

Evolutione *in vitro*-Adaption eines thermostabilen
($\beta\alpha$)₈-*barrel*-Proteins an die Katalyse
einer abiotischen Reaktion

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

vorgelegt von
Stina Schiller
aus Hildesheim

Göttingen 2003

D7

Referent:

Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent:

PD Dr. H. Kolmar

Tag der mündlichen Prüfung:

22.01.2004

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Reaktionsbeschleunigung durch Katalyse	1
1.1.1	Enzymatische Katalyse	2
1.1.2	Generierung von polypeptidischen Katalysatoren.....	3
1.2	(β) ₈ -barrel-Proteine	4
1.3	Thermostabile Proteine mit enzymatischer Aktivität.....	5
1.4	tHisF: ein thermostabiles (β) ₈ -barrel-Protein	6
1.5	Evolutives <i>protein engineering</i>	7
1.6	Selektion enzymatischer Aktivität.....	8
1.7	Synthese von Genbibliotheken	9
1.8	Zielsetzung des Promotionsprojektes	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	MATERIAL.....	11
2.1.1	Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>).....	11
2.1.2	Bakteriophagen.....	11
2.1.3	Plasmide	12
2.1.4	Oligodesoxyribonukleotide für Polymerase-Kettenreaktionen	15
2.1.5	Enzyme, Antikörper und Proteine.....	17
2.1.6	Chemikalien	18
2.1.7	sonstige Materialien und Kits	19
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	20
2.1.9	Nährmedien	22
2.1.10	Geräte/ Materialien	23
2.1.11	Software	25
2.2	METHODEN	26
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	26
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	36
2.2.4	phage display.....	41
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	47
3.1	PRÄSENTATION VON HISF AUF PHAGEN.....	47
3.1.1	Phagenpräsentierte tHisF-Bibliotheken: Planung der Vorgehensweise	47
3.1.2	Test der Membrangängigkeit von tHisF.....	48
3.1.3	Test des pCANTAB-tHisF(C9A)-Konstruktes auf Präsentation des tHisFs auf M13-Phagen	52
3.1.4	Kompatibilität der pCANTAB-Konstrukte mit dem ToxR-System.....	53
3.1.5	Test pCANTAB-hisF _(C9A) -Rep-Konstrukt zur Präsentation von tHisF auf M13-Phagen	54
3.1.6	Modifikation der Signalsequenz.....	56
3.1.7	Panning eines HisF-/Hirudinphagengemisches gegen anti-tHisF-Antikörperserum	59
3.1.8	Nachweis einer Anreicherung von tHisF-Phagen über panning mittels Western-Blot-Analyse.....	61
3.1.9	Enzymatische Aktivität von tHisF-präsentierenden M13-Phagen	62
3.1.10	Zusammenfassung.....	67
3.2	KOMBINATORISCHE SYNTHESE DES HISF-GENREPERTOIRES	69
3.2.1	Planung der Synthese	69
3.2.2	Synthese der Bibliothek.....	74
3.2.3	DNA-Sequenzanalyse und statistische Datenanalyse der hisF-Genbibliothek	88
3.2.4	Zusammenfassung.....	93
3.3	SELEKTION POTENTIELL KATALYTISCH AKTIVER HISF-VARIANTEN ÜBER PHAGE DISPLAY.....	94
3.3.1	4-Nitrophenyl-Phosphonat als Übergangszustandsanalogon einer Esterhydrolyse.....	94
3.3.2	Test des tHisF auf intrinsische Esteraseaktivität.....	96
3.3.3	Selektion potentiell hydrolytisch aktiver HisF-Varianten über phage display	96
3.3.4	Panning der phagenpräsentierten HisF-Bibliothek gegen das Übergangszustandsanalogon.....	96
3.3.5	Test der polyklonalen Phagen auf Bindung.....	97
3.3.6	PCR-Screen auf Anwesenheit des hisF-Gens	98
3.3.7	Western-Blot-Analyse der polyklonalen Phagen der einzelnen panning-Runden.....	99

3.3.8	<i>Test auf 4-Nitrophenylesterhydrolyse-Aktivität der polyklonalen Phagen</i>	99
3.3.9	<i>Test von Phagenpräparationen isolierter Klone auf Hydrolaseaktivität</i>	101
3.3.10	<i>DNA-Sequenzanalyse der hisF-Varianten mit Esteraseaktivität</i>	103
3.3.11	<i>Western-Blot-Analyse von Phagen mit HisF-Varianten mit Esteraseaktivität</i>	103
3.3.12	<i>Zusammenfassung</i>	104
4	ZUSAMMENFASSUNG	106
5	ANHANG	108
5.1	MATHEMATISCHER ANHANG	108
5.2	CHEMISCHER UND MOLEKULARBIOLOGISCHER ANHANG	110
5.2.1	<i>Darstellung des mit dem Übergangszustandsanalogon gekoppelten Rinderserumalbumins (modifiziert nach Tawfik et al., 1993)</i>	110
5.3	NUKLEOTIDSEQUENZEN	117
5.3.1	<i>Nukleotidsequenz des synthetischen hisF-Gens</i>	117
5.3.2	<i>Nukleotidsequenz des hisF-Gens</i>	119
5.3.3	<i>Alignment der sequenzierten Klone der hisF-Genbibliothek</i>	120
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	129
7	LITERATURVERZEICHNIS	131
8	DANKSAGUNG	138

1 EINLEITUNG

Die Geschwindigkeit nahezu jeder biochemischen Reaktion wird von einem entsprechenden Enzym – einem Protein mit katalytischer Aktivität – beschleunigt. Im Vergleich zu abiotischen Katalysatoren sind diese in der Lage, Reaktionen unter weitaus mildereren Bedingungen und mit höherer Beschleunigung und Selektivität zu katalysieren. Diese Eigenschaften, insbesondere ihre Fähigkeit als stereoselektive Katalysatoren zu agieren, machen sie zu interessanten Werkzeugen sowohl für die Forschung als auch für die chemische bzw. pharmazeutische Industrie. Aufgrund ihres biologischen Ursprungs ist ihr Einsatz jedoch normalerweise auf die Katalyse ihrer natürlichen Reaktionen beschränkt. Ein Ziel des *protein engineering* ist deshalb die Entwicklung von polypeptidischen Katalysatoren, von denen keine physiologischen Entsprechungen existieren. Das zu diesem Zweck vorrangig verwendete Proteinfaltungsmuster besitzt jedoch diverse Nachteile (siehe Abschnitt 1.1.2), dementsprechend sollte in diesem Promotionsprojekt ein weitaus geeigneter erscheinender Faltungstyp zur Synthese von polypeptidischen Katalysatoren für beliebige nicht-biologische Reaktionen zugänglich gemacht werden.

