach den Strukturen von Invasin und Intimin eine gestreckte, relativ unflexible Anordnung. Den Übergang zur Transmembrandomäne bildet ein acht Aminosäuren umfassendes Segment flankiert von zwei konservierten Glycin-Resten. Diese Region bildet somit möglicherweise einen flexiblen Übergang zwischen der Transmembrandomäne und der gestreckten Anordnung der extrazellulären Domänen E0 bis E3, der mechanische Bewegung der letzteren zulässt (Luo *et al.*, 2000).

1.4 Oberflächenpräsentation von Proteinen und biotechnologische Anwendungen

Ein Hauptziel der Molekularen Biotechnologie ist es, Proteine mit spezifischer und auf das jeweilige Bedürfnis abgestimmter Funktion zu erzeugen, die dann ihren Einsatz beispielsweise als Wirkstoffe in Medikamenten gegen Krankheiten des Menschen oder als Biokatalysatoren unterschiedlichster Funktion finden. Trotz der großen Diversität heute bekannter und charakterisierter Proteine können diese für eine Vielzahl an Anwendungen nicht unmittelbar genutzt werden. Grund dafür ist zum einen, dass Proteine mit einer relativen Molmasse von über 10.000 bis heute nicht auf chemischem Wege synthetisiert werden können. Desweiteren sind evolutiv entstandene Proteine auf maximale Funktion in zellulärer oder physiologischer Umgebung optimiert, was unter Bedingungen, in denen sie als Reagenzien eingesetzt würden, zu einem Funktionsverlust führte. Auch die Spezifität zu einem bestimmten Substrat, mit welcher evolutiv entstandene Proteine in der Regel ausgestattet sind, ist hoch und zumeist auf die Interaktion mit einem definierten zweiten Protein oder die Katalyse einer einzigen chemischen Reaktion beschränkt. Diese hohe Spezifität zeigt sich bereits daran, dass die Effizienz des Umsatzes stark absinkt, wenn einem Enzym homologe anstelle identischer Substrate angeboten werden. Besonders aufgrund dieser Spezifität ist die Optimierung eines Proteins auf einen bestimmten Verwendungszweck hin häufig indiziert.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden besteht heutzutage die Möglichkeit, ausgehend von natürlichen Proteinen solche zu generieren, die einer bestimmten, gewünschten Funktion genügen. Dabei wird versucht, durch Modifikation von Proteinen eine bestimmte Funktionalität zu verändern, eine bereits vorhandene Funktionalität den jeweiligen Bedürfnissen anzupassen oder gänzlich neuartige Proteineigenschaften zu erzeugen. Disziplinen die diese Ziele verfolgen sind das rationale *Protein Design* oder *Engineering*, das *de novo Protein Design* und die molekulare Evolution.

Ein leistungsfähiger und heutzutage sich immer mehr durchsetzender Ansatz der Erzeugung von Proteinen mit vorgegebener, neuer Funktion beruht auf der Anwendung evolutiver Methoden. Mittels dieser ist es möglich, basierend auf der Einführung der gewünschten funktionellen Eigenschaften durch zufällige Modifikation innerhalb eines Proteins, gefolgt von Detektion und Selektion eine angestrebte, neue Funktion zu erhalten. Auf diesem Weg werden Probleme, wie sie im rationalen *Protein Design* auftreten, umgangen. Dort besteht das Hauptproblem darin, dass der komplexe Vorgang der Proteinfaltung nach wie vor nur wenig verstanden ist.

Experimente zur molekularen Evolution von Nukleinsäuren gehen auf *in vitro* Untersuchungen zur Replikation des Phagen Qβ zurück (Mills *et al.*, 1967). Durch *in vivo* durchgeführte evolutive Modifikation von katalytisch aktiven RNA-Molekülen konnte eine Veränderung der katalytischen Aktivität und Substratspezifität der Ribozyme bewirkt werden (Chapman und Szostak, 1994). Auch Aptamere, RNA-Moleküle mit einer definierten Bindungsspezifität, konnten angereichert werden (Ellington und Szostak, 1990, Sassanfar und Szostak, 1993, Lorsch und Szostak, 1994a,b, Ekland *et al.*, 1995). Der größte Vorteil bei der Veränderung und Selektion von Nukleinsäure-Molekülen bestimmter Aktivität ist, dass im amplifizierten Molekül selbst die genetische Information innewohnt, welche nach jedem Selektionsvorgang, reverser Transkription und Amplifikation mittels PCR sofort entschlüsselbar ist. Wird hingegen ein Protein molekular evolviert, so kann dies nur durch physikalische Kopplung des selektierbaren Phänotyps an den jeweiligen Genotyp geschehen.

Es gibt heutzutage vielgestaltige Verfahren, um den Phänotyp eines Proteins mit der der Funktion zugrundeliegenden genetischen Information zu verbinden (Abb. 4). Namentlich sind dies die unterschiedlichen Methoden der Präsentation auf Bakteriophagen (*phage display*), auf der Oberfläche von Bakterienzellen (*bacterial surface display*) und Hefezellen (*yeast surface display*) sowie eine Reihe reiner *in vitro* Verfahren, bei denen die Kopplung über die Bildung von mRNA-Proteinkonjugaten ternär über das translatierende Ribosom oder kovalent über eine Puromyzin-Gruppe erfolgt.

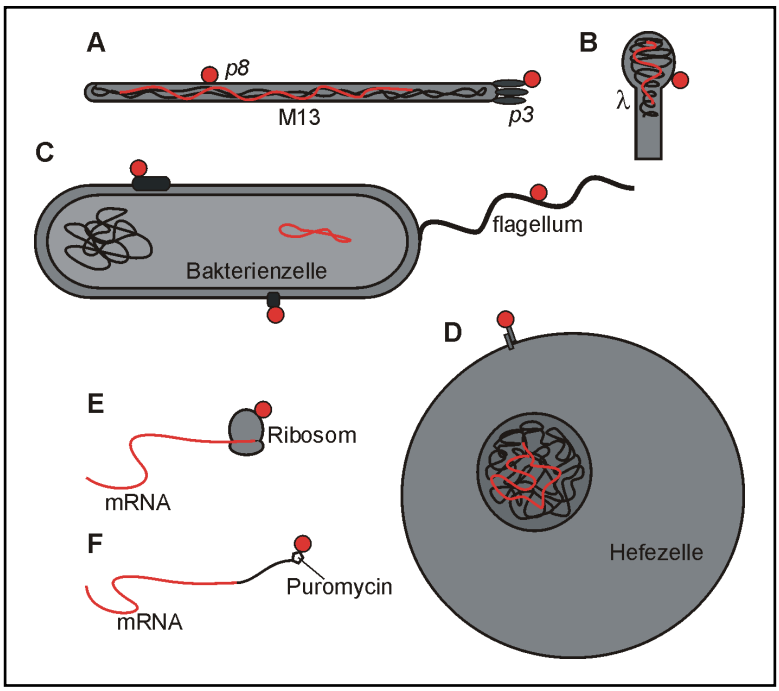


Abbildung 4: Schematische Darstellung unterschiedlicher Verfahren zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung. (A) M13 *phage display* über *p3* oder *p8*, (B) Lambda (λ) *phage display*, (C) *bacterial surface display* über Zelloberflächenproteine (unterschiedliche Verfahren) oder Flagellenproteine, (D) *yeast surface display*, (E) *ribosome display*, (F) *mRNA display*. Das präsentierte Protein und die zugrundeliegende Nukleinsäure sind in rot dargestellt.

1.4.1 Präsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakteriophagen (*phage display*)

Die zur Zeit am weitesten verbreitete Methode, eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung zu gewährleisten, ist mit der Technik des *phage display*s gegeben (Clackson & Wells, 1994, Winter *et al.*, 1994). Hierbei werden zur molekularen Evolution die betreffenden Proteine, welche bestimmte Bindungseigenschaften besitzen oder erlangen sollen, auf der Oberfläche vorzugsweise filamentöser *E. coli* Phagen wie M13, f1 oder fd präsentiert. Diese Phagenklasse eignet sich deshalb so gut für diese Art der Anwendung, weil sie ein relativ kleines Genom besitzt, in dem es leicht möglich ist, aufgrund des filamentösen Baus der Phagen Repertoires von Proteinen mit einer langen kodierenden DNA-Sequenz zu konstruieren. Außerdem sind ihre viralen Partikel (Virionen) relativ stabil, und sie können zu Titern bis zu 10^{12}/ml akkumulieren, so dass die Möglichkeit besteht, von einem sehr großen Pool an varianten Peptiden oder Proteinen auszugehen (Hoess *et al.*, 1993). Die zufallsmäßige Erzeugung eines Repertoires von Proteinvarianten und deren Durchmusterung auf die angestrebte Funktion erfordert ein Maximum an möglichen Varianten als Ausgangsbasis, was durch das *phage display* auf filamentösen Phagen gewährleistet ist. Die Größe der initialen Bibliothek ist hier wie auch beim *bacterial surface display* lediglich durch die Transformationseffizienz von *E. coli* Zellen beschränkt. *Phage display* ist demnach eine gemischte *in vivo/in vitro* Methode zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung.

Die Präsentation von varianten Proteinen auf der Oberfläche filamentöser Phagen erfolgt zum Beispiel durch Kopplung des betreffenden varianten Gens an das für das Phagenprotein *p3* kodierende Gen 3 und Produktion des Fusionsproteins. Die Phagen behalten dabei ihre Infektiösität (Smith, 1985). Die Anreicherung von Klonen mit erhöhter Affinität aus einer Bibliothek an M13 Phagen erfolgt beispielsweise durch sogenanntes *biopanning*, wobei eine Bindung an einer Matrix immobilisierter oder markierter Liganden (z.B. biotinyliert) erfolgt. In jeder Runde des *biopanning* können Binder von Nicht-Bindern mit einer Selektivität von bis zu 10^3 angereichert werden. Die weitere Anreicherung besonders seltener Klone wird durch iterative Runden des *panning*s erreicht (Bass *et al.*, 1990, McCafferty *et al.*, 1990, 1994, Garrard *et al.*, 1991). Auf diesem Wege konnten Immunglobulinfragmente (scF_v, F_{ab}) mit Bindungskonstanten von 10^5-10^7 M^{-1} aus Phagenbibliotheken isoliert werden (Griffiths *et al.*, 1993, 1994, Marks *et al.*, 1993). Auch die Affinitätsreifung der natürlichen Immunantwort konnte *in vitro* durch ungerichtete Mutagenese der Phagen nachgestellt werden (Hawkins *et al.*, 1992). Durch Nutzung des Zwei-Ketten-Charakters von Immunglobulinen in sogenannten kombinatorischen Infekten konnte die aufgrund der Transformationseffizienz der primären Wirtszellen begrenzte Repertoiregröße weiter erhöht werden (Waterhouse *et al.*, 1993). Wirkliche evolutive Bedingungen wurden durch direkte Kopplung der Ligandenbindung an einen Selektionsvorteil, die Infektiösität der Phagenpartikel, erreicht. Durch Fragmentierung des *p3*-Proteins in eine amino- und eine carboxyterminale Domäne und die Fusion der zu untersuchenden Interaktionspartner an jeweils eine der beiden *p3*-Domänen, vermittelt eine Assoziation die Rekonstruktion des vollständigen *p3*-Proteins und damit das Wiedererlangen der Infektiösität (Duenas & Borrebaeck, 1994, Gramatikoff *et al.*, 1994, Krebber *et al.*, 1995). Neben der Präsentation über *p3* ist auch die Präsentation über das Hüllprotein *p8* des Phagen M13 dokumentiert (Markland *et al.*, 1991). Die Fusion dieses häufigsten Proteins von M13

mit einem zu präsentierenden Protein, in angegebenem Fall dem menschlichen Wachstumshormon (hGH), führt zu einer vielfachen Exposition des Proteins, verbunden mit Aviditätseffekten, die zu Bindemoleküle mit meist nur sehr schwachen Bindeeigenschaften führen (z.B. K(d) >1 μM, Sidhu *et al.*, 2000).

Neben den filametösen Phagen wurden auch λ-Phagen zur Oberflächenpräsentation von Proteinen verwendet (Sternberg und Hoess, 1995). Durch die Verwendung des lytischen Phagen Lambda ist anders als beim auf M13 basierten Verfahren die dort nötige Sekretion über die Bakterienmembran nicht nötig, eine Einschränkung, die für Zell-basierte Verfahren in jedem Fall gegeben ist.

1.4.2 Zelloberflächenpräsentation auf der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*yeast surface display*)

Neben den anderen Methoden zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung kann auch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* für die Isolierung von Proteinen mit verbesserten Bindeeigenschaften verwendet werden (Shusta *et al.*, 1999). In diesem Fall ist es möglich, auch eukaryotische Proteine in ihrer nativen, funktionalen Konformation auf der Oberfläche von Hefezellen zu präsentieren (Boder & Wittrup, 1997). Die Proteine werden mit dem Carboxyterminus der *Aga2* Untereinheit des α-Agglutinins der Hefe fusioniert, dem Rezeptor für die Adhäsion der Zellen bei der Kreuzung. Die *Aga2*-Fusion wird über Disulfidbrücken mit dem *Aga1*-Peptid kovalent verknüpft, welches wiederum kovalent mit der Zellwand der Hefezelle über Phosphatidyl-Inositol-Glykan verbunden ist. Auf diese Weise präsentiert jede Zelle einer molekularen DNA-Bibliothek das korrespondierende Protein auf der Zelloberfläche, fest verankert in der Zellwand. Dort besteht die Möglichkeit der Funktionsabfrage beispielsweise bezüglich der Liganden-Bindung. Ein Nachweis kann hier durch Durchflusszytometrie erfolgen, eine Anreicherung durch Fluoreszenz-aktivierte oder andere Methoden der Zellsortierung bewerkstelligt werden.

Anfänglich wurde das Verfahren zur Selektion bezüglich der Ligandenbindung verbesserter, gegen Fluorescein gerichteten Ein-Ketten F_v Antikörperfragmenten aus zufallsmäßig erzeugten molekularen Bibliotheken verwendet. Nach Einführung zufälliger Mutationen in einem Mutatorstamm von *E. coli* konnten Varianten mit um das Dreifache verringerter Dissoziiationsrate angereichert werden (Boder & Wittrup, 1997). In einem anderen Ansatz konnten scF_v Varianten mit erhöhter Affinität zu einer löslichen T-Zell Rezeptor-Domäne erhalten werden (Kieke *et al.*, 1997). Mit diesem Verfahren sollte es möglich sein, eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren antagonistisch zu adressieren (Cereghino & Cregg, 1999). Das Hauptproblem eines auf der Hefe beruhenden Verfahrens zur Selektion von Proteinvarianten liegt in der Limitierung der Größe zu erzeugender Bibliotheken. Es ist bis heute nicht gelungen, die Transformationseffizienz der Zellen bis in einen Bereich zu steigern, der die Erzeugung komplexer Repertoires, die mehr als einige Millionen individuelle Klone umfassen, erlaubt.

1.4.3 Ausschließliche *in vitro* Methoden der Genotyp-Phänotyp-Kopplung (*ribosome display* und *mRNA display*)

Von einer Limitierung aufgrund zellulärer Transformationseffizienzen frei sind Methoden zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung *in vitro*, zu denen unter anderem das *ribosome display* und das *mRNA display* zählen. Mit ihnen ist es möglich, Bibliotheken mit bis zu 10^{14} Varianten zu erzeugen und zu handhaben. Außerdem lassen diese Ansätze den Zusatz bestimmter Reagenzien während eines Selektionsexperimentes zu, was in Zell-basierten Verfahren nur schwer möglich ist. Technologien zur *in vitro* Selektion lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe umfasst solche Ansätze, die auf der Translation und Selektion in einer Wasser-in-Öl Emulsion, also auf Mikrokompartimentierung beruhen (Tawfik & Griffiths, 1998, Doi & Yanagawa, 1999, Griffiths & Tawfik, 2000, Ghadessy *et al.*, 2001), der Imitierung lebender Zellen. Die zweite Gruppe sind die *in vitro* Präsentationstechnologien, die eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung durch physikalische Verknüpfung von mRNA und der auf deren Grundlage entstehenden Polypeptidkette während der Translation bewerkstelligt. Die beiden bekanntesten Verfahren, das *ribosome display* und das *mRNA display* sollen im Folgenden näher erläutert werden. Das *ribosome display* wurde zunächst für die Selektion von Peptiden entwickelt (Mattheakis *et al.*, 1994). Es folgte eine Ausweitung des Anwendungsspektrums auf gefaltete Proteine (Hanes & Plückthun, 1997, He & Taussig, 1997). Die Methode beruht auf der Bildung eines ternären Komplexes aus einer mRNA, dem Ribosom und der durch die Translation der erstgenannten entstandenen Polypeptidkette. Das erzeugte Fusionsprotein ist mit einem carboxyterminalen Linkerpeptid gekoppelt, das im Ribosom verbleibt, während die zu präsentierende Domäne in der Lage ist zu falten. Die translatierte mRNA besitzt kein Stop-Kodon, so dass diese nicht von dem Ribosom freigesetzt werden kann. Eine hohe Magnesiumkonzentration und geringe Temperaturen stabilisieren den ternären Komplex weiter. Das auf diesem Wege mit seiner kodierenden mRNA verbundene Protein kann direkt für die Selektion auf gewünschte Eigenschaften eingesetzt werden (Amstutz *et al.*, 2001). Das *mRNA display* ist konzeptionell mit dem *ribosome display* verwandt und wird auch als *„mRNA-protein fusions"* (Roberts & Szostak, 1997) oder *„in vitro virus"* (Nemoto *et al.*, 1997) bezeichnet. Dieses Verfahren beruht auf der kovalenten Verknüpfung der mRNA mit der durch Translation entstandenen Peptidkette. Die mRNA wird kovalent mit einer kurzen Linker-DNA verbunden, die eine Puromyzin-Gruppe enthält. Wenn im Rahmen der *in vitro* Translation das Ribosom den Übergang von der mRNA zur DNA erreicht, hält es inne, während die Puromyzin-Gruppe in der Peptidyltransferase-Stelle des Ribosoms bindet und dort mit der Peptidkette kovalent verknüpft wird. Das mRNA-Protein Konstrukt wird isoliert und vom Ribosom befreit. An dieser Stelle wird meist eine reverse Transkription angeschlossen, um einen cDNA-Strang als Komplement zur mRNA zu generieren, bevor das RNA-DNA Hybrid für eine Selektion Verwendung findet (Roberts & Szostak, 1997). Wie auch das *ribosome display* wurde das *mRNA display* zunächst im Rahmen der Selektion von kurzen Peptiden eingesetzt, in optimierter Form aber schon bald auch für Proteine (Cho *et al.*, 2000). Der aufwendige Schritt der Ligation des DNA-Linkers mit der mRNA wurde ersetzt durch eine photochemische Reaktion. Der DNA-Linker trägt in verbesserten Protokollen eine Psoralen Gruppe, die nach Hybridisierung mit der mRNA aktiviert wird und zu einer kovalenten Verknüpfung von DNA und mRNA führt (Kurz *et al.*, 2000). Die Optimierung dieses

Verfahren bildet die Grundlage für den Einsatz des *mRNA display*s in Selektionsexperimenten aus komplexen Bibliotheken. Mittels *ribosome display* wurden bereits zahlreiche Anreicherungsexperimente von bevorzugt Antikörperfragmenten mit verbesserten Bindungseigenschaften aus komplexen Bibliotheken durchgeführt (He & Taussig, 1997, Hanes *et al.*, 1998, 2000, Schaffitzel *et al.*, 1999, He *et al.*, 1999, Jermutus *et al.*, 2001, Irving *et al.*, 2001). Das *mRNA display* wurde erfolgreich zur Anreicherung von Streptavidin-Bindeproteinen aus einer Bibliothek von α-helikalen und β-Strang Segmenten eingesetzt (Cho *et al.*, 2000). In einem weiteren Experiment wurden aus einer 80 Aminosäuren umfassenden, vollständig randomisierten Polypeptid-Bibliothek Varianten isoliert, die Affinitäten bis zu 100 nM gegenüber ATP aufwiesen (Keefe & Szostak, 2001). Die isolierten, vermutlich eine dreidimensionale Struktur besitzenden Bindemoleküle konnten in mehrere Sequenzklassen unterteilt werden, eine besaß sogar eine Faltungs-stabilisierende Zinkion-Bindestelle.

Die Verwendung von mRNA in den beschriebenen Methoden der Genotyp-Phänotyp-Kopplung ist aufgrund der Hydrolyse- und Nukleaseempfindlichkeit ein entscheidender Nachteil, dem durch die reverse Transkription in cDNA begegnet werden kann (Kurz *et al.*, 2000). Der ternäre Komplex aus mRNA, Ribosom und Polypeptid beim *ribosome display* hingegen wird mit einer Stabilität von mindestens 15 Tagen beschrieben (Amstutz *et al.*, 2001).

1.4.4 Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakterienzellen (*bacterial surface display*)

Die Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen auf Bakterienzellen wurde in zahlreichen Ansätzen und sowohl auf Stämmen Gram-positiver als auch vor allem Gram-negativer Arten erfolgreich bewerkstelligt. Besonders die Präsentation auf der Oberfläche von *Escherichia coli* wurde unter Verwendung zahlreicher Expressionssysteme beschrieben. *Escherichia coli* ist besonders aufgrund der Möglichkeit zur Erzeugung und Vermehrung umfangreicher molekularer Repertoires, abgeleitet von mehr als 10^{10} unabhängigen Transformanten, der bevorzugte Organismus der evolutiven Biotechnologie. Für die meisten anderen Mikroorganismen ist aufgrund geringerer Tranformationseffizienzen die maximale Repertoiregröße auf mehrere Größenordnungen niedriger begrenzt. Ein Protein oder Peptid, welches auf der Oberfläche von *Escherichia coli* präsentiert werden soll, muss zu diesem Zweck sowohl die Zytoplasma- als auch die äußere Membran der Bakterienhülle durchqueren. Aus diesem Grund basieren nahezu alle Präsentationssysteme in *E. coli* auf der genetischen Fusion oder Insertion des zu präsentierenden Passagierproteins oder –peptids mit einem Translokatorprotein, welches vollständig oder in Teilen auf der Außenseite der Bakterienzelle lokalisiert ist (Lang, 2000).

1.4.4.1 Porin vermittelte Exposition auf der Zelloberfläche

Den Porinen kommt im Zusammenhang mit der bakteriellen Oberflächenpräsentation eine wichtige Rolle zu. Porine kommen in großer Anzahl in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterienzellen vor und dienen dem Stoffaustausch zwischen der Zelle und der sie umgebenden Umwelt. In ihrem Aufbau bestehen sie aus β-Fass Strukturen, gebildet aus antiparallelen β-Strängen, welche die äußere Membran durchspannen, verbunden durch

Schleifen, die einerseits in das Periplasma und andererseits in Richtung des umgebenden Mediums weisen (Cowan *et al.*, 1992). Durch genetische Insertion kurzer Peptide mit Längen von maximal 50-60 Aminosäuren in Oberflächen-exponierte Schleifen von *OmpC* und *LamB* konnten diese auf der Zelloberfläche exponiert nachgewiesen werden (Lang, 2000). Sowohl die Länge des eingefügten Peptids als auch die Auswahl der Schleife für die Insertion spielen dabei für die effiziente Präsentation eine wichtige Rolle, längere Peptide scheinen die korrekte Faltung und Membraninsertion des Porins zu verhindern. Der Weg der Insertion in Schleifenregionen von Porinmolekülen ist nicht der einzige beschrittene Weg zur Nutzung von Porinen als Ankerdomänen für die bakterielle Oberflächenpräsentation. Da die Termini aller bekannten Porine in Richtung des Periplasmas weisen, ist eine terminale Fusion zur Exposition in das umgebende Medium nicht möglich. Georgiou und Mitarbeiter haben daraufhin Präsentationssysteme entwickelt, welche nur kleine Teile des Porins *OmpA* umfassen und für eine Fusion freie Carboxytermini bereithalten. Die *Lpp-OmpA*-Systeme bestehen aus einem die ersten neun Aminosäuren umfassenden Abschnitt des *major outer membrane lipoprotein Lpp* und davon C-terminal drei bzw. lediglich einem die Membran durchspannenden β-Strang des *OmpA* β-Fasses, woran wiederum C-terminal das zu präsentierende Protein oder Peptid fusioniert werden kann (Francisco *et al.*, 1992). Das aminoterminale Cystein des *Lpp*-Anteils wird in *E. coli* mit einem drei Fettsäurereste tragenden Glyzerinrest modifiziert und wirkt so als Anker in der äußeren Membran der Zelle (Ghrayeb *et al.*, 1984). Mit Hilfe des *Lpp-OmpA* Expressionssystems war es möglich, unterschiedliche, größere Proteindomänen auf *E. coli* zu präsentieren, darunter *TEM-1* β-Laktamase (Francisco *et al.*, 1992), Einketten-Antikörper-Fragmente (scF_v) (Daugherty *et al.*, 1999) und Protease-Inhibitoren mit Cystin-Knoten Faltungsmotiv (Christmann, *et al.*, 1999).

1.4.4.2 Exposition auf Flagellen/Fimbrien

Ein anderer Ansatz zur Präsentation von Peptiden auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien wurde durch Kopplung an Proteine von Flagellen und Fimbrien verfolgt. Diese komplexen Strukturen bestehen aus einer großen Anzahl identischer Proteine, in welche an permissiven Stellen Insertionen unterschiedlicher Länge eingefügt werden konnten, ohne dass deren Synthese oder Funktion eingeschränkt wäre. So konnten durch Insertion in die Flagellen-Untereinheit *FliC* Peptide mit einer Länge von bis zu 300 Aminosäuren präsentiert werden (Westerlund-Wikström *et al.*, 1997), und in Fimbrienproteine eingefügte Metall-ionen-Bindemotive waren funktionell auf der bakteriellen Oberfläche nachweisbar (Schembri *et al.*, 1999, Kjaergaard *et al.*, 2001). Der Vorteil der Präsentation über Fimbrien und Flagellen besteht in der hohen Kopienzahl, mit der betreffende, auch längere Peptide exponiert werden können, ohne die Faltung der Passagierdomäne oder die Filamentbildung zu beeinträchtigen. Anwendungsmöglichkeiten für Flagellen- bzw. Fimbrien *display* sind unter anderem die Epitopkartierung und die Untersuchung von Adhesin-Rezeptor Interaktionen (Westerlund-Wikström, 2000).

1.4.4.3 Durch Autotransport-Proteine vermittelte Oberflächenexposition

Eine Klasse von Proteinen, welche für die bakterielle Oberflächenpräsentation verbreitet Anwendung findet, ist die der Autotransporter. Autotransporter sind sekretierte Proteine Gram-negativer Bakterien, die eine charakteristische Domänenstruktur aufweisen. Einer

aminoterminalen Signalsequenz folgen die sekretierte Effektordomäne und eine carboxyterminale β-Domäne, die in der äußeren Membran eine β-Fass Struktur ausbildet (Henderson *et al.*, 1998). Durch dieses Fass bzw. durch eine durch mehrere Untereinheiten der β-Domäne gemeinsam gebildete Pore (Veiga *et al.*, 2002) wird nach der Membraninsertion die Effektordomäne passagiert und meist durch Autoprotolyse freigesetzt. Bekanntester Vertreter der Autotransporter ist die β-Domäne der *IgA*-Protease (*IgAβ*) von *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner *et al.*,1987), welche auch heterolog exprimiert in *E. coli* in der Lage ist, neben der *IgA*-Proteasedomäne auch andere Domänen durch die äußere Membran zu transportieren. Gezeigt wurde dies am Beispiel der Präsentation von Choleratoxin B (Klauser *et al.*, 1992) und Varianten des Protease-Inhibitors *EETI-II* (Wentzel *et al.*, 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *IgAβ*-Fusionsprotein in *E. coli* toxisch wirkt, was die Handhabung des Systems im Rahmen der Durchmusterung Moleklarer Repertoires erschwert (Wentzel *et al.*, 1999). Neben *IgAβ* wurde auch der Autotransporter *AIDA-I* (*adhesin involved in diffuse adherence*) für die Präsentation von Choleratoxin B herangezogen, ebenso wie für die Exposition von T-Zell Epitopen (Maurer *et al.*, 1997) und die *TEM-1* β-Laktamase von *E. coli* (Lattemann *et al.*, 2000). In letzterem Fall konnte die enzymatische Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden.

1.4.4.4 *Ice nucleation protein* (INP) vermittelte Präsentation

Ein weiteres Protein für die Verankerung heterologer Passagierproteine in und deren Exposition auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen ist das *ice nucleation protein* (*INP*) aus *Pseudomonas syringae*. Dieses Protein katalysiert die Bildung von Eiskristallen in unterkühltem, flüssigem Wasser und ist über einen Glykosyl-Phosphatinositol Anker (GPI) in der äußeren Membran der Bakteriums verankert (Kozloff *et al.*, 1991). Wie die Präsentation über *IgAβ* ist auch eine Exposition von Passagierproteinen über *INP* auf Zellen von *Escherichia coli* möglich. Erfolgreich präsentierte Passagierdomänen waren die Levansucrase (Jung *et al.*, 1998), Organophosphat-Hydrolase (Shimazu *et al.*, 2001), Carboxymethylcellulase (Kim *et al.*, 2000), *HIV gp120* (Kwak *et al.*, 1999), das Oberflächen-Antigen des Hepatitis B Virus (Kim *et al.*, 1999) sowie synthetische Phytochelatine (Bae *et al.*, 2002).

1.4.4.5 Zelloberflächenpräsentation auf Gram-positiven Bakterien

Ansätze zur Zelloberflächenpräsentation auf Zellen Gram-positiver Bakterien verfolgt im Gegensatz zur Exposition auf Gram-negativen Bakterienzellen hauptsächlich das Ziel der Vakzinierung. In diesem Zusammenhang kamen neben *Bacillus subtilis*, dem wohl am besten untersuchten Gram-positiven Bakterium, attenuierte Mykobakterien, nicht-pathogene Staphylokokken, Lakto- und Streptokokken zum Einsatz (Hansson *et al.*, 2001). Aber auch biotechnologische Ansätze sind dokumentiert. So konnten Einketten-Antikörperfragmente (scF_v) für diagnostische Tests und die Cellulose Bindedomäne der Cellulase aus *Trichoderma reesei* als mikrobieller Biokatalysator auf Staphylokokken präsentiert werden (Gunneriusson *et al.*, 1996, Lehtio *et al.*, 2001).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, auf der Basis des EHEC O157:H7 *EaeA* Proteins ein neues Verfahren zu entwickeln, mit dem es möglich ist, Proteine auf der Oberfläche von *Escherichia coli* K12 Zellen in hoher Kopienzahl zu präsentieren. Nach erfolgtem qualitativem Nachweis der Oberflächenexposition sollte das Verfahren hinsichtlich der prinzipiellen Einsetzbarkeit bei der Durchmusterung umfangreicher molekularer Repertoires bewertet werden. Entscheidende Parameter der Zelloberflächen-präsentation sind dabei eine maximale Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle bei minimalem Einfluss auf die Vitalität der Zellen. Gleichzeitig sollte anhand dieses Verfahrens der generelle Mechanismus der Translokation von Proteindomänen über die äußere Membran Gram-negativer Bakterien im Speziellen von *Escherichia coli* am Beispiel der *EaeA* vermittelten Translokation untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss diverser Parameter wie Faltung, Größe, Struktur und Stabilität auf die Translokationskompetenz evaluiert werden.

2. Ergebnisse

Die Isolierung von Peptiden und Proteinen mit neuen oder verbesserten Eigenschaften durch die Präsentation komplexer molekularer Bibliotheken auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen hat sich als Verfahren in den vergangenen Jahren gut bewährt (Francisco *et al.*, 1992, Daugherty *et al.*, 1999, Wentzel *et al.*, 1999, Christmann *et al.*, 1999, Christmann *et al.*, 2001, Westerlund-Wikström, 2000). Die bakterielle Oberflächenpräsentation bildet damit neben der Präsentation auf Phagen (1.4.1), dem Hefe *display* (1.4.2) und den auf DNA- bzw. RNA-Bindung basierenden reinen *in vitro* Methoden (1.4.3) ein wirkungsvolles Instrument zur Identifizierung neuer Bindemoleküle. Mehr noch bietet das *bacterial surface display* gegenüber den anderen Methoden sogar deutliche Vorteile. Wichtige Parameter für die Auswahl eines Präsentationsverfahrens sind die Möglichkeit der Erzeugung umfangreicher molekularer Bibliotheken, die Stabilität der Komplexität innerhalb der Repertoires im Verlauf eines Anreicherungsexperiments sowie der experimentelle Aufwand, der mit deren Durchmusterung verbunden ist. Die Verwendung von *Escherichia coli* als bakterieller Wirtsorganismus stellt einen großen Vorteil mit Blick auf die Möglichkeit der Erzeugung sehr großer Bibliotheken gegenüber dem Hefe *display* dar, mit dem Diversitäten jenseits von 10^7 unabhängigen Klonen aufgrund der geringen Transformationseffizienz der Zellen ausgeschlossen sind. Wie auch bei der wohl am weitesten verbreiteten Methode der Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen, der Präsentation auf der Oberfläche von Phagenpartikeln (*phage display*), ist die Komplexität der Repertoires hier lediglich durch die Effizienz der Transformation von *E. coli* Zellen begrenzt, die bei nahe 10^{10} pro Mikrogramm Plasmid-DNA liegt (Dower *et al.*, 1988, Song *et al.*, 1993). Von Bedeutung für die generelle Anwendbarkeit von Verfahren, die auf der biologischen Synthese von Molekülvarianten beruhen, ist der Erhalt der Diversität der von den replizierenden Einheiten produzierten Moleküle bei Vermehrung der Produzentenzellen. Beim *phage display* werden von den produzierenden Bakterien die Proteinvarianten in Phagenpartikel verpackt. In der Regel werden sie dabei als Fusionsprotein mit einem Hüllprotein des Phagen produziert, das für die Infektion von Bakterienzellen und damit für die Phagenvermehrung notwendig ist. Formell nicht auszuschließen und auch häufig beobachtet ist der Fall, dass die Effizienz der Infektion einer Wirtszelle von speziellen Merkmalen der Aminosäuresequenz präsentierter Proteinvarianten abhängig ist und dies bei Anwendung mehrerer Runden von Infektion und Phagenvermehrung im Laufe eines Experimentes zu einem Verlust der Varianten führt, die eine etwas geringere Infektionswahrscheinlichkeit aufweisen als andere. Der damit einhergehende Verlust an Diversität ist unerwünscht, da das Risiko besteht, dass auch Varianten mit gewünschten Bindungseigenschaften eliminiert werden. Die direkte Präsentation auf Bakterienzellen bietet eine Alternative und umgeht diese Unzulänglichkeiten.

Die Komplexität des molekularen Repertoires, wie sie bei der Präsentation auf Phagen und Bakterien möglich ist, wird lediglich von den *in vitro* Methoden des *ribosomal display* übertroffen. Wie aber auch beim *phage display* ist der experimentelle Ansatz der Durchmusterung der Sammlung von Varianten als eine Art *‚black box'* Experiment anzusehen. Es besteht keinerlei Möglichkeit einer Erfolgskontrolle während einer Anreicherungsrunde. Dies ist lediglich bei Zell-basierten Methoden gegeben, die den Einsatz von beispielsweise Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) erlauben. Darüber hinaus

ist der experimentelle Aufwand, wie er bei den reinen *in vitro* Methoden dem Experimentator abverlangt wird, bei der bakteriellen Oberflächenpräsentation deutlich geringer.

Die am häufigsten verwendete Methode zur bakteriellen Zelloberflächenpräsentation auf *Escherichia coli* beruht auf der von Georgiou und Mitarbeitern im Jahre 1992 veröffentlichten Produktion eines Fusionsproteins mit *Lpp-OmpA* (Franscisco *et al.*, 1992, siehe auch 1.4.4.1). Dieses Konstrukt wurde in unterschiedlichen Variationen auch im Rahmen einiger Arbeiten in der Abteilung für Molekulare Genetik des Instituts für Mikrobiologie und Genetik bearbeitet und unter anderem von A. Christmann für die Isolierung von Proteaseinhibitor-Varianten aus einem komplexen Hintergrund negativer Ereignisse heraus angewandt (Christmann *et al.*, 1999). Schon im Rahmen dieser Arbeiten wurde sehr bald deutlich, dass das hauptsächliche Problem dieser Methode in dem Einfluss der Expression des Oberflächen-exponierten Passagierproteins auf die Vitalität der Bakterienzellen lag. Eine hohe Nettoakkumulation auf der Zelloberfläche war hierbei mit dem Überleben der Zellen nur noch schwer vereinbar. Gerade dieser Aspekt stellt jedoch mit Blick auf die generelle Anwendbarkeit des Verfahrens in routinemäßigen Anreicherungs-experimenten aus umfangreichen molekularen Bibliotheken ein nahezu unüberwindbares Problem dar. Die Stabilität der Komplexität der erzeugten Repertoires wäre wie beim *phage display* nur begrenzt gegeben. Es bestand folglich die Notwendigkeit, alternative, verbesserte Methoden zu entwerfen und aufzubauen, die es erlauben, Proteindomänen verankert auf der *E. coli* Zelloberfläche zu exponieren, ohne dass dies mit Einschränkungen der Überlebensfähigkeit der produzierenden Zellen verbunden ist. Die Suche nach Alternativen zu den *Lpp-OmpA* Konstrukten ging von der Arbeitshypothese aus, dass ein in hoher Kopienzahl in der äußeren Membran von *E. coli* vorkommendes Protein, welches seinerseits Proteindomänen auf der Zelloberfläche exponiert, als Grundgerüst für die Exposition von Fremdproteinen besonders gut geeignet ist. Fündig wurde man letztendlich bei pathogenen *Escherichia coli*, im Speziellen bei enterohaemorrhagischen *E. coli* (EHEC). Das in diesen Zellen vorkommende *EaeA* Protein hat seinen originären Platz in der äußeren Membran der Zellen und exponiert mehrere C-terminale Domänen in das die Zelle umgebende Medium. Die natürliche Funktion des *EaeA* Proteins in EHEC liegt dabei in der festen Anheftung der Bakterien an die Zellen des Darmepithels des Wirtsorganismus über die Bildung eines Komplexes mit einem Rezeptormolekül (Rosenshine *et al.*, 1996a,b, Liu *et al.*, 1999a). Das adressierte Zielprotein ist der ebenfalls EHEC kodierte *Tir* Rezeptor, der in die Membranen des Darmepithels eingelagert wird (Kenny *et al.*, 1997). Strukturell ist das *EaeA* Protein in mehrere Domänen untergliedert (Liu *et al.*, 1999b, Luo *et al.*, 2000). Nach Strukturvorhersagen folgt dem in das Periplasma zeigenden aminoterminalen Abschnitt des Proteins eine aus β-Strängen bestehende Transmembrandomäne. An deren Carboxyterminus folgt nach dem Modell nach einem flexiblen Bereich ein relativ rigides Gefüge aus drei Domänen mit Immunglobulin-ähnlicher (E0, E1, E2) und am weitesten C-terminal die Effektordomäne mit Lektin-ähnlicher Struktur (E3). Die Struktur der Domänen E1, E2 und E3 wurde im Jahr 2000 von Luo und Mitarbeitern im Komplex mit der Bindedomäne des *Tir*-Rezeptors gelöst (Luo *et al.*, 2000). Der Mechanismus der Translokation der extrazellulären Domänen hingegen ist noch nicht bekannt, die Möglichkeit eines Autotransport-Mechanismus wie zum Beispiel bei der *Neisseria gonorrhoeae* IgA-Protease (Pohlner *et al.*,

1987a,b, Veiga *et al.*, 2002) oder beim *E. coli AIDA-I* Protein (Maurer *et al.*, 1997) scheint jedoch wahrscheinlich. Die Tatsache, dass dieses Protein gleich mehrere Domänen membranständig auf der Bakterienoberfläche zu exponieren vermag, machte *EaeA* zu einem guten Kandidaten für ein neuartiges Präsentationsverfahren zur bakteriellen Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen auf Zellen von *E. coli* Laborstämmen.

2.1 Aufbau eines EHEC-Intimin basierten Präsentationsverfahrens

Als Membrananker für die bakterielle Oberflächenpräsentation heterologer Proteine auf Zellen von *Escherichia coli* K-12 wurde das Intimin *EaeA* enterohaemorrhagischer *Escherichia coli* ausgewählt. Wie in Kapitel 1.3.3.2 ausführlich dargelegt, fungiert die N-terminale Region mit großer Wahrscheinlichkeit als Ankerdomäne in der äußeren Membran der Bakterien und exponiert vier zum Teil strukturell bekannte carboxyterminale Domänen in das umliegende Medium (Luo *et al.*, 2000). Dabei kommt der carboxyterminalen Domäne mit Lektin-ähnlicher Struktur bei der Anheftung der EHEC-Zellen an das Darmepithel eine zentrale Bedeutung zu, da diese in der Lage ist, das *Tir* Rezeptorprotein auf der Oberfläche von Epithelzellen zu binden (Liu *et al.*, 1999b). Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Intimin-basierten Präsentationsverfahren kommt eine um die Domänen E2 und E3 verkürzte Variante des originären EHEC Intimins *EaeA* zum Einsatz (Abb. 5).

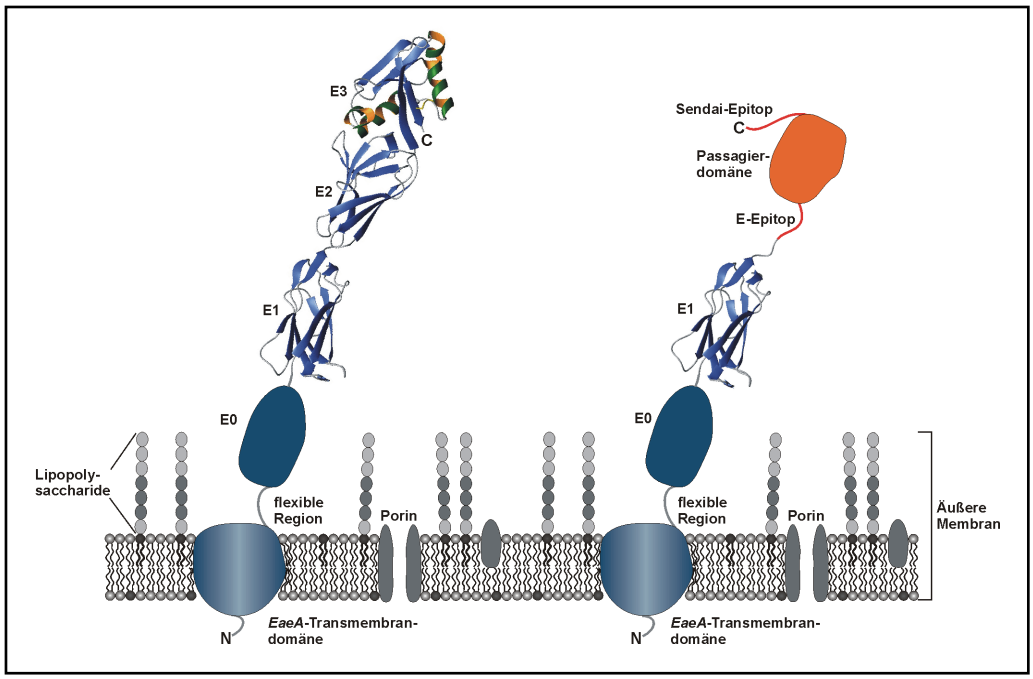


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Intimins enteropathogener *E. coli* (EPEC) (links) sowie des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, davon abgeleiteten *Intimin'* Proteins (rechts). Dargestellt ist die äußere Bakterienmembran und jeweils die relative Lokalisation des Proteins in der Bakterienhülle sowie dessen postulierte Domänenstruktur. In der äußeren Membran: Transmembrandomäne unbekannter Struktur, E0: Domäne unbekannter Struktur, E1, E2: Domänen mit Immunglobulin-ähnlicher Struktur, E3: Domäne mit Lektin-ähnlicher Struktur, rot: Passagierdomäne. Die vier extrazellulären Domänen E0, E1, E2 und E3 sind über eine flexible Region mit der aminoterminalen Transmembrandomäne verbunden, die in der äußeren Membran inseriert (Luo *et al.*, 2000). Die schematische Darstellung der Struktur der Domänen E1, E2 und E3 sowie des *Tir*-Bereichs wurde erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1F02, Luo *et al.*, 2000.

Das aus den ersten 659 Aminosäuren des *EaeA*-Proteins bestehende Konstrukt wird zur besseren Unterscheidung vom EHEC O157:H7 (Wildtyp-) Intimin mit *EaeA′* bzw. *Intimin′* bezeichnet, das zugrundeliegende Gen als *eaeA′*-Gen.

2.1.1 Konstruktion des Plasmids pASKInt100

Die Kodone #1 bis #659 des Gens *eaeA* enterohaemorrhagischer *Escherichia coli* O157:H7, Stamm 933 wurden mittels PCR amplifiziert, wobei als Matrize chromosomale DNA von EHEC O157:H7 in einer Hitze-inaktivierten Gesamtzellpräparation diente. Die Präparation der Hitze-inaktiverten EHEC-Zellen wurde von Prof. Dr. J. Hacker von der Universität Würzburg dankenswerterweise bereitgestellt. Der prinzipielle Ablauf dieser sowie aller anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen ist im Methodenteil ausführlich dargelegt (Methode 5.3.1). Das durch die PCR mit den Oligonukleotiden *Intiminup* und *Intilo1* amplifizierte DNA-Fragment von 2013 bp Länge wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Mun*I gespalten und mit dem durch *Xba*I und *Eco*RI gespaltenen Vektorfragment von pASKC21-EETI-CK^{send} (siehe 4.2) ligiert. Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde nach Transformation von Zellen des *Escherichia coli* Stammes 71-18 amplifiziert. Das erzeugte Plasmid trägt den Namen pASKInt1-EETI-CK^{send} und enthält das *eaeA′*-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des strikt regulierbaren *tetA*-Promotors/Operators des Ursprungsplasmids pASK75 (Skerra, 1994, siehe 4.2). Das im Rahmen dieser Klonierung als Rezipientenvektor fungierende Plasmid pASKC21-EETI-CK^{send} ist ein Derivat des Plasmids pASK21-EETI-CK^{send} (Christmann *et al.*, 1999). Es unterscheidet sich von diesem durch die Anwesenheit der kodierenden Sequenz des mittels eines kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpers leicht nachweisbaren E-Epitops (*E-tag*) des *Gla*-Proteins in menschlichen Knochen (Fa. Amersham Biosciences), welche unmittelbar vor dem 5'-Ende der kodierenden Sequenz für eine Variante des *Ecballium elaterium* Trypsin Inhibitors II (*EETI-II*) eingefügt worden war. Diese Variante von *EETI-II* (*EETI-CK^{Send}*) enthält eine Epitop-Sequenz aus dem *L*-Protein des Sendai-Virus mit einer Länge von 13 Aminosäuren als Austausch der Aminosäuren #3 bis #8 des Wildtyp EETI-II-Proteins. Dieses anstelle der originalen Inhibitor-Schleife verwendete Epitop kann mittels eines monoklonalen anti-Sendai Antikörpers leicht immunochemisch nachgewiesen werden (Einberger *et al.*, 1990). Weiter enthält das Plasmid pASKC21-EETI-CK^{send} anstelle der in den Kodonen #8 bis #281 deletierten kodierenden Sequenz für die Ampicillin-Resistenz vermittelnde β-Laktamase die kodierende Sequenz für eine Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelnde Chloramphenicol-Acetyltransferase.