1.1 Reaktionsbeschleunigung durch Katalyse

Chemische Reaktionen, die zwar thermodynamisch möglich sind, aber aufgrund ihrer hohen Aktivierungsenergie nicht oder nur sehr langsam ablaufen, können durch einen Katalysator, der die freie Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger der Reaktion absenkt, beschleunigt werden. Wie man in Abbildung 1.1 erkennen kann, stellt der Übergangszustand den Punkt höchster Energie auf dem Reaktionsprofil dar, der während der Reaktion durchlaufen werden muss.

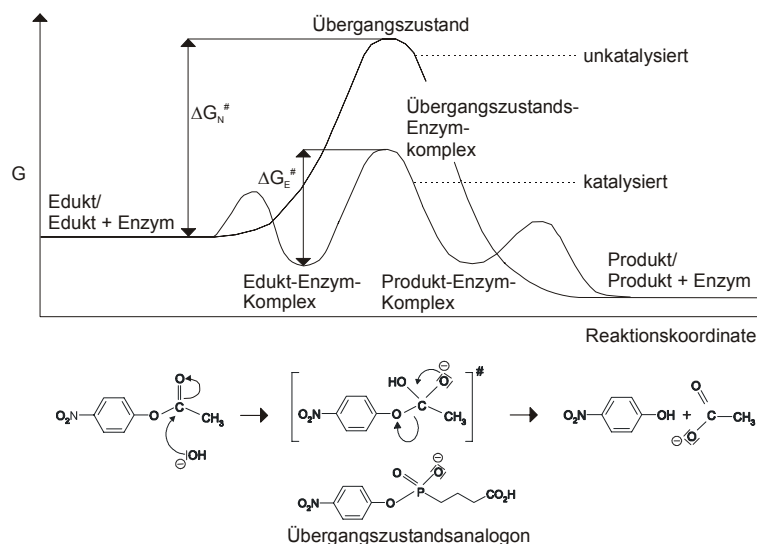


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer abiotischen Reaktion am Beispiel der Hydrolyse eines 4-Nitrophenylesters. Das abgebildete Übergangszustandsanalogon ähnelt dem Übergangszustand in Struktur und Ladungsverteilung.

1.1.1 Enzymatische Katalyse

Enzyme binden ihre Substrate über nichtkovalente Kräfte an den Substratbindestellen, die einen gegenüber dem Substrat komplementären geometrischen Aufbau besitzen. Im Gegensatz zu Reaktionen, die mit einem abiotischen Katalysator in Lösung ablaufen, können so die katalytisch aktiven Gruppen und das Substrat optimal angeordnet werden (Wolfenden und Radzicka, 1991). Es ist sogar möglich, dass erst eine Konformationsänderung des Proteins, die durch die Bindung des Substrates verursacht wird, die entsprechenden Gruppen in eine für die Katalyse optimale Orientierung bringt (*induced fit*).

Der Hauptfaktor für die außergewöhnliche Effizienz der enzymatischen Katalyse liegt aber nicht nur in dem geometrischen Aufbau der Substratbindestelle, sondern auch in der Verteilung von Aminosäureresten, die mit dem Substrat wechselwirken können. Da sich die Struktur des Substrates im Laufe der Reaktion vom Edukt über den Übergangszustand bis hin zum Produkt ändert, kann eine maximale Form der Interaktion der zur Wechselwirkung fähigen Gruppen des Enzyms mit den entsprechenden Gruppen des Substrates nicht während des ganzen Reaktionsverlaufs gewährleistet sein. Durch die Ausbildung von Wasserstoff-, oder Salzbrücken oder durch $\pi\pi$ -Wechselwirkungen von aromatischen Gruppen, kann der Übergangszustand der Reaktion stabilisiert werden, wodurch die Aktivierungsenergie abgesenkt und die Reaktion damit beschleunigt wird (Fersht, 1999).

Wie man aus der Schemazeichnung in Abbildung 1.2 entnehmen kann, kommt es jedoch nur dann zu einer Absenkung der Aktivierungsenergie, wenn das Substrat im Übergangszustand stärker stabilisiert wird als im Ausgangszustand; werden Ausgangszustand und Übergangszustand gleich stark stabilisiert, kommt es zu keiner Katalyse, wird der Ausgangszustand stärker stabilisiert, dann wird die Aktivierungsenergie sogar erhöht und die Reaktion damit inhibiert.

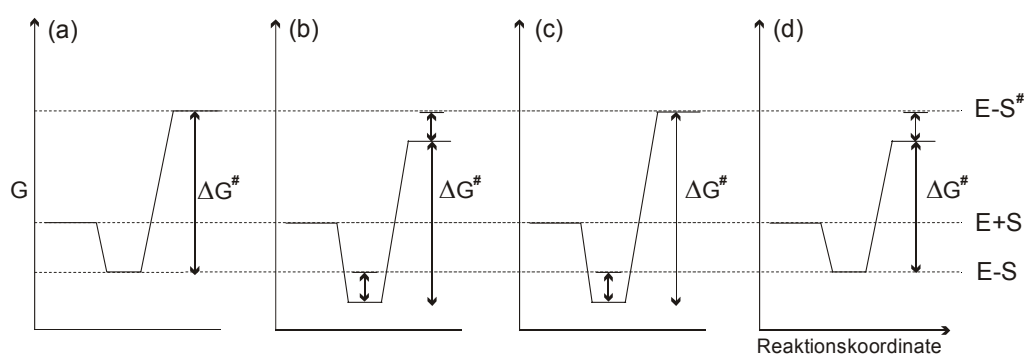


Abbildung 1.2: (modifiziert nach Fersht, 1999)

- (a) Energieprofil einer unkatalysierten Reaktion
- (b) Energieprofil einer Reaktion, in der das „Enzym“ das Substrat im Ausgangszustand ebenso stark stabilisiert wie im Übergangszustand
- (c) Energieprofil einer Reaktion, in der das „Enzym“ das Substrat im Ausgangszustand stärker stabilisiert als im Übergangszustand
- (d) Energieprofil einer Reaktion, in der das Enzym das Substrat im Übergangszustand stärker

stabilisiert als im Ausgangszustand – nur in diesem Fall kommt es zur Absenkung der Aktivierungsenergie und damit zur Katalyse

Abkürzungen:

E+S	Enzym und Substrat im Ausgangszustand
E-S	Komplex aus Enzym und Substrat im Ausgangszustand
E-S [#]	Komplex aus Enzym und Substrat im Übergangszustand
$\Delta G^{\#}$	Aktivierungsenergie

Darüber hinaus stehen den Enzymen aber auch noch weitere Katalysemechanismen zur Verfügung, so können z. B. wie bei der abiotischen Katalyse ungünstige Ladungsverteilungen im Übergangszustand durch ein Proton oder eine Base stabilisiert werden (allgemeine Säure-Base-Katalyse). Ebenso können in Metalloenzymen negative Ladungen durch Metallionen ausgeglichen werden (elektrophile Katalyse). Bei diesen Formen der Katalyse wird der Übergangszustand stabilisiert, ohne dass der Reaktionsmechanismus verändert wird. Es ist aber auch möglich, eine Reaktion zu beschleunigen, indem zwischen Enzym und Substrat eine vorübergehende kovalente Bindung – oftmals wie z. B. bei den Aminotransferasen in Form einer Schiff-Base – gebildet wird (kovalente Katalyse). Bei vielen dieser Katalysatoren fungieren Coenzyme als katalytisch wirksame Gruppen; solche Coenzyme sind nicht proteinartige Bestandteile von Enzymen, die durch die Enzymreaktion chemisch verändert werden, weshalb sie in folgenden Schritten regeneriert werden müssen. Sie können auch dazu dienen, ein Substrat vorübergehend chemisch zu modifizieren und dabei in eine aktivere Verbindung zu überführen, wie es beispielsweise mittels ATP bei der Aktivierung von Aminosäuren durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen geschieht – darüber hinaus wird hier das Gleichgewicht durch die Spaltung des entstehenden Pyrophosphats zur Produktseite hin verschoben.

1.1.2 Generierung von polypeptidischen Katalysatoren

Schon 1948 hat Linus Pauling postuliert, dass ein Enzym einem Antikörper ähneln sollte, wenn auch mit dem Unterschied, dass es nicht so sehr seinem Substrat, sondern vielmehr dem Übergangszustand der von ihm katalysierten Reaktion gegenüber komplementär sein muss (Pauling, 1948; zitiert in Powell und Hansen, 1989).

Darauf aufbauend nahm Jencks an, dass ein Antikörper, der gegen ein Hapten gerichtet ist, das dem Übergangszustand einer chemischen Reaktion ähnelt, die entsprechende katalytische Aktivität aufweisen sollte (Jencks, 1969; zitiert in Powell und Hansen, 1989).

Diese Idee wurde in Form der katalytisch aktiven Antikörper, den sogenannten Abzymen, erstmalig und unabhängig voneinander in den Arbeitsgruppen von Schultz und Lerner realisiert (Pollack *et al.* 1986; Tramontano *et al.*, 1986). Dazu wurden Tiere mit Übergangszustandsanaloga immunisiert – stabilen Verbindungen, die dem Übergangszustand in Struktur und Ladungsverteilung ähneln (vgl. Abbildung 1.1, unten). Allerdings ist die Herstellung monoklonaler Antikörper über Immunisierung und Hybridoma-Technik langwierig und kostenintensiv und die katalytische Aktivität der Abzyme liegt – von wenigen Ausnahmen abgesehen – um Größenordnungen unter der

der entsprechenden natürlichen Enzyme (Haynes *et al.*, 1994; Charbonnier *et al.*, 1997). Katalytisch aktive Antikörper beschleunigen Reaktionen meist um den Faktor 10^2 - 10^5 (Tanaka, 2002), wohingegen natürliche Enzyme, wie z. B. die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, in der Lage sind, Reaktionen bis um den Faktor 10^{17} zu beschleunigen (Miller und Wolfenden, 2002). Der Ansatz, die Aktivität der katalytisch aktiven Antikörper mit evolutiven Techniken zu erhöhen (z. B. Baca *et al.*, 1997; Arkin und Wells, 1998), wird jedoch von den molekularen Eigenschaften der Antikörper, wie z. B. dem Vorhandensein von Disulfidbrücken, der Tendenz zum Dimerisieren, dem Bestehen aus mehreren Ketten, der schlechten Expression in *E. coli*, etc., erschwert.

Wenn sich aber ein Übergangszustand durch Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Substrat stabilisieren lässt, dann bedeutet dies auch, dass ein beliebiges Protein, das an den Übergangszustand einer chemischen Reaktion strukturell angepasst wird, zum Katalysator ebendieser Reaktion werden sollte. In diesem Projekt wurde deshalb ein leichter handhabbares Proteinfaltungsmuster als strukturelle Basis zur Katalyse einer beliebigen Reaktion zugänglich gemacht: das $(\beta\alpha)_8$ -barrel.