Die für die Aminosäure Glutamin kodierende Kodon-Position #35 des *eaeA′*-Gens (CAG) in pASKInt1 wurde in einem weiteren Klonierungsschritt durch ein *amber* Stopkodon (TAG) substituiert. Dazu wurde ein Teil der kodierenden Region des *eaeA′*-Gens in einer PCR mit den Oligonukleotiden *Intiminup* und *Intimin-amber-lo* amplifiziert. Das auf diesem Wege erhaltene DNA-Fragment von 139 bp Länge wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Eco*RI gespalten und in das mit denselben Enzymen gespaltene, lineare Vektorfragment des Plasmids pASKInt1-EETI-CK^{send} ligiert. Es folgte die Amplifikation des auf diesem Wege erzeugten Plasmids pASKInt100-EETI-CK^{send} in Zellen von *Escherichia coli* 71-18. Durch die Einführung eines TAG *amber* Stopkodons im vordersten Abschnitt des *eaeA′*-Gens und die Verwendung eines Suppressor-Stammes wie 71-18 (Rüther & Müller-

Hill, 1983, *supE*) oder DH5α (Hanahan 1983, *supE44*) wird die Expression des *Intimin′*-Konstruktes reduziert, da die Effizienz des Überlesens eines Stopkodons im verwendeten Stamm niedrig ist. Damit wird sichergestellt, dass die Nettoakkumulation des *Intimin′*-Konstruktes in der äußeren Membran reduziert ist und keine unerwünschten, negativen Einflüsse auf Zellvitalität und Wachstum auftreten (siehe 2.1.3).

Die Klonierungen im Rahmen der Erstellung des Plasmids pASKInt100-EETI-CK^{send} sind schematisch in Abbildung 6 wiedergegeben, die vollständige DNA-Sequenz des Plasmids befindet sich im Anhang zu dieser Arbeit.

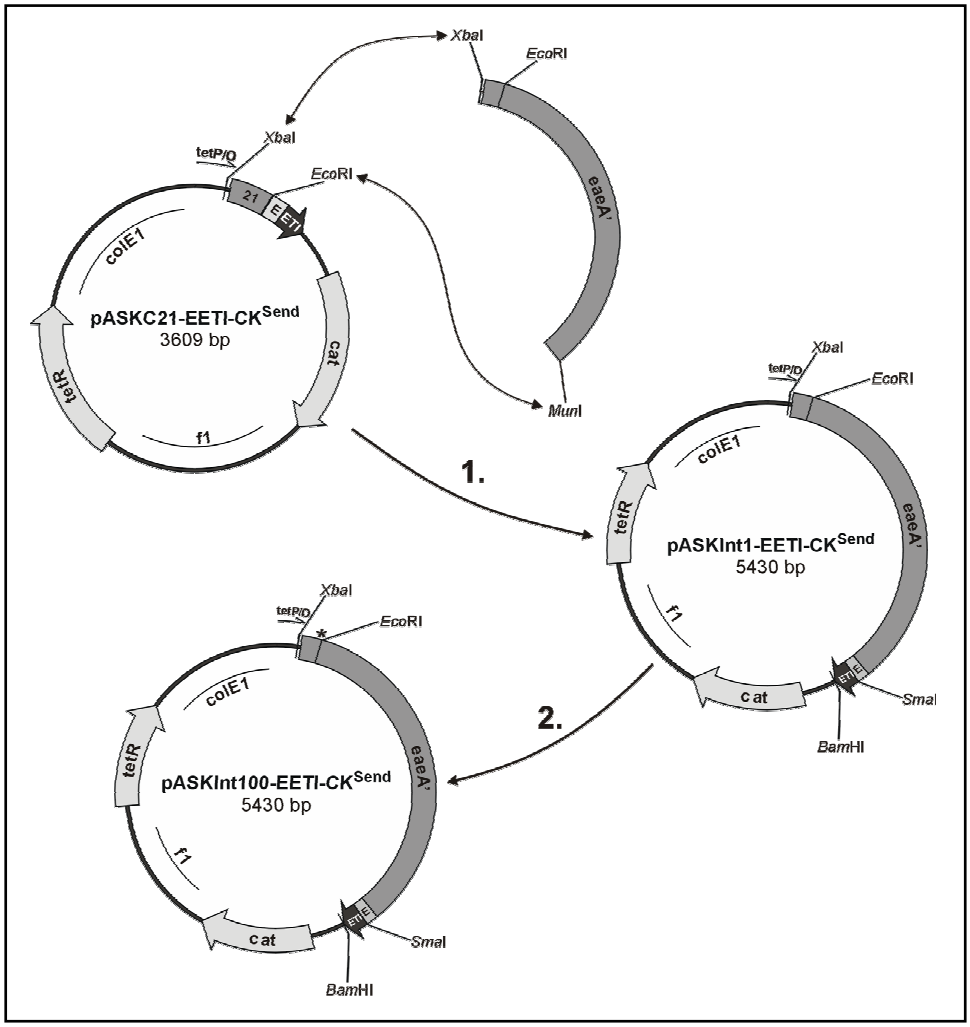


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Erzeugung des Plasmids pASKInt100-EETI-CK^{Send}. (1.) Klonierung des das EHEC O157:H7 *eaeA′*-Gen enthaltenden PCR-Produkts über *Xba*I und *Eco*RI/*Mun*I; (2.) Klonierung eines PCR-Produkts zum Austausch des CAG-Kodons an Position #35 des *eaeA′*-Gens in pASKInt1-EETI-CK^{send} durch ein TAG *amber* Stopkodon über *Xba*I und *Eco*RI in pASKInt100-EETI-CK^{Send}. Nähere Informationen im Text, komplette Sequenz des Plasmids pASKInt100-EETI-CK^{send} im Anhang 8.2.1 zu dieser Arbeit.

2.1.2 Oberflächenexposition von Fusionsproteinen über das EHEC Intimin *EaeA* auf Zellen von *E. coli* K-12

Das aminoterminale Fragment des *EaeA*-Proteins, wie es ausgehend von dem Plasmid pASKInt100-EETI-CK^{send} durch Zellen von *Escherichia coli* produziert werden kann, soll in diesem neuen Verfahren einer bakteriellen Zelloberflächenpräsentation für die Exposition

heterologer Passagierdomänen auf den Bakterienzellen genutzt werden. Um zu untersuchen, ob das verwendete Fragment *EaeA′* des EHEC O157:H7 *EaeA*-Proteins für die Translokation durch die äußere Membran von *E. coli* K-12 Zellen ausreichend ist, wurde als Nachweis-Domäne das Derivat *EETI-CK*^{send} des *EETI-II* Proteins (siehe 2.1.1) verwendet. Dieses gehört zu einer Familie von nur wenige Dutzend Aminosäuren kurzen sogenannten Mikroproteinen, welche als Familie der Cystin-Knoten Protease-Inhibitoren bezeichnet wird (Pallaghy *et al.*, 1994). EETI-II bietet dabei ein stabiles Grundgerüst für die Verankerung konformationell eingeschränkter Peptide unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz (Christmann *et al.*, 1999; Wentzel *et al.*, 1999) wie beispielsweise die des hier verwendeten Sendai-Epitops (DGSLGDIEPYDSS, Einberger *et al.*, 1990). Zur Expression des ein TAG *amber* Stopkodon enthaltenden Fusionsgens *eaeA′-eeti-ck*^{send} wurde der *amber* Suppressor-Stamm DH5αZ1 verwendet. Die Anwesenheit des *Intimin′*-Fragments in der äußeren Membran der pASKInt100-EETI-CK^{send} tragenden DH5αZ1-Zellen wurde durch indirekte Immunfluoreszenz-Markierung der intakten Bakterienzellen mit dem anti-E Antikörper (Fa. Amersham Biosciences) nachgewiesen (Methode 5.5.2, Abb. 7). Dieser Antikörper bindet spezifisch die E-Epitop Sequenz (AGAPVPYPDPLEPRAASG) unmittelbar benachbart des *Intimin′* Carboxyterminus (vgl. Abbildung 5).

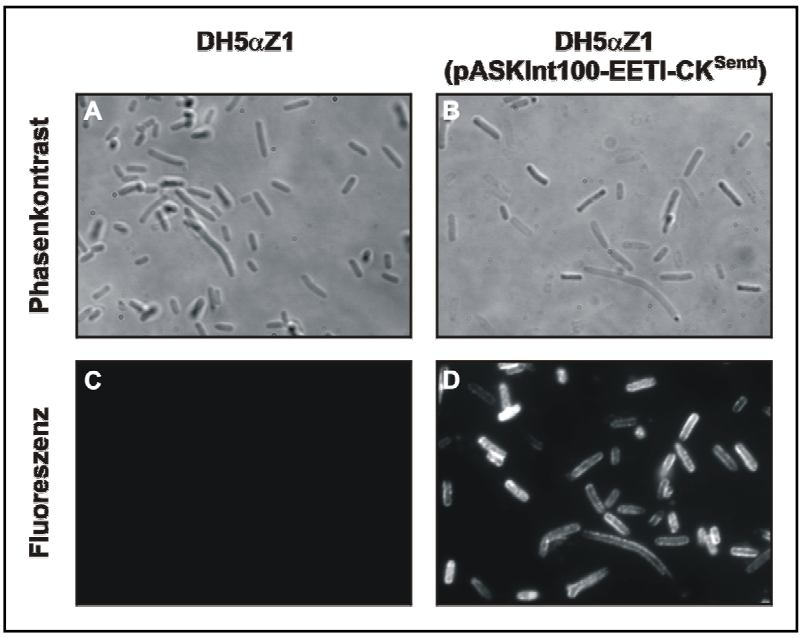


Abbildung 7. (A, B) Phasenkontrast- und (C, D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen desselben Gesichtsfeldes von untransformierten DH5αZ1-Zellen (A, C) und DH5αZ1-Zellen, welche das Plasmid pASKInt100-EETI-CK^{send} tragen (B, D). Die Zellen wurden in Anwesenheit von Anhydrotetrazyklin wachsen gelassen und somit die Expression von *eaeA′-eeti-ck*^{send} induziert. Es folgte die Inkubation der Zellen in Folge mit anti-E Antikörper, biotinyliertem anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat.

Die DH5αZ1-Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm Wellenlänge von 0,2 wurde als Induktor der *Intimin′-EETI-CK*^{send} Expression Anhydrotetrazyklin bis zu einer Endkonzentration von 0,2 μg/ml zugegeben. Nach einer weiteren, 60 minütigen Inkubation bei 37 °C unter Schütteln wurde ein Aliquot der Kulturen zentrifugiert und die pelletierten Bakterienzellen wurden wie in Methode 5.5.2 ausführlich beschrieben nacheinander mit anti-E Antikörper, biotinyliertem

anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat, inkubiert. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass durch diese Markierungsprozedur alle pASKInt100-EETI-CK^{send} tragenden DH5αZ1-Zellen eine Fluoreszenzmarkierung aufwiesen. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt. Nicht mit pASKInt100-EETI-CK^{send} transformierte Zellen von DH5αZ1 zeigten hingegen keinerlei Fluoreszenzmarkierung.

Die Expression von *eaeA′-eeti-ck^{send}* in DH5αZ1 und dessen Exposition auf der bakteriellen Oberfläche konnte folglich spezifisch mittels der anti-E Markierung nachgewiesen werden. Das verwendete Fragment des EHEC O157:H7 *EaeA*-Proteins (*EaeA′*) ist für die Translokation von *EETI-CK^{send}* durch die äußere Membran von *E. coli* K-12 Zellen ausreichend.

2.1.3 Einfluss der Intimin-Produktion auf das klonale Wachstum und das individuelle Überleben der Zellen

Die Induktion der Expression des *Intimin*'-Gens in einer Kultur des Stammes DH5αZ1, der das Plasmid pASKInt1-EETI-CK^{send} trug, führte zu einem Wachstumsstopp der Kultur infolge einer drastischen Verringerung des Überlebens der Zellen (Beobachtung H. Kolmar). Es ist weiter verschiedentlich für andere bakterielle Oberflächenpräsentationssysteme dokumentiert worden, dass die Überproduktion von Proteinen, die mit der äußeren Membran assoziiert sind, die Struktur der Membran derart stört, dass die Zellen sterben (*Lpp-OmpA*: Daugherty *et al.*, 1999, *Igaβ*: Wentzel *et al.*, 1999). Die Rückführung der Nettoakkumulation von Fusionsprotein in der äußeren Membran auf Translationsebene durch die Einführung eines *amber* Stopkodons auf ein geringeres Maß führte dazu, dass entsprechende Kulturen nach Induktion der Expression von *eaeA′* nicht oder zumindest in weit geringerem Ausmaß in ihrem Wachstum beeinträchtigt waren.

Um einen möglichen Einfluss der durch Einführung eines *amber* Stopkodons reduzierten *eaeA*'-Expression auf die Zellvitalität zu beleuchten, wurde die Überlebensrate von pASKInt100-EETI-CK^{send} tragenden DH5αZ1 Zellen im Vergleich zu untransformierten Kontrollzellen untersucht. Dazu wurde eine Kultur in Vollmedium bis zu einer O.D. bei 600 nm Wellenlänge von 0,2 wachsen gelassen und die Expression von *eaeA′-eeti-ck^{send}* mit 0,2 μg/ml Anhydrotetrazyklin induziert. Nach 0, 1, 2 und 4 Stunden wurden Aliquots der Kultur entnommen, und einzelne Zellen mit Hilfe der Einzelzellablagefunktion eines *MoFlo Cell-Sorters* (Fa. Cytomation) über 1024 Kanäle im 20 x 20 Raster auf Vollmediumsplatten abgelegt. Die abgelegten Zellen wurden zu Kolonien herangezogen, und deren Anzahl wurde bestimmt. Bezogen auf die jeweilige Anzahl an Kontrollzellen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde die prozentuale Überlebensrate bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Überlebensrate präsentierender Zelle ist demnach nach einer Stunde Induktion nur geringfügig kleiner als die von Kontrollzellen. Selbst nach 4 Stunden Induktion der Genexpression beträgt die Überlebensrate noch über 60 %.

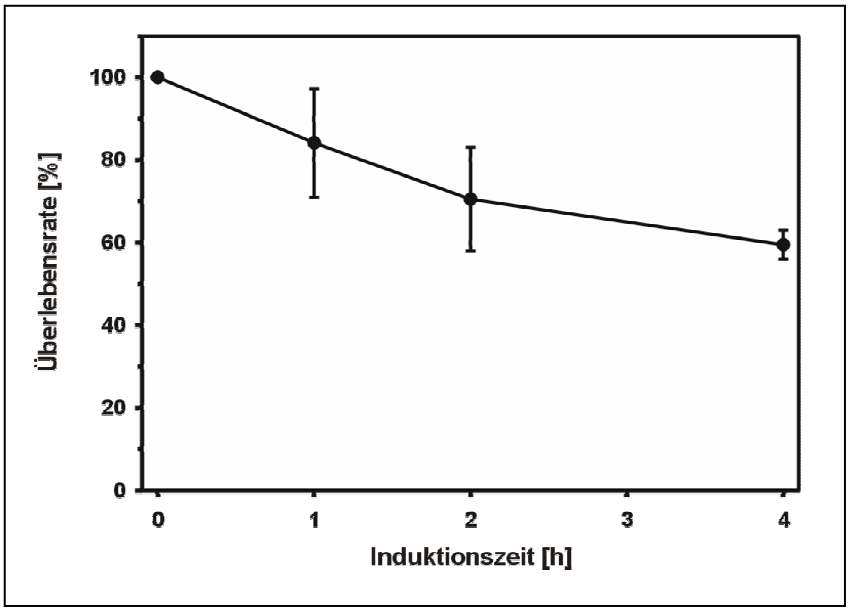


Abbildung 8. Überleben von pASKInt100-EETI-CK^{send} tragenden DH5αZ1 Zellen nach Induktion der *intimin'-eeti-ck*^{send} Expression durch Zugabe von 0,2 μg/ml Induktor Anhydrotetrazyklin (entspricht 0 h). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktionsbeginn wurden Zellen mit dem FACS auf Agar-Platten abgelegt. Nach über Nacht Inkubation bei 37 °C wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt und diese mit der Koloniezahl gleichbehandelter Kontrollzellen (untransformierte DH5αZ1 Zellen, 100 % gesetzt) verglichen. Drei unabhängige Experimente lieferten die Standardabweichungen.

Um zu untersuchen, ob *Intimin*'-präsentierende *E. coli* Zellen einen signifikanten Wachstumsnachteil in Flüssigkultur gegenüber nicht präsentierenden Zellen bei Dauerinduktion haben, wurde ein kompetitives Wachstumsexperiment durchgeführt. Als Expressionsstamm diente hierzu der Stamm 71-18mutS, welcher ein chromosomal integriertes Tetrazyklin-Resistenzgen trägt. Dieses bewirkt, dass die Zellen in der Lage sind, in Anwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin zu wachsen, so dass in dem vorliegenden Experiment auch über Nacht noch genügend Induktor zur Vollinduktion verfügbar war. Übernachtkulturen in dYT Vollmedium mit Chloramphenicol von pASKInt100-EETI-CK^{send} bzw. pASK75cat [ein zusätzlich das *cat*-Gen tragendes Derivat von pASK75 (Skerra, 1994)] tragenden 71-18mutS Zellen wurden im Verhältnis von ca. 1:1, bestimmt über die O.D.$_{600}$, zu einer Mischkultur vereinigt. Mit 2 μl dieses Gemisches wurden 50 ml dYT Vollmedium mit Chloramphenicol (25 μg/ml) und Tetrazyklin (12,5 μg/ml) inokuliert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Kultur als Starterkultur verwendet. Mit je 2 μl wurden drei Kolben mit je 50 ml Vollmedium mit Chloramphenicol (25 μg/ml) und Tetrazyklin (12,5 μg/ml) inokuliert. Nach Wachstum über Nacht wurden mit 2 μl aus jeder Kultur 50 ml frisches Vollmedium mit Chloramphenicol und Tetrazyklin inokuliert. Diese Prozedur wurde noch achtmal wiederholt. Letztendlich wurden Aliquots der einzelnen Übernachtkulturen mit dem anti-E Antikörper markiert und die Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 9 zeigt als Ergebnis die Auftragung des Anteils markierbarer Zellen gegen die Zeit.

Nach Kultivierung der Mischung über mehr als 100 Generationen hinweg kann man erkennen, dass der Anteil an *Intimin'-EETI-CK*^{send} präsentierenden Zellen von 40 % auf

ungefähr 5 % gefallen ist, was anzeigt, dass Kontrollzellen nur einen geringen, wenn auch signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber den präsentierenden Zellen aufweisen.

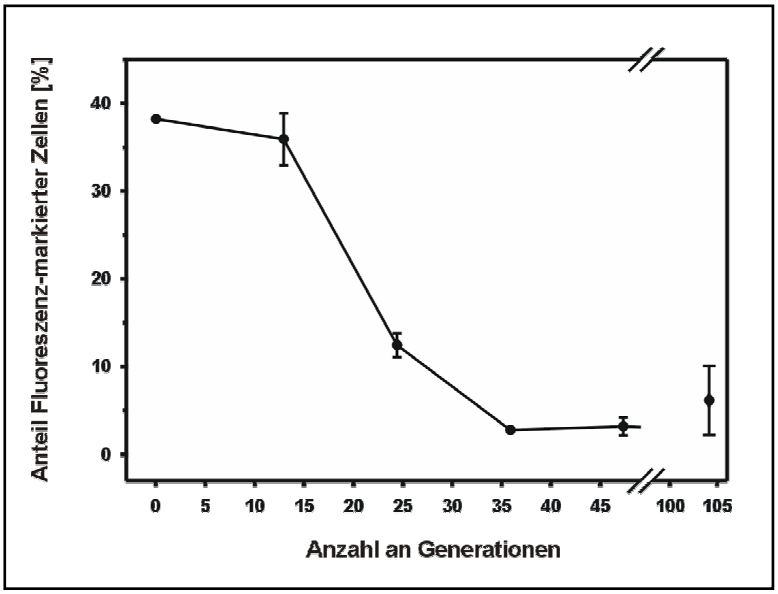


Abbildung 9. Wachstums-Kompetitionstest Tetrazyklin-induzierter Zellen von pASKInt100-EETI-CK^{send} tragenden Zellen von 71-18mutS verglichen mit pASK75cat tragenden 71-18mutS Zellen. Eine 1:1 Mischkultur beider Plasmid-tragender Zellen wurden in permanenter Anwesenheit von Tetrazyklin für über 100 Generationen durch wiederholtes Überimpfen inkubiert. Der Anteil *Intimin*' präsentierender Zellen wurde durch Fluoreszenzmarkierung von Zellen zu bestimmten Zeitpunkten bestimmt. Drei unabhängige Experimente lieferten die Standardabweichungen.

2.1.4 Bestimmung und Regulation der Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle

Für das Konstrukt *EaeA-E-tag-EETI-CK^{send}* sollte die Anzahl Oberflächen-präsentierter Moleküle von *E-tag-EETI-CK^{send}* bestimmt werden. Dazu wurden Expressions-induzierte Zellen von DH5αZ1, die das Plasmid pASKInt100-EETI-CK^{send} trugen, herangezogen. Es wurden 13 x 400 µl Kultur geerntet und die Zellen mit steigenden Mengen anti-E Antikörper inkubiert. Es wurden Mengen von 0 µg, 0,001 µg, 0,003 µg, 0,006 µg, 0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 0,2 µg, 0,4 µg, 0,6 µg, 1 µg und 2 µg anti-E Antikörper in je 10 µl PBS eingesetzt. Die Zellen wurden in der Antikörperlösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl PBS zugegeben und die markierten Zellen abzentrifugiert. In den beiden folgenden Schritten wurden die Zellen mit im Überschuss befindlichem zweiten, biotinylierten Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat behandelt. Die für einen Überschuss notwendige Menge an Antikörper bzw. Streptavidin, R-Phycoerythrin war zuvor ermittelt worden und wurde entsprechend eingesetzt. Von einer mit 0 µg anti-E Antikörper behandelten Probe wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde die Probe in 4 ml PBS verdünnt und 1 ml der Zellsuspension im *cell sorter* gezählt. Es wurde eine Zellzahl von 4,5 x 10^7 pro 400 µl Kulturansatz ermittelt. Die markierten Proben wurden vollständig in 1 ml PBS resuspendiert, und die durchschnittliche relative Fluoreszenz von 300.000 Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Diese durchschnittliche relative Fluoreszenz pro Zelle wurde gegen die eingesetzte (d.h. gebundene) Menge an anti-E Antikörper

logarithmisch aufgetragen. Aus der maximalen Steigung und dem Sättigungswert wurde ein Punkt ermittelt, der einer eingesetzten Menge von etwa 0,4 μg anti-E Antikörper entspricht (Abbildung 10). Unter der Annahme, dass jeder anti-E Antikörper nur ein einziges E-Epitop gebunden hat (für einen Antikörper besteht jedoch auf Grund zweier Bindungsstellen pro Molekül grundsätzlich die Möglichkeit bis zu zwei Epitope zu binden), ist die Anzahl Oberflächen-präsentierter Moleküle gleich der maximalen Anzahl gebundener Antikörper in der gesamten Probe, welche sich auf die durch Durchflusszytometrie bestimmte Anzahl Einzelzellen verteilt. Unter der Annahme eines Molekulargewichts des anti-E Antikörpers von M(IgG)=150.000 g/mol wurden von $4{,}5*10^7$ Zellen ($6{,}023*10^{23}$/mol / 150.000 g/mol) $*0{,}4\mu g = 1{,}61*10^{12}$ Moleküle Antikörper gebunden. Dies entspricht ca. 36.000 Antikörpermolekülen pro Zelle. Folglich sind in etwa 36.000 Moleküle *E-tag-EETI-CK^{send}* auf jeder Zelle exponiert.

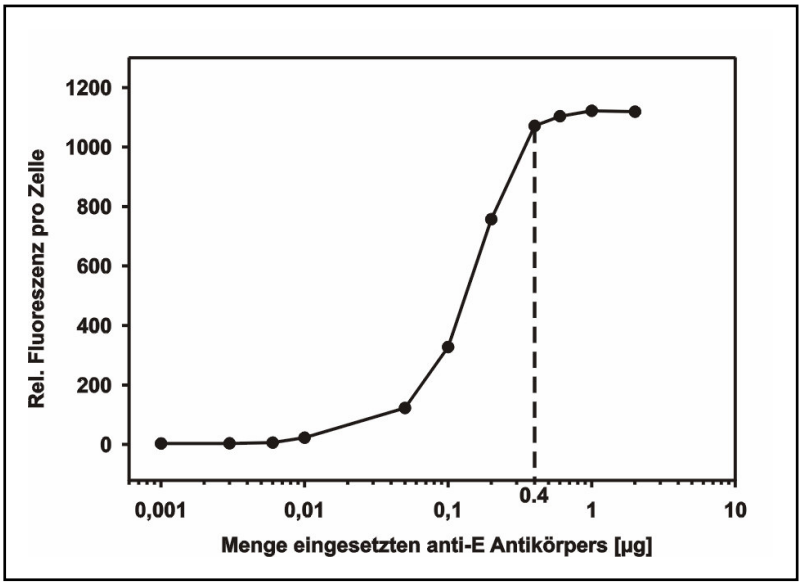


Abbildung 10. Bestimmung der Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle von *E-tag-EETI-CK^{send}* durch Titration der Bindungsstellen mit anti-E Antikörper und durchflusszytometrische Bestimmung der relativen Fluoreszenz pro Zelle bei Sättigung. Stamm: DH5αZ1, transformiert mit dem Plasmid pASKInt100-EETI-CK^{send}, vollinduziert. Aufgetragen ist die durchschnittliche relative Fluoreszenz pro Zelle gegen eine definierte und steigende Menge gebundenen anti-E Antikörpers. Bei einer Menge von 0,4 μg Antikörper ist eine Sättigung erreicht. Die daraus und aus der durchflusszytometrisch bestimmten Zellzahl errechnete Anzahl exponierter Moleküle pro Zelle beträgt in etwa 36.000.

Neben der Bestimmung der relativen Fluoreszenz pro Zelle durch Durchflusszytometrie, wurde in einem vergleichbaren Ansatz die Gesamtfluoreszenz von mit steigender anti-E Antikörpermenge markierten Proben mit definierter Zellzahl (durchflusszytometrisch bestimmt) Fluorezenz-spektrometrisch ermittelt und diese anschließend auf eine relative Fluoreszenz pro Zelle zurückgerechnet. Nach einer ähnlichen Auftragung wie in Abbildung 10 wurde die maximal gebundene Anzahl Antikörpermoleküle pro Zelle bestimmt (nicht gezeigt). Die auf diese Weise erhaltene Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle *E-tag-EETI-CK^{send}* war gut mit dem durch das Durchflusszytometrie basierte Verfahren bestimmten Wert vergleichbar. Die hier geschilderten Experimente lassen den Schluss zu, dass es in Fusion mit dem verwendeten *EaeA′* Konstrukt möglich ist, eine

vergleichsweise große Anzahl Passagierdomänen auf der Oberfläche einer *E. coli* Zelle zu präsentieren.

2.1.5 Regulation der Nettoakkumulation von *Intimin'*-Fusionsprotein in der äußeren Membran von *E. coli*

Versuche, die Nettoakkumulation von *Intimin'-EETI-CK*^{send} Fusionsprotein in der äußeren Membran durch Variation der Konzentration an Induktor der Transkription zu regulieren, scheiterten. Bei niedrigen eingesetzten Konzentrationen an Induktor waren in den meisten Zellen die Expression nicht induziert, während in einem geringen Anteil eine Vollinduktion vorlag. Mit zunehmender Konzentration an Induktor nahm der Anteil voll-induzierter Zellen zu. Allerdings wurde bei keiner der eingesetzten Konzentrationen an Anhydrotetrazyklin eine Bakterienpopulation mit intermediärer Anzahl Oberflächen-exponierter Intimin-Fusionsmoleküle erhalten. Dieses Ergebnis wurde auch bei Verwendung von *Lpp-OmpA* als Zelloberflächen-Ankerdomäne beobachtet (Daugherty *et al.*, 1999, Christmann *et al.*, 1999).

Auf Basis der Transkriptionskontrolle schien es somit nicht möglich zu sein, das Ziel einer regulierten Nettoakkumulation des Oberflächen-exponierten Intimin-Fusionsproteins zu verwirklichen. Eine Alternative sollte die zusätzliche Regulation auf Translationsebene sein. Durch die Variation der Menge an Suppressor tRNA, welche für die Translation über das *amber* Stopkodon an Position #35 des *eaeA*'-Gens hinweg notwendig ist, konnte eine Regulation bewerkstelligt werden. In Abbildung 11 ist die doppelte Regulation schematisch dargestellt.

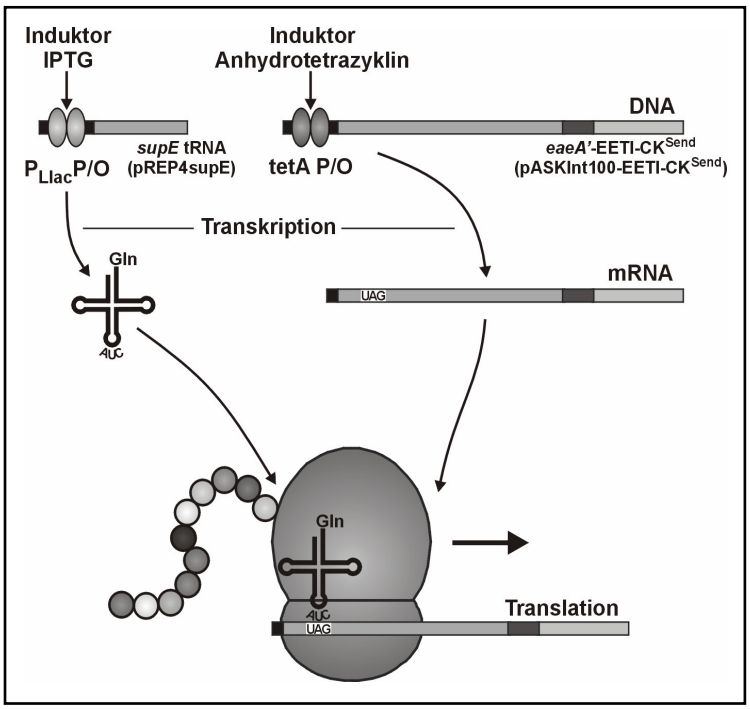


Abbildung 11. Regulation der Nettoakkumulation von *Intimin*'-Fusionsprotein in der äußeren Membran von *E. coli*. Die Induktion durch Anhydrotetrazyklin führt zur Transkription der unter *tetA* Promotor stehenden *eaeA*' mRNA von pASKInt100 aus. Die IPTG induzierte Synthese von *supE* Suppressor tRNA führt zur Suppression an dem UAG Kodon #35 des *eaeA*'-Transkripts und zu einem Translationsprodukt der vollen Länge.

Das Plasmid pREP4-supE kodiert für die Sequenz der Glutaminyl- *amber* Suppressor tRNA unter Kontrolle des P_{Llac} Promotors/Operators. Dieses Plasmid enthält einen p15A Replikationsursprung und ein Kanamycin-Resistenzgen und ist folglich kompatibel mit dem Oberflächenpräsentationsvektor pASKInt100 und seinen Derivaten.

2.1.5.1 Konstruktion des Plasmids pREP4-supE.

Das Plasmid pREP4-supE wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Harald Kolmar konstruiert (siehe Anhang 8.2.2). Hier befindet sich das *supE* tRNA-Gen unter der Kontrolle des P_{Llac} Promotors/Operators. Um dies in den Vektor pREP4 einzubringen, wurde mittels der Oligonukleotide *SupE2-Eco-up* und *SupE2-Mlu-lo* ausgehend von chromosomaler DNA von *E. coli* 71-18 als Matrize ein DNA-Segment mit den kodierenden Sequenzen für die $tRNA^{Gln(CAA)}$, die $tRNA^{Gln(CCT)}$, die $tRNA^{Met}$, die *supE* tRNA und die $tRNA^{Gln(AAT)}$ amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Mlu*I in den ebenso gespaltenen Vektor pZA22-MCS1 (Lutz & Bujard 1997, siehe auch 4.2) eingebracht. Der resultierende Vektor pZA22-supE wurde mit *Xho*I und *Xba*I gespalten, die überhängenden Enden wurden mit T4 DNA-Polymerase aufgefüllt und das die *supE* tRNA enthaltende Fragment wurde in die *Sma*I Schnittstelle des Plasmids pREP4 (Fa. Qiagen, siehe auch 4.2) kloniert, was das Plasmid pREP4-supE ergab. Die Klonierung von pREP4-supE ist in Abbildung 12 zusammenfassend dargestellt.

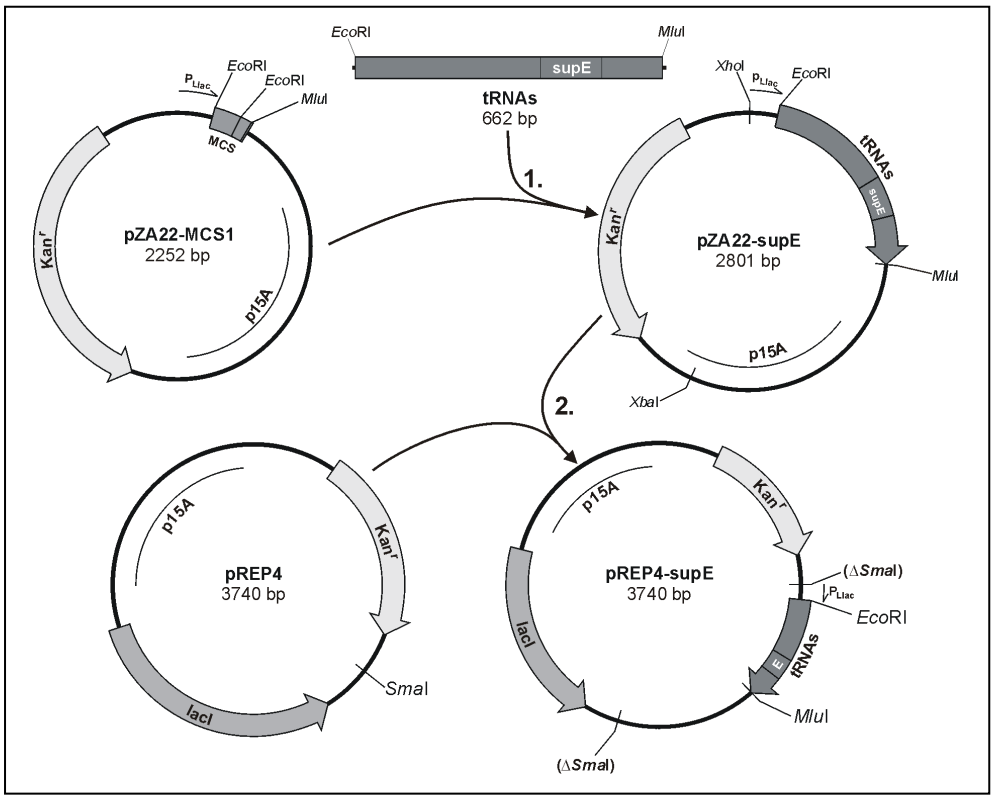


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Erzeugung des Plasmids pREP4-supE. (1.) Klonierung der Sequenz aus fünf tRNA-Genen, darunter die *supE* tRNA (bezeichnet als *supE* oder *E*) über *Eco*RI/*Mlu*I in dem Vektor pZA22-MCS1 (Lutz & Bujard, 1997, siehe auch 4.2). (2.) Umsetzen der tRNA-Gene mitsamt dem P_{Llac}-Promotor/Operatorregion aus pZA22-MCS1 über die *Sma*I-Schnittstelle des Vektor pREP4 (Fa. Qiagen, siehe auch 4.2) durch Spaltung von pZA22-supE mit *Xho*I und *Xba*I und Auffüllen der anfallenden 5' Überhänge mittels T4 DNA-Polymerase. Weitere Informationen im Text und in Kapitel 4.2.

2.1.5.2 Graduelle Induktion der Genexpression und Oberflächenpräsentation des Intimins

Zellen des Stammes WK6 (kein *amber* Suppressor-Stamm), welche die Plasmide pREP4supE und pASKInt100-EETI-CK^{send} enthielten, wurden über Nacht in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen IPTG inkubiert, um die Transkription von *amber* Suppressor tRNA zu induzieren. Zellen dieser Kultur wurden subkultiviert in identischem Medium mit derselben IPTG Konzentration. Nach Induktion mit Anhydrotetrazyklin (0,2 μg/ml) bei einer O.D.$_{600}$ von 0,2 für eine Stunde wurden die Zellen geerntet und nach Markierung mit der anti-E Kaskade durchflusszytometrisch untersucht. Die durchschnittliche, relative Fluoreszenz pro Zelle wurde bestimmt und gegen die Konzentration an Induktor IPTG aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

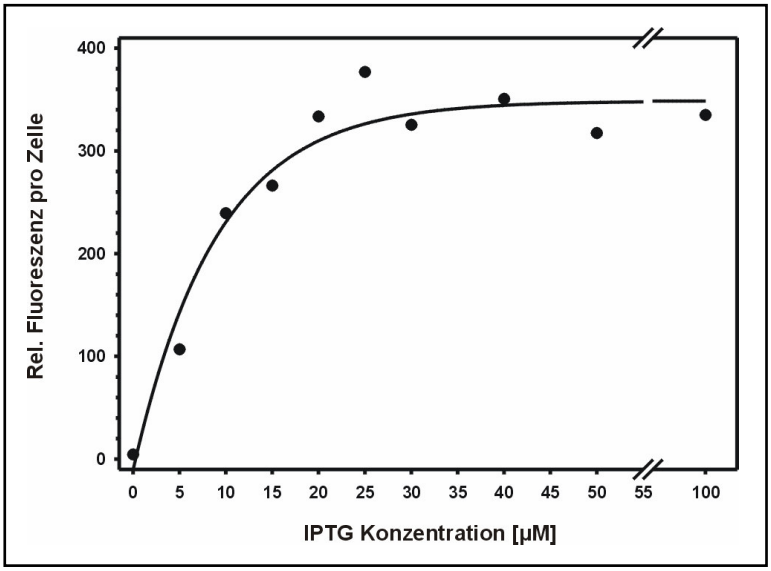


Abbildung 13. *Dose/response* Kurve der relativen Fluoreszenz *Intimin'-E-tag-EETI-CK^{send}* präsentierender Zellen, markiert mit anti-E Antikörper in Abhängigkeit von der eingesetzten IPTG Konzentration.

Bis zu einer Konzentration von 20 μM IPTG nahm die durchschnittliche Fluoreszenz pro Zelle zu. Ähnliche Kurvenverläufe lassen sich für die IPTG Modulation der Transkriptionregulation von Gen-Expressionen unter P_{Llac} Promotor/Operator Kontrolle beobachten (Lutz & Bujard, 1997). Der Maximalwert der Anzahl der auf der Zelloberfläche exponierten Moleküle war dabei immer noch in etwa 50 % unter einem Wert angesiedelt, welcher bei der Transkription eines chromosomal kodierten *amber* Suppressor tRNA-Gens, wie in DH5αZ1 oder 71-18 erreicht wird. Die dort stattfindende Überproduktion der Suppressor tRNA, die unter Kontrolle des sehr starken ribosomalen RNA Promotors steht, kann durch eine Transkription ausgehend von dem in den geschilderten Experimenten eingesetzten P_{Llac} Promotor nicht erreicht werden.

2.2 *Zelloberflächenpräsentation strukturell unterschiedlicher Domänen durch EaeA′*

In den vorangegangenen Experimenten wurde das neu entworfene Zelloberflächenpräsentationsverfahren auf der Basis des *EaeA′* Proteins enterohämorrhagischer *Escherichia coli* hinsichtlich seiner biotechnologischen Anwendbarkeit evaluiert. Der zentrale Parameter war hierbei die Vitalität der Wirtszellen bei gleichzeitiger Exposition einer möglichst großen Anzahl Moleküle auf der Zelloberfläche. Mit dem Mikroprotein *EETI-CK*^{send} wurde in diesen sondierenden Experimenten eine sehr kleine Domäne für die Exposition eingesetzt, einer möglichen Ausgangsstruktur für die Erzeugung umfangreicher konformationell fixierter Peptid-Bibliotheken und die Durchmusterung dieser Cystin-Knoten Mikroproteine nach Varianten mit neuen Bindeeigenschaften (Wentzel *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob es möglich ist, auch in ihren räumlichen Ausmaßen größere Passagierdomänen auf der Zelloberfläche zu präsentieren, wurden aufeinander folgend unterschiedliche Proteine für eine Fusion mit *Intimin′* ausgewählt. Zum Nachweis der Oberflächenexposition von mit *Intimin′* fusionierten Passagierdomänen wurde sowohl amino- als auch carboxyterminal eine Epitopsequenz angefügt. Während der *E-tag* als genereller Nachweis der Lokalisation des *EaeA′*-Konstruktes in der äußeren Membran herangezogen werden kann, da er sich unmittelbar an die Intimindomäne anschließt, kann durch den Nachweis des Sendai-Epitops eine Aussage über das Ausmaß der Präsentation einer in der Sequenz davor befindlichen Passagierdomäne getroffen werden. Wenn beide, die Passagierdomäne flankierenden Epitope Oberflächen-exponiert sind, ist es plausibel zu schließen, dass auch das dazwischen liegende Passagierprotein auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Damit ist es möglich, die Zelloberflächenpräsentation von Proteinen zu untersuchen, für die keine Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung vorliegen. Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der verwendeten Passagierdomänen werden in den nachfolgenden Abschnitten 2.2.1 bis 2.2.5 kurz beschrieben, jeweils gefolgt von der Schilderung der Experimente zu deren Oberflächenpräsentiation *via Intimin′*-Fusion.

2.2.1 Präsentation von *REI*$_v$ auf Zellen von *E. coli*

Das Intimin *EaeA* in seiner natürlichen Form exponiert insgesamt vier Domänen auf der bakteriellen Zelloberfläche. Während die C-terminale Domäne E3 eine Lektin-ähnliche Struktur hat, besitzen zumindest die beiden davor liegenden Domänen E1 und E2 eine Immunglobulin-ähnliche Faltung. Dieses Faltungsmotiv, das ausschließlich aus β-Faltblättern besteht, ist für die Domäne E0 vorhergesagt und auch die Transmembrandomäne soll demnach ausschließlich aus β-Strängen bestehen (Luo *et al.*, 2000). Als weitere Passagierdomäne für den Nachweis der Exposition durch Fusion an *EaeA′* wurde neben *EETI-CK*^{send} für einen strukturell eher konservativen Austausch ein Protein ausgewählt, das wie die *EaeA* Domänen E1 und E2 ebenfalls eine Immunglobulin-Faltungsmotiv aus β-Faltblattstrukturen (anders als E1 und E2 zusätzlich stabilisiert durch eine Disulfidbrücke) aufweist, die Immunglobulin-Domäne *REI*$_v$.

2.2.1.1 Das Bence-Jones Protein *REI*$_v$

Bence-Jones Proteine sind freie leichte Ketten von Immunglobulinen und kommen im Urin vieler Patienten vor, die an multiplem Myelom leiden (Maldonado *et al.*, 1975). Ein Beispiel aus dieser Gruppe ist das *REI* Protein, das aus der gesamten κ leichten Immunglobulin-Kette und der korrespondierenden variablen Domäne besteht (Kolmar *et al.*, 1994). Die solitäre variable Domäne der κ leichten Kette des humanen Immunglobulins wird als *REI*$_v$ bezeichnet. Das Protein hat eine Länge von 107 Aminosäuren bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 12.000.

Das in *REI*$_v$ vorliegende Immunglobulin-Faltungsmotiv besteht aus zwei einander gegenüberliegenden β-Faltblättern jeweils gebildet aus mehreren antiparallelen β-Strängen. Die sequenzielle relative Lage der einzelnen β-Stränge folgt der so genannten *„greek-key"* Anordnung (Abb. 14). Die beiden β-Faltblätter sind durch eine unter den Immunglobulin-Domänen konservierte Disulfidbrücke kovalent verknüpft, welche in dem hydrophoben Kern der Domäne verborgen ist (Amzel & Poljak, 1979). Diese eine Disulfidbrücke ist für die Aufrechterhaltung einer geordneten Faltung des Wildtyp *REI*$_v$ Proteins notwendig (Frisch *et al.*, 1994, 1996).

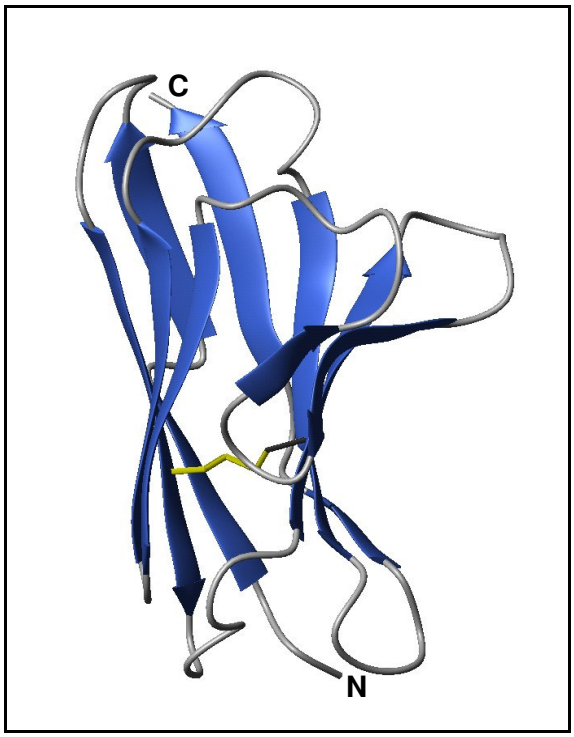


Abbildung 14. Schematische Darstellung der variablen Immunglobulin-Domäne, κ leichte Kette *REI*$_v$. β-Stränge sind mit ihrer Orientierung in Pfeilrichtung in blau, verbindende Regionen in grau dargestellt. Die eine im Molekül vorkommende Disulfidbrücke der Cystein-Reste #23 und #88 innerhalb des hydrophoben Kerns des Moleküls ist in gelb eingezeichnet. (Erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1REI, Epp *et al.*, 1975).

2.2.1.2 Klonierung des *REI*$_v$ Gens in pASKInt100

Um überprüfen zu können, ob, vermittelt durch *Intimin'*, auch *REI*$_v$ auf der *E. coli* Zelloberfläche exponiert werden kann, musste zunächst das dieser Domäne zugrundeliegende *REI*$_v$-Gen in einen Sequenzkontext mit dem *eaeA'*-Gen gestellt werden.

Dies geschah durch die Klonierung des Gens in den Präsentationsvektor pASKInt100. Das Gen für REI_v wurde durch PCR Amplifikation auf dem Plasmid pHKREI (Kolmar *et al.*, 1992, siehe auch 4.2) als Matrize sowie mittels der Oligonukleotide *EheI-up* und *REI-lo-BglII* erhalten. Das PCR-Produkt wurde mit *Eco*RV und *Bgl*II gespalten und das erhaltene Fragment mit dem *Sma*I und *Bgl*II gespaltenen Vektorfragment des Plasmids pASKInt100-(TmDegP) ligiert. Das Rezipientenplasmid ist ein Abkömmling von pASKInt100 (Wentzel *et al.*, 2001), in dem ein Fragment des *DegP*-Gens aus *Thermotoga maritima* in N-terminaler Fusion mit der kodierenden Sequenz des Sendai-Epitops vorliegt. Es besteht in diesem Vektor jedoch kein durchgehendes Leseraster zwischen dem *Intimin'-Etag-* und dem *TmDegP-Sendai*-Modul. Zwischen der kodierenden Sequenz für das E-Epitop und dem *TmDegP*-Genfragment befindet sich die *Sma*I Schnittstelle von pASKInt100, zwischen dem *TmDegP*-Genfragment und der dahinter liegenden Sendai DNA-Sequenz eine *Bgl*II Schnittstelle. Durch Klonierung von DNA Fragmenten über die Schnittstellen *Sma*I und *Bgl*II lässt sich folglich ein durchgehendes Leseraster *Intimin'-E-tag-X-Sendai* erzeugen. Auf diesem Wege wurde das Plasmid pASKInt100-REI erhalten.

2.2.1.3 Präsentation von REI_v durch Fusion an *EaeA'*

Nach der Transformation von Zellen des Stammes 71-18P' mit pASKInt100-REI wurden mit einer daraus hervorgegangenen Einzelkolonie 50 ml Chloramphenicol-haltiges dYT-Medium (25 μg/ml) inokuliert. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach Methode 5.5.1 induziert, und anschließend wurde jeweils ein geringer Volumenanteil der Kultur für die Fluoreszenzmarkierung mit der anti-Sendai- bzw. der anti-E Kaskade nach Methode 5.5.2 aufbereitet. Die Proben wurden sodann durchflusszytometrisch vermessen (Methode 5.5.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 15A dargestellt. Es ist eine Verschiebung des Kurvenmaximums hin zu höherer Fluoreszenz sowohl bei der anti-E-, als auch bei anti-Sendai-Markierung zu erkennen. Als Vergleich dienten unmarkierte Zellen desselben Typs. Die auf der Bindung des anti-Sendai Antikörpers beruhende Markierung bleibt hinter der des anti-E Antikörpers leicht zurück, was auf eine schlechtere Bindung des anti-Sendai Antikörpers zurückgeführt werden kann. In jedem Fall ist die Bindung beider Antikörper für den qualitativen Fluoreszenznachweis ausreichend. Die Immunglobulin-Domäne REI_v wird von Zellen des Stammes 71-18 gut auf der Oberfläche präsentiert.

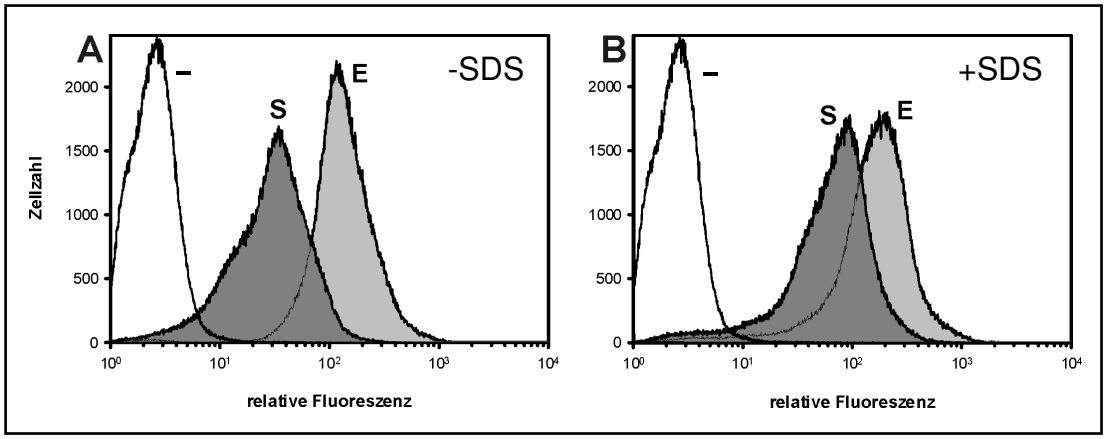


Abbildung 15. FACS Histogramme von pASKInt100-REI tragenden Zellen von 71-18P'. (A) Nach Induktion der *EaeA'*-Expression (siehe Methode 5.5.1) wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinyliertem anti-

Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt. Als Kontrolle dienten unmarkierte Zellen derselben Kultur. (B) wie (A) jedoch unter Verwendung modifizierter Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von SDS gemäß b) (siehe Text).

Zusätzlich zum Stamm 71-18P' wurde eine Exposition von REI_v auch auf Zellen des Stammes DH5αZ1 untersucht (Abb. 18B). Aus diesem Experiment geht hervor, dass das Protein hier in höherer Kopienzahl auf der Oberfläche der Zellen präsentiert wird, da das Maximum der Fluoreszenz zu höherer Kanalzahl hin verschoben ist. Der Befund einer verminderten Nettoakkumulation von REI_v im Stamm 71-18 im Vergleich zu der des EETI-II Mikroproteins weist darauf hin, dass der Prozess der Translokation durch die äußere Membran behindert ist. Möglicherweise stellt eine intakte äußere Membran eine generelle Barriere für die Translokation dar. Alternativ oder kumulativ könnte auch die Bildung eines Makrozyklus der Polypeptidkette durch kovalente Verknüpfung der Cysteinseitenketten #23 und #88 den Export der Passagierdomäne behindern. Um diese Möglichkeiten experimentell zu untersuchen, wurden zum einen während des Wachstums der Bakterien Chemikalien zugesetzt, von denen bekannt ist, dass sie Membran-destabilisierend wirken. Zum anderen wurde durch Zugabe von Reduktionsmitteln versucht, auf die Bildung von Disulfidbrücken Einfluss zu nehmen. Abweichend von den Wachstumsbedingungen nach 5.5.1 wurden folgende Versuchsanordnungen verfolgt.

a) Wachstum in Anwesenheit von EDTA einer Endkonzentration von 1 mM, gefolgt von der Induktion der Expression mit Anhydrotetrazyklin (0,2 μg/ml Endkonzentration) bei einer $O.D._{600}$ von 0,2, sodann weiteres Wachstum für eine Stunde bei 37 °C und anschließende Markierung wie oben nach Methode 5.5.2,

b) Wachstum in Anwesenheit von 0,1 % (w/v) SDS, gefolgt von der Überführung in SDS-freies Medium durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, RT) und Resuspendieren sowie Induktion der Expression mit 0,2 μg/ml Anhydrotetrazyklin bei einer $O.D._{600}$ von 0,2, sodann weiteres Wachstum für eine Stunde bei 37 °C und anschließende Markierung wie oben nach Methode 5.5.2,

c) Wachstum in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol einer Endkonzentration von 20 mM, gefolgt von der Induktion der Expression mit 0,2 μg/ml Anhydrotetrazyklin bei einer $O.D._{600}$ von 0,2, sodann weiteres Wachstum für eine Stunde bei 37 °C und anschließende Markierung wie oben nach Methode 5.5.2,

d) Verwendung des Stammes 71-18dsbA [*DsbA* ist in *E. coli* für die Bildung von Disulfidbrücken essentiell und beschleunigt deren Ausbildung *in vivo* (Bardwell *et al.*, 1991)] und Wachstum ohne weitere Zusätze, Induktion der Expression gemäß Methode 5.5.2,

e) wie a) unter Verwendung des Stammes 71-18dsbA,

f) wie b) unter Verwendung des Stammes 71-18dsbA,

g) wie c) unter Verwendung des Stammes 71-18dsbA.

Die Nettoakkumulation von REI_v auf der Oberfläche von 71-18P' Zellen konnte nur durch Anwendung der Wachstumsbedingungen nach c) (0,1 % (w/v) SDS im Medium) ein

wenig erhöht werden. Das Ergebnis dieser Optimierung ist in Abbildung 15B in Form eines durchflusszytometrischen Diagramms wiedergegeben. Die hier unter a) bis g) aufgeführten Modifikationen des Standardverfahrens fanden auch bei der Optimierung der Präsentation der in den folgenden Kapiteln vorgestellten Passagierdomänen Anwendung. Durch die Behandlung mit SDS wird die äußere Membran der Zellen möglicherweise soweit destabilisiert, dass der Transmembrantransport von in diesem Falle REI_v auf 71-18P'-Zellen erleichtert wird. Ein Einfluss des Detergenz auf die Proteinfaltung sollte in dem gewählten Versuchsaufbau nicht bestehen, da das SDS-haltige Medium vor der Induktion der Expression des Fusionsproteins bereits wieder durch SDS-freies Medium ersetzt wurde. Die verbesserte REI_v Exposition durch Zusatz von SDS deutet darauf hin, dass die Beschaffenheit der äußeren Membran der Zellen einen wichtigen Einfluss auf die Translokation der Passagierdomäne REI_v durch das Intimin *EaeA* hat.

2.2.2 Präsentation von Interleukin 4 auf Zellen von *E. coli*

Das vorangegangene Kapitel beschreibt die *Intimin'* vermittelte Oberflächenpräsentation der Immunglobulin-Domäne REI_v, einem Protein mit ausschließlich aus β-Strängen bestehenden Sekundärstrukturelementen, stabilisiert durch eine Disulfidbrücke, auf Zellen von *E. coli* 71-18P'. Im Rahmen dieses als eher konservativ anzusehenden Austausches der natürlichen Immunglobulin-ähnlichen Domäne E2 von *EaeA* durch REI_v konnte eine gute Präsentation nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob es möglich ist, neben *all-β* Proteinen auch Proteine mit α-helikalen Sekundärstrukturelementen über *Intimin'* zu präsentieren, wurde das humane Interleukin 4 als Passagierdomäne ausgewählt.

2.2.2.1 *Homo sapiens* Interleukin 4

Interleukin 4 (*Il-4*) lässt sich in die Gruppe der Zytokine einordnen. Zytokine werden unter anderem durch Zellen des Immunsystems gebildet und dienen dort als Mediatorsubstanzen. Sie sind verantwortlich für die Induktion und den Verlauf der T-Zell-vermittelten zytotoxischen Immunreaktion sowie die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen (Janeway & Travers, 1995). Als Interleukine werden allgemein solche Zytokine bezeichnet, welche von T-Zellen produziert werden. Interleukin 4 wurde in der Literatur zunächst als B-Zell-Wachstumsfaktor (*BSF-1* bzw. *BCGF-I*) beschrieben (Yokota, *et al.*, 1986, Coffman *et al.*, 1986) und wird von aktivierten T-Helferzellen (T_H2-Zellen) sezerniert (Del Prete, 1992) und ist außerdem in der Lage, das Verhältnis von T_H1-Zellen zu T_H2-Zellen hin zu letzteren zu verschieben (z.B. Rocken *et al.*, 1994). Interleukin 4 wird aus diesem Grund als antiinflammatorisch wirkendes Zytokin z.B. bei der Therapie von Psoriasis (Schuppenflechte) oder bei anderen T_H1 assoziierten Autoimmunkrankheiten in der Medizin eingesetzt (Ghoreschi *et al.*, 2003). Es wirkt als autokriner T-Zell-stimulierender Faktor in Abwesenheit von *Il-2* (z.B. Fernandez-Botran *et al.*, 1986) und stimuliert die Produktion von *IgE* bei hoher Konzentration sowie die von *IgG1* bei niedriger Konzentration (z.B. Snapper *et al.*, 1988). Weiter steigert *Il-4* die Expression von MHC-Antigenen (z.B. Noelle *et al.*, 1986). In seiner Funktion als *„switching factor"* ist es als Differenzierungsfaktor am Wechsel der schweren Immunglobulin Ketten bei der Antikörperproduktion beteiligt (z.B. Lebman & Coffman, 1988). Weitere Effekte im Zusammenhang mit *Il-4* ist die Hemmung der T-Zell Proliferation und zusammen mit *Il-3* die Proliferation von Mastzellen (Jansen *et al.*, 1990).

Interleukin 4 wirkt als monomeres Protein. Seine 129 Aminosäuren machen ein relatives Molekulargewicht von etwa 14.000 aus. Die Peptidkette faltet in eine globuläre Struktur mit hydrophobem Kern, die maßgeblich aus einem Vier-Helix-Bündel besteht (Abb. 16). Stabilisiert wird die Faltung von *Il-4* durch die Ausbildung dreier Disulfidbrücken (Müller *et al.*, 1995). Ausgang für die von *Il-4* vermittelte Wirkung ist dessen Bindung an unterschiedliche Typen von *Il-4* Rezeptor-Komplexen und die Auslösung einer Signaltransduktions-Kaskade gefolgt von Genaktivierung und Zellproliferation (Janeway & Travers, 1995).

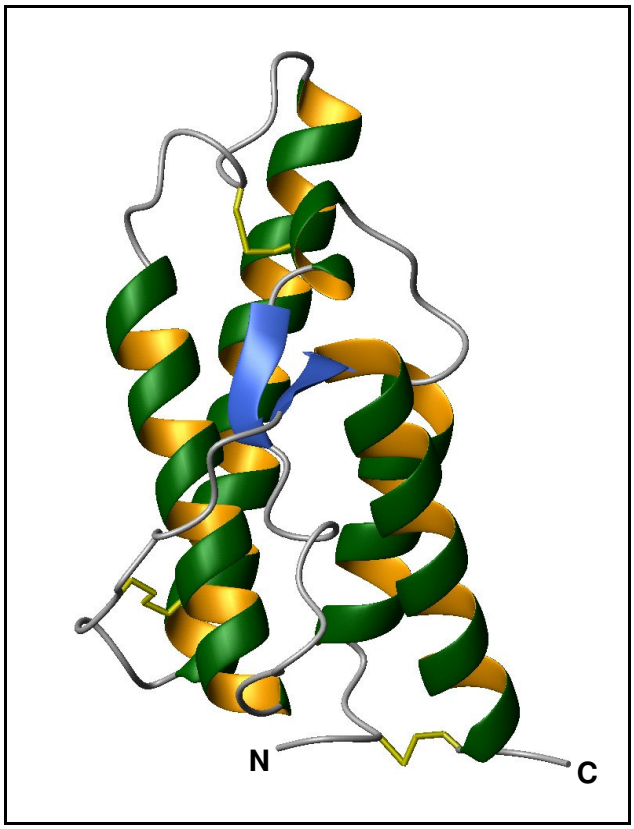


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Struktur des humanen Interleukin 4. β-Stränge sind mit ihrer Orientierung in Pfeilrichtung in blau, α-Helices in grün-orange, verbindende Regionen in grau dargestellt. Die drei im Molekül vorkommenden Disulfidbrücken der Cystein-Reste #3 und #127, #24 und #65 sowie #46 und #99 innerhalb des Moleküls sind in gelb eingezeichnet. (Erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1HIK, Müller *et al.*, 1995).

2.2.2.2 Klonierung des Interleukin 4 Gens in pASKInt100

Das *Il-4*-Gen lag zu Beginn der Arbeit bereits kloniert in dem Plasmid pRPR9IL-4FD vor, welches dankenswerter Weise von Dr. Karlheinz Friedrich, Universität Jena, zur Verfügung gestellt wurde. Das *Il-4* Gen wurde mit den Primern *IL4-up* und *IL4-send-low* amplifiziert. pRPR9IL-4FD diente in der PCR als Matrize. *IL4-send-low* führte dabei die kodierende Sequenz für das Sendai-Epitop ein. Das PCR-Produkt wurde mit *Sma*I und *Bam*HI gespalten und mit dem ebenso gespaltenen Vektor pASKInt100-EETI-CK^{send} ligiert. Das resultierende Plasmid erhielt den Namen pASKInt100-IL4.

2.2.2.3 Präsentation von *Il-4* durch Fusion an *EaeA′*

Nach der Transformation von Zellen des Stammes 71-18P' mit dem Plasmid pASKInt100-IL4 wurden mit einer daraus hervorgegangenen Einzelkolonie 50 ml Chloramphenicol-haltiges (25 μg/ml) dYT-Medium inokuliert. Die Zellen wurden nach Methode 5.5.1 behandelt und anschließend wurde jeweils ein geringer Volumenanteil der Kultur für die Fluoreszenzmarkierung mit der anti-Sendai bzw. der anti-E Kaskade nach Methode 5.5.2 aufbereitet. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Methode 5.5.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 17A dargestellt. Es ist eine deutliche Verschiebung des Kurvenmaximums hin zu höherer Fluoreszenz lediglich bei der anti-E, nur sehr geringfügig bei der anti-Sendai Markierung zu erkennen. Als Vergleich dienten hier dieselben unmarkierten Zellen wie sie unter 2.2.1.3 Verwendung fanden.

Neben dem Stamm 71-18P' wurde auch für die Oberflächenpräsentation von *Il-4* zusätzlich der Stamm DH5αZ1 verwendet. Vergleicht man das Ergebnis der Präsentation von *Il-4* auf Zellen von 71-18P' mit der Präsentation von *Il-4* auf Zellen von DH5αZ1 (Abbildung 18C) so scheint dieses Protein auf 71-18P' deutlich schlechter präsentierbar zu sein. Die Anwesenheit einer starken Immunfluoreszenz nach Zellmarkierung mit dem anti-E Antikörper bei gleichzeitig nur geringfügiger Ausprägung einer anti-Sendai Markierung legt den Schluss nahe, dass die Translokation der *Il-4* Domäne durch die äußere Membran von 71-18P' stark behindert ist.

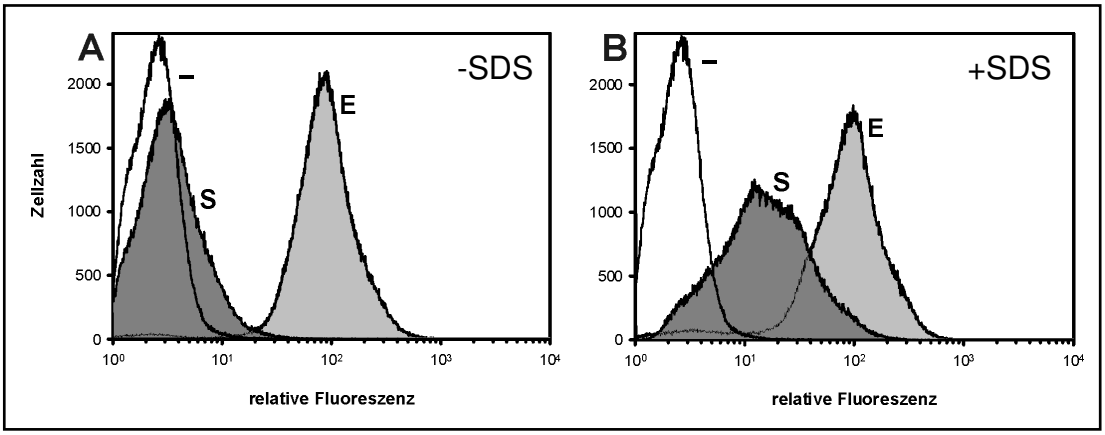


Abbildung 17. FACS Histogramme von pASKInt100-IL4 tragenden Zellen von 71-18P'. (A) Nach Induktion der *EaeA′*-Expression (siehe Methode 5.5.1) wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinyliertem anti-Maus-Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt. Als Kontrolle dienten unmarkierte Zellen derselben Kultur. (B) analog (A) jedoch unter Verwendung modifizierter Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von SDS gemäß b) (siehe 2.2.1.3).

Das *Il-4*-Gen tragende Zellen desselben Typs wurden während des Kulturwachstums ebenfalls den in 2.2.1.3 angegebenen Bedingungen a) bis c) unterzogen. Hier hatte die Behandlung der Zellen nach Bedingung b) (Anwesenheit von 0,1 (w/v) SDS im Medium während des Wachstums vor der Induktion) einen deutlichen Einfluss auf den Nachweis des Sendai-Epitops und somit die Zelloberflächenexposition von Interleukin 4, während die Verwendung von EDTA und β-Mercaptoethanol im Wachstumsmedium keinen messbaren Einfluss auf die Oberflächenexposition hatte. Das Wachstum in Anwesenheit von SDS im Medium führte zu einer deutlichen Verbesserung der Präsentation bis hin zu einer

Ausprägung wie sie bei Verwendung von DH5αZ1 als Wirtsstamm zu beobachten war (siehe Abbildung 18C). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis liegt auch hier in einer möglichen Membran-destabilisierenden Wirkung von SDS (vgl. 2.2.1.3).

2.2.3 Vergleich der Präsentation von *EETI-CK^{send}*, *REI$_v$* und *Il-4* über das *EaeA′*-basierte Zelloberflächenpräsentationssystem

Präsentationsexperimente von *REI$_v$* und *Il-4* auf Zellen von 71-18P' erbrachten experimentelle Evidenzen, dass strukturell unterschiedliche Domänen unterschiedlich gut über *Intimin′* auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. In einem vergleichenden Präsentationsexperiment unter Verwendung des Stammes DH5αZ1 wurden die Domänen *EETI-CK^{send}*, *REI$_v$* und *Il-4 via* Fusion an *Intimin′* auf Zellen von *Escherichia coli* präsentiert. Zellen von DH5αZ1 wurden mit den Plasmiden pASKInt100-EETI-CK^{send}, pASKInt100-REI bzw. pASKInt100-IL4 transformiert. Nach Induktion mit Anhydrotetrazyklin (5.5.1) wurden die Zellen mit der anti-E und der anti-Sendai Markierungskaskade Immunfluoreszenz-markiert (5.5.2). Die derart behandelten Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert (5.5.3). Alle drei Konstrukte mit unterschiedlichen Passagierproteinen konnten mit beiden Antikörpern auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 18A-C dargestellt.

Die Behandlung intakter Zellen mit Proteasen kann als Nachweis der Oberflächenpräsentation dienen (Francisco *et al.*, 1992, Klauser *et al.*, 1992). Nach entsprechender Behandlung sollte der extrazelluläre Anteil des Präsentationskonstruktes in der Membranfraktion nicht mehr nachweisbar sein. Um den Nachweis der Oberflächenexposition der Passagierdomäne zu führen, wurden Zellen von DH5αZ1, welche mit den Plasmiden pASKInt100-EETI-CK^{Send}, pASKInt100-REI bzw. pASKInt100-IL4 transformiert worden waren, bis zu einer O.D.$_{600}$ von 0,8 herangezogen, mit ATC induziert und nach weiteren drei Stunden Wachstum geerntet. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und die Suspension wurde auf eine O.D.$_{600}$ von 10 eingestellt. Nach Zugabe von Trypsin mit einer Endkonzentration von 50 μg/ml für 10 min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ebenso wie bei unbehandelten Kontrollzellen die Membranfraktion isoliert (vgl. 5.4.2). Dazu wurden die Zellen mittels *French Press* und Ultraschall aufgeschlossen und nicht lysierte Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach Inkubation auf Eis in 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton-X 100 für 30 min, 120 min mit 100.000 g bei 15 °C abzentrifugiert. Die Membranfraktion wurde in Protein-Probenpuffer aufgenommen und einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (5.4.3) gefolgt von einem *Western Blot* (5.4.5) unterworfen. In letzterem wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Sendai-Epitop verwendet (Einberger *et al.*, 1990). Das Ergebnis ist in Abbildung 18D-E wiedergegeben.

Die auftretenden Abbaubanden können auf eine aminoterminale bzw. in der Schleifenregionen der Transmembrandomäne stattgefundene Prozessierung zurückgeführt werden. Die carboxyterminale Spaltung würde dazu führen, dass das Konstrukt nach Verlust des Sendai-Epitops nicht mehr nachweisbar wäre. Ohne Behandlung mit der Protease Trypsin konnte in jedem der drei untersuchten Fälle im Vergleich zu den Kontrollpräparationen eine Bande in der erwarteten Höhe beobachtet werden, welche nach

Trypsin-Behandlung nicht mehr vorhanden war. Dies belegt die Anwesenheit und die Exposition dieser drei untersuchten Passagierproteine auf der Oberfläche der Zellen.

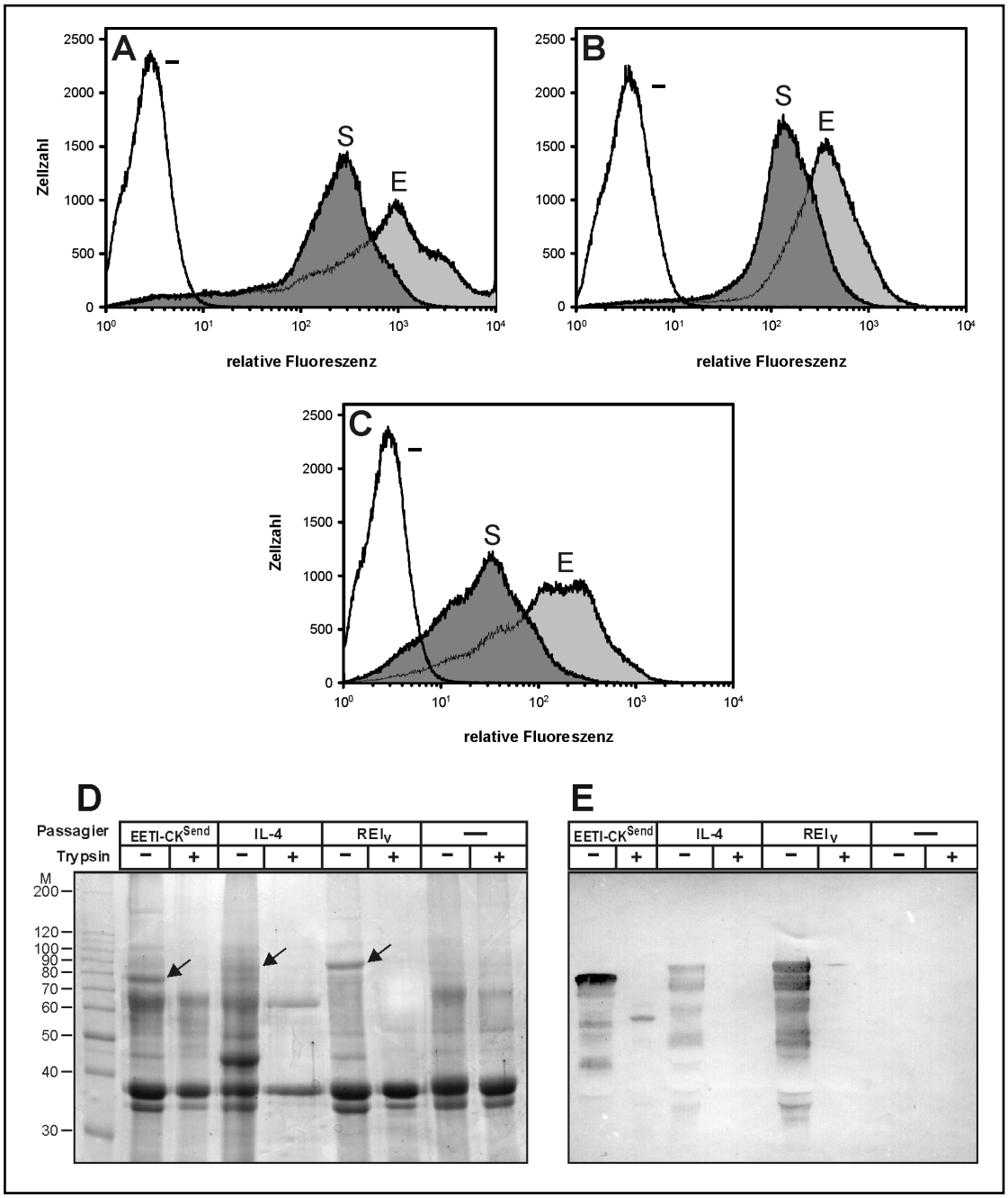


Abbildung 18. FACS Histogramme von induzierten, pASKInt100-EETI-CK^{send} (A), pASKInt100-REI (B) bzw. pASKInt100-IL4 (C) tragenden Zellen von DH5αZ1. Induzierte Zellen wurden nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinyliertem anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat. Als Kontrolle (-) dienten untransformierte Zellen von DH5αZ1, markiert mit anti-E Kaskade (5.5.2). SDS-PAGE (D) und Western Blot (E) zur Analyse von Oberflächenlokalisation und Protease Zugänglichkeit von *Intimin'-EETI-CK^{Send}*, *Intimin'-Il-4* und *Intimin'-REI$_v$* Fusionsproteinen. Membranpräparationen von das jeweilige Passagierprotein präsentierenden DH5αZ1 Zellen wurden durch *SDS-PAGE* und *Western Blot*, entwickelt mit anti-Sendai Antikörper, analysiert. Zum Nachweis der Oberflächenlokalisation wurden von einem Anteil der mit Trypsin behandelten (+ Trypsin) oder unbehandelten Bakterien die Membranen präpariert (- Trypsin). Die jeweilige *Intimin'*-Fusion der erwarteten Volllänge ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Größen der Markerproteine sind angegeben (x 1000).

Im Vergleich zu *EETI-CK*^{send} und *REI*$_v$ fällt die Akkumulation von *Il-4* geringer aus, was konsistent ist mit dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Analysen der drei Oberflächen-präsentierten Konstrukte (Abb. 18A-C). In diesen ist das Maximum der zellulären Fluoreszenz bei *Il-4* in etwa eine Größenordnung geringer als bei den beiden anderen Konstrukten.

2.2.4 Präsentation von Calmodulin auf Zellen von *E. coli* 71-18P'

Die Oberflächenpräsentation von *REI*$_v$ besonders jedoch die von Interleukin 4 über das *Intimin'* basierte Präsentationsverfahren auf Zellen des Stammes 71-18P' konnte durch die Modifikation der Wachstumsbedingungen deutlich verbessert werden. Ohne die Zugabe von SDS während des Kulturwachstums war eine effiziente Exposition von *Il-4* auf diesem Stamm nicht möglich (2.2.2.3). Offenbar gibt es für Proteine gleicher Länge, wie *REI*$_v$ und *Il-4*, Determinanten, die die unterschiedliche Translokationseffizienz bestimmen. Für die Passage durch die Zytoplasmamembran war gezeigt wurden, dass eine Faltung im Zytoplasma mit einer Translokation durch die Membran nicht vereinbar ist (Randall & Hardy, 1986, Arkowitz *et al.*, 1993). In einem eleganten Experiment konnten Arkowitz und Mitarbeiter zeigen, dass Dihydrofolatreduktase mit angefügter Signalsequenz in das Periplasma exportiert wurde. Wenn hingegen die Zellen in Gegenwart der Liganden Methotrexat und NADPH kultiviert wurden, welcher im aktiven Zentrum des Enzyms bindet und dadurch das gefaltete Protein stabilisiert wird, war hier kein Proteinexport zu beobachten. Möglicherweise gilt dies auch für einen Export durch die äußere Membran. Es wurde daher als weiterer Kandidat für die Untersuchung des Proteinexports ein Protein ausgewählt, dessen Faltung durch den Zusatz von Agenzien moduliert werden kann, das Kalzium-bindende Protein Calmodulin.

2.2.4.1 Calmodulin

Calmodulin ist ein kleines, Hitze-stabiles Protein, das als Aktivator auf eine Vielzahl zellulärer Enzyme wirkt. Dazu gehören Proteinkinasen, und –phosphatasen, Adenylyl-zyklase, Kalziumpumpen der Plasmamembran, Proteine des Zytoskeletts wie z.B. Myosin I, Phosphofruktokinase, rasGAP, rasGEF und eine Vielzahl an Ionenkanälen (Cohen & Klee, 1988, Eldik & Watterson, 1998). Das Molekül ist in der Lage, Kalzium-Ionen mit hoher Affinität zu binden (Means & Dedman, 1980), was in den meisten aber nicht allen Fällen Voraussetzung für die Assoziation mit einem Zielprotein ist. Die Menge des Proteins kann bis in den prozentualen Bereich des zytosolischen Gesamtproteins einer Zelle reichen, vor allem in solchen Geweben, welche mit neuronalen Prozessen assoziiert sind, die stark von der Kalzium-Regulation abhängen. Das in eukaryotischen Zellen ubiquitäre und hoch konservierte Calmodulin ist somit der wichtigste intrazelluläre Kalzium-Ionen Rezeptor (Cohen & Klee, 1988). Sein Aktivierungsmechanismus ist am besten im Falle der Proteinkinasen verstanden. Calmodulin bindet dort an die autoinhibitorische Domäne, wodurch das katalytische Zentrum der Kinase freigelegt wird, es kommt zur Phosphorylierung, meist der Ausgangspunkt einer vielstufigen Signaltransduktionskaskade (Eldik & Watterson, 1998).

Die molekulare Struktur von Calmodulin ist gut untersucht und wurde 1988 durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Babu *et al.*, 1988). Das 148 Aminosäuren lange Molekül

mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 16.800 besteht aus zwei globulären Domänen, welche durch einen helikalen *Linker* verbunden sind. Jede der beiden endständigen Bereiche besteht aus zwei Helix-Loop-Helix Motiven, welche jeweils in der Lage sind, Kalzium-Ionen zu komplexieren. Ein Molekül Calmodulin ist somit befähigt, vier Kalzium-Ionen auf kooperative Weise zu binden (Keller *et al.*, 1982, Klevit *et al.*, 1984, Linse *et al.*, 1991, Pedigo & Shea, 1995). Die Bindung bewirkt konformationelle Änderungen hin zu einer gestreckteren Form des Moleküls (Abb. 19). Die beiden endständigen Domänen besitzen ausgeprägte hydrophobe Bereiche, die in der Lage sind, ebensolche ihrer Bindungsstellen zu binden (Tanaka *et al.*, 1982, Persechini & Kretsinger, 1988, Babu *et al.*, 1988). Die flexible, α-helikale Verbindungsregion erlaubt zudem eine Varianz im Abstand der beiden Domänen zueinander, möglicherweise um eine Vielzahl unterschiedlicher Zielregionen mit Affinitäten bis in den niederen nanomolaren Bereich hinein zu adressieren (Persechini & Kretsinger, 1988).

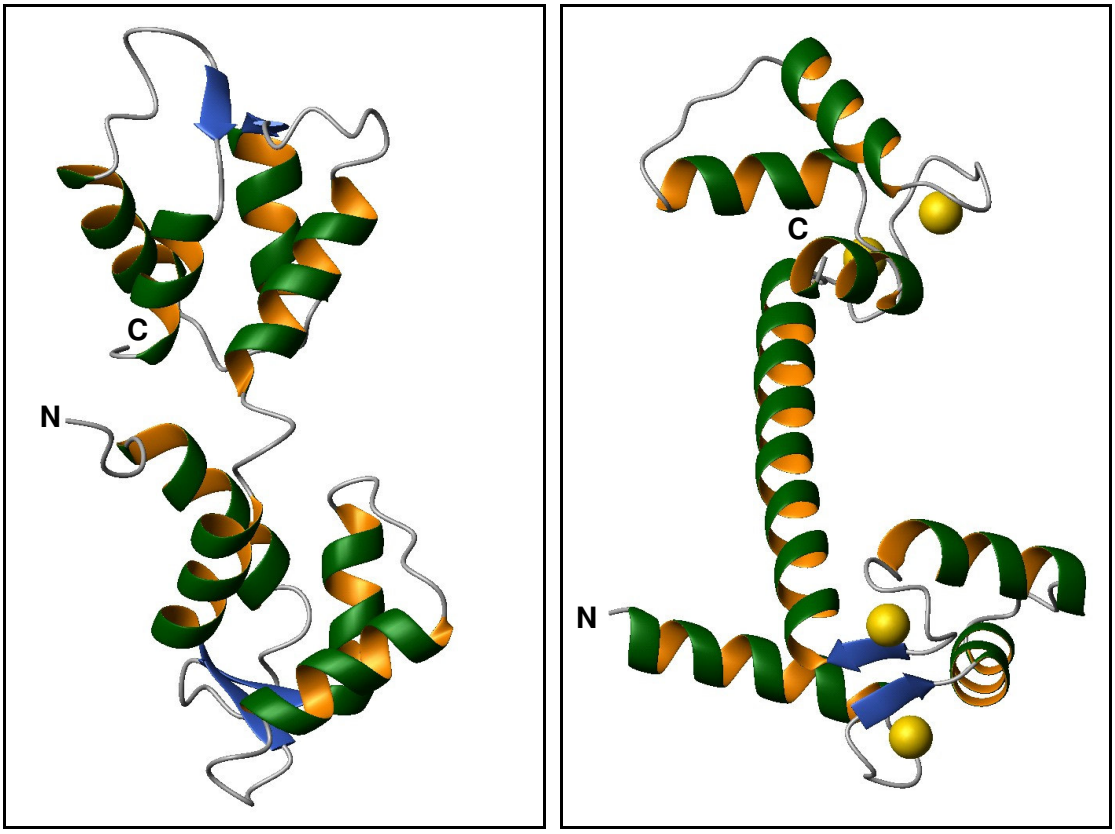


Abbildung 19. Schematische Darstellung der Struktur von Calmodulin ohne (links) und mit gebundenen Kalzium-Ionen (rechts). β-Stränge sind mit ihrer Orientierung in Pfeilrichtung in blau, α-Helices in grün-orange, verbindende Regionen in grau dargestellt, vier gebundene Kalzium-Ionen sind als gelbe Kugeln wiedergegeben. (Erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1CFC, Kuboniwa *et al.*, 1995; 1CLL, Chattopadhyaya *et al.*, 1992).

2.2.4.2 Klonierung des Calmodulin-Gens in pASKInt100

Die kodierende Sequenz des humanen Calmodulin-Gens wurde durch eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide *Calmodulin-SmaI-up* und *Calmodulin-BglII-low* amplifiziert. Als Matrize diente hier das Calmodulin-Gen aus einer humanen Herzmuskel-cDNA-Bank. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bgl*II gespalten

und in den ebenfalls mit diesen Enzymen behandelten und gereinigten Präsentationsvektor pASKInt100-(TmDegP) (siehe 2.2.1.2) kloniert. In dem so erhaltenen Plasmid pASKInt100-Cal befindet sich das Calmodulin-Gen in einem durchgehenden Leseraster zwischen den kodierenden Sequenzen für *EaeA′-E-tag* und das Sendai-Epitop.

2.2.4.3 Präsentation von Calmodulin durch Fusion mit *EaeA′*

Nach der Transformation von 71-18P' Zellen wurden mit einer daraus erhaltenen Einzelkolonie 50 ml Chloramphenicol-haltiges dYT-Medium (25 μg/ml) inokuliert. Die Zellen wurden nach Methode 5.5.1 induziert, und anschließend wurde jeweils ein Aliquot der Kultur für die Fluoreszenzmarkierung mit der anti-Sendai Kaskade bzw. der anti-E Kaskade nach Methode 5.5.2 aufbereitet. Die Proben wurden auch in diesem Fall anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Methode 5.5.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 20A dargestellt. Eine deutliche Verschiebung des Kurvenmaximums hin zu höherer Fluoreszenz ist lediglich bei der anti-E Markierung zu erkennen. Eine anti-Sendai Markierung konnte nicht nachgewiesen werden. Das Signal unmarkierter Zellen unterschied sich nicht von dem Ansatz mit anti-Sendai Markierung. Calmodulin ist mit dem *EaeA′* basierten Präsentationsverfahren unter den hier gewählten Parametern nicht auf der Oberfläche präsentierbar.

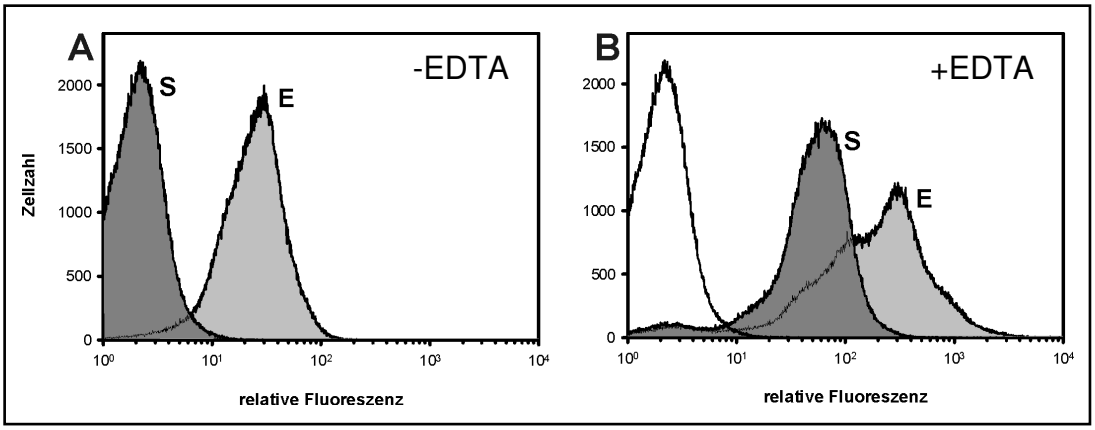


Abbildung 20. FACS Histogramme von pASKInt100-Cal tragenden Zellen von 71-18P'. (A) Nach Induktion der *EaeA′*-Expression (siehe Methode 5.5.1) wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinylierten anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt. (B) Analog (A) jedoch unter Verwendung modifizierter Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von EDTA gemäß a) (siehe 2.2.1.3).

Auch hier wurden die Bedingungen a) bis c) wie unter 2.2.1.3 aufgeführt angewandt. Eine Anzucht der Bakterien in Gegenwart von EDTA brachte eine sehr deutliche Verbesserung der Präsentation, die übrigen Bedingungen hatten hier keinen signifikanten Einfluss. Das Ergebnis nach a) ist in Abbildung 20B wiedergegeben. Es ist eine Verschiebung des Maximums der relativen Fluoreszenz um fast zwei Größenordnungen zu verzeichnen.

Calmodulin besitzt zur Aufrechterhaltung der funktionellen Struktur pro Molekül vier Kalzium-Ionen. Die Entfernung der Kalzium-Ionen hat eine dramatische strukturelle Änderung zur Folge (Kuboniwa *et al.*, 1995). Das Protein zeigt auch in diesem Fall eine Struktur, hauptsächlich gebildet aus zwei globulären Domänen. Sind keine Kalzium-Ionen gebunden, besteht zwischen den beiden überwiegend α-helikalen Domänen kein stabiler

direkter Kontakt (Abbildung 19), wie dies nach Kalziumbindung über die gestreckte α-Helix der Fall ist. Die Präsentation von Calmodulin über *EaeA′* scheint nur im Kalzium-freien Zustand, dann aber sehr effizient möglich zu sein. Die während des Wachstums eingesetzte EDTA ist in der Lage, die im Medium vorhandenen Kalzium-Ionen zu komplexieren. Die mit gebundenem Kalzium offensichtlich nicht Präsentations-permissive Struktur der Domäne wird in die permissive überführt, so dass eine Oberflächenexposition sehr gut möglich und über das Sendai-Epitop nachweisbar ist. Weiter noch war es möglich, nach erneuter Zugabe von Kalzium-Ionen auf die unstrukturiertes Calmodulin exponierenden Zellen eine Konversion des Proteins in den funktionellen Faltungszustand zu induzieren. Calmodulin bindet einen definierten Bereich der Myosin *light chain* Kinase (MLCK, Blumenthal *et al.*, 1985, Blumenthal & Krebs, 1987, Gallagher *et al.*, 1997). Dieses Myosin-Kinase-Peptid wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Harald Kolmar rekombinant in Fusion mit *TEM-1* β-Laktamase und Sendai-Epitop in *E. coli* produziert, isoliert und gereinigt. Zellen von 71-18P', welche das Plasmid pASKInt100-Cal trugen, wurden in Anwesenheit von 1 mM EDTA im Wachstumsmedium (Wachstumsbedingungen a) in 2.2.1.3) kultiviert, die Expression wurde induziert. Ein Aliquot der Kultur wurde abzentrifugiert, die Zellen wurden in 500 μl 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0 mit 50 mM NaCl und 100 mM $CaCl_2$ aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert und auf den Zellen gemäß Methode 5.5.2 eine Markierung mit anti-β-Laktamase, polyklonalem Kaninchen-Antiserum, biotinyliertem anti-Kaninchen Antikörper und letztlich Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat angebracht. Sodann wurde die Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Methode 5.5.3). Parallel zur Markierung der Zellen mit anti-β-Laktamase Antikörper wurde zum Nachweis der Oberflächenexposition zusätzlich auch eine anti-E bzw. eine anti-Sendai Markierung angebracht. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 dargestellt.