1.2 $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Proteine

Das $(\beta\alpha)_8$ -barrel (TIM-barrel) ist bei röntgenkristallographisch aufgeklärten Enzymen die häufigste und variantenreichste Proteindomänenstruktur. Sie findet sich bei über 10 % aller bekannten Faltungen (Gerlt, 2000) und dient unter anderem als Hydrolase, Lyase, Isomerase, Oxidoreduktase und Transferase (Wierenga, 2001). Namensgebend war das erste entdeckte TIM-barrel, die Triosephosphatisomerase (TIM) aus *Gallus gallus* (Banner *et al.*, 1975).

Wie man in Abbildung 1.3 erkennen kann, besteht ein $(\beta\alpha)_8$ -barrel aus einer alternierenden Abfolge von β -Strängen und α -Helices. Die acht β -Stränge bilden ein paralleles Faltblatt aus, das sich auf sich selbst zurückkrümmt. Die Seitenketten der aufeinander folgenden Aminosäuren der β -Stränge sind abwechselnd in das Innere des Proteins gerichtet, wo sie einen hydrophoben Kern bilden, und in Richtung der α -Helices, die ihrerseits die äußere Hülle eines Fässchens („barrel“) bilden. Die Interaktionen zwischen den β -Strängen und den α -Helices werden in erster Linie von den Aminosäure Val, Ile und Leu vermittelt, die hydrophobe, verzweigte Seitenketten besitzen (Branden und Tooze, 1999).

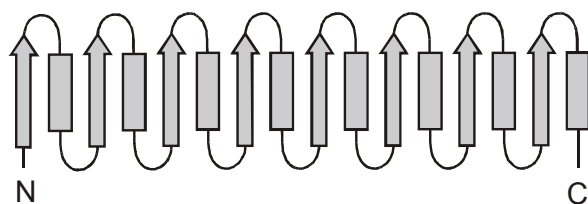


Abbildung 1.3:
Das topologische Diagramm
eines $(\beta\alpha)_8$ -barrels

Sämtliche $(\beta\alpha)_8$ -barrels besitzen einen polaren Aufbau: Das aktive Zentrum besteht bei allen bekannten Vertretern dieser Gruppe aus Aminosäureresten der β -Stränge und/oder der Schleifen auf der carboxyterminalen Seite der β -Stränge. Die Schleifen auf der entgegengesetzten Seite des $(\beta\alpha)_8$ -barrels beeinflussen dagegen vor allem die Stabilität der Struktur (Farber und Petsko, 1990; Lang *et al.*, 2000).

Das $(\beta\alpha)_8$ -Faltungsmotiv hat sich als sehr flexibel gegenüber Veränderungen seines Grundmusters erwiesen: Neben zusätzlichen Sekundärstrukturelementen in den Schleifen auf der carboxyterminalen Seite der β -Stränge fand sich z. B. ein fehlender β -Strang (Babbitt *et al.*, 1996) oder eine weitere, vollständige Domäne zwischen einem β -Strang und einer α -Helix (Hwang *et al.*, 1997); darüber hinaus zeigte sich, dass Circularpermutationen Stabilität und Funktion der Phosphoribosylanthranilat-Isomerase, ebenfalls ein $(\beta\alpha)_8$ -barrel, nicht beeinträchtigen (Luger *et al.*, 1989). Außerdem konnte die Funktion von $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Enzymen durch den Austausch einzelner bis weniger Aminosäuren verändert werden, so konnte z. B. in das HisA-Protein aus *Thermotoga maritima* eine TrpF-Aktivität eingeführt werden (Jürgens *et al.*, 2000). Ebenso war es über einen einzelnen Aminosäureaustausch möglich, eine N-Acetylneuraminat-Lyase mit Dihydrodipicolinat-Synthase-Aktivität zu schaffen (Joerger *et al.*, 2003). Während sich in den beiden ersten Fällen nur die Substratspezifität änderte, konnte darüber hinaus die L-Ala-D/L-Glu-Epimerase aus *Escherichia coli* bzw. das *muconate lactonizing enzyme II* aus *Pseudomonas sp.* dahingehend verändert werden, dass beide Enzyme eine O-Succinylbenzoat-Synthase-Aktivität aufwiesen und somit in der Lage waren, eine Reaktion mit einem neuen Mechanismus zu katalysieren (Schmidt *et al.*, 2003). Diese funktionelle Plastizität macht das $(\beta\alpha)_8$ -Faltungsmotiv zu einem interessanten Kandidaten für das *protein engineering* (Gerlt und Raushel, 2003).

1.3 Thermostabile Proteine mit enzymatischer Aktivität

Im Zuge der Evolution haben sich Organismen an die verschiedensten Umweltbedingungen angepasst, darunter auch an hohe Temperaturen, wie sie beispielsweise in heißen Quellen, Solfatarenfeldern oder in marinen Biotopen wie unterseeischen Vulkanen oder den *black smokers* der Tiefsee vorkommen.

Mikroorganismen, die unter solch hohen Temperaturen leben, werden Thermophile (55-80°C) bzw. Hyperthermophile (>80°C) genannt. Zu ihnen gehören vor allem Archaeen, aber auch einige Bakterien wie z. B. *Thermotoga maritima* (Hough und Danson, 1999; Huber, 2000).

Die Enzyme von mesophilen Organismen beginnen bei Temperaturen oberhalb des Wachstumsoptimums zu denaturieren. Bei höheren Temperaturen können Proteine darüber hinaus durch Spaltung von Disulfidbrücken und Desaminierung von Glutamin- und Asparagin-Seitenketten kovalent modifiziert werden (Adams *et al.*, 1995). Lebewesen, die in entsprechenden Habitaten existieren, benötigen deshalb Enzyme, die eine hohe Stabilität besitzen, um den Anforderungen ihrer Umwelt zu entsprechen (Hough und

Danson, 1999). Faktoren, die eine solche erhöhte Stabilität vermitteln, sind unter anderem zusätzliche Salzbrücken, Verringerung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen, ausgeprägte hydrophobe Interaktionen zwischen den Untereinheiten, Reduktion der *loop*-Längen und verkürzte Amino- und Carboxytermini. Labile Aminosäuren können ersetzt oder im hydrophoben Kern verborgen werden (Jaenicke und Böhm, 1998, Demirjian *et al.*, 2001).