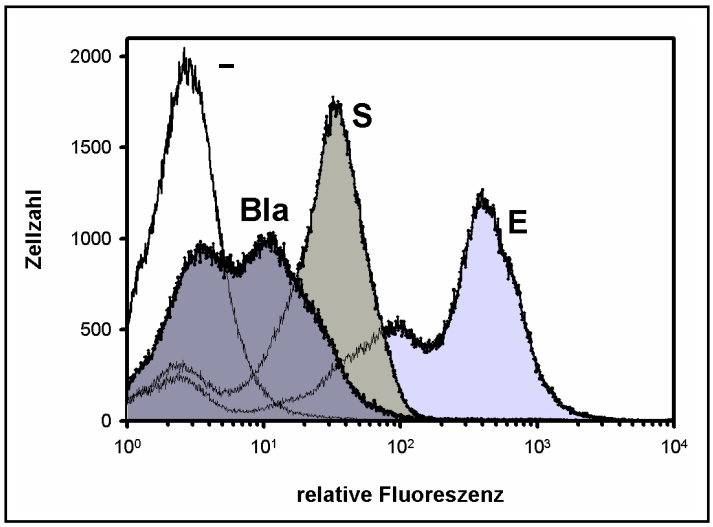


Abbildung 21. Durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenzmarkierung Calmodulin-präsentierender Zellen von 71-18P'. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 1 mM EDTA gemäß a) in Kapitel 2.2.1.3 kultiviert. Nach Induktion der *EaeA′*-Expression wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E) bzw. Myosin-Kinase-Peptid/β-Laktamase-Fusionsprotein und anti-β-Laktamase (Bla), biotinyliertem anti-Maus (S und E) bzw. anti-Kaninchen (Bla) Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt.

Das Ergebnis dieses Experimentes legt den Schluss nahe, dass durch die Zugabe von Kalzium-Ionen nach der Expression von Calmodulin, dessen Translokation durch die äußere Membran ohne gebundene Kalzium-Ionen im Molekül sowie dessen Exposition auf der Zelloberfläche die Funktionalität des Proteins wieder hergestellt werden konnte. Ein natürliches Substrat von Calmodulin, die Binderegion der Myosin-Kinase, konnte in Fusion mit β-Laktamase auf der Oberfläche fixiert nachgewiesen werden. Wurden die Calmodulin exprimierenden Zellen ohne EDTA im Wachstumsmedium kultiviert, oder wird nach dem Hervorrufen der Oberflächenexposition die native Faltung nicht durch Bereitstellung von Kalzium-Ionen wieder hergestellt, konnte keine Bindung des Fusionsproteins festgestellt werden (nicht gezeigt).

Der Befund, dass Calmodulin nur dann über *Intimin'* durch die äußere Membran transloziert und auf der Zelloberfläche verankert nachgewiesen werden kann, wenn sich im Molekül keine die native Struktur aufrechterhaltenden Kalzium-Ionen befinden, stützt die Hypothese, dass eine Grundvoraussetzung der Präsentation von Passagierdomänen über *EaeA'* eine zumindest partielle Entfaltung des zu translozierenden Proteins ist.

2.2.5 Präsentation von *Streptomyces clavuligerus* β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*) auf Zellen von *E. coli* 71-18P'

Nachdem mit REI_v eine ausschließlich aus β-Faltblatt aufgebaute Passagierdomäne und mit *Il-4* und Calmodulin zwei Proteine mit zumindest überwiegend α-helikaler Molekülstruktur über *Intimin'* präsentiert worden sind, sollte nun ein Protein Oberflächen-exponiert werden, das beide Sekundärstrukturelemente enthält. Außerdem sollte dem Einfluss der Ausbildung von Disulfidbrücken erhöhte Aufmerksamkeit erteilt werden. Die ausgewählte Domäne war das β-Laktamase-Inhibitor Protein *BLIP* aus *Streptomyces clavuligerus*.

2.2.5.1 Das *Streptomyces clavuligerus* β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*)

Das β-Laktamase Inhibitor Protein (Doran *et al.*, 1990) ist ein potenter Inhibitor einer Vielzahl von β-Laktamasen, darunter auch die *TEM-1* β-Laktamase aus *Escherichia coli*. Letztere wird mit einer Konstante K_i von 0,1 nM gebunden und inhibiert (Strynadka *et al.*, 1996b). Das Exoenzym aus *Streptomyces clavuligerus* besteht aus 165 Aminosäuren und besitzt ein relatives Molekulargewicht von 17.500.

Die Molekülstruktur des β-Laktamase Inhibitor-Proteins (*BLIP*) wurde 1996 kristallographisch gelöst (Strynadka *et al.*, 1994, 1996b). *BLIP* besteht aus zwei aufeinanderfolgenden, strukturell ähnlichen Domänen, welche eine polare, konkave Oberfläche bilden (Abb. 22). Es ist damit in der Lage, die ebenfalls polare aber konvexe Oberfläche der β-Laktamase zu binden. Die β-Haarnadelschleife der einen Domäne reicht in das katalytische Zentrum des Enzyms. Ein Aspartatrest bildet dort Wasserstoffbrücken zu insgesamt vier Resten der β-Laktamase und simuliert somit die Carboxylatfunktion von Penicillin G, dem natürlichen Substrat des Enzyms (Strynadka *et al.*, 1996a). *BLIP* weist in seiner Struktur sowohl α-helikale Bereiche als auch zu einem größeren Anteil β-Faltblatt Struktur auf. Stabilisiert wird die Struktur durch die Ausbildung zweier Disulfidbrücken, eine in jeder der zwei aufeinanderfolgenden Domänen.

2.2.5.2 Klonierung des *BLIP*-Gens in pASKInt100

Zur Klonierung des *Streptomyces clavuligerus* β-Laktamase Inhibitor Proteins wurde das Strukturgen mittels PCR auf einem von N. C. J. Strynadka freundlicherweise bereitgestellten Plasmid als Matrize durch Verwendung des Primerpaares *BLIP-up* und *BLIP-low* amplifiziert. Das Oligonukleotid *BLIP-low* kodiert dabei zusätzlich für das Sendai-Epitop. Das erhaltene PCR-Produkt wurde von T. Adams mit den Restriktionsenzymen *Sma*I und *Bam*HI gespalten und in dem ebenso gespaltenen Vektor pASKInt100-EETI-CK^{send} kloniert. Das so erhaltene Plasmid trägt den Namen pASKInt100-BLIP und enthält das *BLIP*-Gen in einem durchgehenden Leseraster zwischen den kodierenden Sequenzen für *EaeA′-E-tag* und das Sendai-Epitop.

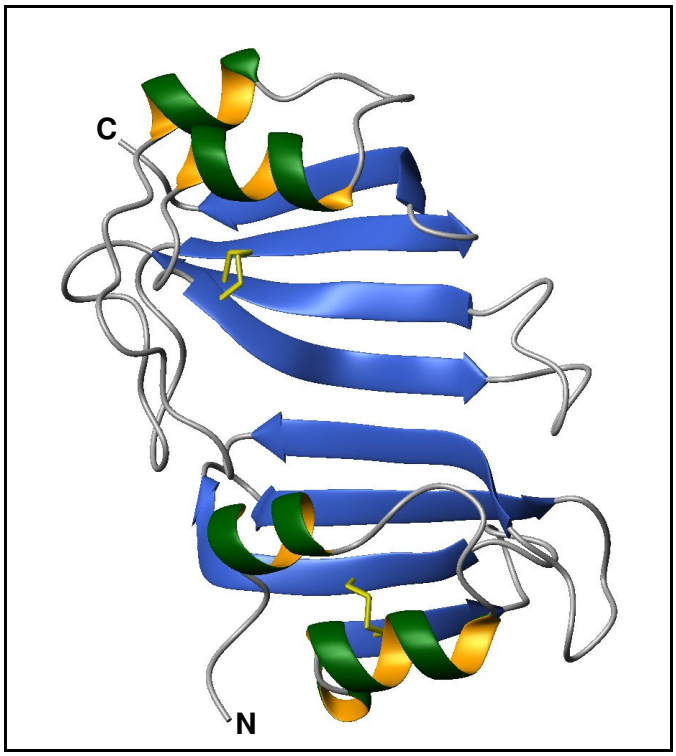


Abbildung 22. Schematische Darstellung der Struktur des β-Laktamase Inhibitor Proteins (BLIP) aus *Streptomyces clavuligerus*. β-Stränge sind mit ihrer Orientierung in Pfeilrichtung in blau, α-Helices in grün-orange, verbindende Regionen in grau dargestellt. Die zwei im Molekül vorkommenden Disulfidbrücken der Cystein-Reste #30 und #42 sowie #109 und #131 innerhalb des Moleküls sind in gelb eingezeichnet. (Erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1JTG, Lim *et al.*, 2001)

2.2.5.3 Präsentation von *BLIP* durch Fusion mit *EaeA′*

Nach der Transformation von Zellen von 71-18P' wurden erneut mit einer daraus erhaltenen Einzelkolonie 50 ml Chloramphenicol-haltiges dYT-Medium (25 μg/ml) inokuliert. Die Zellen wurden nach Methode 5.5.1 induziert und ein Aliquot der Kultur wurde anschließend jeweils für die Fluoreszenzmarkierung mit der anti-Sendai Kaskade bzw. der anti-E Kaskade nach Methode 5.5.2 aufbereitet. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Methode 5.5.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 23A dargestellt. Es ist eine deutliche Verschiebung des Kurvenmaximums hin zu höherer Fluoreszenz lediglich bei der anti-E Markierung zu erkennen. Eine anti-Sendai Markierung

konnte wie zuvor bei der Präsentation von Calmodulin nicht detektiert werden. Das Signal unmarkierter Zellen unterschied sich auch hier nicht von dem Ansatz mit anti-Sendai-Markierung. *BLIP* ist wie Calmodulin mit dem *EaeA′* basierten Präsentationsverfahren unter den in diesem Experiment gewählten Parametern nicht auf der Oberfläche der Zellen präsentierbar.

Das *BLIP*-Gen tragende Zellen wurden während des Kulturwachstums zusätzlich den in 2.2.1.3 angegebenen Bedingungen a) bis g) unterzogen. Die Verwendung von SDS bzw. EDTA führte hier zu keinerlei Verbesserung der Exposition. Wurden die Zellen nach den Bedingungen c) während des Wachstums und der Expression mit β-Mercaptoethanol behandelt, konnte eine leichte Verbesserung beobachtet werden, die aber nur geringfügig über dem Signal unmarkierter Zellen lag. Eine noch ein wenig verbesserte Präsentation wurde nach Methode d) erreicht. Der hier verwendete Stamm 71-18dsbA besitzt kein funktionales *dsbA*-Gen. *DsbA* ist in *E. coli* für die Bildung von Disulfidbrücken essentiell und beschleunigt deren Ausbildung *in vivo* (Bardwell *et al.*, 1991). Die im funktionalen *BLIP*-Molekül gebildeten zwei Disulfidbrücken können in Abwesenheit von *dsbA* möglicherweise nur verlangsamt geschlossen werden. Die Kombination aus der Verwendung des *dsbA*-defizienten Stammes und einem Wachstum in Anwesenheit von Reduktionsmittel wie nach g), lieferte hier das beste Ergebnis (Abbildung 23B).

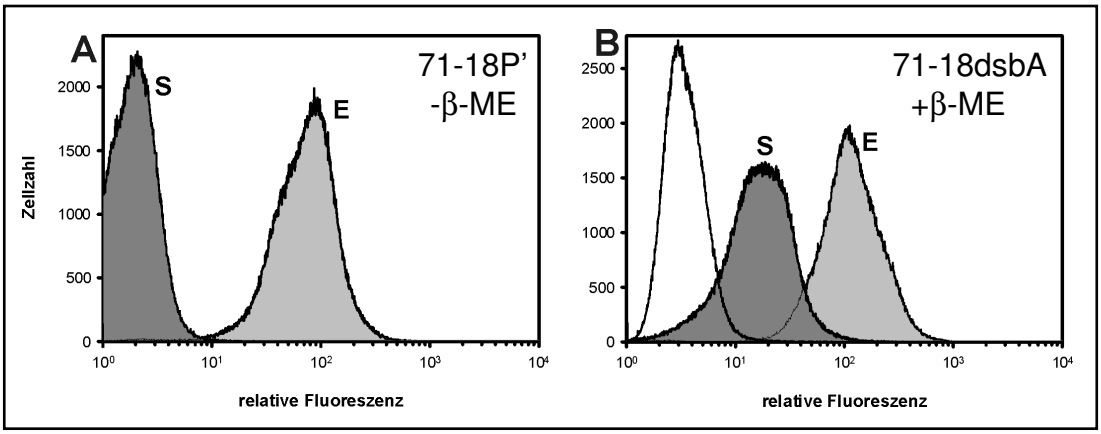


Abbildung 23. FACS Histogramme von pASKInt100-BLIP tragenden Zellen von 71-18P'. (A) Nach Induktion der *EaeA′*-Expression (siehe Methode 5.5.1) wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinyliertem anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt. (B) Analog (A) jedoch unter Verwendung des Stammes 71-18dsbA und modifizierter Wachstumsbedingungen in Anwesenheit von β-Mercaptoethanol gemäß g) (siehe 2.2.1.3).

Im Falle der Präsentation von *BLIP* über *EaeA′* scheint eine frühzeitige Faltung und vor allem die Fixierung derselben in diesem Fall durch die Bildung zweier Disulfidbrücken bereits im *E. coli* Periplasma einer Translokation durch die äußere Membran entgegenzustehen, während im reduzierten Zustand die Polypeptidkette des β-Laktamase Inhibitor Proteins gut auf der Oberfläche exponiert werden kann. Auch in diesem Fall war wie bei der Präsentation von Calmodulin (vgl. 2.2.4.3) ein funktionaler Nachweis nach Überführen der Zellen in nicht mehr reduzierende Umgebung möglich. Die Bindung rekombinant erzeugter und gereinigter *TEM-1* β-Laktamase konnte auch hier auf der Oberfläche mittels anti-β-Laktamase Markierungskaskade nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

2.2.6 Präsentation von *E. coli TEM-1* β-Laktamase auf Zellen von 71-18

REI$_v$, Il-4, Calmodulin und *BLIP* sind Proteine, die eine Größe zwischen 100 und 170 Aminosäuren aufweisen. Mit der *TEM-1* β-Laktamase wurde in diese Serie zu präsentierender Proteindomänen ein weiteres Protein aufgenommen, welches mit 273 Aminosäuren deutlich größer ist, α-helikale und β-Faltblatt Sekundärstrukturelemente aufweist und dessen funktionale Struktur durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird.

2.2.6.1 Die *TEM-1* β-Laktamase von *Escherichia coli*

β-Laktam-Antibiotika üben ihre Wirkung auf membrangebundene, sogenannte DD-Peptidasen aus, die für die Synthese und die Umstrukturierung von Peptidoglycan verantwortlich sind (Ghuysen, 1991, Nanninga, 1991). Die Ausbildung von Resistenzen gegen diese Art Antibiotika können zum einen mit der Veränderung dieser Enzyme oder der Membranpermeabilität (Frère *et al.*, 1991), vor allem aber durch das Vorhandensein einer oder mehrerer β-Laktamasen begründet sein (Waley, 1988, Jacoby, 1994, Davies, 1994, Frère, 1995). β-Laktamasen sind Enzyme, die auf sehr effiziente Weise und irreversibel die Hydrolyse der Amidbindung des β-Laktamrings katalysieren und somit β-Laktame biologisch inaktivieren (Waley *et al.*, 1992, Frère, 1995). β-Laktamasen kommen im Periplasma Gram-negativer Bakterien vor und werden von Gram-positiven Stämmen in das umgebende Medium sezerniert. Auch eine Membranassoziation ist in einigen Fällen dokumentiert (Nielsen & Lampen, 1982, Parker & Smith, 1993). β-Laktamasen werden aufgrund ihres katalytischen Mechanismus in Serin- (Klassen A, C und D) und Zink-Enzyme (Klasse B) unterteilt (Ambler, 1980, Jaurin & Grundstrøm, 1981, Huovinen *et al.*, 1988, Waley 1988, Joris *et al.*, 1991). Die Enzyme der ersteren Gruppe besitzen einen Serinrest im aktiven Zentrum und funktionieren nach einem Drei-Schritt-Mechanismus. Nach Bindung des β-Laktams wird die Hydroxylgruppe des Serinrestes durch eine Carbonylfunktion des Antibiotikums verestert. Es entsteht das acylierte Enzym, der β-Lactamring wird geöffnet (Fisher *et al.*, 1980, Frère *et al.*, 1991, Waley *et al.*, 1992). Die Rückübertragung eines Protons auf den Serinrest setzt den inaktivierten Liganden frei. Gleichzeitig wird das aktive Enzym regeneriert (Lamotte-Brasseur *et al.*, 1991). Die Bildung des Adduktes ist vergleichbar mit der Bindung des Antibiotikums an sein physiologisches Zielprotein. Der Unterschied ist lediglich quantitativer Natur und spiegelt sich in unterschiedlichen Gleichgewichtskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte wider, mit drastisch verschiedenem Ergebnis. β-Laktamasen inaktivieren β-Laktamantibiotika, jene inaktivieren ihrerseits wiederum DD-Proteasen (Matagne *et al.*, 1998).

Die *TEM-1* von *Escherichia coli* ist eine Klasse A β-Laktamase. Wie alle anderen Enzyme dieser größten und am besten untersuchten Klasse ist sie ein monomeres Enzym mit einer relativen Molmasse von ca. 29.000. Strukturell besteht es aus einer α-helikalen und einer gemischt α-helikalen und β-Faltblatt-Domäne. Erstere ist stabilisiert durch die einzige Disulfidbrücke im Molekül (Abb. 24). Das aktive Zentrum befindet sich in einer Einsenkung zwischen den beiden Domänen. Das aktive Serin liegt am Aminoterminus der langen, hydrophoben Helix der α-helikalen Domäne. Der katalytische Mechanismus wird im Detail noch kontrovers diskutiert, besonders die Frage nach dem als Base fungierenden Rest, welcher die Nukleophilie des aktiven Serins erhöht, und nach dem Mechanismus der

Regeneration des Serinrestes. Der Mechanismus, wie er von Lamotte-Brasseur und Mitarbeitern 1991 postuliert wurde, scheint jedoch durch kinetische Daten (Matagne & Frère, 1995, Guillome *et al.*, 1997) mehr und mehr belegt zu werden, mit Glutamat #166 als Base, wirkend über ein Wassermolekül.

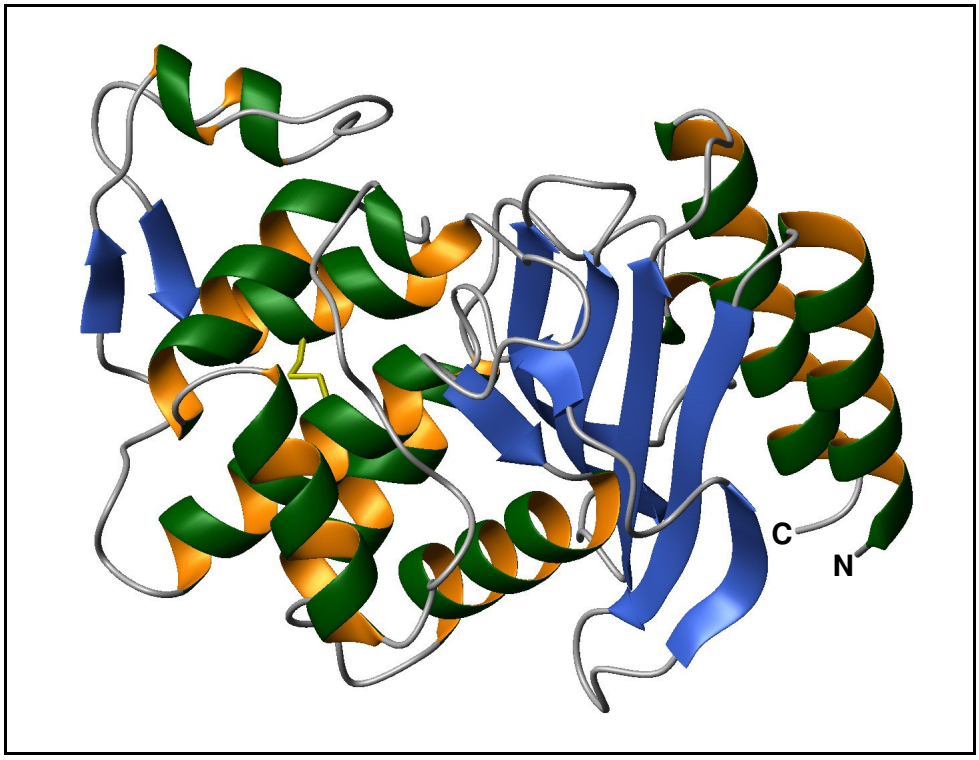


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Struktur der *TEM-1* β-Laktamase von *Escherichia coli*. β-Stränge sind mit ihrer Orientierung in Pfeilrichtung in blau, α-Helices in grün-orange, verbindende Regionen in grau dargestellt. Die eine im Molekül vorkommende Disulfidbrücke der Cystein-Reste #77 und #123 innerhalb des Moleküls ist in gelb eingezeichnet. (Erzeugt unter Verwendung von Molmol, Version 2K.2, Reto Konradi, PDB: 1M40, Minasov *et al.*, 2002)

2.2.6.2 Klonierung des *TEM-1* β-Laktamase-Gens in pASKInt100

Die kodierende Sequenz von *E. coli TEM-1* β-Laktamase wurde mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pHK5-20 (Kolmar *et al.*, 1992), die verwendeten Oligodesoxyribonukleotide waren *Bla-Sma-up* und *Bla-BglII-low*. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit *Sma*I und *Bgl*II gespalten und mit dem ebenso gespaltenen Vektor pASKInt100-(TmDegP) (siehe 2.2.1.2) ligiert. Auf diesem Wege wurde das Plasmid pASKInt100-Bla erhalten. Dieses trägt das *TEM-1* β-Laktamase-Gen in einem durchgehenden Leseraster zwischen den kodierenden Sequenzen für *EaeA′-E-tag* und das Sendai-Epitop.

2.2.6.3 Präsentation von *TEM-1* β-Laktamase durch Fusion mit *EaeA′*

Nach der Transformation von Zellen von 71-18P' wurden mit einer daraus erhaltenen Einzelkolonie 50 ml 25 μg/ml Chloramphenicol-haltiges dYT-Medium inokuliert. Die Expression des Oberflächenpräsentations-Fusionsproteins wurde nach Methode 5.5.1 induziert und ein Aliquot der Kultur wurde anschließend jeweils für die Fluoreszenz-markierung mit der anti-Sendai Kaskade bzw. der anti-E Kaskade nach Methode 5.5.2 aufbereitet. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Methode

5.5.3). Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt. Es ist eine deutliche Verschiebung des Kurvenmaximums hin zu höherer Fluoreszenz lediglich bei der anti-E Markierung zu erkennen. Eine anti-Sendai Markierung konnte wie zuvor bei der Präsentation von Calmodulin und *BLIP* nicht angebracht werden. Das Signal unmarkierter Zellen unterschied sich nicht von dem Ansatz mit anti-Sendai Markierung. *TEM-1* β-Laktamase ist wie Calmodulin und *BLIP* mit dem *EaeA′* basierten Präsentationsverfahren unter den in diesem Experiment gewählten Parametern nicht auf der Zelloberfläche präsentierbar.

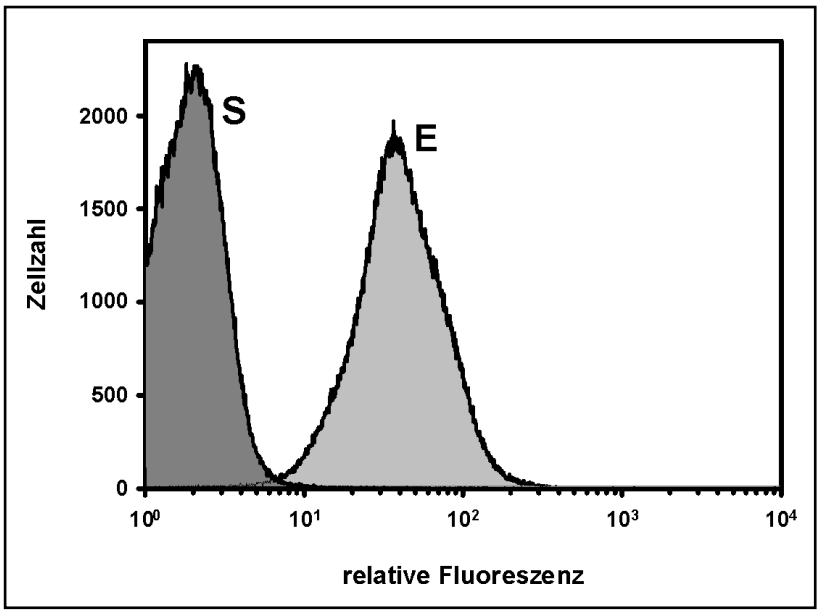


Abbildung 25. FACS Histogramm von pASKInt100-Bla tragenden Zellen von 71-18P'. Nach Induktion der *EaeA′*-Expression (siehe Methode 5.5.1) wurden die Zellen nacheinander mit anti-Sendai Antikörper (S) oder anti-E Antikörper (E), biotinyliertem anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 behandelt.

Das *TEM-1* β-Laktamase Gen tragende Zellen wurden während des Kulturwachstums zusätzlich den in 2.2.1.3 angegebenen Bedingungen a) bis g) unterzogen. Weder das Wachstum in Anwesenheit des Detergenz SDS oder des Chelatkomplex-Bildners EDTA noch ein Einfluss auf das Ausbilden der einen, im nativen Molekül vorhandenen Disulfidbrücke durch Wachstum in Anwesenheit von Reduktionsmittel, führte zu einer Oberflächenexposition. Die Verwendung von 71-18dsbA als Wirtsstamm führte weiter ebenso wenig zu einer Exposition von β-Laktamase wie die Kombination desselben mit der Chemikalienbehandlung während des Wachstums. Trotz dieser Optimierungsversuche blieb *TEM-1* β-Laktamase von *Escherichia coli* mittels des *EaeA′* basierten Präsentationsmoduls nicht auf der Zelloberfläche exponierbar.

2.2.6.4 Zufallsmutagenese zur Erzeugung und Präsentation von β-Laktamase-Varianten

Zusammen mit H. Kolmar wurden Experimente durchgeführt, die zum Ziel hatten, Varianten von *TEM-1* β-Laktamase zu generieren und zu isolieren, die *via* Fusion an *Intimin′* auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden können. Aus der so gewonnenen Sequenzinformation der Translokations-kompetenten Varianten sollten Ergebnisse erhalten werden,

die Auskunft über den Grund geben, warum *TEM-1* β-Laktamase mit dieser Methode nicht Oberflächen-exponierbar ist.

Zellen des *E. coli* Stammes 71-18mutS (enthält eine Transposon 10 Insertion im *mutS* Gen und vermittelt daher eine Resistenz gegen Tetrazyklin) wurden nacheinander mit den Plasmiden pASKInt100-Bla und pZA22-mutD transformiert. Das Plasmid pZA22-mutD ist ein Derivat von pZA22-MCS1 (siehe 4.2), in dem unter Kontrolle des P_{Llac} Promotors das *mutD* Gen exprimiert werden kann. Das *MutD* Protein ist eine dominante Variante der *dnaQ* kodierten ε-Untereinheit der replikativen Polymerase III ohne Exonukleaseaktivität. Es ist noch in der Lage, das Polymerase III Holoenzym zu bilden, das dann jedoch keine *proofreading* Aktivität mehr aufweist. Die Überproduktion von MutD führt zu einer starken Erhöhung der Mutationsrate im Zuge der Replikation (Echols *et al.*, 1983, Selifonova *et al.*, 2001). Mit je 150 µl einer Übernacht-Kultur von Zellen dieser genetischen Ausstattung wurden parallel vier Kolben mit dYTCm^{25}Kan^{75} beimpft und die Kulturen über Nacht bei 30 °C kultiviert. Mit je 150 µl der resultierenden Kulturen wurden sodann erneut parallel vier Kolben mit dYTCm^{25}Kan^{75} inokuliert und wie angegeben inkubiert. Der Vorgang wurde insgesamt fünfmalig wiederholt. Aus den vier Kulturen der fünften Inkubationsrunde wurden je 250 µl entnommen und mit den insgesamt 1000 µl 50 ml dYTCm^{25}Kan^{75}, welches mit 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA und 15 mM β-Mercaptoethanol versetzt worden waren, inokuliert. Die Kultur wurde bis zu einer O.D.$_{600}$ von 0,2 kultiviert und sodann 10 ml davon mit 1 µl Anhydrotetrazyklin versetzt. Zur Isolierung von β-Laktamase Varianten, die Translokations-kompetent sind, wurde von dem Befund Gebrauch gemacht, dass *E. coli* Zellen, die in Gegenwart von 0,1 % (w/v) SDS kultiviert wurden, nach Induktion der Expression des *intimin'*-β-Laktamase Fusionsgens sich nicht weiter vermehren und in der Bakterienkultur eine massive Zelllyse zu beobachten war. Nach einer Inkubation von 2 Stunden wurden mit 5 ml der Kultur 50 ml dYTCm^{25}Kan^{75} inokuliert und diese dann über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 50 ml dYTCm^{25}Kan^{75}, welches mit 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA und 15 mM β-Mercaptoethanol versetzt worden waren, inokuliert. Nach Induktion der Expression mit ATC bei einer O.D.$_{600}$ von 0,2 und weiterem Wachstum der Kultur für eine Stunde wurden die Zellen mit der anti-Sendai Kaskade markiert (Methode 5.5.2). In drei aufeinander folgenden Sortierrunden mittels FACS wurden aus einem Sortierfenster der Kanäle 300 bis 800 letztendlich 150.000 Zellen aussortiert (Methode 5.5.3). Diese wurden sodann auf dYTCm^{25}Kan^{75} Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die erhaltenen Kolonien wurden mit frischem Medium von den Platten abgespült, auf dYTAmp^{20}Tet^{10} Platten plattiert und erneut kultiviert. Durch die Selektion auf Ampicillin-Resistenz an dieser Stelle werden alle diejenigen Zellen, die aufgrund von Mutationen keine funktionale β-Laktamase mehr produzieren, aus dem Experiment entfernt. Die aus der Selektion auf Ampicillin-Resistenz hervorgegangenen Klone wurden von der Platte abgenommen. Mit diesen wurden 50 ml dYTCm^{25}Kan^{75} inokuliert, welches 0,5 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA und 15 mM β-Mercaptoethanol enthielt. Nach der Induktion der Expression bei einer O.D.$_{600}$ von 0,2 wurde nach einer weiteren Inkubation für 1 h ein Aliquot der Zellen mit der anti-Sendai Kaskade (5.5.2) Fluoreszenz-markiert. Eine zum Vergleich des Kulturwachstums an dieser Stelle parallel kultivierte Kultur von 71-18mutS, welcher die Ausgangsplasmide pASKInt100-Bla und pZA22-mutD trug, zeigte Lysis zum Zeitpunkt der Induktion der Expression mit Anhydrotetrazyklin. Es wurden 10.000 Zellen

aussortiert, die nach Markierung mit der anti-Sendai Kaskade eine erhöhte Fluoreszenz zeigten. Diese wurden auf dYTCm^{25}Kan^{75} Platten plattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Von auf diesem Wege erhaltenen Einzelklonen wurde die individuelle Oberflächenpräsentation des Sendai-Epitops (und somit auch indirekt die der β-Laktamase) bestimmt. Bei allen untersuchten Klonen war die Exposition des Sendai-Epitops durch die Zelloberflächenmarkierung nachweisbar. Von diesen Klonen wurden die Plasmide isoliert und die Sequenz des β-Laktamase-Gens bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt.

Klon Nr.	**Austausch (Protein)**	**Austausch (DNA)**
K2	C123R	TGC->**C**GC
K3	C123R T109T	TGC->**C**GC ACA->AC**G**
K6	C123R	TGC->**C**GC
K7	C77R	TGT->**C**GT
K8	C123Y	TGC->T**A**C
K10	C123R	TGC->**C**GC
K11	C123R	TGC->**C**GC
K14	C123R	TGC->**C**GC

Tabelle 1. Mutationen von acht Klonen aus der ungerichteten *in vivo* Mutagenese von pASKInt100-Bla tragenden *E. coli* 71-18mutS Zellen. Zur Durchführung des Mutagenese-experimentes siehe Text.

Es wurden ausschließlich Klone erhalten, die Austausche eines der beiden die eine stabilisierende Disulfidbrücke bildenden Cysteine #77 (K7) oder #123 gegen die Aminosäure Arginin (K2, K3, K6, K10, K11, K14) oder Tyrosin (K8) aufwiesen. Offenbar ist die Bildung der Disulfidbrücke der β-Laktamase im Periplasma der Zellen mit einer Translokation durch die äußere Membran nicht vereinbar.

2.2.7 Zur biotechnologischen Anwendung: Anreicherung das Sendai-Epitop präsentierender Zellen aus einem Klongemisch

Verfahren zur bakteriellen Zelloberflächenpräsentation können wie andere Verfahren der Genotyp-Phänotyp-Kopplung zur Durchmusterung umfangreicher molekularer Bibliotheken nach Bindemolekülen mit neuen oder verbesserten Eigenschaften herangezogen werden. Um für das *EaeA′* basierte Präsentationsverfahren dieses Potential zu evaluieren, wurde ein Modellexperiment entworfen. Dieses beruht auf der Anreicherung von Proteinvarianten aus einem großen Überschuss negativer Ereignissen und somit der Simulation einer Anreicherung eines seltenen Ereignisses aus einer molekularen Bibliothek Zelloberflächen-exponierter Proteine.

Dabei sollten Zellen isoliert werden, die auf ihrer Oberfläche das Sendai-Epitop tragen. Hierzu wurden Zellen ausgewählt, die das Plasmid pASKInt100-REI trugen und somit in der Lage waren, nach Induktion der Expression das REI_v Protein mitsamt der C-terminalen Extension des Sendai-Epitops zu exponieren. Als Hintergrund sollten Zellen dienen, die eine Sendai-Epitop freie REI_v Variante exponierten. Um eine solche Variante zu erzeugen, wurde das Plasmid pASKInt100-REI mit *Bgl*II und *Bam*HI (unmittelbar vor und hinter der

kodierenden Sendai-Sequenz gelegen) gespalten und religiert, die überhängenden Enden des *Bgl*II-*Bam*HI Spaltproduktes sind kompatibel, so dass auf diesem Wege die kodierende Sequenz für das Sendai-Epitop entfernt und das Plasmid pASKInt100-REIΔsend erhalten wurde.

Zellen von 71-18, welche das Plasmid pASKInt100-REI trugen, wurden 1:200.000 mit solchen Zellen gemischt, welche das Plasmid pASKInt100-REIΔsend trugen. Zellen des Gemisches wurden in 50 ml dYT-Medium, welches mit Chloramphenicol (25 μg/ml) komplettiert worden war, bei 37 °C inkubiert. Nach der Induktion der Expression des Fusionsgens gemäß Methode 5.5.1 wurde ein Aliquot der Kultur zentrifugiert, und die Zellen wurden in Folge mit anti-Sendai Antikörper, biotinyliertem anti-Maus Antikörper und Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat gemäß Methode 5.5.2 markiert. Die so markierte Zellpopulation wurden mittels des *MoFlo Cell-Sorters* mit einer Ereignis-Rate von 30.000/s auf Basis der Fluoreszenzintensität sortiert (Methode 5.5.3). Das Sortierfenster wurde derart gewählt, dass weniger als 0,5 % der Ereignisse als positiv eingestuft wurden (Abb. 26A).

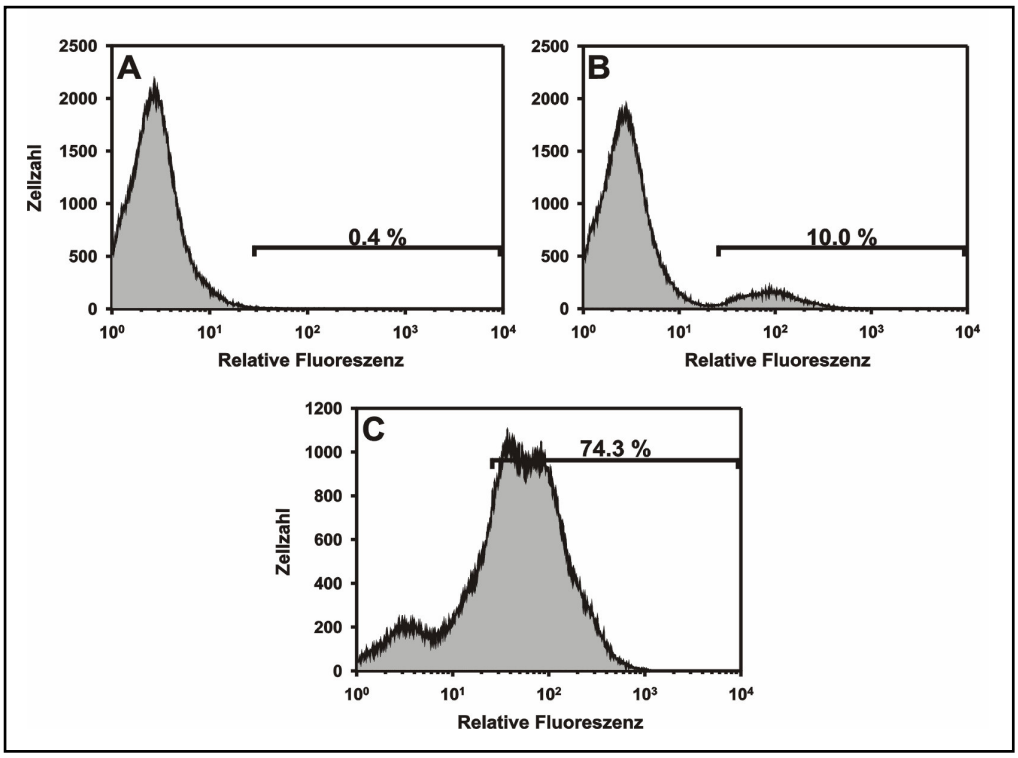


Abbildung 26: Anreicherung von pASKInt100-REI tragenden Zellen von *E. coli* 71-18. Die Klammer zeigt das Sortierfenster der entsprechenden Sortierrunde an und somit die Definition des entsprechenden in diesen Bereich einzuordnenden Ereignisses als ein Positives. (A) 1:200.000 Mischung von 71-18(pASKInt100-REI) und 71-18(pASKInt100-REIΔsend) vor der ersten Sortierrunde; (B) Mischung nach zwei direkt aufeinander folgenden Runden FACS und Wachstum über Nacht; (C) Mischung aus Runde (B) nach erneuter Sortierung und Wachstum über Nacht.

Nach sofortiger Re-Sortierung wurden die aussortierten Zellen auf festem Medium plattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nachdem mit einem repräsentativen Anteil der Zellen erneut 50 ml dYTCm^{25}-Medium inokuliert worden waren, wurde erneut induziert, mit der anti-Sendai Kaskade markiert und sortiert. Nach zwei aufeinander folgenden

Runden der Sortierung konnten auf diese Weise bereits 10 % der Ereignisse als positiv identifiziert werden, nach einer erneuten Sortierrunde waren es 74 % der Zellpopulation, welche mittels anti-Sendai Antikörper eine Fluoreszenzmarkierung trugen. Der Verlauf der Anreicherung ist in Abbildung 26 dargestellt.

Das Ergebnis dieses Anreicherungsexperimentes zeigt, dass es mit Hilfe des *EaeA'* basierten Oberflächenpräsentationsverfahrens prinzipiell möglich ist, seltene Ereignisse durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung anzureichern. Eine Übertragung dieses Modellexperiments auf Anreicherungsexperimente aus großen molekularen Bibliotheken wurde bereits von A. Christmann erfolgreich durchgeführt (Christmann *et al.*, 2001). Aus zufallsmäßig erzeugten Peptidbibliotheken eines Proteins des Schweinepest-Virus konnten Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die spezifisch von gegen das Protein gerichteten Antikörpern gebunden wurden.

3. Diskussion

Verfahren zur bakteriellen Oberflächenpräsentation von Peptiden und Proteinen auf Zellen von *Escherichia coli* ergänzen neben dem weit verbreiteten *Phage Display* (Übersicht z.B. bei Willats, 2002), der Präsentation auf Hefezellen (z.B. Boder & Wittrup, 2000) und einigen *in vitro* Verfahren (z.B. Amstutz *et al.*, 2001) das Spektrum der in der molekularen Biotechnologie weit verbreiteten Methoden zur Genotyp-Phänotyp-Kopplung. Die dokumentierten Verfahren des *bacterial surface display* verwenden dabei ganz unterschiedliche funktionelle Plattformen, meist jedoch solche auf der Basis natürlich vorkommender Proteine der äußeren Membranen Gram-negativer Bakterien [*Lpp-OmpA* (Francisco *et al.*, 1992), *LamB* (Charbit *et al.*, 1986), *Iga*β (Klauser et al., 1992), *AIDA-I* (Maurer *et al.*, 1997), *INP* (Jung *et al.*, 1998), Flagellenproteine (Westerlund-Wikström *et al.*, 1997)]. Man kann die dokumentierten Verfahren einteilen in solche, bei denen modifizierte, wirtseigene Moleküle als membranständige Ankerdomäne zum Einsatz kommen (*Lpp-OmpA*, *LamB*, *AIDA-I*, Flagellenproteine bei Verwendung von *Escherichia coli* als Expressionswirt), und solche, die auf heterologer Expression beruhen (*Iga*β aus *Neisseria gonorrhoeae*, *INP* aus *Pseudomonas syringae*). Grundvoraussetzung für die biotechnologische Anwendung eines jeden dieser Verfahren ist, dass die Vitalität der verwendeten Zellen nicht oder nur in begrenztem Ausmaß durch die genetische und damit verbundene physiologische Modifikation beeinträchtigt wird. Dabei kann sich sowohl die zusätzliche Expression von Konstrukten, deren Komponenten bereits durch die Wirtszelle selbst bereitgestellt werden, die Gefahr einer Unverträglichkeit bergen, wie auch diejenige eines heterologen Moleküls, welches einer anderen Bakterienart entnommen ist. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verfahren wurde deshalb auf der Basis eines Moleküls aufgebaut, welches von *E. coli* stammt und dort in der äußeren Membran in hoher Kopienzahl vorkommt. Das *EaeA* Protein, welches die funktionelle Basis des neuen Präsentationsverfahrens auf Zellen von *E. coli* K12 darstellt, entstammt dem Serotypen O157:H7 enterohaemorrhagischer *E. coli* (EHEC), welche mit den Laborstämmen von *E. coli* sehr nah verwandt sind und deren Pathogenität maßgeblich auf der Anwesenheit bestimmter zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren, kodiert in einer sogenannten Pathogenitätsinsel, beruht (Groisman & Ochman, 1993, Kaper, 1998). *EaeA* ist einer dieser zusätzlichen Faktoren und ist an der Anheftung der EHEC Zellen an das Darmepithel maßgeblich beteiligt, dem Ausgangspunkt der weiteren Infektion. Die Übertragung von Teilen des *EaeA* Proteins auf Laborstämme von *E. coli* sollte folglich, so die initiale Annahme, für die strukturelle Integrität der Zellen einen geringeren Einfluss haben als andere beschriebene, funktionelle Einheiten der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation.

Zunächst wurde der Präsentationsvektor pASKInt100 konstruiert. Dieser Vektor trägt als funktionelle Einheit den *tetA* Promotor/Operator des Plasmids pASK75 (Skerra, 1994) in Kombination mit der kodierenden Sequenz des diesen zu regulieren vermögenden Repressorproteins. Anders als in dem Ursprungsvektor wird von pASKInt100 eine Chloramphenicolresistenz kodiert, das ursprüngliche Gen für β-Laktamase wurde deletiert, da die Präsentation dieses Proteins auf der Zelloberfläche ein definiertes Ziel bei der Evaluation des Systems darstellen sollte. Zellen, welche das Plasmid pASKInt100-EETI-CK^{send} trugen, präsentierten die *EETI-CK^{send}* Variante des *Ecballium elaterium* Trypsin

Inhibitors II (*EETI-II*), nachweisbar mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Sendai-Epitop (Einberger *et al.*, 1990). Bereits mittels des *Lpp-OmpA* Systems konnte die funktionelle Präsentation dieses in die Klasse der Cystin-Knoten Mikroproteine fallenden Proteins gezeigt werden (Christmann *et al.*, 1999). Die Fluoreszenzaufnahmen in Abschnitt 2.1.2 zeigen, dass die Zellen mittels einer Antikörperkaskade markierbar sind. Es ist darüber hinaus sogar mikroskopisch zu erkennen, dass sich die Markierung offenbar auf der Oberfläche der Zellen befindet. Durch ein indirektes Verfahren wurde die Anzahl der Oberflächen-exponierten Moleküle mit durchschnittlich 36.000 pro Zelle bestimmt, einer sehr großen Anzahl, die nahe der dokumentierten Anzahl des am häufigsten in der äußeren Membran von *E. coli* vorkommenden Proteins *OmpF* liegt (vgl. 2.1.4, Bourdineaud *et al.*, 1990). Im Rahmen der Rechnung wurde die Annahme gemacht, dass eine Stöchiometrie von 1:1 zwischen exponiertem Molekül und gebundenem Antikörper vorliegt. Immunglobuline vom Typ G (IgG) besitzen jedoch zwei bindefähige Regionen, die jeweils ein Oberflächen-präsentiertes Epitop binden können. Aus diesem Grund könnte die wirkliche Anzahl exponierter Moleküle maximal noch um den Faktor zwei höher als errechnet liegen. Es ist somit zumindest festzustellen, dass eine gegenüber anderen Präsentationsverfahren vergleichbar sehr große Anzahl an Passagierdomänen auf der Oberfläche über *EaeA′* exponierbar ist und dort einer Funktionsabfrage zur Verfügung steht.