Enzyme werden einerseits durch eine Packung aus hydrophoben Aminosäuren in der Kernregion und hydrophilen Resten, die in den lösungsmittel exponierten Bereichen des Proteins lokalisiert sind, stabilisiert, andererseits kann es für die Funktion eines Enzyms notwendig sein, dass polare oder geladene Gruppen vom Lösungsmittel abgeschirmt werden bzw. dass hydrophobe Gruppen in Kontakt mit dem Lösungsmittel gelangen. Ein Enzym muss also auf ausreichend hohe Stabilität hin evolviert worden sein, wobei seine strukturelle Integrität sowohl durch stabilisierende als auch destabilisierende Faktoren bestimmt wird. So konnte z. B. gezeigt werden, dass ein Austausch von Resten, die für die Katalyse bzw. die Ligandenbindung notwendig sind, die Stabilität des T₄-Lysozyms erhöht, gleichzeitig aber die Aktivität des Enzyms verringert (Shoichet *et al.*, 1995). Es besteht demnach die Möglichkeit, dass eine neue enzymatische Aktivität Aminosäurereste erfordern kann, die sich nachteilig auf die Stabilität des Proteins auswirken. Möchte man ein Enzym beispielsweise im Zuge von *protein engineering* modifizieren, könnte es deshalb von Vorteil sein, dazu ein Protein aus einem thermophilen Organismus zu wählen, da dieses von Natur aus stabiler ist.

Wie in Abschnitt 1.1.1 besprochen, ist aber die Komplementarität von Enzym und Übergangszustand nicht die einzige Basis für katalytische Aktivität und es ist möglich, dass weitere Katalysemechanismen Konformationsänderungen verlangen. Es gibt Hinweise, dass die höhere katalytische Effizienz bei niedrigeren Temperaturen, die Enzyme aus mesophilen Organismen auszeichnet, durch eine höhere Flexibilität des Proteingerüsts verursacht wird (z. B. Lönn *et al.*, 2002); ein Enzym aus einem thermophilen Organismus könnte demnach aufgrund seiner potentiell größeren Starrheit das Einführen einer neuen katalytischen Eigenschaft erschweren, wenn für diese Konformationsänderungen notwendig werden. Es besteht demgegenüber aber auch die Möglichkeit, dass Enzyme aus thermophilen Organismen nur deshalb bei niedrigeren Temperaturen eine geringere Aktivität aufweisen, da sie für Temperaturbereiche optimiert wurden, in denen Reaktionen von sich aus schneller ablaufen, weswegen keine hohen Beschleunigungen der Reaktionen notwendig werden.

1.4 tHisF: ein thermostabiles ($\beta\alpha$)₈-barrel-Protein

In diesem Projekt soll das ($\beta\alpha$)₈-barrel-Faltungsmotiv als Grundgerüst für eine phagenpräsentierte Bibliothek dienen. Ein geeignetes Protein muss dazu einige Voraussetzungen erfüllen: Es sollte aus einem thermophilen Organismus stammen, um eine möglichst hohe Faltungsstabilität zu besitzen. Für ein erfolgreiches *phage display*

(siehe Abschnitt 1.5) ist es notwendig, dass das Protein membrangängig ist. Darüber hinaus sollte es bei physiologischen Konzentrationen monomer sein und keine Cysteine besitzen, um zu verhindern, dass die Phagen polyvalent binden, beziehungsweise dass Faltung und Sekretion durch Di- oder Multimerbildung behindert werden. Um Aminosäuren auszuwählen, die mit großer Wahrscheinlichkeit an der Ligandenbindung beteiligt sind, muss die Struktur aufgeklärt sein. Ein einzelner Tryptophanrest zur Analyse der Faltungsstabilität und ein etablierter Aktivitätsassay erleichtern den proteinchemischen Umgang. Und nicht zuletzt muss die DNA-Sequenz verfügbar sein und sich das Gen heterolog in *E. coli* exprimieren lassen.

Ein $(\beta\alpha)_8$ -barrel mit den entsprechenden Eigenschaften ist das tHisF, ein Teil der heterodimeren Imidazolglyzerinphosphat-Synthase (ImGP-Synthase) aus dem Histidin-Biosyntheseweg des hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima*. Es handelt sich bei diesem Protein um ein irreguläres $(\beta\alpha)_8$ -barrel, das in einigen Schleifen, die carboxyterminal zu den β -Strängen liegen, zusätzliche Strukturelemente besitzt (siehe Abbildung 1.4).

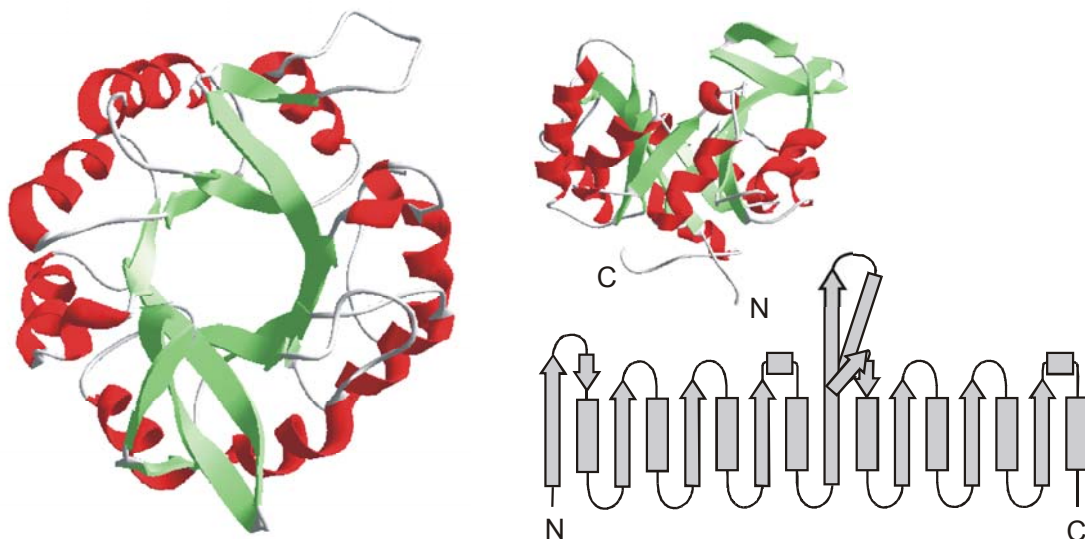


Abbildung 1.4: Struktur und Topologie der Synthetase-Untereinheit der Imidazol-Glyzerinphosphat-Synthetase (tHisF) aus *Thermotoga maritima*.