Die große Anzahl präsentierter Moleküle wurde erhalten, obgleich die Transkription des *EaeA′* Konstruktes in voller Länge ausgehend vom *tetA* Promotor bereits durch das Einfügen eines *amber* Stop-Kodons anstelle des ersten für Glutamin kodierenden Kodons und die Verwendung eines *amber* Supressor-Stammes wie DH5αZ1 oder 71-18 als Expressionswirt gedrosselt worden war. Ein möglicher Grund für die trotz der Reduktion der Anzahl an *EaeA′* Molekülen auf translationeller Ebene immer noch sehr hohe Nettoakkumulation könnte in einer im Vergleich zur Produktion geringen Abbaurate des Membran-inserierten *Intimin′* Proteins in den verwendeten Stämmen liegen. Ohne die Maßnahme zur Verringerung der Nettoakkumulation von *EaeA′* Protein in der äußeren Membran war dessen ungehinderte Expression vom *tetA* Promotor mit dem Überleben der Zellen nicht vereinbar (Beobachtung Dr. H. Kolmar). Es kommt in diesem Fall möglicherweise zu einer Akkumulation von *EaeA′* Molekülen in der äußeren Membran, die deren Kapazität übersteigt, so dass die Membran destabilisiert wird und die Zelle zugrunde geht. Das hier zur Drosselung der Expression angewandte Verfahren der Suppression wurde bereits vormals erfolgreich bei einem *Lpp-OmpA* Konstrukt zur Reduktion des Expressionslevels verwendet (Christmann *et al.*, 1999). Nachdem es sich bereits zur Anpassung der Expression zweier verschiedener Proteine gut bewährt hat, dürfte es sich generell auf die kontrollierte Expression von Proteinen der äußeren Membran anwenden lassen, die unter der Kontrolle des *lac* bzw. des *tetA* Promotors stehen.

Durch die kontrollierte Expression der für die Suppression verantwortlichen Suppressor tRNA in einem nicht *amber* Supressor Stamm war es möglich, die Anzahl Oberflächen-exponierter Moleküle in einem bestimmten Rahmen zu variieren (2.1.5). Auf diese Weise kann eine definierte Anzahl auf der Zelloberfläche exponierter Moleküle eingestellt werden, und das Verfahren kann auch auf nicht *amber* Suppressor Stämme übertragen werden. Warum die Regulation der Genexpression allein über eine Transkriptionskontrolle bei

Verwendung des *tetA* Promotors nicht erfolgreich ist, ist gegenwärtig unklar. Offenbar bewirkt die Variation der Induktorkonzentration lediglich die Etablierung zweier Extremzustände, nämlich der vollständigen Repression oder Derepression der Genexpression, wobei durch Erhöhung der Induktorkonzentration nur der Anteil an Zellen zunimmt, in denen eine Vollinduktion der Expression vorliegt. Die auf dem Wege der doppelten Regulation bewerkstelligte Expression ist deutlich geringer als die unter Verwendung eines Supressor-Stammes. In letzterem steht die Expression der Suppressor tRNA unter der Kontrolle des sehr starken ribosomalen RNA Promotors, einem der stärksten Promotoren überhaupt. Über den Austausch des P_{Llac} Promotors zur Expression der *supE* tRNA durch einen stärkeren Promotor könnte es möglich sein, die Präsentation über einen noch größeren Bereich zu regulieren, Experimente, die bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht angegangen wurden.

Der größte Vorteil der bakteriellen Zelloberflächenpräsentation gegenüber anderen Verfahren liegt in der Möglichkeit, positiv angereicherte Zellen direkt zu vermehren. Grundvoraussetzung dafür ist, dass die Zellen nach Expression und Selektion noch in der Lage sind, sich zu teilen und direkt wieder zu Klonen heranzuwachsen. Die Vitalität der Zellen bei Verwendung des *EaeA′* basierten Präsentationsverfahrens ist daher ein entscheidendes Kriterium für dessen Einsatz zur Durchmusterung großer molekularer Repertoires. Es wurde in Kapitel 2.1.3 gezeigt, dass durch die mittels Suppression kontrollierte Oberflächenpräsentation von *Intimin′* Fusionsprotein nur eine sehr geringfügige Einschränkung der Zellvitalität auftritt, obgleich ein gewisser Wachstumsnachteil gegenüber nicht-präsentierenden Zellen beobachtet werden konnte. Dies kann jedoch zumindest teilweise auf die physiologische Last einer zusätzlichen Expression zurückgeführt werden, die allerdings im Rahmen eines Anreicherungsexperimentes aufgrund ansonsten identischer Ausstattung der Zellen kaum einen unerwünschten Selektionsdruck ausüben dürfte. Die Synthese des Membranproteins über lediglich mehrere Stunden führte nur zu einer geringen Beeinträchtigung des Überlebens (2.1.3). Im Rahmen von Selektionsexperimenten sollte deshalb eine Induktionszeit von mehr als einer bis eineinhalb Stunden nicht überschritten werden.

Um das Verfahren in Bezug auf seine Anwendbarkeit zur Selektion seltener Ereignisse aus einem komplexen Hintergrund heraus zu testen, wurden in einem Modellexperiment das Sendai-Epitop präsentierende Zellen in drei Runden aus einem großen Überschuss ausschließlich die Immunglobulindomäne REI_v als Passagier präsentierender Zellen angereichert (2.2.7). Das Ergebnis zeigt, dass das Verfahren zum Zwecke der Isolierung bindefähiger Moleküle im Rahmen gerichteter Evolutionsexperimente gut nutzbar ist. Um zu verhindern, dass nach jeder Sortierrunde einzelne Klone, die sich stärker vermehren als andere, diese wegen deren schlechterer Etablierung in Kultur verdrängen, sollten die Zellen nach jeder Sortierrunde zunächst auf festem Medium wieder zu Kolonien kultiviert werden, bevor ein repräsentativer Anteil der nächsten Anreicherungsrunde zugeführt wird.

In den vorangegangen Abschnitten wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, die Lektinbindedomäne E3 gemeinsam mit der Immunglobulindomäne E2 des Intimins *EaeA* enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) durch eine andere Proteindomäne, nämlich das Cystin-Knoten Inhibitor-Protein *EETI-II* zu ersetzen und eine Oberflächenexposition zu

erreichen. Der Mechanismus der Translokation von Proteindomänen durch die äußere Membran der *E. coli* Zelle ist wenig verstanden. Arbeiten von Meyer und Mitarbeitern mit der Autotransporter-Domäne der *IgA*-Protease *Iga*β aus *Neisseria gonorrhoeae* legen nahe, dass die translozierte Passagierdomäne nur in ungefaltetem Zustand auf die Zelloberfläche transportiert wird. Proteine, die intramolekulare Disulfidbrücken enthalten und bei denen wahrscheinlich bereits im Periplasma präformierte Sekundärstrukturelemente kovalent fixiert werden, werden nicht transloziert (Klauser *et al.*, 1992). Es stellte sich daher die Frage, ob diese einschränkende Bedingung für Intimin-vermittelte Zelloberflächenexposition ebenso gilt. Es wurde daher eine Reihe von Passagierdomänen in *E. coli* als Fusionsprotein mit *EaeA′* produziert und analysiert, ob diese auf die Zelloberfläche gelangen können. Dabei wurden sowohl disulfidhaltige, als auch disulfidfreie Proteine unterschiedlicher Größe und Sekundärstruktur eingesetzt. Um untersuchen zu können, ob eine Exposition der Passagierdomäne auf der Zelloberfläche stattfindet, wurde der Präsentationsvektor so konstruiert, dass die Passagierdomäne von zwei unterschiedlichen Epitopsequenzen flankiert wird (Abb. 5). Wenn *E. coli* Zellen die jeweilige Passagierdomäne auf ihrer Oberfläche tragen und somit mit beiden Antikörpern eine Immunfluoreszenz zeigen, weist dies auf einen Transport durch die äußere Membran und eine Exposition des Passagierproteins auf der Zelloberfläche hin.

Neben dem Mikroprotein *EETI-CK*^{send} und der Immunglobulindomäne *REI*$_v$ wurde versucht, folgende weitere Proteine auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen zu präsentieren. Dies waren die wie *REI*$_v$ ebenfalls humanen Proteine Interleukin 4 (*Il-4*) und Calmodulin sowie das β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*) aus *Streptomyces clavuligerus* und dessen natürliches Substrat die *TEM-1* β-Laktamase von *Escherichia coli*. Ohne weitere Optimierung der Oberflächenexposition konnte lediglich die Translokation von *EETI-CK*^{send}, *REI*$_v$ und Interleukin 4 nachgewiesen werden. Im Falle von Interleukin 4 konnte ferner ein Unterschied der Exposition in zwei unterschiedlichen Stämmen von *E. coli*, DH5αZ1 und 71-18P' beobachtet werden. Wie aus den sondierenden Experimenten mit DH5αZ1 und den systematischen Experimenten mit dem *E. coli* Stamm 71-18P', welcher außerhalb dieser Arbeit bereits routinemäßig zur Präsentation von molekularen *EETI-II* Bibliotheken eingesetzt wird, hervorgeht, besteht offenbar ein gewisser Einfluss des Stammhintergrundes auf die Präsentation der Passagierdomänen. Durch gelelektrophoretische Auftrennung von Membranfraktionen und anschließende Analyse mittels *Western Blot* unter Verwendung des Anti-Sendai Antikörpers konnte abgeleitet werden, dass die Insertion von *EaeA′*-Interleukin 4 Fusionsprotein in die äußere Membran von *E. coli* DH5αZ1 in geringerem Ausmaß stattfindet als die von *EETI-CK*^{send} und *REI*$_v$. Mögliche Gründe sind ein geringeres Expressionslevel des Interleukins aufgrund anderer Kodon-Nutzung in humanen Zellen als in *Escherichia coli* oder ein carboxyterminaler Abbau der Vier-Helix-Domäne des Interleukin 4 durch periplasmatische Proteasen. Bei allen drei Passagier-Fusionsproteinen, mit *EETI-CK*^{send}, *REI*$_v$ und Interleukin 4, akkumulieren Abbauprodukte, was ein Hinweis auf aminoterminale Prozessierung durch eine periplasmatische Proteaseaktivität ist, welche vor allem die in Richtung des Periplasmas zeigenden Schleifen von *EaeA′* spaltet. Der Nachweis einer carboxyterminalen Prozessierung war im gewählten experimentellen Ansatz nicht möglich, weil ein derartiger Abbau nicht mehr über das dort befindliche Epitop nachweisbar ist. C-terminale Prozessierung spiegelt sich deshalb in einer Verringerung nachweisbarer

Proteinmenge mittels anti-Sendai Antikörper wider. Die beobachtete geringere Nettoakkumulation von Interleukin 4 Fusionsprotein korreliert dabei mit der geringeren Fluoreszenz markierter, *Il-4* präsentierender Zellen.

Benutzt man anstelle von DH5αZ1 als Expressionsstamm 71-18P', so werden *EETI-CK*^{send} und *REI*$_v$ in beiden Stämmen nahezu gleich gut präsentiert, die Exposition von Interleukin 4 hingegen reduziert sich auf ein fast nicht mehr nachweisbares Minimum. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied könnte in der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Stämme liegen. DH5αZ1 wächst als *recA* defizienter Stamm deutlich langsamer als 71-18P'. Offensichtlich ist in ersterem der Stoffwechsel generell verlangsamt, also möglicherweise auch die Proteinproduktion von *EaeA'*-Fusionsprotein. In 71-18P' hingegen kommt es schnell zu einer Akkumulation dieses Proteins. Folgt die Faltung von Interleukin 4 einem langsamen Weg und können die drei Disulfidbrücken nicht zügig geschlossen werden, kann es bei einer zu hohen Akkumulation von Fusionsprotein möglicherweise zur Bildung von Aggregaten kommen, welche von intrazellulären Proteasen abgebaut werden. Bei geringerer Expression von Fusionsprotein pro Zeiteinheit hingegen, wie möglicherweise in DH5αZ1, findet eine solche Aggregation unter Umständen nur in geringerem Ausmaß statt.

Die drei weiteren, hinsichtlich ihrer Zelloberflächenexposition untersuchten Domänen Calmodulin, *BLIP* und *TEM-1* β-Laktamase waren auf der Oberfläche der produzierenden Zellen des Stammes 71-18P' nicht präsentierbar. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass eine Destabilisierung der äußeren Membran möglicherweise die Translokation des Intimin-Fusionsproteins verbessert. Die Zellen wurden deshalb in Anwesenheit unterschiedlicher chemischer Zusätze (2.2.1.3) im Wachstumsmedium inkubiert. Dabei konnte die *Il-4* Präsentation in Anwesenheit von 0,1 % (w/v) SDS deutlich verbessert werden. Die aus Lipiden aufgebaute äußere Membran von *E. coli* wird möglicherweise durch die Anwesenheit des Detergenz Dodecylsulfat derart destabilisiert, dass die Blockade der Translokation von *Il-4* teilweise aufgehoben wird. Die Präsentation von Calmodulin konnte durch Kultivierung der produzierenden Zellen in Anwesenheit von EDTA einer Endkonzentration von 1 mM sehr stark verbessert werden. Der Chelatkomplex-Bildner EDTA ist befähigt, eventuelle, von Calmodulin gebundene Kalzium-Ionen aus dem Molekül zu binden und zu entfernen. Es ist daher plausibel anzunehmen, dass durch Entfernen der Kalzium-Ionen das Molekül in eine translozierbare, weniger rigide gefaltete Form überführt wird und diese eine Translokation und Oberflächenpräsentation gestattet. Durch nachträgliche Zugabe von Kalzium-Ionen zu den in Anwesenheit von EDTA gewachsenen, präsentierenden Zellen konnte die funktionelle Faltung von Calmodulin auf der Zelloberfläche wiederhergestellt werden. Das Molekül ist danach wieder in der Lage, ein Fusionsprotein aus β-Laktamase und dem natürlichen Bindepeptid der Myosin-Kinase (Blumenthal *et al.*, 1985), einem natürlichen Substrat von Calmodulin, zu binden. Dies zeigt, dass die funktionale Oberflächenpräsentation auch größerer Proteindomänen als *EETI-CK*^{send} mittels *EaeA'* prinzipiell möglich ist, dass die Exposition auf der Zelloberfläche jedoch von speziellen Merkmalen der Kinetik und/oder der Thermodynamik der Faltung der Passagierdomänen abhängig ist.

Neben Interleukin 4 und Calmodulin konnte durch Behandlung mit Chemikalien während des Kulturwachstums auch das β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*) aus *Streptomyces clavuligerus* präsentiert werden. Hier war ein positiver Einfluss von Reduktionsmitteln zu beobachten. Durch Anwesenheit von 20 mM β-Mercaptoethanol im Medium konnte eine Verbesserung der Präsentation erreicht werden. Auch die Verwendung von 71-18dsbA als Wirtsstamm bewirkte eine erhöhte Nettoakkumulation auf der Zelloberfläche. Dieser Stamm besitzt kein funktionales *DsbA* Protein, welches die Ausbildung von Disulfidbrücken beschleunigt (Bardwell *et al.*, 1991). Gefaltetes *BLIP* besitzt im Molekül zwei geschlossene Disulfidbrücken. Offensichtlich ist eine Ausbildung derselben bereits im Periplasma mit einer Translokation durch die äußere Membran von *E. coli* nicht vereinbar. In hoher Kopienzahl wurde *BLIP* nur dann auf der Zelloberfläche exponiert, wenn die produzierenden Zellen nicht in der Lage waren, die Bildung von Disulfidbrücken katalytisch zu beschleunigen und die spontane Disulfidbildung durch Zusatz von Reduktionsmitteln unterdrückt wurde. Es ist plausibel anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen die Oxidation der Passagierdomäne *BLIP* stark verlangsamt ist und dies eine Translokation durch die äußere Membran begünstigt.

Die größte strukturelle Domäne, mit der eine Oberflächenpräsentation über *EaeA'* untersucht wurde, war die *TEM-1* β-Laktamase von *E. coli* (278 Aminosäuren) und somit auch das einzige Enzym, das zu diesem Zwecke herangezogen wurde. Es wurden unterschiedliche Bedingungen experimentell evaluiert, um auch in diesem Fall eine Exposition auf der Bakterienoberfläche zu erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, mit dem *EaeA'* System die Exposition des Wildtyp Enzyms auf der Zelloberfläche zu bewerkstelligen. Durch ungerichtete Mutagenese wurden Varianten der *TEM-1* β-Laktamase gewonnen, die über *EaeA'* auf der Oberfläche der Zellen präsentierbar waren und auch noch β-Laktamaseaktivität aufwiesen. Alle identifizierten Mutationen führten zum Austausch eines der beiden Cysteinreste im Molekül, die für die Ausbildung der Disulfidbrücke nötig sind, gegen eine raumfüllende Aminosäure (Arginin bzw. Tyrosin). Dadurch kann zum einen die Disulfidbrücke nicht mehr ausgebildet werden, und zum anderen wird die Struktur neben dieser fehlenden Stabilisierung möglicherweise durch die Ausdehnung der neuen Aminosäureseitenkette weiter destabilisiert.

Aus den Untersuchungen zur Translokation der diversen Passagierdomänen lassen sich einige mechanistische Folgerungen den Prozess der Translokation durch die äußere Membran betreffend ableiten. Es konnten drei kritische Parameter identifiziert werden: (a) die Größe der Passagierdomäne, (b) die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma der Zellen und (c) die Faltung der Passagierdomäne im periplasmatischen Raum. Für *EETI-CK*^{send} ist eine sehr schnelle Faltung mehrfach beschrieben (Le-Nguyen *et al.*, 1993, Heitz *et al.*, 1995, Wentzel *et al.*, 1999), so dass davon auszugehen ist, dass dieses bereits im Periplasma der Zellen gefaltet vorliegt. Trotzdem wird es transloziert und präsentiert. Immunglobulindomänen kommt offensichtlich bei diesem Präsentationssystem eine Sonderstellung zu, da drei der natürlichen Intimindomänen eine Immunglubulin-ähnliche Faltung aufweisen. Allerdings werden die Domänen E0, E1 und E2 des Intimins im Gegensatz zu REI_v nicht durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert. Die Bildung dieser Disulfidbrücke in REI_v ist ein vergleichsweise langsamer Prozess und hat einen großen

Anteil an der Faltung des Proteins (Schmidt, 1995, Frisch *et al.*, 1996). Möglicherweise wird dadurch ein Zeitfenster eröffnet, in dem eine Translokation der noch nicht vollständig gefalteten Immunglobulindomäne durch die äußere Zellmembran stattfinden kann (Abb. 27A). Stabilisieren Disulfidbrücken die Faltung bereits im Periplasma, steht dies einer vollständigen Translokation durch die Bakterienhülle, wie im Falle von *BLIP* gezeigt, in vielen Fällen entgegen. Gleiches dürfte für die Stabilisierung der Passagierdomäne durch Heteroatome wie im Falle von Calmodulin durch Kalzium-Ionen gelten. Das Unterbinden einer frühzeitigen Stabilisierung der Faltung durch Reduktionsmittel oder Chelatoren lässt die Translokation in zumindest partiell ungefaltetem Zustand zu. Wie im Falle der β-Laktamase gibt es demgegenüber jedoch auch Proteindomänen, die selbst durch die Zugabe von Agenzien, die in anderen Fällen eine Exposition begünstigen, eine Oberflächenpräsentation über das *EaeA′* Protein unmöglich machen. Erst die Einführung destabilisierender Mutationen kann zur Überführung in eine Translokations-permissive Form führen.

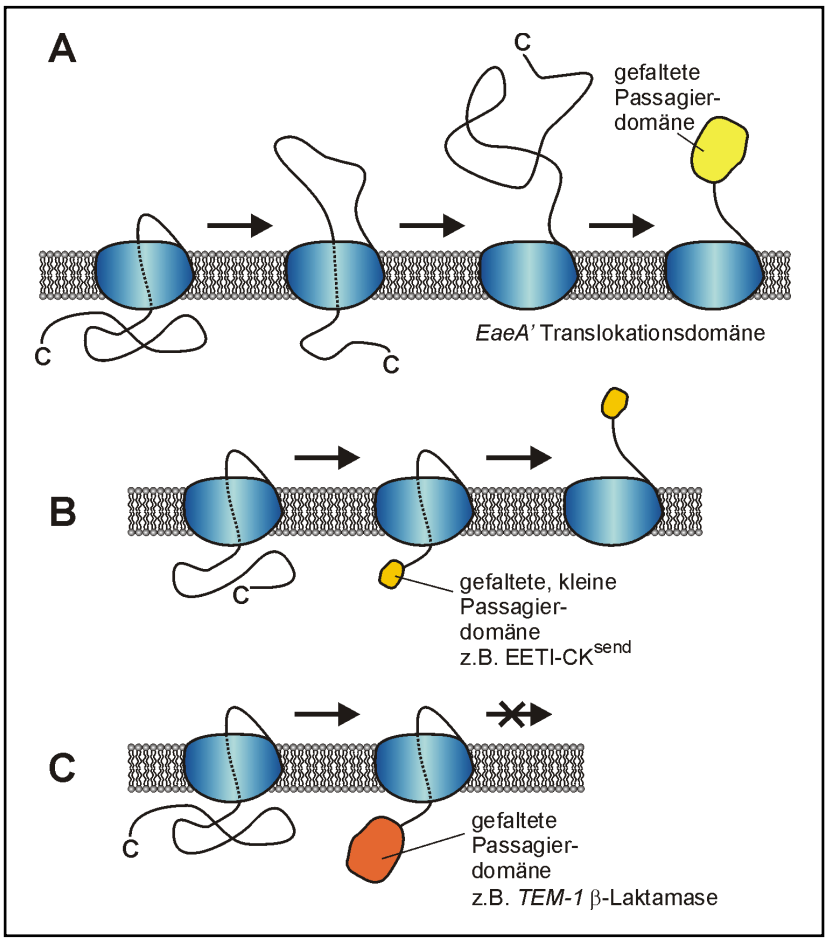


Abbildung 27. Schematische Darstellung der *Intimin′* vermittelten Translokation durch die äußere Membran von *E. coli*. (A) Autotransport-Mechanismus analog zu dem von T. F. Meyer und Mitarbeitern für AIDA-I vorgeschlagen (verändert nach Lattemann *et al.*, 2000). (B) Präsentation des bereits im Periplasma gefaltetem Mikroprotein *EETI-CK^{send}* über *EaeA′*. Das gefaltete Protein kann transloziert werden. (C) Die Faltung einer größeren Domäne, die bereits im Periplasma gefaltet vorliegt, kann nicht auf der Oberfläche präsentiert werden. Durch partielle Entfaltung kann eine Translokation wieder gewährleistet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem *Intimin′* basierten Präsentationsverfahren auf *E. coli* ein robustes Werkzeug für die Durchmusterung umfangreicher

molekularer Bibliotheken zur Anreicherung von Varianten mit verbesserten oder neuen Funktionalitäten zur Verfügung steht. Offenbar gelten jedoch hierbei für die Intimin-vermittelte Translokation von Passagierproteinen durch die äußere Membran von *E. coli* die gleichen einschränkenden Bedingungen wie für die Familie der bakteriellen Autotransport-proteine beschrieben (Lattemann *et al.*, 2000). Eine vorzeitige Faltung zu translozierender Domänen und deren strukturelle Fixierung durch Disulfidbrücken bereits vor der Translokation stehen dort, wie auch im Falle von *EaeA′* einer Passage durch die Membran entgegen (Abb. 27C). Passagierdomänen werden nur in zumindest partiell entfaltetem Zustand transloziert. Eine Ausnahme bildet hier offenbar das Mikroprotein *EETI-CK*^{send}, das drei Disulfidbrücken und einen schnellen Faltungsweg besitzt und sehr wahrscheinlich bereits gefaltet transportiert wird (Abb. 27B).

Autotransporter wie die *IgA*-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* ermöglichen wie Intimine die Zelloberflächenexposition einer fusionierten Passagierdomäne, sind jedoch gänzlich anders aufgebaut als diese (Pohlner *et al.*, 1987a,b, Klauser *et al.*, 1992, Maurer *et al.*, 1997, Lattemann *et al.*, 2000). Während bei ersteren die Translokatordomäne carboxyterminal angeordnet ist, ist diese bei Intiminen aminoterminal positioniert. Intimine und Autotransporter weisen zudem bezüglich ihrer Translokatorregionen keinerlei Sequenz-homologien auf. Für *IgA*-Protease wurde ein Mechanismus für die Translokation der Passagierdomäne vorgeschlagen, der auf eine Oligomerisierung der membranständigen Domäne beruht. Ein Export der Passagierdomäne soll demnach durch die dadurch gebildete zentrale Pore erfolgen (Veiga *et al.*, 2002). Es wäre daher interessant zu ergründen, ob im Falle des Intimins, wie von Veiga und Mitarbeitern vorgeschlagen, die Translokation durch eine gemeinsame Membranpore, durch den Innenraum des β-Fasses eines individuellen Transmembranmoleküls, durch die Membran oder an der Protein/Lipid Grenzfläche stattfindet. Auch ohne Wissen über die mechanistischen Details des Intimin-vermittelten Proteinexports konnten empirische Rahmenbedingungen geschaffen werden, die eine Exposition diverser Passagierdomänen auf der Zelloberfläche zuließen. Damit steht nun mit *Intimin′* ein robustes Werkzeug zur Verfügung, unterschiedliche Passagierdomänen als Grundgerüst für die Erzeugung und Durchmusterung molekularer Repertoires einer extrazellulären Funktionsabfrage zugänglich zu machen.

4. Material

4.1 Stämme von Escherichia coli

DH5α (Hanahan, 1983)

[F^- (Φ80d*lacZ*ΔM15) Δ(*lacZYA-argF*)*U169 deoR recA1 hsdR17*($r_k^- m_k^-$) *endA1 supE44* λ^- *thi-1 gyrA(nal^r) relA1*]

DH5αZ1 (Lutz & Bujard, 1997)

[F^- (Φ80d*lacZ*ΔM15) Δ(*lacZYA-argF*)*U169 deoR recA1 hsdR17*($r_k^- m_k^-$) *endA1 supE44* λ^- *thi-1 gyrA(nal^r) relA1 tetR$^+$ lacR$^+$ sp^r*]

71-18 (Quelle: B. Müller-Hill)

[F' *lac*I^q (*lac*ZΔM15) *pro*A$^+$B$^+$ Δ(*lac-pro*AB) *sup*E *thi-1*]

71-18P' (Quelle: H. Kolmar)

71-18P' wurde selektiert als resistente Stamm-Variante von 71-18 nach Infektion mit einem lytischen *E. coli* Phagen nicht näher charakterisierter Art. Zellen dieses Stammes tragen wahrscheinlich eine nicht näher bestimmte Mutation in einem exponierten Rezeptorprotein der Bakterienoberfläche und sind mit einigen lytischen Phagen wie z.B. T5 nicht infizierbar.

71-18dsbA (Quelle: H. Kolmar)

[F' *lac*I^q (*lac*ZΔM15) *pro*A$^+$B$^+$ Δ(*lac-pro*AB) *sup*E *thi-1 dsbA::kan1*]

Der Stamm 71-18dsbA wurde durch P1-Transduktion von *dsbA::kan1* aus JCB609 (Bardwell *et al.*, 1991) in 71-18 hergestellt.

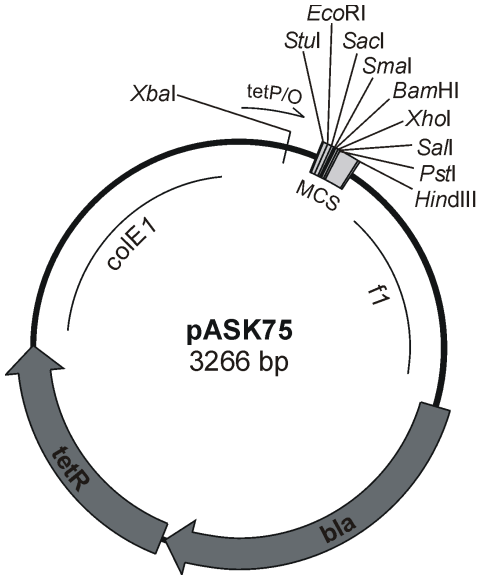
71-18mutS (Kramer, *et al.*, 1984)

[F' *lac*I^q (*lac*ZΔM15) *pro*A$^+$B$^+$ Δ(*lac-pro*AB) *sup*E *thi-1 mut*S*::Tn10*]

WK6 (Quelle: W. Kramer)

[F' *lac*I^q (*lac*ZΔM15) *pro*A$^+$B$^+$ Δ(*lac-pro*AB) *gal*E *str*A *nal^r*]

4.2 Plasmide

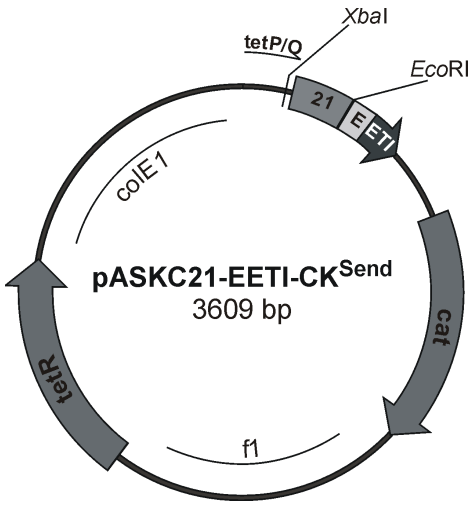


Name: pASK75

Größe: 3266 bp

Elemente: β-Laktamase Gen (*bla*)
TetA-Repressor (*tetR*)
colE1-Replikationsurprung (*colE1*)
f1-Replikationsursprung (*f1*)
TetA Pomotor/Operator-Region (*tetP/O*)
multiple cloning site (*MCS*)
wichtige Restriktionsschnittstellen der MCS sind angegeben

Zitat: Skerra, 1994

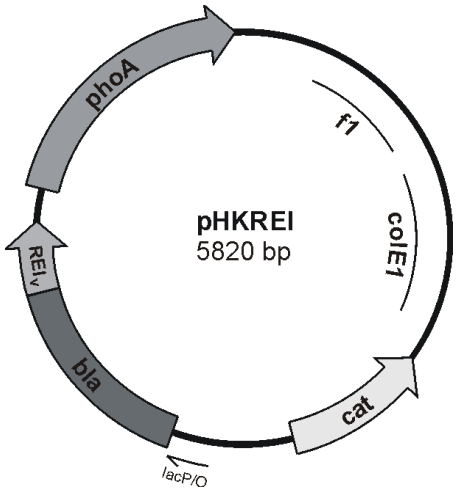


Name: pASKC21-EETI-CK^{send}

Größe: 3609 bp

Elemente: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*)
TetA-Repressor (*tetR*)
colE1-Replikationsurprung (colE1)
f1-Replikationsursprung (f1)
TetA Pomotor/Operator-Region (*tetP/O*)
OmpA21-E-tag-EETI-II Oberflächenpräsentationsmodul (*21-E-ETI*)

Zitat: nicht veröffentlicht, verändert nach Christmann *et al.*, 1999 (pASK21-EETI)

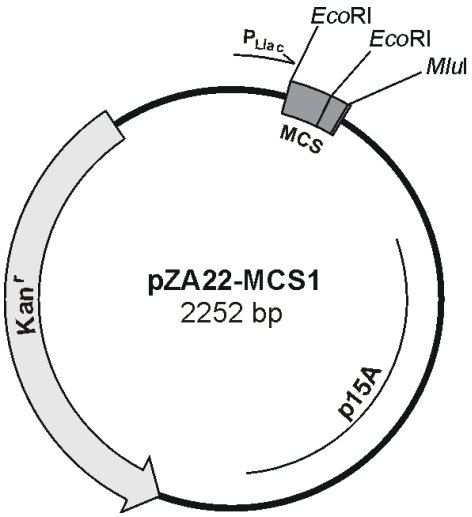


Name: pHKREI

Größe: 5820 bp

Elemente: Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*)
colE1-Replikationsurprung (*colE1*)
f1-Replikationsursprung (*f1*)
lac Pomotor/Operator-Region (*lacP/O*)
β-Laktamase Gen (*bla*)
REI$_v$ kodierende Sequenz
kodierende Sequenz für alkalische Phosphatase (*phoA*)

Zitat: Kolmar *et al.*, 1992

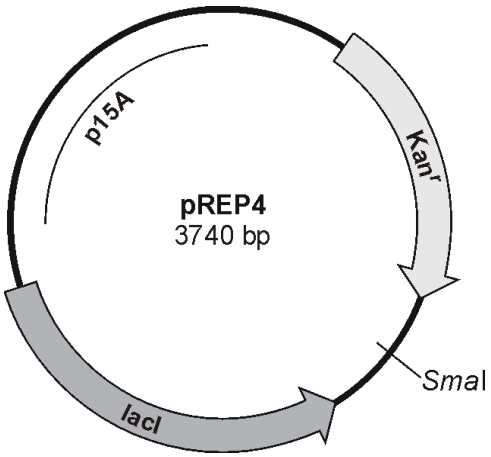


Name: pZA22-MCS1

Größe: 2252 bp

Elemente: Kanamycin Resistenz-Gen (*Kan*^{r})
p15A-Replikationsurprung (*p15A*)
P_{Llac} Pomotor/Operator-Region (P_{Llac})
multiple cloning site (*MCS*)
Wichtige und im Rahmen dieser Arbeit verwendete Restriktionsschnittstellen der MCS sind angegeben.

Zitat: Lutz & Bujard, 1997



Name: pREP4

Größe: 3740 bp

Elemente: Kanamycin Resistenz-Gen (*Kan*^{r})
p15A-Replikationsurprung (*p15A*)
multiple cloning site (*MCS*)
codierende Sequenz für den *Lac*-Repressor (*lacI*)
Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Restriktionsschnittstelle für *Sma*I ist angegeben.

Quelle: Qiagen

4.3 Oligodesoxyribonukleotide

Synthetische Oligodesoxyribonukleotide wurden bezogen von den Unternehmen Metabion GmbH (Martinsried), SigmaARK GmbH (Darmstadt) und MWG Biotech AG (Ebersberg).

4.3.1 Oligodesoxyribonukleotide für die Sequenzierung

ASK-up-IR 5'-(IRD800)-TACCACTCCCTATCAGTG-3'

Etag-Seq-up 5'-(IRD800)-AATTCCTCCAACGCCCCTG-3'

Int100-low 5'-(IRD800)-TATCAACAGGGACACCAGG-3'

pASKD-IR 5'-(IRD800)-GTGATAGAGAAAAGTGAA-3'

pASKU-IR 5'-(IRD800)-TTAATGCGCCGCTACAGG-3'

RSPU-IR 5'-(IRD800)-GTGAATTTCGACCTCTAG-3'

4.3.2 Oligodesoxyribonukleotide für die Amplifikation mittels PCR

ASKprom-BglII-up	5‘-GCGCAGATCTCCATCGAATGGCCAGATG-3‘
ASKprom-Nhe	5‘-GCGCGCTAGCCCATCGAATGGCCAGATG-3‘
AWcatlow	5’-CGCGTCGACAAGCTTGAAAACGTTTCAGTTTGC-3’
AW-cat-Sal-low	5‘-GCGCGTCGACAAAAATTACGCCCCGCCCT-3‘
Bla-BglII-low	5‘-GCCCAGATCTCCAATGCTTAATCAGTGAG-3‘
Bla-Sma-up	5‘-GCGCCCCGGGCACCCAGAAACGCTGGTG-3‘
BLIP-low	5’-GCGCGGATCCTTATGATGAATCGTATGGTTCGATATCAC-CTAATGATCCATCTACAAGGTCCCACTGCCG
BLIP-up	5’-GCGCGCCCGGGGCGGGGGTGATGACCGGGG-3’
Calmodulin-BglII-low	5’-GCGCAGATCTCTTTGCAGTCATCATCTGTACAAAC-3’
Calmodulin-Sma-up	5’-GCGCCCCGGGATGGCTGATCAGCTGACCGAAGAAC-3’
Cat-Hind-low	5’-GCGCAAGCTTACTTTGCAGTCATCATCTG-3’
Cat-Hind-Mitte-low	5‘-CCACAAGCTTGAAAACGTTTCAG-3‘
EheI-up	5’-CAGCTGTTGCCCGTCTCG-3’
Etag-PvuII-up	5’-GCGCCAGCTGGGTGCGCCGGTACCGTATCC-3’
IL4-Send-low	5’-GCGCGGATCCTTATGATGAATCGTATGGTTCGATATCAC-CTAATGATCCATCGCTCGAACACTTTGAATATT-3’
IL4-up	5’-GCGCCCCGGGCACAAGTGCGATATCACC-3’
Intilo1	5’-GCGCCAATTGCGCTGGCCTTGGTTTGATC-3’
Intimin-amber-low	5’-GCGCGAATTCTAATTAACATAAAAAAACAATCC-3’
Intimin-up	5’-GCGCTCTAGATAACGAGGGCAAAAAATGATTACTCATG-GTTGTTATAC-3’
pASK-cat-5’-seqlo	5’-TATCAACAGGGACACCAGG-3’
REI-lo-BglII	5’-GCGCAGATCTCCTAGTGATTTGAAGCTTAG-3’
RSPX	5’-GTGAATTTCGACCTCTAG-3’
SupE2-Eco-up	5’-GCGCGAATTCACCAGAAAGCGTTGTACGG-3’
SupE2-Mlu-lo	5’-GCGCACGCGTAAGACGCGGCAGCGTCGC-3’

4.4 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

4.4.1 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, *Eco*47I 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, *Eco*91I geschnitten

Fragmentlängen in bp:
8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117

λ-DNA, *Hin*dIII geschnitten

Fragmentlängen in bp:
23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125

4.4.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine

"*low-range*"-Standard (BioRad)

relatives Molekulargewicht: 97 400 (Phosphorylase b, Kaninchenmuskel), 66 200 (Rinderserum-Albumin, Rinderserum), 42 700 (Ovalbumin, Hühnereiweiß), 31 000 (Kohlensäure-Anhydrase, Rind), 21 500 (Trypsin-Inhibitor, Soyabohne), 14 400 (Lysozym, Hühnereiweiß)

Molekulargewichtsstandard „*protein ladder*“ (MBI Fermentas)

Bestehend aus 14 rekombinant erzeugten Proteinen der relativen Molekulargewichte 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 40 000, 50 000, 60 000, 70 000, 85 000, 100 000, 120 000, 150 000 und 200 000; die Bande bei 50 000 erscheint stärker ausgeprägt.

4.5 Chemikalien

Acros Organics, Geel, Belgien

Anhydrotetrazyklin

Applichem, Darmstadt

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

Baker, Deventer, Niederlande

Dimethylformamid

Biozym, Hessisch Oldendorf

Chill Out 14 Flüssigwachs

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

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA.,USA
PADAC (Substrat für β-Laktamase)

Carl Roth, Karlsruhe
Paraffin, Einmalküvetten für Photometer, Rotiphorese 30, Rotiphorese 40, APS, NBT, BCIP

Difco, Dreieich
Bacto-Agar

Fluka, Neu-Ulm
DMSO, Bromphenolblau, Glyzerin, β-Mercaptoethanol, Saccharose, Trypsin, Coomassie Brillant Blue R, Natriumchlorid, D(+)-Glukose Monohydrat

Gerbu, Gaiberg
IPTG

Gibco BRL, Eggenstein
Yeast Extract

ICN Biochemicals, Aurora, OH., USA
Borsäure, EDTA, Tris

Life Technologies, Gaithersburg, MD., USA
UltraPure Agarose (Electrophoresis Grade)

Merck, Darmstadt
Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, die zur Anwendung kamen.

Metabion, Martinsried
Oligodesoxyribonukleotide

MJ Research, Waltham, MA., USA
Chill Out 14 (Flüssigwachs)

MWG Biotech, Ebersberg
Oligodesoxyribonukleotide

National Diagnostics, Atlanta, GA., USA
Protogel, Sequagel XR, Sequagel Complete

Oxoid, Wesel
Agar Bacteriological, Trypton, Yeast Extract

Riedel-De Haen, Seelze
Ammoniumacetat, Chloroform, Ethanol, Formamid, Methanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Ammoniumsulfat

Serva, Heidelberg
DTT, EDTA, D(+)-Glukose Monohydrat, SDS, TEMED, APS

Sigma-Aldrich, München

Borsäure, Ethidiumbromid, Bromphenolblau, Tris, Triton X-100, Chloramphenicol, Kanamycin, Tween 20 (Polyethylen-Sorbitan-Monolaureat), Tetrazyklin

Sigma-ARK, Steinheim

Oligodesoxyribonukleotide

4.6 Enzyme und Proteine

Amersham Pharmacia

Anti-E Antikörper, monoklonal

5prime-to-3prime Inc., Boulder, CO., USA

Anti-β-Laktamase Antikörper (polyklonaler Anti-β-Laktamase-Kaninchen-Antikörper)

BioRad, München

Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE *molecular weight standard*, 'low-range')

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

DNA-Längenstandards, Restriktionsendonukleasen, Rinderserumalbumin (BSA), T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Polymerase, T4 Polynukleotidkinase, *calf intestine* Alkalische Phosphatase (CIAP), Molekulargewichtsstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Puffer für benannte Enzyme

Molecular Probes, Eugene, OR., USA

Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1 mg/ml)

New England Biolabs, Bad Schwalbach

Restriktionsendonukleasen, Puffer für Restriktionsendonukleasen, Rinderserum-albumin (BSA)

Promega, Madison, WI., USA

Tfl-Polymerase (5 u/μl)

Sigma, Deisenhofen

α-Rabbit IgG (whole molecule), Biotin-Konjugat (polyklonaler Anti-Kaninchen-Antikörper), α-Mouse IgG (whole molecule), Biotin-Konjugat (polyklonaler Anti-Maus-Antikörper), α-Mouse IgG (whole molecule), Alkalische Phosphatase-Konjugat (polyklonaler Anti-Maus-Antikörper), Ponceau S

4.7 Sonstige Materialien und Geräte

American National Can., Greenwich, CN., USA

Parafilm "M" Laboratory Film

Amersham Pharmacia / LKB, Freiburg

Elektrophorese Stromversorger ECPS 3000/150, Novoblot Elektrophoretische Transferapparatur, AutoRead 1000 Sequencing Kit, Ultrospec II Spektralphotometer (LKB Biochrom)

Ansell, München

Puderfreie Einmal-Handschuhe

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Vortex Genie 2

BioRad, München
Gene Pulser und Pulse Controller, Elektroporationsküvetten

Biozym, Hessisch Oldendorf
PCR-Tube ultradünn, 0,2 ml

Branson Ultrasonics, Danbury, CT., USA
Sonifier Ultraschallstab und Steuereinheit

Coulter Corporation (Epics Division), Hialeah, FL., USA
EPICS Alignment Fluorespheres for optical alignment of flow cytometers, fluoreszierende MicroBeads

Cytomation Inc., Fort Collins, CO., USA
MoFlo Cytometer mit Cyclone Sortiereinheit, Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) mit Coherent Laser Enterprise II, CyClops Software-Paket

Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
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

Genomed, Bad Oeyenhausen
JetStar Plasmid Midiprep Kit 2.0

Gilson, Middleton, WI., USA
Mikroliter-Pipetten, 1000 μl, 200 μl, 20 μl und 10 μl

Hardware & Service, Groß Schneen
Agarosegelkammern, Heizblock-Thermostate

Heinzinger, Rosenheim
Stromversorger LNGs 350-06

Helma, Müllheim/Baden
Quarzküvetten (0,5 ml und 2 ml, 1 cm Schichtdicke)

Heraeus, Hanau
Mikrobiologische Brutschränke

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

Hoefer Scientific, San Francisco, CA., USA
Platten für SDS-Gele, Midget-Apparatur

Infors HT, Bottmingen-Basel, Schweiz
Schüttelwasserbad, Inkubationsschüttler

Ingold, Steinbach/Ts
pH-Elektrode U402-M5

Invitek, Berlin
Invisorp Spin Plasmid Mini Kit, Invisorp Spin DNA Extraction Kit, dNTP

IKA-Labortechnik, Staufen
beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT

Knick, Berlin
pH-Meter 761 Calimatic

Kontron, Eching
Zweistrahl-Spektralphotometer Uvicon 930, Centrikon T-1055 Ultrazentrifuge + TST41-14 Schwenkbecherrotor, Ultrazentrifugenröhrchen

Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Wasserbad

Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE., USA
DNA Sequencer Model 4000L und 4100L, incl. Softwarepaket BaseImagIR V2.21

Machery & Nagel, Düren
Nucleotrap und NucleotrapCR Kit

Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger (76 x 26 mM), Deckgläser (18 x 18 mM)

Merck, Darmstadt
pH-Indikator-Teststäbchen

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

MJ Research, Waltham, MA., USA
DNA Thermal Mini-Cycler PTC-150

MWG Biotech, Ebersberg
Primus 96 Thermo-Cycler

Nalgene, Hereford, England
Cryoware Cryovial (2 ml-Röhrchen für Gefrierkulturen)

Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit

Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml, Petrischalen, Röhrchen 5 ml, Röhrchen 12 ml, Röhrchen 50 ml

Sartorius, Göttingen
Minisart NML Sterilfilter 0,2 μm und 0,45 μm, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

Savant Instruments, Vaterstetten
Speed Vac Concentrator SVC 200 H

Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulose-Membranen (0,45 μm), 3 MM-Filterpapier (Whatman)

Schott, Mainz
Glaswaren

SLM Aminco, Rochester, NY., USA
French Pressure Cell Press, French Pressure Cell

Sorvall, Bad Nauheim
Zentrifuge RC-5C, Rotortypen SS34, HB-4 und GSA

Terumo, Leuven, Belgien
Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
pH-Meter-522

Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 10 x, Sehfeldzahl 20, Objektive: Plan Neofluar 63 x/1,25 Oil, 440480, Plan Neofluar 100 x/1,25 Oil, 440460, Acroplan 20 x, 440845, Immersionsöl

4.8 Zusammensetzung der Nährmedien

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

M9-Minimalmedium
7 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 3 g KH_2PO_4, 1 g NH_4Cl, H2O ad 1000 ml. Komplettiert mit 25 ml 20 % (w/v) Glukose, 1 ml 100 mM $CaCl_2$, 1 ml 1 M $MgSO_4$, 5 ml 0,1 mM $FeCl_3$, 1 ml 0,1 % (w/v) Thiamin, jeweils aus sterilen Lösungen zugesetzt.

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

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

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar Bacteriological (Oxoid) zugegeben.

Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/l Chloramphenicol, 12,5 mg/l Tetrazyklin bzw. 75 mg/l Kanamycin zugegeben.

4.9 Lösungen und Puffer

Alkalische Phosphatase-Puffer
0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,05 M $MgCl_2$

APS-Stammlösung
10 % APS in Wasser

ATC-Stammlösung
2 mg/ml Anhydrotetrazyklin in Dimethylformamid

BCIP-Stammlösung
50 mg/ml BCIP in Dimethylformamid

Blocking-Puffer
5 % BSA in PBS-Puffer

***Calf Intestine* Alkalische Phosphatase Puffer (10x)**
0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M $MgCl_2$

Chloramphenicol-Stammlösung
25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % Ethanol

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

Ethidiumbromid-Stammlösung (10x)
10 mg/ml Ethidiumbromid

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

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

NBT-Stammlösung

75 mg/ml NBT in Dimethylformamid

Nucleotrap- und NucleotrapCR-Puffer (Macherey & Nagel)

Zusammensetzung der Puffer NT1, NT2, NT3, sowie der Nucleotrap- und NucleotrapCR-Suspension sind vom Hersteller nicht angegeben.

PAG-Färbelösung

50 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure, 0,75 % Coomassie Brillant Blue R

PBS-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4

PBST-Puffer

140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 0,05 % (v/v) Tween 20

Phenollösung (Grinsted & Bennet, 1990)

500 g festes Phenol wurden in 130 ml Wasser, 7,5 ml 2 N NaOH und 6 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 gelöst. Zum Schutz vor Oxidation wurde 8-Hydroxychinolin (0,1 % (w/v)) hinzugefügt und die Lösung lichtgeschützt in einer dunklen Flasche bei 4 °C gelagert. Die so präparierte Phenollösung wird im folgenden als Phenol, die Mischung aus je 50 % (v/v) Phenollösung und Chloroform wird im Rahmen dieser Arbeit als Phenol/Chloroform bezeichnet.

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

Protein-Probenpuffer

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) Glyzerin, 70 mM β-Mercaptoethanol, 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau

Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)

Blau: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$

Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl

Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl

Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 10 mM $MgCl_2$, 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 $MgCl_2$, 1 mM DTT

NEB2: 10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 1 mM DTT

NEB3: 50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

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

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

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

T4 DNA-Ligase-Puffer

400 mM Tris-HCl, pH 7,8 bei 25 °C, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP

T4 DNA-Polymerase-Puffer (5x)

335 mM Tris-HCl, pH 8,8, 33 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 84 mM $(NH_4)_2SO_4$

***Taq* DNA-Polymerase-Puffer / *Taq*-Puffer**

50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 15 mM $MgCl_2$, 1 % (w/v) Triton X 100

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

***Tfl* DNA-Polymerase-Puffer (20x)**

1 M Tris-HCl, pH 9,0, 400 mM Ammoniumsulfat, 30 mM $MgCl_2$

Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

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

Tris-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 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.

***Western Blot*-Transferpuffer**

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

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

4.10 Verwendete Computer-Software

Windows NT, 2000, XP (Microsoft Corporation)

Office 97, 2000, Word 2002 (Microsoft Corporation)

Internet Explorer Version 5.0, 6.0 (Microsoft Corporation)

Netscape Communicator Version 4.51 (Netscape)

Acrobat Reader Version 5.0 (Adobe)

Vector NTI 5 (*Demonstration Version*) (Informax Inc.)

SigmaPlot 2000, Version 8.0 (*Demonstration Version*) (Jandel Software, SPSS Inc.)

Molmol Version 2K.2 (Reto Koradi)

Chromas 1.45 (Conor Mc Carthy, School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus, Southport, Queensland, Australia)

Corel Draw 9.397 (Corel Corporation)

EndNote 6.0 (*Trial Version*) (Thomson ISI ResearchSoft)

5. Methoden

5.1 Handhabung von Bakterien

5.1.1 Lagerung von *Escherichia coli*

Zur dauerhaften Lagerung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden Glyzerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer stationären Übernachtkultur des betreffenden Bakterienstammes mit 3 ml durch Autoklavieren sterilisiertem Glyzerin versetzt und bei -20 °C in einem Schraubdeckelgefäß eingelagert. Bakterienstämme, die häufiger Verwendung fanden, wurden auf M9-Minimalmediumsplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht kultiviert. In dieser Form konnten sie anschließend bei 4 °C für bis zu acht Wochen aufbewahrt werden.

5.1.2 Vermehrung von *Escherichia coli*

Alle verwendeten *Escherichia coli*-Stämme wurden, wenn nicht explizit anders spezifiziert, bei 37 °C in dYT-Medium vermehrt. Im Falle von Plasmid-kodierter Resistenz wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika aus sterilen Stammlösungen komplettiert. Bis zu einem Volumen von 5 ml wurden die Kulturen zur Sicherstellung ausreichender Luftzufuhr unter Rollen in Kulturröhrchen inkubiert. Kulturen mit einem Volumen von bis zu 50 ml wurden zu diesem Zweck in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 150 Upm unter einer Wärmehaube geschüttelt. Kulturen mit einem Volumen von 1.000 ml wurden in der Regel mit 25 ml einer Vorkultur in logarithmischer Wachstumsphase beimpft und bei ebenfalls 150 Upm im temperierbaren Schüttel-Wasserbad inkubiert.

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde durch Messung der Optischen Dichte bei 600 nm ($O.D._{600}$) photometrisch bestimmt. Gegebenfalls wurden die Kulturen mit sterilem dYT-Medium bis zu einer $O.D._{600}$ von maximal 1 verdünnt.

5.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* Zellen wurde standardmäßig nach der Elektroporationsmethode (Dower *et al.*, 1988) verfahren. Zur Plasmid-Vermehrung und zur Vermehrung von durch Ligation von DNA-Fragmenten erzeugten Plasmiden wurden 50 ml dYT-Medium mit Zellen des entsprechenden Bakterienstammes von einer M9-Minimalmediumsplatte inokuliert und diese bis zu einer $O.D._{600}$ von 0,4 bis maximal 0,6 vermehrt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem 50 ml Schraubdeckelgefäß pelletiert (Hettich-Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) und in 50 ml eiskaltem, autoklaviertem demineralisierten Wasser durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren aufgenommen und erneut unter denselben Bedingungen wie zuvor abzentrifugiert. Dieses Waschen der Zellen wurde zweimalig wiederholt, wobei bei der ersten Wiederholung in 40 ml, bei der zweiten in 30 ml eiskaltem, sterilem demineralisierten Wasser resuspendiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen des Pellets in 200 µl–400 µl eiskaltem Wasser resuspendiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Zur Transformation wurden auf Eis 100-150 µl der vorbereiteten Zellsuspension mit 0,5-4 µl DNA-Lösung versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm, Fa. BioRad)

überführt. Der Vorgang der Elektroporation wurde mit Hilfe eines *Gene Pulser*s der Firma BioRad unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Stromstärke 200 mA, Spannung 2,5 V, Feldstärke 6250 V/cm, Impuls 5 s, Zeitkonstante 4,0 - 4,5 ms, Raumtemperatur. Unmittelbar nach der Auslösung des Potentialpulses wurde 1 ml steriles, Antibiotika-freies dYT-Medium in die Elektroporationsküvette hinzugegeben, der gesamte Inhalt in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz unter anderem zur Bestimmung der Transformationsausbeute in Verdünnung auf selektive Vollmediums-Agarplatten ausgestrichen, bzw. es wurden mit diesem 50 ml selektives dYT-Medium inokuliert.

5.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Molekularbiologische Arbeitstechniken, die im Folgenden nicht explizit aufgeführt und beschrieben sind, wurden nach Sambrook *et al*. (1989) durchgeführt.

5.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige 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 mittels eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0,2 μm sterilfiltriert.

5.2.2 Reinigung und Präzipitation von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Alkoholische Präzipitation von DNA

Zur Präzipitation von DNA in wässrigem Milieu wurde die DNA-haltige Lösung mit 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetatlösung sowie 3 Vol. 96 % Ethanol versetzt und in der Regel 45 min bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation in der Kälte (13 000 Upm, 15 min, 4 °C). Das DNA-haltige Pellet wurde sodann mit 3 Vol. 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und die DNA erneut bei identischen Bedingungen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, eventuelle Reste von Ethanol und Ammoniumacetat wurden anschließend bei 37 °C durch Abdampfen entfernt und auf diesem Wege das DNA-Pellet getrocknet. Die trockene DNA wurde danach bis zur gewünschten Konzentration in sterilem demineralisierten Wasser gelöst.

Gelegentlich wurde DNA anstelle mit Ethanol mit 2-Propanol präzipitiert, dies besonders um mit Blick auf nachfolgende sensible enzymatische Reaktionen die Ko-Präzipitation von Salzen zu minimieren. Bei einer Isopropanolfällung wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,7 Vol. 2-Propanol versetzt. Wie auch nach einer Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen.

5.2.2.2 Extraktion von DNA in wässrigen Lösungen mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Chloroform

Zur Entfernung von Proteinen und hydrophoben Kontamination wie beispielsweise Ethidiumbromid diente die Extraktion von wässrigen DNA-Lösungen mit Phenol,

Phenol/Chloroform und Chloroform. Die DNA-Lösung wurde aufeinander folgend mit 1 Vol. Phenol, 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) und 1 Vol. Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Um die zwei Phasen vollständig zu trennen, wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 Upm, 3 min, RT) und anschließend die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgten weitere Extraktionsschritte, zuletzt mit 1 Vol. Chlorofom, um Reste von Phenol zu entfernen, gefolgt von einer alkoholischen Präzipitation der DNA aus der wässrigen Phase.

5.2.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in Agarosegelen unterschiedlicher Größe und Konzentration (1 % - 2 % (w/v) Agarose in 1 x TBE-Puffer) durchgeführt. Kurze Fragmente wurden in höherprozentigen, lange Fragmente in niedrigprozentigen Gelen aufgetrennt. Gele für analytische Zwecke besaßen in der Regel eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v). Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer bis zur vollständigen Lösung in einem Mikrowellenofen aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 65 °C wurde zum späteren Fluoreszenznachweis von DNA in der Regel 0,5 μg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Gele wurden entweder in einer Gelschale (125 x 80 x 7,5 mm) oder im Falle von Mini-Gelkammern (100 x 7 x 0,5 mm, Hardware & Service) direkt in einen abgegrenzten Bereich der Elektrophoresekammer gegossen. Als Laufpuffer wurde ausschließlich das gesamte Gel bedeckender 1 x TBE-Puffer verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol. Sucrosefarbmarker versetzt und in die Geltaschen gegeben. Elektrophoresen wurden bei einer konstanten Spannung zwischen 40 V und maximal 130 V für 20-60 min durchgeführt (5 bis 10 V/cm Feldstärke). Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht (302 nm Wellenlänge) durch die Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und dokumentiert. Zur Längen- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Banden wurden DNA-Fragmentlängenstandards (DNA-Konzentration: 100 ng/μl) parallel zu den Proben aufgetrennt.

5.2.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen kamen kommerziell erhältliche Fertigprodukte unterschiedlicher Hersteller zum Einsatz. Explizit waren dies: das *Nucleotrap-Kit* der Firma Macherey & Nagel, das DNA Extraktions *Kit* der Firma Invitek sowie das *QiaSpin* Gel Extraktions *Kit* der Firma Qiagen. Die aus dem Gel aufzureinigenden DNA-Fragmente wurden möglichst ohne UV-Exposition auf dem UV-Durchlicht-Tisch mit Hilfe eines sauberen Skalpells ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Es folgte die von dem jeweiligen Hersteller angegebene Prozedur zur Reinigung der DNA aus dem Agarosegelstück. Letztendlich wurde die DNA in 50 μl autoklaviertem demineralisierten Wasser aufgenommen und für weitere Manipulationen eingesetzt.

5.2.5 Abtrennung von Oligonukleotiden und kurzen DNA-Fragmenten mit Hilfe des *NucleotraPCR-Kits* (Macherey & Nagel)

Um aus einer komplexen DNA-Lösung Salze, Mononukleotide sowie kurze DNA-Fragmente (z.B. Oligonukleotide aus einer PCR) zu entfernen, wurde das *NucleotrapCR-Kit* der Firma Macherey & Nagel eingesetzt. Die *NucleotrapCR*-Suspension schließt dabei DNA-

Fragmente mit einer Größe von bis zu 150 bp von der Sorption aus. Das Volumen der DNA-haltigen Lösung wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 μl aufgefüllt und die Lösung einer Extraktion mit Chloroform unterzogen. Anschließend wurde nach dem *"direct purification"*-Protokoll des Herstellers verfahren und im letzten Schritt des Protokolls die gereinigte DNA mit 50 μl Wasser eluiert.

5.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab kam das *JetStar* Plasmidpräparations *Kit* der Firma Genomed zum Einsatz, welches auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen beruht. Zellen einer stationären 50 ml Übernachtkultur in dYT-Medium wurden in einem 50 ml Röhrchen pelletiert (Hettich-Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, 4.000 Upm, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet entlang der Vorschrift des Herstellers aufgearbeitet. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in der Regel in 200 μl sterilem demineralisierten Wasser aufgenommen. Es folgte die photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes der Lösung durch Messung der Absorption bei 260 nm.

Die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde mit Hilfe des Plasmid *Miniprep Kit*s der Firma Invitek durchgeführt. Hier wurde in der Regel von 2 ml einer stationären Übernachtkultur ausgegangen. Es wurde streng nach der Vorschrift des Herstellers verfahren und am Ende des Protokolls in einem Volumen von 50 μl sterilem demineralisierten Wasser Plasmid-DNA erhalten.

5.2.7 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen

Die Konzentration einer wässrigen Lösung von Nukleinsäuren wurde aus der Messung der Absorption einer entsprechenden Verdünnung bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die Messung wurde gegen Wasser in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Eine $O.D._{260}$ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 μg dsDNA / ml. Es wurde in der Regel eine 200 fache Verdünnung der Lösung in einem Endvolumen von 1 ml hergestellt und photometrisch vermessen (Zweistrahl-Spektralphotometer *Uvicon 930*, Fa. Kontron). Durch zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm Wellenlänge konnte über den Vergleich der beiden Messwerte eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung gemacht werden. In proteinfreien Proben liegt der Quotient von $O.D._{260}$ / $O.D._{280}$ bei 2.

5.3 Enzymatische Manipulation von DNA

5.3.1 Klonierung von DNA-Fragmenten in *Escherichia coli*

Unter einer Klonierung versteht man die Neukombination eines zu klonierenden DNA-Fragments mit einem in einem Wirtsorganismus replizierbaren Vektor zum Zwecke der Amplifikation des daraus hervorgehenden Plasmidkonstruktes. Im Rahmen dieser Arbeit kamen als Wirtsorganismus ausschließlich Stämme von *Escherichia coli* zur Anwendung. Das klonierte DNA-Fragment kann so beispielsweise in einen DNA-Kontext gesetzt werden, welcher eine solitäre Expression oder eine Expression in Fusion mit im Vektorfragment vorliegenden DNA-Bereichen in einer Wirtszelle bewirkt. Wichtige Elemente des Vektoranteils sind - neben mindestens einem Replikationsursprung für die Amplifikation in

mindestens einer Spezies Wirtsorganismus - zur Selektion auf das Vorhandensein des Plasmids in der Wirtszelle ein dieser eine Resistenz gegen ein Antibiotikum vermittelndes exprimierbares Gen sowie fallweise für die Expression des zu klonierenden DNA-Fragments eine Promotor/Operator Region zur Bindung der Transkriptions-ausführenden und –regulierenden zellulären Komponenten. Die Klonierung erfolgt in den meisten Fällen über sowohl das zu klonierende DNA-Fragment flankierende als auch an geeigneter Stelle im Vektorfragment vorkommende Erkennungs- und Spaltstellen von Restriktionsendonukleasen und hat in der Regel folgende Arbeitsschritte zum Inhalt:

1. Amplifikation von Vektor-Plasmiden in diesem Falle in Zellen von *Escherichia coli* und Isolierung derselben durch Aufschluss und Affinitätsreinigung (Methode 5.2.6),
2. Bereitstellung der zu klonierenden DNA-Fragmente z.B. durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Oligodesoxyribonukleotiden (Methode 5.3.5) oder, sofern der betreffende Abschnitt bereits kloniert in einem Plasmid vorliegt, ebenfalls durch Amplifikation des betreffenden Plasmids in *Escherichia coli* und Isolierung desselben durch Aufschluss und Affinitätsreinigung (siehe oben 1.),
3. Spaltung des Vektorfragments mit geeigneten Restriktionsendonukleasen; Spaltung des amplifizierten Insert-Bereichs mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Methode 5.3.2),
4. Fallweise Auftrennung der gewünschten Fragmente in und Isolierung derselben aus Agarosegelen (Methode 5.2.3) sowie deren Reinigung z.B. durch Affinitätschromatographie (Methode 5.2.4),
5. Kovalente Verknüpfung von Vektor- und Insert-Fragment über die kompatiblen Doppelstrangenden mit Hilfe von T4 DNA-Ligase (Methode 5.3.4),
6. Transformation von Zellen des gewünschten Wirtsstammes mit den Ligationsprodukten durch Elektroporation (Methode 5.1.3),
7. Selektion von Transformanten durch Koloniewachstum auf selektivem, Antibiotikum enthaltenden Medium,
8. Identifizierung von Klonen mit gewünschter Vektor-Insert Verknüpfung durch Kolonie-PCR-*Screening* (Methode 5.3.5), Testspaltung nach Plasmidisolierung (Methoden 5.3.2 und 5.2.6) und anschließende Sequenzierung des relevanten Plasmidbereichs (Methode 5.3.6).

5.3.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA aus PCR-Ansätzen (5.3.5) sowie 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, die laut Hersteller zu einer mindestens 50 %-igen bis 100 %-igen Spaltaktivität der Endonukleasen Anlass gaben. War eine Doppelspaltung wegen Inkompatibilität der Enzyme in den mitgelieferten Puffern nicht möglich, wurden die Spaltungen nacheinander unter den vom Hersteller der Enzyme empfohlenen Bedingungen durchgeführt, alternativ wurde KGB-Puffer verwendet. In diesem Puffer zeigen

fast alle Restriktionsendonukleasen bei den empfohlenen Konzentrationen eine gute Aktivität (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA wurde in der Regel in einer Endkonzentration des Spaltungsansatzes von 100 ng/µl mit 1 - 2 Einheiten Enzym pro Mikrogramm DNA für 1 h inkubiert. Längeren Inkubationszeiten wurde mit einer Verringerung der Enzymmenge begegnet.

5.3.3 Auffüllen überhängender DNA-Enden

Zum Auffüllen von beispielsweise nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen entstehenden überhängenden DNA-Enden wurde T4 DNA-Polymerase verwendet. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und in Anwesenheit von 250 µM dNTPs durchgeführt. Nach 30 min wurde die Auffüllreaktion durch Extraktion der T4 DNA-Polymerase mit Phenol/Chloroform beendet.

5.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Ligationsprodukt wurde mit einem bis zu fünffachen molaren Überschuss an DNA-Insert-Fragment gegenüber dem DNA-Vektor-Fragment durchgeführt. Verwendet wurde T4 DNA-Ligase-Puffer aus einer fünffach konzentrierten Stammlösung und ca. 2 u T4 DNA-Ligase in einem Proben-Endvolumen von 30 – 50 µl. Die Reaktion erfolgte in der Regel durch Inkubation über Nacht bei 15 °C. Die ligierte DNA wurde vor einem Einsatz zur Transformation von *E. coli*-Zellen einmalig mit Chloroform extrahiert (5.2.2.2) und mittels Ethanol präzipitiert (5.2.2.1).

5.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, DNA-Fragmente enzymatisch zu amplifizieren und so auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus selektiv eine definierte DNA-Matrize spezifisch zu vervielfachen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA-Vorlage durch Erhitzen in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Absenken der Temperatur lagern sich zwei im Überschuss angebotene Oligodesoxyribonukleotid-*Primer* an die Matritzen-DNA an (*Primer*-Hybridisierung) und flankieren die zu amplifizierende komplementäre Zielregion. Die *Primer* werden mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase komplementär zur ursprünglichen Duplex-DNA verlängert (*Primer*-Extension). Es wird eine bestimmte Anzahl an Amplifikationszyklen durchgeführt, wodurch sich die durch die beiden *Primer* flankierte DNA-Region in dem Ansatz akkumuliert.

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz sowie der Länge und des G/C-Gehaltes der verwendeten spezifischen *Primer* angepasst. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrize wurden in der Regel zwischen fünf und 25 ng DNA eingesetzt. Des weiteren enthielten die Ansätze 10 pmol eines jeden *Primers*, 200 µM jedes dNTPs, 2,5 µl *Tfl* DNA-Polymerase-Puffer (20x), 2 mM $MgCl_2$ und 1 u *Tfl* DNA-Polymerase. Zum Schutz vor Verringerung des Reaktionsvolumens durch Verdampfen von Wasser aus den Ansätzen wurden diese mit 25 µl *Chill Out* 14 Flüssigwachs (Fa. Biozym) oder Paraffin überschichtet. Die Länge und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte der PCR-Zyklen, sowie deren Anzahl wurde durch die Wahl der

Matrize, die Basenzusammensetzung und Länge der *Primer*, sowie durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Denaturierungsphase erfolgte für 2 min bei 98 °C. Bei sich anschließenden 85 °C wurde die *Tfl* DNA-Polymerase hinzugegeben und der erste Zyklus der PCR gestartet (*hot start*). Die zyklische Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 s bei 94 °C, gefolgt von der *Primer*-Hybridisierung mit einer Dauer von in der Regel ebenfalls 30 s bei der für das jeweilige *Primer*-Paar charakteristischen Temperatur. Die Elongationsreaktion (*Primer*-Verlängerung) wurde bei 72 °C für 30 s pro 1.000 bp durchgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug zwischen 25 und 30. Die Schmelztemperatur T_M eines Oligodesoxyribonukleotids wurde nach folgender empirischer Formel (1) berechnet, welche sowohl den relativen G/C-Gehalt (% G/C) als auch die Länge der *Primer* (*n*) mit einbezieht:

$$T_M\,[°C] = 69{,}3 + 0{,}41 \cdot (\%\,G/C) - \frac{650}{n} \qquad (1)$$

Die errechnete Temperatur lag in der Regel zwischen 45 °C und 60 °C. Die optimale Hybridisierungs-Temperatur T_A für die Durchführung einer PCR wurde nach (2) bestimmt, sofern die nach (1) errechneten Temperaturen nicht mehr als 10 °C voneinander abwichen. T_{M1} und T_{M2} stehen dabei für die Schmelztemperaturen der beiden verwendeten *Primer*.

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3°C \qquad (2)$$

Differierten die nach (1) errechneten Temperaturen um mehr als 10 °C wurde ausschließlich der geringere Wert als Variable T_{M1} bzw. T_{M2} in (2) eingesetzt.

Zur direkten Amplifikation von DNA-Bereichen aus Bakterienzellen kam eine modifizierte PCR zur Anwendung ("*Kolonie-PCR*"). Mit dieser Methode kann schnell und eindeutig das Vorhandensein eines definierten Plasmid-Abschnitts in Bakterienklonen direkt nachgewiesen werden. In PCR-Gefäßen (0,2 ml) wurden 25 µl *Taq* DNA-Polymerase-Puffer vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Zellen aus einer Bakterienkolonie aufgenommen, einfach auf einer Mediumsplatte ausgestrichen und die restlichen Zellen in dem PCR-Gefäß resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in die PCR-Maschine gestellt, die übrigen Agenzien wurden in Form eines *Master-Mixes* zusammengegeben und der Ansatz wurde mit 25 µl *Chill out 14* Flüssigwachs oder Paraffin überschichtet. Für zehn PCR-Reaktionen wurden 2 µl *Taq* DNA-Polymerase (wurde aus einer Präparation innerhalb der Abteilung bereitgestellt, eine Konzentrationsangabe ist deshalb nicht möglich), 30 µl 10 x *Taq* DNA-Polymerase-Puffer , 10 µl dNTPs (je 10 mM), jeweils 50 pmol der zu verwendenden *Primer* und Wasser bis auf 300 µl zusammengegeben. Folgendes PCR-Programm kam zur Anwendung: 2 min 98 °C, Zugabe von 25 µl *Master-Mix* bei 85 °C, 30 Zyklen mit 30 s 94 °C, 30 s spezifische Hybridisierungstemperatur, 1 min/kb 72 °C, danach Abkühlung auf 4 °C. Die Hybridisierungstemperatur wurde wie oben beschrieben ermittelt. Der Erfolg der "*Kolonie-PCR*" wurde auf einem Agarosegel bestimmt (5.2.3).

5.3.6 DNA-Sequenzbestimmung

Für die durchgeführten Sequenzierungen wurden ausschließlich 45 cm lange Sequenziergele hergestellt. Die Gießkammer für Gele dieser Art wurde aus zwei Glasplatten, zwei *Spacern* und zwei Halterungen zusammengebaut. Dabei wurden die Glasplatten zuerst

mit demineralisiertem Wasser gewaschen und danach mit 2-Propanol behandelt, um eine staub- und fettfreie, glatte Oberfläche zu gewährleisten. In einem Becherglas wurden 30 ml *SequagelXR*, 7,5 ml *Sequagel Complete*, 3 ml *Protogel* und 400 µl DMSO vermischt. Zum Start der Polymerisation wurden 300 µl APS-Stammlösung untergemischt, und der Inhalt des Becherglases wurde mittels einer Spritze zwischen die beiden Glasscheiben gegeben. Das Gel wurde mit einem Taschenkamm versehen und die Andruckplatte eingespannt. Das Gel wurde in der Horizontalen bis zur vollständigen Polymerisation gelagert. Zur Sequenzbestimmung wurde das Gel in einen *Li-Cor* DNA-Sequenzierautomaten (Fa. MWG Biotech) eingesetzt. Die beiden Pufferkammern wurden mit 1 x TBE-Puffer bis zu den Markierungen gefüllt, die Elektroden aufgesetzt, und es wurde ein Vorlauf des Gels von 60 min Dauer gestartet, um das Elektrophoresesystem zu äquilibrieren und das Gel auf die vorgesehenen 50 °C zu erhitzen. Die Laufbedingungen für sowohl Vor- als auch Hauptlauf waren: 1500 V, 37 mA, 50 W, 50 °C. Während des Vorlaufes wurden Laser und Optik des Sequenzier-Automaten auf das Gel abgestimmt und nach Beendigung des Vorlaufes die Proben aufgetragen. Der Hauptlauf wurde nach einigen Stunden automatisch beendet. Die Sequenzauswertung erfolgte entweder manuell oder mit Hilfe des Softwarepakets *BaseImagIR V.2.21*.

Zusätzlich zur Sequenzierung mit dem *Li-Cor* DNA-Sequenzierautomaten wurde gegen Ende der praktischen Arbeit verschiedentlich der Sequenzier-Service des *Göttingen Genomics Laboratory* (G_2L) in Anspruch genommen. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzinformation erfolgte in diesem Fall mittels des *Chromas* Sequenzanalyseprogramms.

5.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

5.4.1 Bestimmung der Konzentration von Proteinen in einer wässrigen Lösung

Die Proteinkonzentration einer wässrigen Proteinlösung wurde spektroskopisch bestimmt. Die Absorption von Licht einer Wellenlänge von 280 nm ($O.D._{280}$) dient dabei als eine charakteristische Größe. Eine $O.D._{280}$ von 1 entspricht in etwa einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Als Referenzwert wurde das Lösungsmittel vermessen. Die Proteinlösungen wurden jeweils soweit verdünnt, dass die gemessene Optische Dichte einen Wert von 1 in keinem Fall überschritt. An der Optischen Dichte von Proteinen sind die aromatischen Reste der Aminosäuren maßgeblich beteiligt. Tryptophanreste alleine führen zu einer molaren Extinktion bei 280 nm von 5.500 $M^{-1}cm^{-1}$, gefolgt von Tyrosin-Resten mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1.490 $M^{-1}cm^{-1}$. Einen nur geringen Anteil besitzen Disulfidbrücken mit einer Extinktion bei 280 nm von 125 $M^{-1}cm^{-1}$. Aus diesen Vorgaben ergibt sich ein molarer Extinktionskoeffizient für ein Protein aus der Anzahl seiner Tryptophan- und Tyrosinreste, sowie der Anzahl an Disulfidbrücken. Zusammengefasst lässt sich der molare Extinktionskoeffizient durch folgende Gleichung (3) berechnen (Pace *et al.*, 1995):

$$\varepsilon(Protein) = 5500 * \left[\sum Trp\right] + 1490 * \left[\sum Tyr\right] + 125 * \left[\sum Disulfid\right] \qquad (3)$$

Bovines Trypsin mit 4 Tryptophanresten, 10 Tyrosinresten und 6 Disulfidbrücken besitzt somit beispielsweise einen molaren Extinktionskoeffizienten von 37.650 $M^{-1}cm^{-1}$.

5.4.2 Präparation von Proteinen der äußeren Membran von *Escherichia coli*-Zellen (verändert nach Klauser *et al.*, 1992)

Zur Gewinnung der Proteinenfraktion der äußeren Membran von *Escherichia coli* wurden die in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Bakterienzellen einer 50 ml Kultur bei einer $O.D._{600}$ von 0,8 mit Induktor (z.B. Anhydrotetrazyklin) versetzt, weitere drei Stunden bei 37 °C kultiviert und schließlich durch Zentrifugation geerntet (Hettich-Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, 4000 Upm, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 7 ml PBS resuspendiert, und die Zellen wurden mittels einer *French Press* (SLM Aminco, 1000 psi, große Zelle, 1-2 Passagen) aufgeschlossen. Das so erhaltene Lysat wurde in einem 50 ml Röhrchen für 10 min bei 4000 Upm und 4 °C zentrifugiert, um noch intakte Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde mit 100 mM Tris/Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton-X 100 (Endkonzentrationen) versetzt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein 13 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt, das Röhrchen gegebenenfalls mit PBS aufgefüllt und der Ansatz mit Paraffin überschichtet. Das Röhrchen wurde tariert in den TST41-14-Schwenkbecherrotor geladen und in der Kontron *Centrikon T-1055* Ultrazentrifuge im Vakuum zentrifugiert (100.000 g, 2 h, 15 °C). Die im Pellet vorliegenden Proteine der äußeren Membran wurden mit 200 µl Protein-Probenpuffer oder Hoechst-Puffer versetzt und zwecks Lösung mit Ultraschall (*Branson Sonifier* W-250, 10-15 mal, 40 %, Stufe 2) behandelt und anschließend für 10 min auf 100 °C erhitzt. Danach wurde zentrifugiert (13.000 Upm, 5 min, 4 °C), der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und an dieser Stelle gegebenenfalls bei -20 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der gelelektrophoretischen Analyse wurde ein Aliquot der Probe erneut für 10 min auf 100 °C erhitzt und maximal 20 µl des Ansatzes auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

5.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen über SDS-haltige Polyacrylamidgele der Größe nach auftrennen (Laemmli, 1970). Die hergestellten Gele hatten eine Größe von 100 x 60 x 0,75 mm. Es wurden ausschließlich 12,5 % ige (w/v) SDS-Polyacrylamidgele verwendet.

5.4.3.1 Herstellung 12,5 % iger (v/v) Polyacrylamidgele

In dem verwendeten Gelgießstand wurden in der Regel 10 Polyacrylamidgele gleichzeitig hergestellt. Die Gele wurden zwischen eine Aluminiumoxid- und eine Glasplatte gegossen. Für das Trenngel wurden 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 zuletzt 225 µl APS-Stammlösung vereinigt und bis zu einer Höhe von ca. 5 cm in den Gelgießstand gegossen. Jedes Gel wurde mit 500 µl 96 % Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Acrylamids wurde das Ethanol mit demineralisiertem Wasser vollständig von den Gelen entfernt. Für das verwendete Sammelgel wurden 4 ml 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (*Protogel*), 2,625 ml Sammelgelpuffer, 263 µl 20 % (w/v) SDS, 18,9 ml Wasser, 26 µl TEMED und zuletzt 90 µl APS-Stammlösung zusammengegeben. Jedes Gel wurde bis zur Oberkante des Gelgießstands befüllt, zuletzt wurden die Taschenkämme eingebracht. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele

aus dem Gelgießstand entfernt, einzeln in mit demineralisiertem Wasser befeuchtete Papiertücher eingeschlagen und gemeinsam in Plastiktüten verpackt. In dieser Form wurden die Gele für maximal einige Wochen bei 4 °C gelagert.

5.4.3.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Polyacrylamidgel wurde in der Laufkammer befestigt und der Taschenkamm entfernt. Die obere und die untere Kammer wurden mit Laemmli-Puffer befüllt und die Proben wurden, mit 1/2 bis 1 Vol Protein-Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard dienten der *'low-range'* Protein-Standard der Firma BioRad bzw. die *Protein Ladder* der Firma MBI Fermentas. Die Elektroden wurden mit der Stromversorgung verbunden. Die Elektrophorese wurde bis zum Durchlauf der Farbmarkerbande konstant bei 6 W Leistung durchgeführt.

5.4.3.3 Entwicklung eines SDS-Polyacrylamidgels

Zum Sichtbarmachen von Proteinbanden in einem Polyacrylamidgel wurde dieses in einer Schale mit einer Lösung aus 10 ml PAG-Färbelösung und 10 ml 30 % (v/v) Essigsäure 15 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln eingefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel zweimalig für 4 min in einem Mikrowellengerät mit Wasser bedeckt gekocht.

5.4.4 Biochemischer Nachweis von β-Laktamase

Zum Nachweis von β-Laktamase in einem Proteinpräparationsansatz wurde das β-Laktamase-Substrat PADAC (Fa. Calbiochem) verwendet. Dieses Substrat besitzt eine intensiv-rote Farbe, welche nach Umsatz durch β-Laktamase in eine gelbe Färbung übergeht. Zum Nachweis von β-Laktamase in einem Präparationsansatz wurden 50 μl Proteinlösung mit 1 μl einer PADAC Stammlösung (10 mg/ml) versetzt. Nach wenigen Sekunden konnte bei Anwesenheit von β-Laktamase in dem untersuchten Ansatz ein Umschlag von rot nach gelb beobachtet werden.

5.4.5 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (*Western Blot*)

Zum Nachweis von auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Westermeier, 1990). Hierzu wurde ein Filterpapier (Fa. Schleicher & Schuell) in der Größe des Polyacrylamidgels mit *Western Blot*-Transferpuffer getränkt und auf die Graphitanode einer Transfer-Apparatur (Novoblot, Fa. Amersham Biosciences) gelegt. Auf das Filterpapier wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrozellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) aufgebracht, welche zuvor ebenfalls mit *Western Blot*-Transferpuffer getränkt worden war. Das Proteine enthaltende Polyacrylamidgel wurde in *Western Blot*-Transferpuffer geschwenkt und im feuchten Zustand auf die Nitrozellulose gebettet. Ein weiteres Filterpapier wurde, ebenfalls getränkt, darauf gelegt. Es folgten das Aufsetzen der Kathode und der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran. Die Proteine wurden für 1 h bei einer konstanten Spannung von 10 V aus dem Gel auf die Nitrozellulose transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran für 3 min mit Ponceau S-Färbelösung inkubiert und danach kurz in demineralisiertem Wasser geschwenkt. Mit einem Bleistift wurden die nun sichtbaren Laufspuren und die Banden des

Molekulargewichtsstandards markiert, bevor die Membran zweimal für je 10 min mit 20 ml PBS-Puffer gewaschen wurde. Anschließend wurde für 1 h in 20 ml *Blocking*-Puffer unter leichtem Schwenken inkubiert, bevor dreimal 10 min mit je 20 ml PBST-Puffer gewaschen wurde. Es folgte eine mehrstündige Inkubation der Membran mit 1 µl des ersten Antikörpers (1 mg/ml) in 20 ml PBS-Puffer. Nach erneut dreimaligem Waschen mit PBST-Puffer wurde 1 µl des alkalische Phosphatase-gekoppelten zweiten Antikörpers (1 mg/ml) in 20 ml PBST-Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 1 h wurde noch dreimal mit PBST-Puffer und einmal mit demineralisiertem Wasser gewaschen, bevor der *"Western Blot"* entwickelt wurde. Dazu wurde eine Lösung aus 2,5 µl NBT- und 30 µl BCIP-Stammlösung in 10 ml alkalische Phosphatase-Puffer frisch hergestellt und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubation bei RT wurden Banden sichtbar. Durch einmaliges Waschen mit demineralisiertem Wasser wurde die Reaktion beendet und das Ergebnis durch *Scannen* dokumentiert.

5.5 Zellbiologische Arbeitsmethoden

5.5.1 Induktion der Expression in Bakterienkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Plasmide zum Einsatz, welche die regulierte Expression kodierter Gene erlauben. Verwendet wurde die *lac* Promotor/Operatorregion und die *tetA*-Promotor/Operatorregion. Die Induktion der Transkription vom *lac* Promotor aus wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM in einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur von *E. coli* erreicht. Es folgte in der Regel das weitere Wachstum bis in die stationäre Wachstumsphase. Die Expression ausgehend vom *tetA* Promotor/Operator wurde in der Regel durch Anhydrotetrazyklin, welches auf *E. coli* im Gegensatz zu Tetrazyklin nicht antibiotisch wirkt, induziert. Für die Expression von Intimin-Fusionsprotein von pASK75-Derivaten (Skerra, 1994) aus wurde dYT-Medium mit dem ein entsprechendes Expressionsplasmid enthaltenden Stamm inokuliert und bei 37 °C bis zu einer $O.D._{600}$ von 0,2 bis 0,3 inkubiert und bei Erreichen einer $O.D._{600}$ von 0,2 bis 0,3 mit 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin für 60 min induziert. Die Expression in 71-18mutS wurde in der Regel durch Zugabe von Tetrazyklin mit einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml induziert. Das in diesem Stamm integrierte Transposon 10 vermittelt den Zellen eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum. Besonders bei gewünschter längerer Induktionsdauer kam dieser Stamm zur Anwendung. Die höhere Stabilität von Tetrazyklin gegenüber Anhydrotetrazyklin bei 37 °C erlaubt längere Induktionszeiten.

5.5.2 Fluoreszenzmarkierung von *Escherichia coli* Zellen

Für die Fluoreszenzmarkierung Epitope präsentierender *E. coli* Zellen wurden in der Regel 200-500 µl einer Expressions-induzierten Kultur (5.5.1) herangezogen. Die Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 2 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 10 µl 1:10 in PBS-Puffer verdünntem ersten Antikörper (Anti-Sendai-Antikörper (Einberger, *et al.*, 1990), Anti-E-Antikörper (Amersham Biosciences), Anti-β-Laktamase-Antikörper (5prime-to-3prime Inc.)) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl 1 x PBS-Puffer folgte eine erneute Zentrifugation (13.000 Upm, 2 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 10 µl 1:10 in PBS-Puffer verdünntem, biotinylierten zweiten Antikörpern (α-

Maus IgG, α-Kaninchen IgG, Biotin-Konjugate (Fa. Sigma-Aldrich)) resuspendiert und der Ansatz erneut für 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 500 μl 1 x PBS-Puffer und Zentrifugation wie oben beschrieben erfolgte die Inkubation der Zellen in 10 μl 1:10 in PBS-Puffer verdünntem Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (Fa. Molecular Probes) für weitere 5 Minuten. Nach Zugabe von 500 μl PBS-Puffer wurden die Zellen ein letztes Mal pelletiert und in 50 μl 1 x PBS-Puffer aufgenommen. So aufbereitet konnten sie für die Untersuchung mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops oder die Durchflusszytometrie herangezogen werden.

5.5.3 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung von *Escherichia coli* Zellen

Für durchflusszytometrische Untersuchungen und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungen wurde ein Gerät der Firma Cytomation (Fort Collins, USA) verwendet. Es wurden nach 5.5.2 präparierte Zellen herangezogen (Markierung mit R-Phycoerythrin als fluoreszierendem Farbstoff). Der Strahlengang des FACS wurde unter Verwendung fluoreszierender *MicroBeads* (Fa. Coulter) justiert und fokussiert, und die Photomultiplier wurden auf die Werte 730 (*side scatter*), 600 (FITC-Fluoreszenz), 600 (Phycoerythrin-Fluoreszenz) eingestellt. Die Anzahl der Ereignisse wurde bei einer Tropfenzahl zwischen 95.000 und 100.000 pro Sekunde auf maximal 30.000 pro Sekunde begrenzt. Der Hintergrundwert betrug in keinem Fall mehr als 100 Ereignisse pro Sekunde (0,3 %). Es wurden in der Regel 300.000 Ereignisse vermessen. Die Datenverwaltung erfolgte mittels des Softwarepakets *CyClops*. Die weitere Aufbereitung der gewonnen Daten wurde mit dem Programm *SigmaPlot for Windows* (Fa. Jandel Software) durchgeführt. Sollte eine Sortierung durchgeführt werden, wurde zusätzlich zur Justierung des Strahlengangs und des Flüssigkeitsstrahls auch noch der Tropfenabrisspunkt eingestellt und die Tropfenverzögerung bestimmt und kalibriert. Je nach Anreicherungsgrad wurde im *single-sort-* oder *enrich*-Modus sortiert, um nach Bedarf negative von positiven Ereignissen scharf oder weniger scharf voneinander abzutrennen. Die positiven Zellen konnten entweder in 5 ml Röhrchen sortiert werden oder mit Hilfe des *CyClone*-Einzelablagearms einzeln in mit flüssigem Medium gefüllte Mikrotiterplatten oder auf Festmediums-Platten abgelegt werden. Die Frequenz der Ereignisse betrug zwischen 5.000 und 25.000 pro Sekunde bei einem Druck im Probenröhrchen zwischen 59 und 61 psi.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Bekämpfung unterschiedlichster Erkrankungen des Menschen ist das gemeinsame Ziel zahlloser Ansätze der Grundlagen- und anwendungsorientierten Forschung. Dank einer heute zur Verfügung stehenden, breiten Palette effizienter Verfahren der modernen Zellbiologie, Molekularbiologie und Molekularen Medizin werden in naher Zukunft Krankheiten gezielter bekämpft werden können. Durch Einsatz evolutiver Methoden wurde es möglich, Proteinvarianten mit gewünschten Eigenschaften aus großen Sammlungen von in ausgewählten Regionen zufallsmäßig variierten Proteinen zu isolieren und damit maßgeschneiderte Werkzeuge für den Einsatz in den Biowissenschaften und der Medizin in die Hand zu bekommen. Leistungsfähigen Durchmusterungsverfahren kommt dabei eine bedeutende Rolle zu. Eine Möglichkeit, Proteine einer solchen Sammlung direkt einer Funktionsabfrage zugänglich zu machen, besteht darin, diese auf der Oberfläche von Bakterien bereitzustellen, die gleichzeitig Synthesemaschinen und präsentierende Mikropartikel sind. Durch klonale Expansion solcher Bakterien können nachfolgend neue Bindemoleküle hoher Passgenauigkeit und Bindungsstärke isoliert und identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf dem Membranprotein *EaeA* (Intimin) enterohämorrhagischer *Escherichia coli* ein Zelloberflächenpräsentationsverfahren entwickelt und in Hinblick auf die Parameter hohe Nettoakkumulation von Passagierproteinen auf der Zelloberfläche und zelluläre Vitalität optimiert. Passagierproteine konnten durch Fusion an *EaeA* im Vergleich zu anderen bakteriellen Präsentationsverfahren in großer Kopienzahl auf der bakteriellen Oberfläche verankert werden. Die Vermehrungsfähigkeit der Wirtszellen wurde durch deren Expression und Exposition vergleichsweise wenig beeinträchtigt. Durch die kombinierte Regulation auf Transkriptions- und Translationsebene gelang es, die Expression und Exposition stufenlos über einen großen Bereich zu variieren. In einem Modellexperiment konnten Bakterien, die *EaeA*-vermittelt ein Epitop auf ihrer Oberfläche präsentierten aus einer 1:200.000 Mischung mit Kontrollzellen durch Immunfluoreszenz-Markierung und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung in wenigen Runden von Markierung und Sortierung isoliert werden. Damit ist die generelle Einsetzbarkeit dieses Expositionsverfahrens zur Durchmusterung komplexer Protein- und Peptidbibliotheken gezeigt.

Zur funktionalen Charakterisierung der Intimin-vermittelten Translokation durch die äußere Membran von *Escherichia coli* wurde die Zelloberflächenexposition systematisch ausgewählter Passagierdomänen untersucht. Zu den Kandidaten gehörten *EETI-CK*^{send}, eine Variante des Trypsin-Inhibitors *EETI-II* aus *Ecballium elaterium*, die menschliche Immunglobulin-Domäne *REI*$_v$, das humane Interleukin 4 (*Il-4*), das unter den Säugetieren hoch konservierte, Kalzium-bindende Protein Calmodulin, das β-Laktamase Inhibitor Protein *BLIP* aus *Streptomyces clavuligerus* und dessen Substrat, die *TEM-1* β-Laktamase aus *E. coli*. Eine Exposition in hoher Kopienzahl wurde lediglich für die Domänen *EETI-CK*^{send} und *REI*$_v$ nachgewiesen. Durch Zugabe membrandestabilisierender oder die Geschwindigkeit der Faltung der Passagierdomänen modulierender Agenzien konnte das Spektrum auf fünf der sechs untersuchten Proteine ausgeweitet werden. Es wurde experimentelle Evidenz zusammengetragen, dass Proteine nur in zumindest partiell ungefaltetem Zustand die

Barriere der äußeren Membran passieren können. Im Falle von Calmodulin, das zur Stabilisierung seiner Faltung Kalzium-Ionen benötigt, führte der Zusatz von EDTA zu einer Zelloberflächenexposition in hoher Kopienzahl. Im Falle des β-Laktamase Inhibitor-Proteins, das im gefalteten Zustand zwei Disulfidbrücken besitzt, hatte die Zugabe von Reduktionsmitteln zum Kulturmedium einen vergleichbaren Effekt. Im Falle der *TEM-1* β-Laktamase, die eine intramolekulare Disulfidbrücke besitzt, konnte auch nach Chemikalienbehandlung keine Exposition erreicht werden. Nach Durchmusterung einer Bibliothek zufallsmäßig erzeugter β-Laktamase-Varianten konnten Translokations-kompetente Enzyme isoliert werden, bei denen einer der beiden Cysteinreste durch eine andere Aminosäure ersetzt und damit die Ausbildung von Disulfidbrücken unterbunden war.