Rechte Seite: Aufsicht auf das aktive Zentrum des tHisF. Linke Seite, oben: seitliche Ansicht des tHisF; die carboxyterminalen Enden der β -Stränge, die das aktive Zentrum bilden, zeigen nach oben. Linke Seite, unten: schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente des tHisF.

(Strukturdaten: Lang *et al.*, 2000; bearbeitet mit dem Swiss-PdbViewer)

1.5 Evolutes *protein engineering*

Obwohl die Kenntnisse über Funktionsweise und Struktur von Proteinen stetig wachsen, sind Versuche, eine gewünschte Funktion über einen gezielten Austausch von

Aminosäuren zu erhalten, bis jetzt größtenteils gescheitert – nicht zuletzt deshalb, weil schon geringfügige Modifikationen der Aminosäuresequenz große strukturelle Änderungen hervorrufen können. Ein neuer Ansatz ist das evolutive Proteindesign, das sich an das darwinische Paradigma der Evolution als Resultat von Mutation, Selektion und nachfolgender Amplifikation anlehnt. Um den Prozess an Labormaßstäbe anzupassen, wird das Protein jedoch nicht über lange Zeiträume hinweg langsam verändert, sondern eine Ausgangsbibliothek des Proteins erstellt und diese nach Varianten durchmustert, die die gewünschten Eigenschaften besitzen.

Im Gegensatz zu *screening*-Verfahren, mittels derer einzelne Klone untersucht werden, erlaubt eine genetische Selektion, extrem umfangreiche Bibliotheken mit mehr als 10^{10} zu durchmustern – und je größer eine Bibliothek ist, desto wahrscheinlicher ist es, in ihr eine geeignete Variante zu finden.

Bedingung sowohl für ein *screening* als auch für eine Selektion ist die Kopplung des Genotypes an den – im Falle des letzteren selektierbaren – Phänotyp. Eine Methode, die dies gewährleistet, ist das *phage display*, dessen Grundlage 1985 entwickelt wurde (Smith, 1985). Dabei wird das zu präsentierende Protein auf genetischer Ebene an ein Hüllprotein eines Phagen fusioniert. Der Phage präsentiert das Protein auf seiner Oberfläche und trägt gleichzeitig die zugehörige genetische Information. Es existieren mittlerweile diverse *phage display*-Systeme, das am häufigsten angewandte und am besten erprobte Verfahren ist jedoch die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von filamentösen Phagen der Ff-Klasse wie f1, Fd oder M13.

Während des *assembling*-Prozesses von filamentösen Phagen wird der neu entstehende Phage durch die Bakterienhülle geschleust, ohne sie zu lysieren, wobei so lange Hüllproteine an seine DNA angelagert werden, bis ihr Ende erreicht ist. Dadurch wird es möglich, zusätzliche DNA-Elemente in das Phagenom einzuführen bzw. Plasmide, die größer sind als das ursprüngliche Genom, in dem Phagen zu verpacken. Darüber hinaus genügt es für die meisten Anwendungen, die Phagen aus dem Medium zu fällen, wodurch zeitintensive Reinigungsschritte entfallen. In dieser Arbeit wurde deshalb das $(\beta\alpha)_8$ -*barrel*-Protein tHisF an das Hüllprotein gIIIp des Phagen M13 fusioniert und dementsprechend auf dessen Oberfläche präsentiert.

1.6 Selektion enzymatischer Aktivität

Die Methoden, um mittels evolutivem *protein engineering* bestehende Enzyme zu verbessern oder gänzlich neue zu schaffen, unterscheiden sich in Hinblick auf die gewünschte Funktion und die evolutive Distanz, die überwunden werden muss.

Es existieren zwei Möglichkeiten, auf Aktivität eines Enzyms zu selektieren: die direkte Selektion, beispielsweise *in vivo* oder in künstlichen Kompartimenten (Griffiths und Tawfik; 2003), oder eine indirekte Selektion, bei der nicht auf die Aktivität des Enzyms sondern auf seine Fähigkeit, an ein Übergangszustandsanalogon zu binden, selektiert

wird. Während die Selektion *in vivo* auf Funktionen beschränkt ist, die für die Zelle notwendig sind (Komplementierung einer Funktion in einem defizienten Stamm, Bereitstellen einer essentiellen Substanz, Neutralisieren einer toxischen Verbindung), lassen sich mittels indirekter Selektion prinzipiell beliebige katalytische Eigenschaften in ein Protein einführen. Voraussetzung ist jedoch, dass ein Übergangszustandsanalogon synthetisch zugänglich ist, wozu zuallererst eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus der entsprechenden Reaktion notwendig ist, um dessen Struktur zu ermitteln.

1.7 Synthese von Genbibliotheken

Um komplexe Genrepertoires herzustellen, stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die z. B. auf Polymerase-Kettenreaktionen mit Polymerasen basieren, die, wie beispielsweise die Taq-Polymerase, kein *proofreading* besitzen. Ebenso können Mutatorstämme verwendet werden, die Mutationen während der Replikation zulassen. Das Gen kann aber auch z. B. durch DNase I fragmentiert und in einer nachfolgenden PCR ohne Primer wieder zusammengefügt werden. Diese Methode kann auch dazu genutzt werden, um Gene verwandter Proteine (*family shuffling*) oder eine bereits bestehende Bibliothek zu durchmischen (Patten *et al.*, 1997; Cramer *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999).