Bei Beachtung der Randbedingung, dass Passagierdomänen zur Translokation durch die äußere Membran in einem ungefalteten Zustand vorliegen müssen, kann das in dieser Arbeit neu entwickelte *EaeA*-basierte Präsentationsverfahren als ein robustes und vielseitig einsetzbares Instrument zur Exposition von Proteindomänen auf *Escherichia coli* Zellen die Anreicherung von Proteinen mit neuen Funktionalitäten vereinfachen und damit neue Zugänge zu Biomolekülen mit maßgeschneiderten Eigenschaften erschließen.

7. Literatur

Ambler, R. P. (1980). The structure of β-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **289**(1036), 321-31.

Amstutz, P., Forrer, P., Zahnd, C. & Plückthun, A. (2001). *In vitro* display technologies: novel developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**(4), 400-5.

Amzel, L. M. & Poljak, R. J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 961-97.

Arkowitz, R. A., Joly, J. C. & Wickner, W. (1993). Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *Embo J.* **12**(1), 243-53.

Babu, Y. S., Bugg, C. E. & Cook, W. J. (1988). Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **204**(1), 191-204.

Baddiley, J. (1989). Bacterial cell walls and membranes. Discovery of the teichoic acids. *Bioessays* **10**(6), 207-10.

Bae, W., Mulchandani, A. & Chen, W. (2002). Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *J. Inorg. Biochem.* **88**(2), 223-7.

Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**(3), 581-9.

Bass, S., Greene, R. & Wells, J. A. (1990). Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8**(4), 309-14.

Beebakhee, G., Louie, M., De Azavedo, J. & Brunton, J. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the eae gene homologue from enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**(1), 63-8.

Bingen, E., Bonacorsi, S., Brahimi, N., Denamur, E. & Elion, J. (1997). Virulence patterns of *Escherichia coli* K1 strains associated with neonatal meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **35**(11), 2981-2.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331), 1453-74.

Blumenthal, D. K. & Krebs, E. G. (1987). Preparation and properties of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Methods Enzymol.* **139**, 115-26.

Blumenthal, D. K., Takio, K., Edelman, A. M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K. A. & Krebs, E. G. (1985). Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin light chain kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**(10), 3187-91.

Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**(6), 553-7.

Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (2000). Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol.* **328**, 430-44.

Bourdineaud, J. P., Fierobe, H. P., Lazdunski, C. & Pages, J. M. (1990). Involvement of OmpF during reception and translocation steps of colicin N entry. *Mol. Microbiol.* **4**(10), 1737-43.

Braun, V. (1975). Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **415**(3), 335-77.

Braun, V. & Rehn, K. (1969). Chemical characterization, spatial distribution and function of a lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall. The specific effect of trypsin on the membrane structure. *Eur. J. Biochem.* **10**(3), 426-38.

Buchanan, S. K., Smith, B. S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. & Deisenhofer, J. (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**(1), 56-63.

Cereghino, G. P. & Cregg, J. M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**(5), 422-7.

Chai, T. J. & Foulds, J. (1977). Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **493**(1), 210-5.

Chapman, K. B. & Szostak, J. W. (1994). *In vitro* selection of catalytic RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 618-22.

Charbit, A., Boulain, J. C., Ryter, A. & Hofnung, M. (1986). Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface. *Embo J.* **5**(11), 3029-37.

Chattopadhyaya, R., Meador, W. E., Means, A. R. & Quiocho, F. A. (1992). Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **228**(4), 1177-92.

Cho, G., Keefe, A. D., Liu, R., Wilson, D. S. & Szostak, J. W. (2000). Constructing high complexity synthetic libraries of long ORFs using *in vitro* selection. *J. Mol. Biol.* **297**(2), 309-19.

Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Krätzner, R. & Kolmar, H. (1999). The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng.* **12**(9), 797-806.

Christmann, A., Wentzel, A., Meyer, C., Meyers, G. & Kolmar, H. (2001). Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries. *J. Immunol. Methods* **257**(1-2), 163-73.

Clackson, T. & Wells, J. A. (1994). *In vitro* selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol.* **12**(5), 173-84.

Coffman, R. L., Ohara, J., Bond, M. W., Carty, J., Zlotnik, A. & Paul, W. E. (1986). B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* **136**(12), 4538-41.

Cohen, P. & Klee, C. B. (1988) Calmodulin. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.

Coulton, J. W., Mason, P., Cameron, D. R., Carmel, G., Jean, R. & Rode, H. N. (1986). Protein fusions of β-galactosidase to the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **165**(1), 181-92.

Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. & Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**(6389), 727-33.

Daugherty, P. S., Olsen, M. J., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (1999). Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* **12**(7), 613-21.

Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**(5157), 375-82.

Deamer, D. W. (1997). The first living systems: a bioenergetic perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 230-61.

Deamer, D. W., Mahon, E. H. & Bosco, G. (1994). Self assembly and function of primitive membrane structures. In: *Early life on Earth* (Bengtson, S., Hg.), S. 107-23. Columbia University Press, New York, Chichester, UK.

Dekker, N. (2000). Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function. *Mol. Microbiol.* **35**(4), 711-7.

Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* **47**(5), 450-5.

Doi, N. & Yanagawa, H. (1999). STABLE: protein-DNA fusion system for screening of combinatorial protein libraries *in vitro*. *FEBS Lett.* **457**(2), 227-30.

Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991). Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* **59**(12), 4310-7.

Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**(10), 3953-61.

Doran, J. L., Leskiw, B. K., Aippersbach, S. & Jensen, S. E. (1990). Isolation and characterization of a β-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* **172**(9), 4909-18.

Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**(13), 6127-45.

Duenas, M. & Borrebaeck, C. A. (1994). Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechnology (N Y)* **12**(10), 999-1002.

Echols, H., Lu, C. & Burgers, P. M. (1983). Mutator strains of *Escherichia coli*, mutD and dnaQ, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**(8), 2189-92.

Einberger, H., Mertz, R., Hofschneider, P. H. & Neubert, W. J. (1990). Purification, renaturation, and reconstituted protein kinase activity of the Sendai virus large (L) protein: L protein phosphorylates the NP and P proteins *in vitro*. *J. Virol.* **64**(9), 4274-80.

Ekland, E. H., Szostak, J. W. & Bartel, D. P. (1995). Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences. *Science* **269**(5222), 364-70.

Eldik, L. V. & Watterson, D. M. (1998) Calmodulin and signal transduction (Van Eldrick, L. J. & Watterson, D. M., Hgg.). Academic Press, New York, USA.

Ellington, A. D. & Szostak, J. W. (1990). *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**(6287), 818-22.

Epp, O., Lattman, E. E., Schiffer, M., Huber, R. & Palm, W. (1975). The molecular structure of a dimer composed of the variable portions of the Bence-Jones protein REI refined at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* **14**(22), 4943-52.

Fath, M. J. & Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**(4), 995-1017.

Ferguson, A. D., Hofmann, E., Coulton, J. W., Diederichs, K. & Welte, W. (1998). Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**(5397), 2215-20.

Fernandez-Botran, R., Sanders, V. M., Oliver, K. G., Chen, Y. W., Krammer, P. H., Uhr, J. W. & Vitetta, E. S. (1986). Interleukin 4 mediates autocrine growth of helper T cells after antigenic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**(24), 9689-93.

Fisher, J., Belasco, J. G., Khosla, S. & Knowles, J. R. (1980). β-Lactamase proceeds via an acyl-enzyme intermediate. Interaction of the *Escherichia coli* RTEM enzyme with cefoxitin. *Biochemistry* **19**(13), 2895-901.

Fleischaker, G. R. (1990). Origins of life: an operational definition. *Orig. Life Evol. Biosphere* **20**, 127-37.

Forst, D., Welte, W., Wacker, T. & Diederichs, K. (1998). Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat. Struct. Biol.* **5**(1), 37-46.

Foubister, V., Rosenshine, I., Donnenberg, M. S. & Finlay, B. B. (1994a). The eaeB gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**(7), 3038-40.

Foubister, V., Rosenshine, I. & Finlay, B. B. (1994b). A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**(3), 993-8.

Foxman, B., Zhang, L., Tallman, P., Palin, K., Rode, C., Bloch, C., Gillespie, B. & Marrs, C. F. (1995). Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J. Infect. Dis.* **172**(6), 1536-41.

Francisco, J. A., Earhart, C. F. & Georgiou, G. (1992). Transport and anchoring of β-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**(7), 2713-7.

Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B. & Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* **30**(5), 911-21.

Frère, J. M. (1995). β-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol. Microbiol.* **16**(3), 385-95.

Frère, J. M., Joris, B., Granier, B., Matagne, A., Jacob, F. & Bourguignon-Bellefroid, C. (1991). Diversity of the mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics. *Res. Microbiol.* **142**(6), 705-10.

Frisch, C., Kolmar, H. & Fritz, H. J. (1994). A soluble immunoglobulin variable domain without a disulfide bridge: construction, accumulation in the cytoplasm of *E. coli*, purification and physicochemical characterization. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**(5), 353-6.

Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Usón, I., Schneider, T. R. & Fritz, H. J. (1996). Contribution of the intramolecular disulfide bridge to the folding stability of REIv, the variable domain of a human immunoglobulin kappa light chain. *Fold. Des.* **1**(6), 431-40.

Galan, J. E. & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**(5418), 1322-8.

Gallagher, P. J., Herring, B. P. & Stull, J. T. (1997). Myosin light chain kinases. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **18**(1), 1-16.

Garrard, L. J., Yang, M., O'Connell, M. P., Kelley, R. F. & Henner, D. J. (1991). Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology (N Y)* **9**(12), 1373-7.

Ghadessy, F. J., Ong, J. L. & Holliger, P. (2001). Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(8), 4552-7.

Ghoreschi, K., Thomas, P., Breit, S., Dugas, M., Mailhammer, R., van Eden, W., van der Zee, R., Biedermann, T., Prinz, J., Mack, M., Mrowietz, U., Christophers, E., Schlondorff, D., Plewig, G., Sander, C. A. & Rocken, M. (2003). Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat. Med.* **9**(1), 40-6.

Ghrayeb, J. & Inouye, M. (1984). Nine amino acid residues at the NH2-terminal of lipoprotein are sufficient for its modification, processing, and localization in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**(1), 463-7.

Ghuysen, J. M. (1991). Serine β-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 37-67.

Ginocchio, C. C. & Galan, J. E. (1995). Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.* **63**(2), 729-32.

Gram, C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritt der Medicin* **2**, 185-9.

Gramatikoff, K., Georgiev, O. & Schaffner, W. (1994). Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**(25), 5761-2.

Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., Hughes-Jones, N. C. & et al. (1993). Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *Embo J.* **12**(2), 725-34.

Griffiths, A. D. & Tawfik, D. S. (2000). Man-made enzymes--from design to *in vitro* compartmentalisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**(4), 338-53.

Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J. & et al. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *Embo J.* **13**(14), 3245-60.

Grinsted, J. & Bennett, P. M. (1988). Methods in microbiology: plasmid technology **21**, Academic Press, San Diego.

Groisman, E. A. & Ochman, H. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**(5), 791-4.

Guillaume, G., Vanhove, M., Lamotte-Brasseur, J., Ledent, P., Jamin, M., Joris, B. & Frère, J. M. (1997). Site-directed mutagenesis of glutamate 166 in two β-lactamases. Kinetic and molecular modeling studies. *J. Biol. Chem.* **272**(9), 5438-44.

Gunneriusson, E., Samuelson, P., Uhlen, M., Nygren, P. A. & Stahl, S. (1996). Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *J. Bacteriol.* **178**(5), 1341-6.

Hamburger, Z. A., Brown, M. S., Isberg, R. R. & Björkman, P. J. (1999). Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science* **286**(5438), 291-5.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**(4), 557-80.

Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H. R. & Plückthun, A. (1998). Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies *in vitro* from immune libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**(24), 14130-5.

Hanes, J. & Plückthun, A. (1997). *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**(10), 4937-42.

Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A. & Plückthun, A. (2000). Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nat. Biotechnol.* **18**(12), 1287-92.

Hansson, M., Samuelson, P., Gunneriusson, E. & Stahl, S. (2001). Surface display on gram positive bacteria. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **4**(2), 171-84.

Hartland, E. L., Batchelor, M., Delahay, R. M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I. & Frankel, G. (1999). Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol. Microbiol.* **32**(1), 151-8.

Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G. (1992). Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226**(3), 889-96.

He, M., Menges, M., Groves, M. A., Corps, E., Liu, H., Bruggemann, M. & Taussig, M. J. (1999). Selection of a human anti-progesterone antibody fragment from a transgenic mouse library by ARM ribosome display. *J. Immunol. Methods* **231**(1-2), 105-17.

He, M. & Taussig, M. J. (1997). Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for *in vitro* display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res.* **25**(24), 5132-4.

Heitz, A., Chiche, L., Le-Nguyen, D. & Castro, B. (1995). Folding of the squash trypsin inhibitor EETI II. Evidence of native and non-native local structural preferences in a linear analogue. *Eur. J. Biochem.* **233**(3), 837-46.

Henderson, I. R. & Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**(3), 1231-43.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1998). The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**(9), 370-8.

Hoess, R., Brinkmann, U., Handel, T. & Pastan, I. (1993). Identification of a peptide which binds to the carbohydrate-specific monoclonal antibody B3. *Gene* **128**(1), 43-9.

Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(2), 379-433.

Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(1), 181-203.

Huovinen, P., Huovinen, S. & Jacoby, G. A. (1988). Sequence of PSE-2 β-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**(1), 134-6.

Irving, R. A., Coia, G., Roberts, A., Nuttall, S. D. & Hudson, P. J. (2001). Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J. Immunol. Methods* **248**(1-2), 31-45.

Ismaili, A., Philpott, D. J., Dytoc, M. T., Soni, R., Ratnam, S. & Sherman, P. M. (1995). α-actinin accumulation in epithelial cells infected with attaching and effacing gastrointestinal pathogens. *J. Infect. Dis.* **172**(5), 1393-6.

Jacoby, G. A. (1994). Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of β-lactamase. *Trends Microbiol.* **2**(10), 357-60.

Janeway, C. A. jr., Travers, P. (1997). *Immunologie*, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.

Jansen, J. H., Fibbe, W. E., Willemze, R. & Kluin-Nelemans, J. C. (1990). Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut* **60**(5), 269-74.

Jarvis, K. G., Giron, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(17), 7996-8000.

Jarvis, K. G. & Kaper, J. B. (1996). Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect. Immun.* **64**(11), 4826-9.

Jaurin, B. & Grundström, T. (1981). ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β-lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **78**(8), 4897-901.

Javaux, E. J., Knoll, A. H. & Walter, M. R. (2001). Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature* **412**(6842), 66-9.

Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J. & Plückthun, A. (2001). Tailoring *in vitro* evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**(1), 75-80.

Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. & Kaper, J. B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**(20), 7839-43.

Johnson, J. R., Brown, J. J., Carlino, U. B. & Russo, T. A. (1998). Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection. *J. Infect. Dis.* **177**(4), 1120-4.

Joris, B., Ledent, P., Dideberg, O., Fonze, E., Lamotte-Brasseur, J., Kelly, J. A., Ghuysen, J. M. & Frère, J. M. (1991). Comparison of the sequences of class A β-lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**(11), 2294-301.

Jung, H. C., Lebeault, J. M. & Pan, J. G. (1998). Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* **16**(6), 576-80.

Kaper, J. B. (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(1), 103-8.

Karmali, M. A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**(1), 15-38.

Keefe, A. D. & Szostak, J. W. (2001). Functional proteins from a random-sequence library. *Nature* **410**(6829), 715-8.

Keller, C. H., Olwin, B. B., LaPorte, D. C. & Storm, D. R. (1982). Determination of the free-energy coupling for binding of calcium ions and troponin I to calmodulin. *Biochemistry* **21**(1), 156-62.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**(4), 511-20.

Kenny, B. & Finlay, B. B. (1995). Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(17), 7991-5.

Kieke, M. C., Cho, B. K., Boder, E. T., Kranz, D. M. & Wittrup, K. D. (1997). Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display. *Protein Eng.* **10**(11), 1303-10.

Kim, E. J. & Yoo, S. K. (1999). Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**(5), 292-7.

Kim, Y. S., Jung, H. C. & Pan, J. G. (2000). Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2), 788-93.

Kjaergaard, K., Schembri, M. A. & Klemm, P. (2001). Novel Zn(2+)-chelating peptides selected from a fimbria-displayed random peptide library. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(12), 5467-73.

Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1992). Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga β-mediated outer membrane transport. *Embo J.* **11**(6), 2327-35.

Klevit, R. E., Dalgarno, D. C., Levine, B. A. & Williams, R. J. (1984). 1H-NMR studies of calmodulin. The nature of the Ca2+-dependent conformational change. *Eur. J. Biochem.* **139**(1), 109-14.

Knutton, S., McConnell, M. M., Rowe, B. & McNeish, A. S. (1989). Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia coli* producing colonization factor antigens III and IV. *Infect. Immun.* **57**(11), 3364-71.

Koch, A. L. (1996). What size should a bacterium be? A question of scale. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 317-48.

Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**(2), 239-53.

Kolmar, H. (1991). Über die Faltungsstabilität einer variablen Immunglobulindomäne und deren Abhängigkeit von speziellen Merkmalen der Aminosäuresequenz. *Dissertation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.

Kolmar, H., Ferrando, E., Hennecke, F., Wippler, J. & Fritz, H. J. (1992). General mutagenesis/gene expression procedure for the construction of variant immunoglobulin domains in *Escherichia coli*. Production of the Bence-Jones protein REIv via fusion to β-lactamase. *J. Mol. Biol.* **228**(2), 359-65.

Kolmar, H., Frisch, C., Kleemann, G., Götze, K., Stevens, F. J. & Fritz, H. J. (1994). Dimerization of Bence Jones proteins: linking the rate of transcription from an Escherichia coli promoter to the association constant of REI_V. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**(1), 61-70.

Kozloff, L. M., Turner, M. A. & Arellano, F. (1991). Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. *J. Bacteriol.* **173**(20), 6528-36.

Kramer, B., Kramer, W. & Fritz, H. J. (1984). Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* **38**(3), 879-87.

Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D. & Plückthun, A. (1995). Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS Lett.* **377**(2), 227-31.

Kuboniwa, H., Tjandra, N., Grzesiek, S., Ren, H., Klee, C. B. & Bax, A. (1995). Solution structure of calcium-free calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* **2**(9), 768-76.

Kurz, M., Gu, K. & Lohse, P. A. (2000). Psoralen photo-crosslinked mRNA-puromycin conjugates: a novel template for the rapid and facile preparation of mRNA-protein fusions. *Nucleic Acids Res.* **28**(18), E83.

Kwak, Y. D., Yoo, S. K. & Kim, E. J. (1999). Cell surface display of human immunodeficiency virus type 1 gp120 on *Escherichia coli* by using ice nucleation protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**(4), 499-503.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.

Lambert, P. A., Hancock, I. C. & Baddiley, J. (1977). Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **472**(1), 1-12.

Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J. M. & Ghuysen, J. M. (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine β-lactamase of *Streptomyces albus* G. *Biochem. J.* **279 (Pt 1)**, 213-21.

Lang, H. (2000). Outer membrane proteins as surface display systems. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**(7), 579-85.

Lattemann, C. T., Maurer, J., Gerland, E. & Meyer, T. F. (2000). Autodisplay: functional display of active β-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* **182**(13), 3726-33.

Lazcano, A. (1994a). The transition from nonliving to living. In: *Early life on Earth* (Bengtson, S., Hg.), S. 60-9. Columbia University Press, New York, Chichester, UK.

Lazcano, A. (1994b). The RNA world, its predecessors, and its descendants. In: *Early life on Earth* (Bengtson, S., Hg.), S. 70-80. Columbia University Press, New York, Chichester, UK.

Lebman, D. A. & Coffman, R. L. (1988). Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. *J. Exp. Med.* **168**(3), 853-62.

Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J. C., Moras, D. & Poch, O. (2002). Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.* **30**(24), 5382-90.

Lehtio, J., Wernerus, H., Samuelson, P., Teeri, T. T. & Stahl, S. (2001). Directed immobilization of recombinant staphylococci on cotton fibers by functional display of a fungal cellulose-binding domain. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**(2), 197-204.

Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., el Hajji, M. & Castro, B. (1993). Characterization and 2D NMR study of the stable [9-21, 15-27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II. *Protein Sci.* **2**(2), 165-74.

Liébecq, C. (1978). Biochemical nomenclature and related documents. International Union for Biochemistry. The Biochemical Society, London.

Lim, D., Park, H. U., De Castro, L., Kang, S. G., Lee, H. S., Jensen, S., Lee, K. J. & Strynadka, N. C. (2001). Crystal structure and kinetic analysis of β-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 β-lactamase. *Nat. Struct. Biol.* **8**(10), 848-52.

Linse, S., Helmersson, A. & Forsen, S. (1991). Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *J. Biol. Chem.* **266**(13), 8050-4.

Liu, H., Magoun, L. & Leong, J. M. (1999a). β1-chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli*-induced actin condensation. *Infect. Immun.* **67**(4), 2045-9.

Liu, H., Magoun, L., Luperchio, S., Schauer, D. B. & Leong, J. M. (1999b). The Tir-binding region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signalling. *Mol. Microbiol.* **34**(1), 67-81.

Locher, K. P., Rees, B., Koebnik, R., Mitschler, A., Moulinier, L., Rosenbusch, J. P. & Moras, D. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**(6), 771-8.

Lorsch, J. R. & Szostak, J. W. (1994a). *In vitro* evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature* **371**(6492), 31-6.

Lorsch, J. R. & Szostak, J. W. (1994b). *In vitro* selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry* **33**(4), 973-82.

Louie, M., de Azavedo, J. C., Handelsman, M. Y., Clark, C. G., Ally, B., Dytoc, M., Sherman, P. & Brunton, J. (1993). Expression and characterization of the eaeA gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. Immun.* **61**(10), 4085-92.

Luckey, M. & Nikaido, H. (1980a). Diffusion of solutes through channels produced by phage lambda receptor protein of *Escherichia coli*: inhibition by higher oligosaccharides of maltose series. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **93**(1), 166-71.

Luckey, M. & Nikaido, H. (1980b). Specificity of diffusion channels produced by lambda phage receptor protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **77**(1), 167-71.

Luisi, P. L., Walde, P. & Oberholzer, T. (1999). Lipid vesicles as possible intermediates in the origin of life. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*. **4**, 33-38.

Luo, Y., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Creagh, A. L., Knoechel, D. G., Haynes, C. A., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**(6790), 1073-7.

Lutz, R. & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **25**(6), 1203-10.

Maldonado, J. E., Velosa, J. A., Kyle, R. A., Wagoner, R. D., Holley, K. E. & Salassa, R. M. (1975). Fanconi syndrome in adults. A manifestation of a latent form of myeloma. *Am. J. Med.* **58**(3), 354-64.

Mangel, W. F., Toledo, D. L., Brown, M. T., Worzalla, K., Lee, M. & Dunn, J. J. (1994). Omptin: an *Escherichia coli* outer membrane proteinase that activates plasminogen. *Methods Enzymol.* **244**, 384-99.

Markland, W., Roberts, B. L., Saxena, M. J., Guterman, S. K. & Ladner, R. C. (1991). Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. *Gene* **109**(1), 13-9.

Marks, J. D., Ouwehand, W. H., Bye, J. M., Finnern, R., Gorick, B. D., Voak, D., Thorpe, S. J., Hughes-Jones, N. C. & Winter, G. (1993). Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology (N Y)* **11**(10), 1145-9.

Martin, W. & Russell, M. J. (2003). On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**(1429), 59-85.

Matagne, A. & Frère, J. M. (1995). Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A β-lactamases. *Biochim. Biophys. Acta* **1246**(2), 109-27.

Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J. & Frère, J. M. (1998). Catalytic properties of class A β-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem. J.* **330 (Pt 2),** 581-98.

Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R. & Dower, W. J. (1994). An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**(19), 9022-6.

Maurer, J., Jose, J. & Meyer, T. F. (1997). Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**(3), 794-804.

McCafferty, J., Fitzgerald, K. J., Earnshaw, J., Chiswell, D. J., Link, J., Smith, R. & Kenten, J. (1994). Selection and rapid purification of murine antibody fragments that bind a transition-state analog by phage display. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **47**(2-3), 157-71; discussion 171-3.

McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**(6301), 552-4.

McDaniel, T. K. & Kaper, J. B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**(2), 399-407.

Means, A. R. & Dedman, J. R. (1980). Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature* **285**(5760), 73-7.

Mills, D. R., Peterson, R. L. & Spiegelman, S. (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **58**(1), 217-24.

Minasov, G., Wang, X. & Shoichet, B. K. (2002). An ultrahigh resolution structure of TEM-1 β-lactamase suggests a role for Glu166 as the general base in acylation. *J. Am. Chem. Soc.* **124**(19), 5333-40.

Mojzsis, S. J., Arrhenius, G., McKeegan, K. D., Harrison, T. M., Nutman, A. P. & Friend, C. R. (1996). Evidence for life on Earth before 3,800 million years ago. *Nature* **384**(6604), 55-9.

Monnard, P. A. & Deamer, D. W. (2002). Membrane self-assembly processes: steps toward the first cellular life. *Anat. Rec.* **268**(3), 196-207.

Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. & Giannella, R. A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**(3), 1340-51.

Müller, T., Oehlenschlager, F. & Buehner, M. (1995). Human interleukin-4 and variant R88Q: phasing X-ray diffraction data by molecular replacement using X-ray and nuclear magnetic resonance models. *J. Mol. Biol.* **247**(2), 360-72.

Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-50.

Nanninga, N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**(4), 791-5.

Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1), 142-201.

Nemoto, N., Miyamoto-Sato, E., Husimi, Y. & Yanagawa, H. (1997). *In vitro* virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome *in vitro*. *FEBS Lett.* **414**(2), 405-8.

Nielsen, J. B. & Lampen, J. O. (1982). Membrane-bound penicillinases in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **257**(8), 4490-5.

Nikaido, H. & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**(1), 1-32.

Nisbet, E. G. & Sleep, N. H. (2001). The habitat and nature of early life. *Nature* **409**(6823), 1083-91.

Noelle, R. J., Kuziel, W. A., Maliszewski, C. R., McAdams, E., Vitetta, E. S. & Tucker, P. W. (1986). Regulation of the expression of multiple class II genes in murine B cells by B cell stimulatory factor-1 (BSF-1). *J. Immunol.* **137**(5), 1718-23.

Overbeeke, N. & Lugtenberg, B. (1980). Expression of outer membrane protein e of *Escherichia coli* K12 by phosphate limitation. *FEBS Lett.* **112**(2), 229-32.

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**(11), 2411-23.

Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J. & Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci.* **3**(10), 1833-9.

Parker, A. C. & Smith, C. J. (1993). Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A β-lactamase responsible for cefoxitin resistance in Bacteroides species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**(5), 1028-36.

Pautsch, A. & Schulz, G. E. (1998). Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**(11), 1013-7.

Pedigo, S. & Shea, M. A. (1995). Discontinuous equilibrium titrations of cooperative calcium binding to calmodulin monitored by 1-D 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**(33), 10676-89.

Perna, N. T., Mayhew, G. F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. & Blattner, F. R. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **66**(8), 3810-7.

Persechini, A. & Kretsinger, R. H. (1988). Toward a model of the calmodulin-myosin light-chain kinase complex: implications for calmodulin function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12 Suppl 5,** S1-12.

Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & Meyer, T. F. (1987a). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**(6103), 458-62.

Pohlner, J., Halter, R. & Meyer, T. F. (1987b). *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Secretion and implications for pathogenesis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**(6), 479-84.

Prince, S. M., Achtman, M. & Derrick, J. P. (2002). Crystal structure of the OpcA integral membrane adhesin from *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**(6), 3417-21.

Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**(1), 50-108.

Pugsley, A. P. & Reeves, P. (1976). Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **126**(3), 1052-62.

Pugsley, A. P. & Reeves, P. (1977). Uptake of ferrienterochelin by *Escherichia coli*: energy dependent stage of uptake. *J. Bacteriol.* **130**(1), 26-36.

Randall, L. L. & Hardy, S. J. (1986). Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell* **46**(6), 921-8.

Reeves, P. (1995). Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends Microbiol.* **3**(10), 381-6.

Roberts, R. W. & Szostak, J. W. (1997). RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**(23), 12297-302.

Rocken, M., Urban, J. & Shevach, E. M. (1994). Antigen-specific activation, tolerization, and reactivation of the interleukin 4 pathway *in vivo*. *J. Exp. Med.* **179**(6), 1885-93.

Rogers, H. J. (1974). Peptidoglycans (mucopeptides): structure, function, and variations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**(0), 29-51.

Rosenshine, I., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. & Finlay, B. B. (1992). Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *Embo J.* **11**(10), 3551-60.

Rosenshine, I., Ruschkowski, S. & Finlay, B. B. (1996a). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**(3), 966-73.

Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D. J., Mills, S. D. & Finlay, B. B. (1996b). A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J.* **15**(11), 2613-24.

Rosing, M. T. (1999). 13C-Depleted carbon microparticles in >3700-Ma sea-floor sedimentary rocks from west greenland. *Science* **283**(5402), 674-6.

Rüther, U. & Müller-Hill, B. (1983). Easy identification of cDNA clones. *Embo J.* **2**(10), 1791-4.

Saffman, P. G. & Delbrück, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **72**(8), 3111-3.

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. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sandkvist, M. (2001). Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol.* **40**(2), 271-83.

Sassanfar, M. & Szostak, J. W. (1993). An RNA motif that binds ATP. *Nature* **364**(6437), 550-3.

Schaffitzel, C., Hanes, J., Jermutus, L. & Plückthun, A. (1999). Ribosome display: an *in vitro* method for selection and evolution of antibodies from libraries. *J. Immunol. Methods* **231**(1-2), 119-35.

Schauer, D. B. & Falkow, S. (1993). Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* **61**(6), 2486-92.

Schembri, M. A., Kjaergaard, K. & Klemm, P. (1999). Bioaccumulation of heavy metals by fimbrial designer adhesins. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**(2), 363-71.

Schirmer, T. (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *J. Struct. Biol.* **121**(2), 101-9.

Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F. & Rosenbusch, J. P. (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* **267**(5197), 512-4.

Schlegel, H. G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Schmidt, A. (1995). Konstruktion und Charakterisierung varianter Immunglobulindomänen mit putativ faltungsstabilisierenden Aminosäureaustauschen. *Diplomarbeit an der Georg-August-Universität Göttingen*.

Selifonova, O., Valle, F. & Schellenberger, V. (2001). Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8), 3645-9.

Shimazu, M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001). Cell surface display of organophosphorus hydrolase using ice nucleation protein. *Biotechnol. Prog.* **17**(1), 76-80.

Shusta, E. V., Kieke, M. C., Parke, E., Kranz, D. M. & Wittrup, K. D. (1999). Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J. Mol. Biol.* **292**(5), 949-56.

Sidhu, S. S., Weiss, G. A. & Wells, J. A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *J. Mol. Biol.* **296**(2), 487-95.

Singer, S. J. & Nicholson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science **175**: 720-31.

Skerra, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**(1-2), 131-5.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**(4705), 1315-7.

Snapper, C. M., Finkelman, F. D. & Paul, W. E. (1988). Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J. Exp. Med.* **167**(1), 183-96.

Snijder, H. J., Ubarretxena-Belandia, I., Blaauw, M., Kalk, K. H., Verheij, H. M., Egmond, M. R., Dekker, N. & Dijkstra, B. W. (1999). Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase. *Nature* **401**(6754), 717-21.

Song, S., Zhang, T., Qi, W., Zhao, W., Xu, B. & Liu, J. (1993). Transformation of *Escherichia coli* with foreign DNA by electroporation. *Chin. J. Biotechnol.* **9**(3), 197-201.

Staley, T. E., Jones, E. W. & Corley, L. D. (1969). Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am. J. Pathol.* **56**(3), 371-92.

Sternberg, N. & Hoess, R. H. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(5), 1609-13.

Strynadka, N. C., Eisenstein, M., Katchalski-Katzir, E., Shoichet, B. K., Kuntz, I. D., Abagyan, R., Totrov, M., Janin, J., Cherfils, J., Zimmerman, F., Olson, A., Duncan, B., Rao, M., Jackson, R., Sternberg, M. & James, M. N. (1996a). Molecular docking programs successfully predict the binding of a β-lactamase inhibitory protein to TEM-1 β-lactamase. *Nat. Struct. Biol.* **3**(3), 233-9.

Strynadka, N. C., Jensen, S. E., Alzari, P. M. & James, M. N. (1996b). A potent new mode of β-lactamase inhibition revealed by the 1.7 A X-ray crystallographic structure of the TEM-1-BLIP complex. *Nat. Struct. Biol.* **3**(3), 290-7.

Strynadka, N. C., Jensen, S. E., Johns, K., Blanchard, H., Page, M., Matagne, A., Frère, J. M. & James, M. N. (1994). Structural and kinetic characterization of a β-lactamase-inhibitor protein. *Nature* **368**(6472), 657-60.

Szostak, J. W., Bartel, D. P. & Luisi, P. L. (2001). Synthesizing life. *Nature* **409**(6818), 387-90.

Tanaka, T., Ohmura, T. & Hidaka, H. (1982). Hydrophobic interaction of the Ca2+-calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol. Pharmacol.* **22**(2), 403-7.

Tawfik, D. S. & Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* **16**(7), 652-6.

Tzipori, S., Gunzer, F., Donnenberg, M. S., de Montigny, L., Kaper, J. B. & Donohue-Rolfe, A. (1995). The role of the eaeA gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* **63**(9), 3621-7.

Ueno, Y., Yurimoto, H., Yoshioka, H., Komiya, T. & Maruyama, S. (2002). Ion microprobe analysis of graphite from ca. 3.8 Ga metasediments, Isua crustal belt, West Greenland: relationship between metamorphism and carbon isotopic composition. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 1257-68.

Ulshen, M. H. & Rollo, J. L. (1980). Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man--another mechanism. *N. Engl. J. Med.* **302**(2), 99-101.

van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**(3), 25R-36R.

Vandeputte-Rutten, L., Kramer, R. A., Kroon, J., Dekker, N., Egmond, M. R. & Gros, P. (2001). Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *Embo J.* **20**(18), 5033-9.

Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H., de Lorenzo, V. & Fernandez, L. A. (2002). Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J.* **21**(9), 2122-31.

Vogt, J. & Schulz, G. E. (1999). The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. *Structure Fold. Des.* **7**(10), 1301-9.

Waley, S. G. (1988). β-lactamases: a major cause of antibiotic resistance. *Sci. Prog.* **72**(288 Pt 4), 579-97.

Waley, S. G. (1992). In: *The Chemistry of β-Lactams* (Page, M. I., Hg.), S. 198-228. Blackie, London.

Walter, K. (1999). Isolierung von Varianten des *Ecballium elaterium* Trypsin-Inhibitors II durch *Escherichia coli* Zelloberflächenpräsentation und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung. *Diplomarbeit an der Georg-August-Universität Göttingen*.

Walter, M. (1983). Archaean stromatolites: evidence for the Earth's earliest benthos. In: *Earth's earliest biosphere: it's origin and evolution* (J. W. Schopf, Hg.), S. 187-213. Princeton University Press.

Waterhouse, P., Griffiths, A. D., Johnson, K. S. & Winter, G. (1993). Combinatorial infection and *in vivo* recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res.* **21**(9), 2265-6.

Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. & Kolmar, H. (2001). Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J. Bacteriol*. **183**(24), 7273-84.

Wentzel, A., Christmann, A., Krätzner, R. & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG β-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**(30), 21037-43.

Westerlund-Wikström, B. (2000). Peptide display on bacterial flagella: principles and applications. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**(3), 223-30.

Westerlund-Wikström, B., Tanskanen, J., Virkola, R., Hacker, J., Lindberg, M., Skurnik, M. & Korhonen, T. K. (1997). Functional expression of adhesive peptides as fusions to *Escherichia coli* flagellin. *Protein Eng.* **10**(11), 1319-26.

Westermeier, R. Hg. (1990). In: *Elektrophorese-Praktikum*, S. 53-64. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Whittaker, R. H. & Margulis, L. (1978). Protist classification and the kingdoms of organisms. *Biosystems* **10**(1-2), 3-18.

Wilde, S. A., Valley, J. W., Peck, W. H. & Graham, C. M. (2001). Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4 Gyr ago. *Nature* **409**(6817), 175-8.

Willats, W. G. (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* **50**(6), 837-54.

Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. & Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-55.

Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**(12), 4576-9.

Woese, C. R., Magrum, L. J. & Fox, G. E. (1978). Archaebacteria. *J. Mol. Evol.* **11**(3), 245-51.

Wolf, Y. I., Rogozin, I. B., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. (2002). Genome trees and the tree of life. *Trends Genet.* **18**(9), 472-9.

Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G. & Rosenshine, I. (1998). Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**(1), 143-55.

Yokota, T., Otsuka, T., Mosmann, T., Banchereau, J., DeFrance, T., Blanchard, D., De Vries, J. E., Lee, F. & Arai, K. (1986). Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **83**(16), 5894-8.

Yu, J. & Kaper, J. B. (1992). Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **6**(3), 411-7.

Zhang, L., Foxman, B., Manning, S. D., Tallman, P. & Marrs, C. F. (2000). Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**(4), 2009-15.

Diplomarbeit:

Wentzel, A. (1999). Über die Faltung eines Mikroproteins mit Cystin-Knoten-Faltungsmotiv am Beispiel des Trypsin-Inhibitors II von *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (EETI-II). *Diplomarbeit an der Georg-August Universität Göttingen*.

Eigene Veröffentlichungen:

Wentzel, A., Christmann, A., Krätzner, R. & Kolmar, H. (1999). Sequence requirements of the GPNG β-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. *J. Biol. Chem.* **274**(30), 21037-43.

Christmann, A., Walter, K., Wentzel, A., Krätzner, R. & Kolmar, H. (1999). The cystine knot of a squash-type protease inhibitor as a structural scaffold for *Escherichia coli* cell surface display of conformationally constrained peptides. *Protein Eng.* **12**(9), 797-806.

Eigene Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit:

Christmann, A., Wentzel, A., Meyer, C., Meyers, G. & Kolmar, H. (2001). Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by *Escherichia coli* cell surface display of gene-derived random peptide libraries. *J. Immunol. Methods* **257**(1-2), 163-73.

Wentzel, A., Christmann, A., Adams, T. & Kolmar, H. (2001). Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. *J. Bacteriol*. **183**(24), 7273-84.

Patente:

Kolmar, H., Wentzel, A., Christmann, A. (2002). Verfahren zur Exposition von Peptiden und Proteinen auf der Zelloberfläche von Bakterien. Anmelder: Georg-August-Universität Göttingen. DE 10053224 A1

Kolmar, H., Christmann, A., Wentzel, A. (2002). Method for exposing peptides and polypeptides on the cell surface of bacteria. Anmelder: Georg-August-Universität Göttingen. WO 02/34906 A2

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liébecq, 1978).

λ	Phage Lambda
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp^x	Ampicillin, x μg/ml
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (*p*-Toluidinsalz)
Bla	β-Laktamase
bla	β-Laktamase-Gen
BLIP	β-Laktamase Inhibitor Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	cirka
cat	Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
Cm^x	Chloramphenicol, x μg/ml
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
d.h.	das heißt
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Desoxyribonucleic Acid*, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	*double stranded DNA*, doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dYT	*double Yeast Tryptone* (-Medium)
E. coli	*Escherichia coli*
EaeA, EaeA'	Intimin enterohaemorrhagischer *E. coli*, *Intimin'* (um E2 und E3 verkürzte Varianten von EaeA)
eaeA, eaeA'	EHEC Intimin-Gen, *Intimin'*-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EETI-II	*Ecballium elaterium* Trypsin-Inhibitor II
eeti-II	Gen des *Ecballium elaterium* Trypsin-Inhibitors II
$EETI\text{-}CK^{send}$	EETI-II mit dem Sendai-Epitop anstelle der Wildtyp-Inhibitorschleife

EHEC, EPEC	enterohaemorrhagische *E. coli*, enteropathogene *E. coli*
et al.	*et alteri* (und andere)
f	femto
f1	Replikationsursprung des Phagen f1
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorter* (Gerät) oder Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Verfahren)
F_v	variable Immunglobulin-Domäne
G	Guanin
h	Stunde(n)
Hg(g).	Herausgeber (Plural)
Il-4	Interleukin 4
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
Kan^x	Kanamycin, x μg/ml
kb	Kilobasen
K_i	Inhibitionskonstante in M
l	Liter
lac	zum *E. coli* Laktose-Operon gehörend (z.B. *lac*-Repressor, *lac* P/O)
M	Molar
mA	Milliampère
min	Minute
ml	Milliliter
M_r	relatives Molekulargewicht, relative Molmasse
mRNA	*messenger* RNA
n	nano
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid(e)
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
$O.D._x$	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ori	Replikationsursprung
p	pico
p.A.	*pro analysi*
P/O	Promotor/Operator-Region
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphate Buffered Saline* (-Puffer)
PBST	*Phosphate Buffered Saline Tween20* (-Puffer)
PCR	*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	*Ribonucleic Acid*, Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (~20°C)
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
scF_v	*single-chain* F_v, Einketten-F_v-Domäne

SDS	*Sodiumdodecylsulfate*, Natriumdodecylsulfat
send	Sequenz für das Sendai-Epitop (Einberger *et al.*, 1990)
SSC	*Saline Sodium-Citrate*(-Puffer)
ssDNA	*single stranded DNA*, einzelsträngige DNA
T	Thymin
TAE	*Tris-Acetate-EDTA* (-Puffer)
TBE	*Tris-Borate-EDTA* (-Puffer)
TE	*Tris-EDTA* (-Puffer)
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil
u, U	*units*
u.a.	unter anderem/anderen
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Thiogalactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

8.2 Sequenzen

8.2.1 pASKInt100-P

- **Schematische Darstellung des Plasmids pASKInt100-P.**

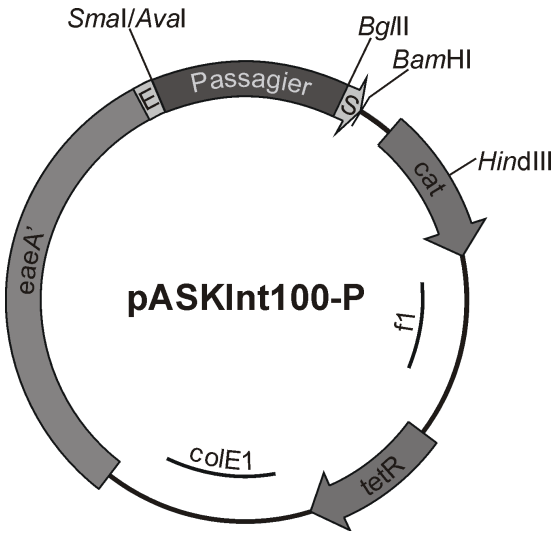


Abbildung 28. Schematische Darstellung des Plasmids pASKInt100-P. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. *eaeA'*: Kodone 1 bis 659 des *eaeA* Gens enterohaemorrhagischer *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7, E: kodierende Sequenz für das 17 Aminosäuren umfassende E-Epitop des menschlichen *Gla*-Proteins, Passagier: kodierende Sequenz für die jeweils verwendete Passagierdomäne P, S: kodierende Sequenz für das 13 Aminosäuren umfassende Epitop des Sendai-Virus, *cat*: kodierende Sequenz für das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen, *f1*: intergenetische Region des filamentösen Phagen *f1* mit dem *f1*-Replikationsursprung, *tetR*: kodierende Sequenz für den *tetA*-Repressor, *colE1*: *colE1*-Replikationsursprung von *E. coli*. Die Expression des *eaeA'* Fusionsgens erfolgt unter der strikten Kontrolle der *tetA*-Promotor/Operator-Region. Wichtige Erkennungssequenzen für im Rahmen dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen sind hervorgehoben.