Mit Hilfe dieser Verfahren erhält man aber allenfalls Punktmutationen, die zufällig über das Gen verstreut sind; selbst bei sehr hohen Mutationsraten wäre man damit nicht in der Lage, alle möglichen Kombinationen von Aminosäuren zu erhalten. Schon bei 8 vollständig randomisierten Positionen ergeben sich $2,56 \times 10^{10}$ (20^8) mögliche Kombinationen – die Grenze der Handhabbarkeit wäre bald erreicht. Es ist deshalb wünschenswert, nur die Positionen zu randomisieren, die voraussichtlich einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben. Eine solche Möglichkeit bieten synthetische Bibliotheken, bei denen Zufallsmutationen über randomisierte Oligonukleotide an spezifischen Stellen in das Gen eingeführt werden. Werden solche Genrepertoires jedoch auf Basis einzelner Nukleotide synthetisiert, wird deren Größe durch einen weiteren Faktor limitiert: die Degeneration des genetischen Codes. Mit Ausnahme von Tryptophan und Methionin existieren für alle Aminosäuren mehrere Codone, so dass die Bibliothek hinsichtlich bestimmter Aminosäuren verzerrt wird. Zusätzlich führen die drei ebenfalls vorkommenden Stop-Codone zu vorzeitigen Kettenabbrüchen.

In diesem Projekt wurden deshalb chemisch vorgefertigte Trinukleotide zur Synthese der Oligonukleotide eingesetzt. Dadurch ist es möglich Trinukleotidmischungen, die den 20 Codonen der natürlich vorkommenden Aminosäuren entsprechen oder auch Subsätze, die eine gewünschte Zusammensetzung von Trinukleotiden enthalten, an den zu randomisierenden Stellen zu verwenden (erstmalig realisiert: Virnekäs *et al.*, 1994). Sowohl redundante Codone als auch die Stop-Codone können vermieden werden, so

dass die Komplexität frei wählbar wird und die maximale Größe der Bibliothek optimal ausgenutzt werden kann.

1.8 Zielsetzung des Promotionsprojektes

In diesem Promotionsprojekt sollte der Faltungstyp des $(\beta\alpha)_8$ -barrels als strukturelles Grundgerüst zur Konstruktion polypeptidischer Katalysatoren für beliebige Reaktionen zugänglich gemacht werden. Dazu sollte auf der Basis des tHisF-Proteins aus dem thermophilen Organismus *Thermotoga maritima* eine Genbibliothek partiell randomisierter *thisF*-Varianten synthetisiert und an das Gen eines Hüllproteins des M13-Phagen fusioniert werden. Nach Präsentation auf der Phagenoberfläche sollten die entsprechenden tHisF-Varianten, die in der Lage waren ein Übergangszustandsanalogon einer abiotischen Reaktion zu binden, über *phage display* selektiert und auf ihre katalytischen Eigenschaften hin getestet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 α (Hanahan, 1983)

[F⁻, *endA1*, *hsdR17* ($r_K^- m_K^-$), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA* (Nal^r), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, Φ 80*lacZ* Δ M15]

WK6 (Quelle: W. Kramer)

[Δ (*lac-pro*), *galE*, *strA*, *naI*, F' *lacI^q*, *lacZ* Δ M15, *proA⁺B⁺*]

BMH71-18 (Quelle: B. Müller-Hill)

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

TG1

[*supE thi-1* Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5 ($r_K^- m_K^-$) [F' *traD36 proAB lacI^qZ* Δ M15]

HS 3018 (Shuman, 1982)

[MC 4100, *malTc-1*(F⁻, (*argF-lac*)U169, *araD139*, *rpsL150*, *ptsF25*, *flbB5301*, *rbsR*, *deoC*, *relA1*, *malTc-1*, Δ *malE444*]

2.1.2 Bakteriophagen

M13KO7-Helferphage (Vieira und Messing, 1987)

M13KO7 ist ein 8,7 kb großes Derivat des M13-Phagen, das sämtliche für die Phagenproduktion wichtigen Proteine liefert.

Der M13KO7-Phage trägt im gII die M40I-Mutation und besitzt, im M13-Replikationsursprung inseriert, sowohl einen p15A-Replikationsursprung, als auch das Kanamycin Resistenzgen des Transposons Tn903. Aufgrund dieser Modifikationen kann sich der Helferphage unabhängig vom gIIp replizieren, so dass ausreichende Mengen an genomischer DNA für die Synthese von Phagenproteinen vorhanden sind. Da das mutierte gIIp den veränderten Replikationsursprung aber nur schlecht erkennen kann, interagiert es bevorzugt mit dem Replikationsursprung des Plasmids, so dass vor allem einzelsträngige Plasmid- statt Phagen-DNA synthetisiert und in die Phagenpartikel verpackt wird. Das Kanamycin Resistenzgen vermittelt den infizierten Wirtszellen zusätzlich eine Resistenz bis mindestens 70 μ g/ml Kanamycin.

2.1.3 Plasmide

pET-11c-*thisF*_(C9A)

Der pET-11c-*thisF*_(C9A)-Vektor ist ein Derivat aus der pET11-Reihe der Firma Novagen, dessen Klonierungs-/Expressionsregion von der T7-Polymerase transkribiert wird. Das *thisF*(C9A)-Insert wurde ausgehend vom wildtyp-*thisF* aus *Thermotoga maritima* konstruiert und über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Bam*HI in den Vektor eingefügt (Arbeitsgruppe Sterner, Institut für Biochemie, Universität Köln).