- **Nukleotidsequenz des Plasmids pASKInt100-P.**

1-138	pASK75 (1-138)
139-2115	Kodone 1 bis 659 des EHEC O157-H7 *eaeA* Gens (*eaeA'*)
2116-2133	*spacer*-Region (kodierte *IgA*-Protease Erkennungssequenz)
2134-2184	kodierende Sequenz für das E-Epitop (17 AS)
2185-2193	*spacer*-Region (*Ava*I/*Sma*I)
2194-3223	kodierende Sequenz der Passagierdomäne P (unterschiedliche Länge, hier 1029 bp)
3224-3235	*spacer*-Region (*Bgl*II)
3236-3274	kodierende Sequenz für das Sendai-Epitop (13 AS)
3275-3283	*spacer*-Region (*Bam*HI)
3284-4152	pHK5-20 mit kodierender Sequenz für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
4153-4979	pASK75 (246-1830 unter Deletion des β-Lactamase-Gens)
4980-5603	kodierende Sequenz für den *tetA*-Repressor
5604-6412	pASK75 (2458-3266)

```
  1  CCATCGAATG GCCAGATGAT TAATTCCTAA TTTTTGTTGA CACTCTATCA
     GGTAGCTTAC CGGTCTACTA ATTAAGGATT AAAAACAACT GTGAGATAGT

 51  TTGATAGAGT TATTTTACCA CTCCCTATCA GTGATAGAGA AAAGTGAAAT
     AACTATCTCA ATAAAATGGT GAGGGATAGT CACTATCTCT TTTCACTTTA

                        XbaI
 +1                     ~~~~~~~                M   I   T   H
101  GAATAGTTCG ACAAAAATCT AGATAACGAG GGCAAAAAAT GATTACTCAT
     CTTATCAAGC TGTTTTTAGA TCTATTGCTC CCGTTTTTTA CTAATGAGTA

 +1  G   C   Y   T   R   T   R   H   K   H   K   L   K   K   T   L   I
151  GGTTGTTATA CCCGGACCCG GCACAAGCAT AAGCTAAAAA AAACATTGAT
     CCAACAATAT GGGCCTGGGC CGTGTTCGTA TTCGATTTTT TTTGTAACTA

                                                   EcoRI
                                                   ~~~~~~
 +1   M   L   S   A   G   L   G   L   F   F   Y   V   N   *   N   S
201  TATGCTTAGT GCTGGTTTAG GATTGTTTTT TTATGTTAAT TAGAATTCAT
     ATACGAATCA CGACCAAATC CTAACAAAAA AATACAATTA ATCTTAAGTA

 +1 F   A   N   G   E   N   Y   F   K   L   G   S   D   S   K   L   L
251  TTGCAAATGG TGAAAATTAT TTTAAATTGG GTTCGGATTC AAAACTGTTA
     AACGTTTACC ACTTTTAATA AAATTTAACC CAAGCCTAAG TTTTGACAAT

 +1  T   H   D   S   Y   Q   N   R   L   F   Y   T   L   K   T   G   E
301  ACTCATGATA GCTATCAGAA TCGCCTTTTT TATACGTTGA AAACTGGTGA
     TGAGTACTAT CGATAGTCTT AGCGGAAAAA ATATGCAACT TTTGACCACT

 +1   T   V   A   D   L   S   K   S   Q   D   I   N   L   S   T   I
351  AACTGTTGCC GATCTTTCTA AATCGCAAGA TATTAATTTA TCGACGATTT
     TTGACAACGG CTAGAAAGAT TTAGCGTTCT ATAATTAAAT AGCTGCTAAA

 +1 W   S   L   N   K   H   L   Y   S   S   E   S   E   M   M   K   A
401  GGTCGTTGAA TAAGCATTTA TACAGTTCTG AAAGCGAAAT GATGAAGGCC
     CCAGCAACTT ATTCGTAAAT ATGTCAAGAC TTTCGCTTTA CTACTTCCGG

 +1  A   P   G   Q   Q   I   I   L   P   L   K   K   L   P   F   E   Y
451  GCGCCTGGTC AGCAGATCAT TTTGCCACTC AAAAAACTTC CCTTTGAATA
     CGCGGACCAG TCGTCTAGTA AAACGGTGAG TTTTTTGAAG GGAAACTTAT

 +1   S   A   L   P   L   L   G   S   A   P   L   V   A   A   G   G
501  CAGTGCACTA CCACTTTTAG GTTCGGCACC TCTTGTTGCT GCAGGTGGTG
     GTCACGTGAT GGTGAAAATC CAAGCCGTGG AGAACAACGA CGTCCACCAC

 +1 V   A   G   H   T   N   K   L   T   K   M   S   P   D   V   T   K
551  TTGCTGGTCA CACGAATAAA CTGACTAAAA TGTCCCCGGA CGTGACCAAA
     AACGACCAGT GTGCTTATTT GACTGATTTT ACAGGGGCCT GCACTGGTTT

 +1  S   N   M   T   D   D   K   A   L   N   Y   A   A   Q   Q   A   A
601  AGCAACATGA CCGATGACAA GGCATTAAAT TATGCGGCAC AACAGGCGGC
     TCGTTGTACT GGCTACTGTT CCGTAATTTA ATACGCCGTG TTGTCCGCCG

 +1   S   L   G   S   Q   L   Q   S   R   S   L   N   G   D   Y   A
651  GAGTCTCGGT AGCCAGCTTC AGTCGCGATC TCTGAACGGC GATTACGCGA
     CTCAGAGCCA TCGGTCGAAG TCAGCGCTAG AGACTTGCCG CTAATGCGCT

 +1 K   D   T   A   L   G   I   A   G   N   Q   A   S   S   Q   L   Q
701  AAGATACCGC TCTTGGTATC GCTGGTAACC AGGCTTCGTC ACAGTTGCAG
     TTCTATGGCG AGAACCATAG CGACCATTGG TCCGAAGCAG TGTCAACGTC

 +1  A   W   L   Q   H   Y   G   T   A   E   V   N   L   Q   S   G   D
751  GCCTGGTTAC AACATTATGG AACGGCAGAG GTTAATCTGC AGAGTGGTGA
     CGGACCAATG TTGTAATACC TTGCCGTCTC CAATTAGACG TCTCACCACT
```

```
  +1   N  F  D   G  S  S  L   D  F  L   L  P  F   Y  D  S
 801  TAACTTTGAC GGTAGTTCAC TGGACTTCTT ATTACCGTTC TATGATTCCG
      ATTGAAACTG CCATCAAGTG ACCTGAAGAA TAATGGCAAG ATACTAAGGC

  +1 E  K  M  L   A  F  G   Q  V  G  A   R  Y  I   D  S  R
 851  AAAAAATGCT GGCATTTGGT CAGGTCGGAG CGCGTTACAT TGACTCCCGC
      TTTTTTACGA CCGTAAACCA GTCCAGCCTC GCGCAATGTA ACTGAGGGCG

  +1  F  T  A  N   L  G  A   G  Q  R   F  F  L  P   A  N  M
 901  TTTACGGCAA ATTTAGGTGC GGGTCAGCGT TTTTTCCTTC CTGCAAACAT
      AAATGCCGTT TAAATCCACG CCCAGTCGCA AAAAAGGAAG GACGTTTGTA

  +1   L  G  Y   N  V  F  I   D  Q  D   F  S  G   D  N  T
 951  GTTGGGCTAT AACGTCTTCA TTGATCAGGA TTTTTCTGGT GATAATACCC
      CAACCCGATA TTGCAGAAGT AACTAGTCCT AAAAAGACCA CTATTATGGG

  +1 R  L  G  I   G  G  E   Y  W  R  D   Y  F  K   S  S  V
1001  GTTTAGGTAT TGGTGGCGAA TACTGGCGAG ACTATTTCAA AAGTAGCGTT
      CAAATCCATA ACCACCGCTT ATGACCGCTC TGATAAAGTT TTCATCGCAA

  +1  N  G  Y  F   R  M  R   R  W  H   E  S  Y  H   K  K  D
1051  AACGGCTATT TCCGCATGAG GCGCTGGCAT GAGTCATACC ATAAGAAAGA
      TTGCCGATAA AGGCGTACTC CGCGACCGTA CTCAGTATGG TATTCTTTCT

  +1   Y  D  E   R  P  A  N   G  F  D   I  R  F   N  G  Y
1101  CTATGATGAG CGCCCAGCAA ATGGCTTCGA TATCCGTTTT AATGGCTATC
      GATACTACTC GCGGGTCGTT TACCGAAGCT ATAGGCAAAA TTACCGATAG

  +1 L  P  S  Y   P  A  L   G  A  K  L   I  Y  E   Q  Y  Y
1151  TACCGTCATA TCCGGCATTA GGCGCCAAGC TGATATATGA GCAGTATTAT
      ATGGCAGTAT AGGCCGTAAT CCGCGGTTCG ACTATATACT CGTCATAATA

  +1  G  D  N  V   A  L  F   N  S  D   K  L  Q  S   N  P  G
1201  GGTGATAATG TTGCTTTGTT TAATTCTGAT AAGCTGCAGT CGAATCCTGG
      CCACTATTAC AACGAAACAA ATTAAGACTA TTCGACGTCA GCTTAGGACC

  +1   A  A  T   V  G  V  N   Y  T  P   I  P  L   V  T  M
1251  TGCGGCGACC GTTGGTGTAA ACTATACTCC GATTCCTCTG GTGACGATGG
      ACGCCGCTGG CAACCACATT TGATATGAGG CTAAGGAGAC CACTGCTACC

  +1 G  I  D  Y   R  H  G   T  G  N  E   N  D  L   L  Y  S
1301  GGATCGATTA CCGTCATGGT ACGGGTAATG AAAATGATCT CCTTTACTCA
      CCTAGCTAAT GGCAGTACCA TGCCCATTAC TTTTACTAGA GGAAATGAGT

  +1  M  Q  F  R   Y  Q  F   D  K  S   W  S  Q  Q   I  E  P
1351  ATGCAGTTCC GTTATCAGTT TGATAAATCG TGGTCTCAGC AAATTGAACC
      TACGTCAAGG CAATAGTCAA ACTATTTAGC ACCAGAGTCG TTTAACTTGG

  +1   Q  Y  V   N  E  L  R   T  L  S   G  S  R   Y  D  L
1401  ACAGTATGTT AACGAGTTAA GAACATTATC AGGCAGCCGT TACGATCTGG
      TGTCATACAA TTGCTCAATT CTTGTAATAG TCCGTCGGCA ATGCTAGACC

  +1 V  Q  R  N   N  N  I   I  L  E  Y   K  K  Q   D  I  L
1451  TTCAGCGTAA TAACAATATT ATTCTGGAGT ACAAGAAGCA GGATATTCTT
      AAGTCGCATT ATTGTTATAA TAAGACCTCA TGTTCTTCGT CCTATAAGAA

  +1  S  L  N  I   P  H  D   I  N  G   T  E  H  S   T  Q  K
1501  TCTCTGAATA TTCCGCATGA TATTAATGGT ACTGAACACA GTACGCAGAA
      AGAGACTTAT AAGGCGTACT ATAATTACCA TGACTTGTGT CATGCGTCTT

  +1   I  Q  L   I  V  K  S   K  Y  G   L  D  R   I  V  W
1551  GATTCAGTTG ATCGTTAAGA GCAAATACGG TCTGGATCGT ATCGTCTGGG
      CTAAGTCAAC TAGCAATTCT CGTTTATGCC AGACCTAGCA TAGCAGACCC

  +1 D  D  S  A   L  R  S   Q  G  G  Q   I  Q  H   S  G  S
1601  ATGATAGTGC ATTACGCAGT CAGGGCGGTC AGATTCAGCA TAGCGGAAGC
      TACTATCACG TAATGCGTCA GTCCCGCCAG TCTAAGTCGT ATCGCCTTCG
```

```
  +1  Q  S  A  Q   D  Y  Q   A  I  L   P  A  Y  V   Q  G  G
1651  CAAAGCGCAC AAGACTACCA GGCTATTTTG CCTGCTTATG TGCAAGGTGG
      GTTTCGCGTG TTCTGATGGT CCGATAAAAC GGACGAATAC ACGTTCCACC

  +1   S  N  I   Y  K  V  T   A  R  A   Y  D  R   N  G  N
1701  CAGCAATATT TATAAAGTGA CGGCTCGCGC CTATGACCGT AATGGCAATA
      GTCGTTATAA ATATTTCACT GCCGAGCGCG GATACTGGCA TTACCGTTAT

  +1 S  S  N  N   V  Q  L   T  I  T  V   L  S  N   G  Q  V
1751  GCTCTAACAA TGTACAGCTT ACTATTACCG TTCTGTCGAA TGGTCAAGTT
      CGAGATTGTT ACATGTCGAA TGATAATGGC AAGACAGCTT ACCAGTTCAA

  +1  V  D  Q  V   G  V  T   D  F  T   A  D  K  T   S  A  K
1801  GTCGACCAGG TTGGGGTAAC GGACTTTACG GCGGATAAGA CTTCGGCTAA
      CAGCTGGTCC AACCCCATTG CCTGAAATGC CGCCTATTCT GAAGCCGATT

  +1   A  D  N   A  D  T  I   T  Y  T   A  T  V   K  K  N
1851  AGCGGATAAC GCCGATACCA TTACTTATAC CGCGACGGTG AAAAAGAATG
      TCGCCTATTG CGGCTATGGT AATGAATATG GCGCTGCCAC TTTTTCTTAC

  +1 G  V  A  Q   A  N  V   P  V  S  F   N  I  V   S  G  T
1901  GGGTAGCTCA GGCTAATGTC CCTGTTTCAT TTAATATTGT TTCAGGAACT
      CCCATCGAGT CCGATTACAG GGACAAAGTA AATTATAACA AAGTCCTTGA

  +1  A  T  L  G   A  N  S   A  K  T   D  A  N  G   K  A  T
1951  GCAACTCTTG GGGCAAATAG TGCCAAAACG GATGCTAACG GTAAGGCAAC
      CGTTGAGAAC CCCGTTTATC ACGGTTTTGC CTACGATTGC CATTCCGTTG

  +1   V  T  L   K  S  S  T   P  G  Q   V  V  V   S  A  K
2001  CGTAACGTTG AAGTCGAGTA CGCCAGGACA GGTCGTCGTG TCTGCTAAAA
      GCATTGCAAC TTCAGCTCAT GCGGTCCTGT CCAGCAGCAC AGACGATTTT

  +1 T  A  E  M   S  S  A   L  N  A  S   A  V  I   F  F  D
2051  CCGCGGAGAT GAGTTCAGCA CTTAATGCCA GTGCGGTTAT ATTTTTTGAT
      GGCGCCTCTA CTCAAGTCGT GAATTACGGT CACGCCAATA TAAAAAACTA

  +1  Q  T  K  A   S  A  I   P  P  T   P  L  G  A   P  V  P
2101  CAAACCAAGG CCAGCGCAAT TCCTCCAACG CCCCTGGGTG CGCCGGTACC
      GTTTGGTTCC GGTCGCGTTA AGGAGGTTGC GGGGACCCAC GCGGCCATGG

                                          AvaI/SmaI
                                           ~~~~~~~
  +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G
2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGG/------
      CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCC/------

                                 BglII
                                ~~~~~~
  +1                             R  S  Q   G  D  G   S  L  G
3201 -kodierende Sequenz------/AGATCTC AGGGGGATGG ATCATTAGGT
     -der Passagierdomäne-----/TCTAGAG TCCCCCTACC TAGTAATCCA

                                 BamHI
                                ~~~~~~
  +1  D  I  E  P   Y  D  S   S  G  S   *
3251  GATATCGAAC CATACGATTC ATCAGGATCC TAAATACCTG TGACGGAAGA
      CTATAGCTTG GTATGCTAAG TAGTCCTAGG ATTTATGGAC ACTGCCTTCT

3301  TCACTTCGCA GAATAAATAA ATCCTGGTGT CCCTGTTGAT ACCGGGAAGC
      AGTGAAGCGT CTTATTTATT TAGGACCACA GGGACAACTA TGGCCCTTCG

3351  CCTGGGCCAA CTTTTGGCGA AAATGAGACG TTGATCGGCA CGTAAGAGGT
      GGACCCGGTT GAAAACCGCT TTTACTCTGC AACTAGCCGT GCATTCTCCA

3401  TCCAACTTTC ACCATAATGA AATAAGATCA CTACCGGGCG TATTTTTTGA
      AGGTTGAAAG TGGTATTACT TTATTCTAGT GATGGCCCGC ATAAAAAACT
```

```
  +1                                        M  E   K  K  I
3451  GTTATCGAGA TTTTCAGGAG CTAAGGAAGC TAAAATGGAG AAAAAAATCA
      CAATAGCTCT AAAAGTCCTC GATTCCTTCG ATTTTACCTC TTTTTTTAGT

  +1 T  G  Y  T   T  V  D   I  S  Q  W   H  R  K   E  H  F
3501  CTGGATATAC CACCGTTGAT ATATCCCAAT GGCATCGTAA AGAACATTTT
      GACCTATATG GTGGCAACTA TATAGGGTTA CCGTAGCATT TCTTGTAAAA

  +1  E  A  F  Q   S  V  A   Q  C  T   Y  N  Q  T   V  Q  L
3551  GAGGCATTTC AGTCAGTTGC TCAATGTACC TATAACCAGA CCGTTCAGCT
      CTCCGTAAAG TCAGTCAACG AGTTACATGG ATATTGGTCT GGCAAGTCGA

  +1   D  I  T   A  F  L  K   T  V  K   K  N  K   H  K  F
3601  GGATATTACG GCCTTTTTAA AGACCGTAAA GAAAAATAAG CACAAGTTTT
      CCTATAATGC CGGAAAAATT TCTGGCATTT CTTTTTATTC GTGTTCAAAA

  +1 Y  P  A  F   I  H  I   L  A  R  L   M  N  A   H  P  E
3651  ATCCGGCCTT TATTCACATT CTTGCCCGCC TGATGAATGC TCATCCGGAA
      TAGGCCGGAA ATAAGTGTAA GAACGGGCGG ACTACTTACG AGTAGGCCTT

  +1  F  R  M  A   M  K  D   G  E  L   V  I  W  D   S  V  H
3701  TTTCGTATGG CAATGAAAGA CGGTGAGCTG GTGATATGGG ATAGTGTTCA
      AAAGCATACC GTTACTTTCT GCCACTCGAC CACTATACCC TATCACAAGT

                                                   HindIII
                                                   ~~~~~~
  +1   P  C  Y   T  V  F  H   E  Q  T   E  T  F   S  S  L
3751  CCCTTGTTAC ACCGTTTTCC ATGAGCAAAC TGAAACGTTT TCAAGCTTGT
      GGGAACAATG TGGCAAAAGG TACTCGTTTG ACTTTGCAAA AGTTCGAACA

  +1 W  S  E  Y   H  D  D   F  R  Q  F   L  H  I   Y  S  Q
3801  GGAGTGAATA CCACGACGAT TTCCGGCAGT TTCTACACAT ATATTCGCAA
      CCTCACTTAT GGTGCTGCTA AAGGCCGTCA AAGATGTGTA TATAAGCGTT

  +1  D  V  A  C   Y  G  E   N  L  A   Y  F  P  K   G  F  I
3851  GATGTGGCGT GTTACGGTGA AAACCTGGCC TATTTCCCTA AAGGGTTTAT
      CTACACCGCA CAATGCCACT TTTGGACCGG ATAAAGGGAT TTCCCAAATA

  +1   E  N  M   F  F  V  S   A  N  P   W  V  S   F  T  S
3901  TGAGAATATG TTTTTCGTCT CAGCCAATCC CTGGGTGAGT TTCACCAGTT
      ACTCTTATAC AAAAAGCAGA GTCGGTTAGG GACCCACTCA AAGTGGTCAA

  +1 F  D  L  N   V  A  N   M  D  N  F   F  A  P   V  F  T
3951  TTGATTTAAA CGTGGCGAAT ATGGACAACT TCTTCGCCCC CGTTTTCACT
      AACTAAATTT GCACCGCTTA TACCTGTTGA AGAAGCGGGG GCAAAAGTGA

  +1  M  G  K  Y   Y  T  Q   G  D  K   V  L  M  P   L  A  I
4001  ATGGGCAAAT ATTATACGCA AGGCGACAAG GTGCTGATGC CGCTGGCGAT
      TACCCGTTTA TAATATGCGT TCCGCTGTTC CACGACTACG GCGACCGCTA

  +1   Q  V  H   H  A  V  C   D  G  F   H  V  G   R  M  L
4051  TCAGGTTCAT CATGCCGTTT GTGATGGCTT CCATGTCGGC AGAATGCTTA
      AGTCCAAGTA GTACGGCAAA CACTACCGAA GGTACAGCCG TCTTACGAAT

  +1 N  E  L  Q   Q  Y  C   D  E  W  Q   G  G  A   *
4101  ATGAATTACA ACAGTACTGC GATGAGTGGC AGGGCGGGGC GTAATTTTTG
      TACTTAATGT TGTCATGACG CTACTCACCG TCCCGCCCCG CATTAAAAAC

4151  TCGACCTGCA GGCAGCGCTT GGCGTCACCC GCAGTTCGGT GGTTAAGCTA
      AGCTGGACGT CCGTCGCGAA CCGCAGTGGG CGTCAAGCCA CCAATTCGAT

4201  GCTTGACCTG TGAAGTGAAA AATGGCGCAC ATTGTGCGAC ATTTTTTTTG
      CGAACTGGAC ACTTCACTTT TTACCGCGTG TAACACGCTG TAAAAAAAAC

4251  TCTGCCGTTT ACCGCTACTG CGTCACGGAT CTCCACGCGC CCTGTAGCGG
      AGACGGCAAA TGGCGATGAC GCAGTGCCTA GAGGTGCGCG GGACATCGCC
```

```
4301  CGCATTAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC
      GCGTAATTCG CGCCGCCCAC ACCACCAATG CGCGTCGCAC TGGCGATGTG

4351  TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC
      AACGGTCGCG GGATCGCGGG CGAGGAAAGC GAAAGAAGGG AAGGAAAGAG

4401  GCCACGTTCG CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTTT
      CGGTGCAAGC GGCCGAAAGG GGCAGTTCGA GATTTAGCCC CCGAGGGAAA

4451  AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCCAAA AAACTTGATT
      TCCCAAGGCT AAATCACGAA ATGCCGTGGA GCTGGGGTTT TTTGAACTAA

4501  AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC
      TCCCACTACC AAGTGCATCA CCCGGTAGCG GGACTATCTG CCAAAAAGCG

4551  CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC
      GGAAACTGCA ACCTCAGGTG CAAGAAATTA TCACCTGAGA ACAAGGTTTG

4601  TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA
      ACCTTGTTGT GAGTTGGGAT AGAGCCAGAT AAGAAAACTA AATATTCCCT

4651  TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA
      AAAACGGCTA AAGCCGGATA ACCAATTTTT TACTCGACTA AATTGTTTTT

4701  TTTAACGCGA ATTTTAACAA AATATTAACG CTTACAATTT CAGGTGGCAC
      AAATTGCGCT TAAAATTGTT TTATAATTGC GAATGTTAAA GTCCACCGTG

4751  TTTTCGGGGA AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC
      AAAAGCCCCT TTACACGCGC CTTGGGGATA AACAAATAAA AAGATTTATG

4801  ATTCAAATAT GTATCCGCTC ATGAGACAAT AACCCTGATA AATGCTTCAA
      TAAGTTTATA CATAGGCGAG TACTCTGTTA TTGGGACTAT TTACGAAGTT

4851  TAATATTGAA AAAGGAAGAG TATGAGTATT CAACATTTCC GTACGGGGAG
      ATTATAACTT TTTCCTTCTC ATACTCATAA GTTGTAAAGG CATGCCCCTC

4901  TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT
      AGTCCGTTGA TACCTACTTG CTTTATCTGT CTAGCGACTC TATCCACGGA

   +2                                M   S  R  L   D  K  S
4951  CACTGATTAA GCATTGGTAG GAATTAATGA TGTCTCGTTT AGATAAAAGT
      GTGACTAATT CGTAACCATC CTTAATTACT ACAGAGCAAA TCTATTTTCA

   +2  K  V  I  N   S  A  L   E  L  L   N  E  V  G   I  E  G
5001  AAAGTGATTA ACAGCGCATT AGAGCTGCTT AATGAGGTCG GAATCGAAGG
      TTTCACTAAT TGTCGCGTAA TCTCGACGAA TTACTCCAGC CTTAGCTTCC

   +2   L  T  T   R  K  L  A   Q  K  L   G  V  E   Q  P  T
5051  TTTAACAACC CGTAAACTCG CCCAGAAGCT AGGTGTAGAG CAGCCTACAT
      AAATTGTTGG GCATTTGAGC GGGTCTTCGA TCCACATCTC GTCGGATGTA

   +2 L  Y  W  H   V  K  N   K  R  A  L   L  D  A   L  A  I
5101  TGTATTGGCA TGTAAAAAAT AAGCGGGCTT TGCTCGACGC CTTAGCCATT
      ACATAACCGT ACATTTTTTA TTCGCCCGAA ACGAGCTGCG GAATCGGTAA

   +2  E  M  L  D   R  H  H   T  H  F   C  P  L  E   G  E  S
5151  GAGATGTTAG ATAGGCACCA TACTCACTTT TGCCCTTTAG AAGGGGAAAG
      CTCTACAATC TATCCGTGGT ATGAGTGAAA ACGGGAAATC TTCCCCTTTC

   +2   W  Q  D   F  L  R  N   N  A  K   S  F  R   C  A  L
5201  CTGGCAAGAT TTTTTACGTA ATAACGCTAA AAGTTTTAGA TGTGCTTTAC
      GACCGTTCTA AAAAATGCAT TATTGCGATT TTCAAAATCT ACACGAAATG

   +2 L  S  H  R   D  G  A   K  V  H  L   G  T  R   P  T  E
5251  TAAGTCATCG CGATGGAGCA AAAGTACATT TAGGTACACG GCCTACAGAA
      ATTCAGTAGC GCTACCTCGT TTTCATGTAA ATCCATGTGC CGGATGTCTT
```

```
  +2  K  Q  Y  E   T  L  E   N  Q  L   A  F  L  C   Q  Q  G
5301  AAACAGTATG AAACTCTCGA AAATCAATTA GCCTTTTTAT GCCAACAAGG
      TTTGTCATAC TTTGAGAGCT TTTAGTTAAT CGGAAAAATA CGGTTGTTCC

  +2   F  S  L   E  N  A  L   Y  A  L   S  A  V   G  H  F
5351  TTTTTCACTA GAGAATGCAT TATATGCACT CAGCGCAGTG GGGCATTTTA
      AAAAAGTGAT CTCTTACGTA ATATACGTGA GTCGCGTCAC CCCGTAAAAT

  +2 T  L  G  C   V  L  E   D  Q  E  H   Q  V  A   K  E  E
5401  CTTTAGGTTG CGTATTGGAA GATCAAGAGC ATCAAGTCGC TAAAGAAGAA
      GAAATCCAAC GCATAACCTT CTAGTTCTCG TAGTTCAGCG ATTTCTTCTT

  +2  R  E  T  P   T  T  D   S  M  P   P  L  L  R   Q  A  I
5451  AGGGAAACAC CTACTACTGA TAGTATGCCG CCATTATTAC GACAAGCTAT
      TCCCTTTGTG GATGATGACT ATCATACGGC GGTAATAATG CTGTTCGATA

  +2   E  L  F   D  H  Q  G   A  E  P   A  F  L   F  G  L
5501  CGAATTATTT GATCACCAAG GTGCAGAGCC AGCCTTCTTA TTCGGCCTTG
      GCTTAATAAA CTAGTGGTTC CACGTCTCGG TCGGAAGAAT AAGCCGGAAC

  +2 E  L  I  I   C  G  L   E  K  Q  L   K  C  E   S  G  S
5551  AATTGATCAT ATGCGGATTA GAAAAACAAC TTAAATGTGA AAGTGGGTCT
      TTAACTAGTA TACGCCTAAT CTTTTTGTTG AATTTACACT TTCACCCAGA

5601  TAAAAGCAGC ATAACCTTTT TCCGTGATGG TAACTTCACT AGTTTAAAAG
      ATTTTCGTCG TATTGGAAAA AGGCACTACC ATTGAAGTGA TCAAATTTTC

5651  GATCTAGGTG AAGATCCTTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC
      CTAGATCCAC TTCTAGGAAA AACTATTAGA GTACTGGTTT TAGGGAATTG

5701  GTGAGTTTTC GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAAGGA
      CACTCAAAAG CAAGGTGACT CGCAGTCTGG GGCATCTTTT CTAGTTTCCT

5751  TCTTCTTGAG ATCCTTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGCAAACAAA
      AGAAGAACTC TAGGAAAAAA AGACGCGCAT TAGACGACGA ACGTTTGTTT

5801  AAAACCACCG CTACCAGCGG TGGTTTGTTT GCCGGATCAA GAGCTACCAA
      TTTTGGTGGC GATGGTCGCC ACCAAACAAA CGGCCTAGTT CTCGATGGTT

5851  CTCTTTTTCC GAAGGTAACT GGCTTCAGCA GAGCGCAGAT ACCAAATACT
      GAGAAAAAGG CTTCCATTGA CCGAAGTCGT CTCGCGTCTA TGGTTTATGA

5901  GTCCTTCTAG TGTAGCCGTA GTTAGGCCAC CACTTCAAGA ACTCTGTAGC
      CAGGAAGATC ACATCGGCAT CAATCCGGTG GTGAAGTTCT TGAGACATCG

5951  ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCAGTG GCTGCTGCCA
      TGGCGGATGT ATGGAGCGAG ACGATTAGGA CAATGGTCAC CGACGACGGT

6001  GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG
      CACCGCTATT CAGCACAGAA TGGCCCAACC TGAGTTCTGC TATCAATGGC

6051  GATAAGGCGC AGCGGTCGGG CTGAACGGGG GGTTCGTGCA CACAGCCCAG
      CTATTCCGCG TCGCCAGCCC GACTTGCCCC CCAAGCACGT GTGTCGGGTC

6101  CTTGGAGCGA ACGACCTACA CCGAACTGAG ATACCTACAG CGTGAGCTAT
      GAACCTCGCT TGCTGGATGT GGCTTGACTC TATGGATGTC GCACTCGATA

6151  GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA AGGCGGACAG GTATCCGGTA
      CTCTTTCGCG GTGCGAAGGG CTTCCCTCTT TCCGCCTGTC CATAGGCCAT

6201  AGCGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCACG AGGGAGCTTC CAGGGGGAAA
      TCGCCGTCCC AGCCTTGTCC TCTCGCGTGC TCCCTCGAAG GTCCCCCTTT

6251  CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCGGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC
      GCGGACCATA GAAATATCAG GACAGCCCAA AGCGGTGGAG ACTGAACTCG

6301  GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC
      CAGCTAAAAA CACTACGAGC AGTCCCCCCG CCTCGGATAC CTTTTTGCGG
```

```
6351  AGCAACGCGG CCTTTTTACG GTTCCTGGCC TTTTGCTGGC CTTTTGCTCA
      TCGTTGCGCC GGAAAAATGC CAAGGACCGG AAAACGACCG GAAAACGAGT

6401  CATGACCCGA CA
      GTACTGGGCT GT
```

- **Passagierdomäne *EETI-CK*^{send}**

```
                                                  AvaI/SmaI
                                                   ~~~~~~~
  +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G  C  D
2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGGTGCGATG
      CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCCACGCTAC

  +1  G  S  L  G   D  I  E   P  Y  D  S   S  C  K   Q  D  S
2201  GAAGCTTAGG TGATATCGAA CCATACGATT CATCATGCAA ACAGGACTCC
      CTTCGAATCC ACTATAGCTT GGTATGCTAA GTAGTACGTT TGTCCTGAGG

                                                     BamHI
                                                    ~~~~~~
  +1  D  C  L  A   G  C  V   C  G  P   N  G  F  C   G  S  *
2251  GACTGCCTGG CTGGCTGCGT TTGCGGGCCC AACGGTTTCT GCGGATCCTA
      CTGACGGACC GACCGACGCA AACGCCCGGG TTGCCAAAGA CGCCTAGGAT

2301  AATACCTGTG ACGGAAGATC ACTTCGCAGA ATAAATAAAT CCTGGTGTCC
      TTATGGACAC TGCCTTCTAG TGAAGCGTCT TATTTATTTA GGACCACAGG
```

- **Passagierdomäne *REI*$_v$**

```
                                                  Δ(SmaI/StuI)
                                                   ~~~~~~~
  +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   P  P  T ../
2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC CCTCCAACG../
      CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG GGAGGTTGC../

                                     BglII
                                    ~~~~~~~
  +1 /. G  T  K   L  Q  I   T  R  R  S   Q  G  D   G  S  L
2501  /.GGTACTAA GCTTCAAATC ACTAGGAGAT CTCAGGGGGA TGGATCATTA
      /.CCATGATT CGAAGTTTAG TGATCCTCTA GAGTCCCCCT ACCTAGTAAT

                                     BamHI
                                    ~~~~~~~
  +1  G  D  I  E   P  Y  D   S  S  G   S  *
2551  GGTGATATCG AACCATACGA TTCATCAGGA TCCTAAATAC CTGTGACGGA
      CCACTATAGC TTGGTATGCT AAGTAGTCCT AGGATTTATG GACACTGCCT
```

- **Passagierdomäne Interleukin 4**

```
                                                  AvaI/SmaI
                                                   ~~~~~~~
  +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G  H  K ../
2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGGCACAAG../
      CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCCGTGTTC../

  +1  /. R  E  K   Y  S  K   C  S  S   D  G  S  L   G  D  I
2551   /.AGAGAGA AATATTCAAA GTGTTCGAGC GATGGATCAT TAGGTGATAT
       /.TCTCTCT TTATAAGTTT CACAAGCTCG CTACCTAGTA ATCCACTATA

                                     BamHI
  +1   E  P  Y   D  S  S  *  ~~~~~~
2601  CGAACCATAC GATTCATCAT AAGGATCCTA AATACCTGTG ACGGAAGATC
      GCTTGGTATG CTAAGTAGTA TTCCTAGGAT TTATGGACAC TGCCTTCTAG
```

- **Passagierdomäne Calmodulin**

```
                                                  AvaI/SmaI
                                                   ~~~~~~~
   +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G  M  A ../
 2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGGATGGCT../
       CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCCTACCGA../

                                                    BglII
                                                   ~~~~~~
   +1 /... N  Y   E  E  F  V   Q  M  M   T  A  K   R  S  Q
 2601  /...AATTAT GAAGAGTTTG TACAGATGAT GACTGCAAAG AGATCTCAGG
       /...TTAATA CTTCTCAAAC ATGTCTACTA CTGACGTTTC TCTAGAGTCC

                                                    BamHI
                                                   ~~~~~~
   +1 G  D  G  S   L  G  D   I  E  P  Y   D  S  S   G  S  *
 2651  GGGATGGATC ATTAGGTGAT ATCGAACCAT ACGATTCATC AGGATCCTAA
       CCCTACCTAG TAATCCACTA TAGCTTGGTA TGCTAAGTAG TCCTAGGATT
```

- **Passagierdomäne β-Laktamase Inhibitor Protein (*BLIP*)**

```
                                                  AvaI/SmaI
                                                   ~~~~~~~
   +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G  A  G ../
 2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGGGCGGGG../
       CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCCCGCCCC../

   +1 /. G  V  L   Q  G  K   R  Q  W  D   L  V  D   G  S  L
 2651  /.GGGGTGCT TCAGGGCAAG CGGCAGTGGG ACCTTGTAGA TGGATCATTA
       /.CCCCACGA AGTCCCGTTC GCCGTCACCC TGGAACATCT ACCTAGTAAT

                                              BamHI
   +1  G  D  I  E   P  Y  D   S  S  *   ~~~~~~
 2701  GGTGATATCG AACCATACGA TTCATCATAA GGATCCTAAA TACCTGTGAC
       CCACTATAGC TTGGTATGCT AAGTAGTATT CCTAGGATTT ATGGACACTG
```

- **Passagierdomäne *TEM-1* β-Laktamase**

```
                                                  AvaI/SmaI
                                                   ~~~~~~~
   +1   Y  P  D   P  L  E  P   R  A  A   S  G  P   G  H  P ../
 2151  GTATCCAGAT CCGCTGGAAC CGCGTGCCGC TTCTGGCCCC GGGCACCCA../
       CATAGGTCTA GGCGACCTTG GCGCACGGCG AAGACCGGGG CCCGTGGGT../

                                                   BglII
                                                  ~~~~~~~
   +1 /.. P  T  P   D  I  G   T  E  F   I  D  R  S   Q  G  D
 3001  /..CCAACGC CTGATATCGG TACCGAATTC ATCGATAGAT CTCAGGGGGA
       /..GGTTGCG GACTATAGCC ATGGCTTAAG TAGCTATCTA GAGTCCCCCT

                                                   BamHI
                                                  ~~~~~~~
   +1   G  S  L   G  D  I  E   P  Y  D   S  S  G   S  *
 3051  TGGATCATTA GGTGATATCG AACCATACGA TTCATCAGGA TCCTAAATAC
       ACCTAGTAAT CCACTATAGC TTGGTATGCT AAGTAGTCCT AGGATTTATG
```

8.2.2 pREP4-supE

- **Schematische Darstellung des Plasmids pREP4-supE.**

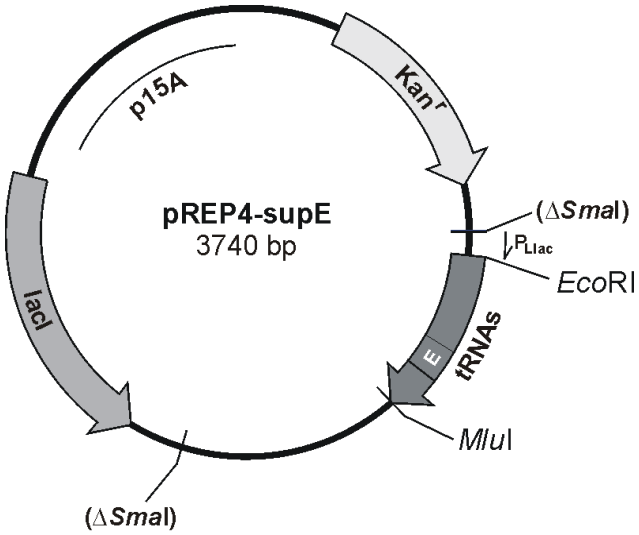


Abbildung 29. Schematische Darstellung des Plasmids pREP4-supE. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an. tRNAs: kodierende Sequenz für die $tRNA^{Gln(CAA)}$, die $tRNA^{Gln(CCU)}$, die $tRNA^{Met}$, die *supE* tRNA (E) und die $tRNA^{Gln(AAU)}$, *Kan*^{r}: kodierende Sequenz für das Kanamycin-Resistenz-Gen, *lacI* des Transposons 5, kodierende Sequenz für den *lac*-Repressor, *p15A*: *p15A*-Replikationsursprung von *E. coli*. Die Transkription des tRNA-Clusters erfolgt unter der Kontrolle der P_{Llac}-Promotor/Operator-Region (P_{Llac}). Wichtige Erkennungssequenzen für im Rahmen dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen sowie die beiden Hälften der durch die Klonierung der tRNA-Gene deletierten *Sma*I Schnittstelle (Δ*Sma*I) sind hervorgehoben.

- **Ausschnitt aus der Nukleotidsequenz des Plasmids pREP4-supE.**

1356-1419	Promotor-Region aus pZA22-MCS1
1420-2061	Ausschnitt aus dem *supB-E* tRNA gene cluster von *E. coli*, kloniert über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Mlu*I, darin
1431-1514	kodierende Sequenz für die $tRNA^{Gln(CAA)}$
1549-1623	kodierende Sequenz für die $tRNA^{Gln(CCU)}$
1639-1715	kodierende Sequenz für die $tRNA^{Met}$
1763-1837	kodierende Sequenz für die *supE* tRNA
1875-1945	kodierende Sequenz für die $tRNA^{Gln(AAU)}$
2062-	Bereich aus pZA22-MCS1

```
1356  .....TGTGA GCGGATAACA ATGATACTTA GATTCAATTG TGAGCGGATA
      .....ACACT CGCCTATTGT TACTATGAAT CTAAGTTAAC ACTCGCCTAT

                        EcoRI
                       ~~~~~~
1401  ACAATTTCAC ACAGAATTCA CCAGAAAGCG TTGTACGGAT GGGGTATCGC
      TGTTAAAGTG TGTCTTAAGT GGTCTTTCGC AACATGCCTA CCCCATAGCG
```

```
1451  CAAGCGGTAA GGCACCGGTT TTTGATACCG GCATTCCCTG GTTCGAATCC
      GTTCGCCATT CCGTGGCCAA AAACTATGGC CGTAAGGGAC CAAGCTTAGG

1501  AGGTACCCCA GCCATCTTCT TCGAGTAAGC GGTTCACCGC CCGGTTATTG
      TCCATGGGGT CGGTAGAAGA AGCTCATTCG CCAAGTGGCG GGCCAATAAC

1551  GGGTATCGCC AAGCGGTAAG GCACCGGTTT TTGATACCGG CATTCCCTGG
      CCCATAGCGG TTCGCCATTC CGTGGCCAAA AACTATGGCC GTAAGGGACC

1601  TTCGAATCCA GGTACCCCAG CCATCGAAGA AACAATCTGG CTACGTAGCT
      AAGCTTAGGT CCATGGGGTC GGTAGCTTCT TTGTTAGACC GATGCATCGA

1651  CAGTTGGTTA GAGCACATCA CTCATAATGA TGGGGTCACA GGTTCGAATC
      GTCAACCAAT CTCGTGTAGT GAGTATTACT ACCCCAGTGT CCAAGCTTAG

1701  CCGTCGTAGC CACCAAATTC TGAATGTATC GAATATGTTC GGCAAATTCA
      GGCAGCATCG GTGGTTTAAG ACTTACATAG CTTATACAAG CCGTTTAAGT

1751  AAACCAATTT GTTGGGGTAT CGCCAAGCGG TAAGGCACCG GATTCTGATT
      TTTGGTTAAA CAACCCCATA GCGGTTCGCC ATTCCGTGGC CTAAGACTAA

1801  CCGGCATTCC GAGGTTCGAA TCCTCGTACC CCAGCCAATT TATTCAAGAC
      GGCCGTAAGG CTCCAAGCTT AGGAGCATGG GGTCGGTTAA ATAAGTTCTG

1851  GCTTACCTTG TAAGTGCACC CAGTTGGGGT ATCGCCAAGC GGTAAGGCAC
      CGAATGGAAC ATTCACGTGG GTCAACCCCA TAGCGGTTCG CCATTCCGTG

1901  CGGATTCTGA TTCCGGCATT CCGAGGTTCG AATCCTCGTA CCCCAGCCAC
      GCCTAAGACT AAGGCCGTAA GGCTCCAAGC TTAGGAGCAT GGGGTCGGTG

1951  ATTAAAAAAG CTCGCTTCGG CGAGCTTTTT GCTTTTCTGC GTTCATTCAA
      TAATTTTTTC GAGCGAAGCC GCTCGAAAAA CGAAAAGACG CAAGTAAGTT

2001  TGTCGAATGC GATGTTGACA CGTCTTATCC TTCAATGTCG GATGCGACGC
      ACAGCTTACG CTACAACTGT GCAGAATAGG AAGTTACAGC CTACGCTGCG

                 MluI
                ~~~~~~
2051  TGCCGCGTCT TACGCGTGCT AGAGGCATCA AATAAAACGA AAGGC.....
      ACGGCGCAGA ATGCGCACGA TCTCCGTAGT TTATTTTGCT TTCCG.....
```

8.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt und durch den Sonderforschungsbereich 416 „Chemische und biologische Synthese und Transformation von Naturstoffen und Naturstoff-Analoga“ sowie das Graduiertenkolleg „Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen“ unterstützt.

An erster Stelle möchte ich Harald Kolmar für die langjährige, kollegiale und fruchtbare Zusammenarbeit an der Universität Göttingen und darüber hinaus danken. Die stets vorhandene Bereitschaft zu wissenschaftlicher Diskussion und Hilfestellung gepaart mit dem mir entgegengebrachten Vertrauen in Sachen Planung und Durchführung von Experimenten sowie die unterstützende Mitarbeit in vielen Bereichen dieser Arbeit hatten einen entscheidenden Anteil an deren Gelingen.

Prof. Hans-Joachim Fritz danke ich recht herzlich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen und alle zur Verfügung stehenden Ressourcen nutzen zu können sowie für eine Vielzahl wertvoller Anregungen und Diskussionen im Rahmen der Arbeitsberichte und Seminare.

Den Gruppenleitern Wilfried Kramer, Susanne Behrens, Reinhard Sterner und Andreas Schwienhorst danke ich für viele hilfreiche Lösungsvorschläge in Sachen Wissenschaft. Wilfried Kramer danke ich darüber hinaus für die Übernahme des Korreferats.

Marita Kalck, Rainer Merkl, Olaf Waase und Patrick Regin danke ich für ihre stete, ideenreiche Hilfsbereitschaft in Fragen der Bürokratie, bei Problemen mit Soft- und Hardware sowie in allen sonstigen technischen Angelegenheiten. Weiter gilt ein Dank Elisabeth Schafflik, Marlies Bartels und Angelika Löffers für die reibungslose Ver- und Entsorgung.

Meinen jetzigen und ehemaligen Mitstreitern Andreas Christmann, Thorsten Adams, Ulli Schmoldt, Bettina Hucke, Kerstin Walter, Dirk Ponsel, Gerrit Hennecke, Martina Henn-Sax, Anke Schürer, Christian Rudolph, Birgit Zeike, Jürgen Scheller, Martin Laging, Eva Kansy, Julia Wittmann, Stina Schiller, Rüdiger Dietrich, Milena Ninkovic, Gülden Aral, Dennis Wegener, Christian Hildmann, Christian Klug, Frank Wirsching, René Hempel und allen, die ich unbeabsichtigt in der Aufzählung unterschlagen habe, gilt ein großer Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre auf der Etage über die gesamte Zeit. Thorsten Adams danke ich hierbei besonders für die Mithilfe bei der Klonierung des *BLIP*-Gens.

Der Belegschaft des *Göttingen Genomics Laboratory* (G_2L) gilt der Dank für eine Vielzahl gut auswertbarer Sequenzen. Ralph Pries aus der Abteilung für Molekulare Mikrobiologie von Prof. Braus danke ich für die Unterstützung in Sachen fluoreszenzmikroskopische Fotografie.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Hacker, Universität Würzburg, danke ich für die Bereitstellung von abgetöteten EHEC Zellen, Dr. Karlheinz Friedrich, Universität Jena, für die Bereitstellung des Plasmids pRPR9IL-4FD sowie Dr. N. C. J. Strynadka, University of British Columbia, Vancouver, für die Überlassung eines für *BLIP* kodierenden Plasmids.

Besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets in meinen Zielen bestärkt und die mich die gesamte Zeit meines Studiums über nach Kräften unterstützt haben. Sie haben auf diese Weise einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Verlobten Heike,... für Ihre Geduld.

8.4 Lebenslauf

Name: Alexander Wentzel

Geburtsdatum: 25. Februar 1973

Geburtsort: Freie und Hansestadt Hamburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Wolfgang Wentzel und Hannelore Wentzel, geb. Ehmann

Schulbesuch:
1979 bis 1983 Grundschule „An der Berner Au“ in Hamburg
1983 bis 1984 Gymnasium Meiendorf in Hamburg
1985 bis 1992 Johann-Rist-Gymnasium in Wedel/Holstein
1992 Abitur am Johann-Rist-Gymnasium in Wedel/Holstein

Zivildienst: 1992 bis 1993 Mobiler Sozialer Hilfsdienst bei der Arbeiterwohlfahrt, Kreisverband Pinneberg

Studium der Biologie: 1993 bis 1997 an der Georg-August-Universität zu Göttingen

Diplomarbeit: 1997 bis 1999 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen.

Titel: „Über die Faltung eines Mikroproteins mit Cystin-Knoten-Faltungsmotiv am Beispiel des Trypsin-Inhibitors II von *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (EETI-II)“, Gesamtnote: „Mit Auszeichnung“

Doktorarbeit: seit April 1999 in der Abteilung für Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie des Instituts für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen. Unterstützt durch den SFB416 „Chemische und biologische Synthese und Transformation von Naturstoffen und Naturstoffanaloga“ sowie durch das Graduiertenkolleg „Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen“ der Georg-August-Universität zu Göttingen.

Sonstiges: Gründungsgesellschafter der im Juli 2001 in Göttingen gegründeten *Selecore* GmbH.

seit Juli 2002 Projektleiter „Technologieentwicklung“ bei der *Selecore* GmbH Göttingen.