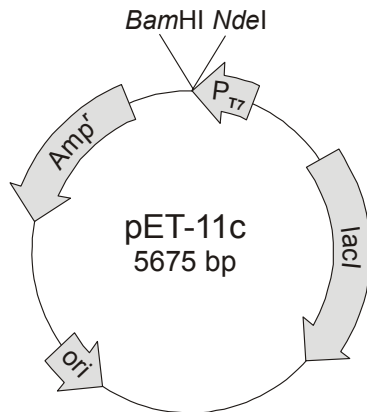


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Vektors pET-11c der Firma Novagen. Das von Silke Beismann-Driemeyer (Arbeitsgruppe Sterner, Institut für Biochemie, Universität Köln) zur Verfügung gestellte Vektorkonstrukt trug, das über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nde*I einklonierte *thisF*(C9A)-Gen, das als Grundlage für die in diesem Projekt verwendeten *hisF*-Varianten diente. Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an.

Amp^r: β -Lactamase Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin; ori: Replikationsursprung; lacI, codiert für den Lac-Repressor

pCANTAB 5 E

Das Phagemid pCANTAB 5 E von Pharmacia wurde dahingehend konstruiert, dass ein Gen für ein zu präsentierendes Protein zwischen die gIII-Signalsequenz und zwei Genen, die für einen Immunotag (*E-tag*) und das gIII-Hüllprotein kodieren, kloniert werden kann. Durch ein Amber-Stop-Codon zwischen dem Gen für den E-tag und dem gIII wird in einem *E. coli* Amber-Suppressor-Stamm wie z. B. TG1 ein Fusionsprotein produziert, das auf einem M13-Phagen präsentiert werden kann. In nicht-Suppressor-Stämmen wie WK6 reichert sich das rekombinante Protein ohne gIIIp-Fusion im Periplasma an.

Die Expression der *hisF-gIII*-Genfusion wird im pCANTAB 5E-Vektor durch einen induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert, der wiederum durch den *lac*-Repressor reguliert wird. Dieser wird vom *lacI^q*-Gen kodiert, das in *E. coli*-Stämmen wie z. B. TG1 vorhanden ist. Der *lac*-Promotor besitzt eine relativ hohe Hintergrundaktivität, die für die Produktion von ausreichenden Mengen an Fusionsprotein für das *phage display* genügt.

Für eine Infektion ist es dagegen notwendig, die Expression des gIII-Proteins zu unterbinden, da dieses nicht nur toxisch ist, sondern auch eine Infektion mit M13-Phagen behindert. Deshalb wird dem Medium Glucose zugesetzt, wodurch die Hintergrundaktivität durch die Katabolit-Repression unterdrückt wird. Sollen große Mengen an periplasmatischen Protein produziert werden, kann die Expression durch IPTG induziert werden (2.2.3.2).

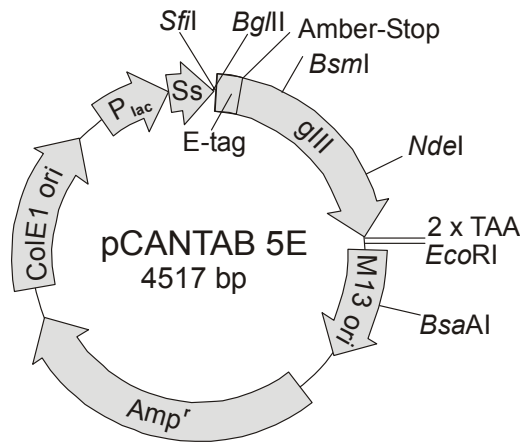


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des für das *phage display* verwendeten auf dem pCANTAB 5E-Vektor der Firma basierenden Plasmid-Derivates. Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Vektor dienen in diesem Konstrukt die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *BgIII* zum Einfügen der entsprechenden Gene.

Pfeilrichtungen geben die funktionellen Orientierungen der genetischen Elemente an.

Ss: gIIIp Signalsequenz: verantwortlich für Translokation des Proteins ins Periplasma; pIII: Gen für das Phagenhüllprotein gIIIp; P_{lac}: Promotor/Operator Region; E-tag: Gen für das Anti-E-tag-Epitop; Amp^r: β-Lactamase Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin; M13 ori: Replikationsursprung des filamentösen Phagen M13; colE1: Replikationsursprung;

pCANTAB 5 E-Varianten für Klonierungen und Phagenproduktion

Für Klonierungen und Phagenproduktion wurden folgende pCANTAB 5 E-Varianten konstruiert und eingesetzt:

pCANTAB- <i>thisF</i> _(C9A)	pCANTAB 5 E mit <i>thisF</i> (C9A) aus <i>Thermotoga maritima</i>
pCANTAB- <i>thisF</i> _(of frame)	pCANTAB 5 E mit einem <i>thisF</i> (C9A)-Gen, das nicht <i>in frame</i> an das gIII fusioniert ist (Variante zur Konstruktion von pCANTAB- <i>hisF</i> _(Rep.))
pCANTAB- <i>hisF</i> _(Rep.)	Mit dem Tox-System kompatible Vektorvariante
pCANTAB- <i>thisF</i> _(Spacer)	pCANTAB 5 E-Variante, die einen zusätzlichen 5-Aminosäure-Spacer zwischen Signalsequenz und <i>thisF</i> trägt
pCANTAB- <i>hisF</i> _(Synth.)	pCANTAB 5 E-Variante mit einem aus synthetischen Oligonukleotiden konstruierten <i>hisF</i> -Gen
pCANTAB- <i>hisF</i> _(Del.)	pCANTAB 5 E-Variante mit einem aus synthetischen Oligonukleotiden konstruierten <i>hisF</i> -Gen, das an den zu randomisierenden Stellen Codon-Deletionen trägt
pCANTAB- <i>hisF</i> _(Bib.)	pCANTAB 5 E-Variante mit einer aus synthetischen Oligonukleotiden konstruierten <i>hisF</i> -Bibliothek
pCANTAB- <i>hisJ</i> _(Rep.)	pCANTAB 5 E-Variante mit einem <i>hisJ</i> -Gen
pCANTAB-2 x <i>SfiI</i>	pCANTAB 5 E-Variante, die zwei asymmetrische <i>SfiI</i> -Restriktionsschnittstellen zur Klonierung des Inserts besitzt.
pCANTAB- 2 x <i>SfiI</i> - <i>hisF</i> _(Bibliothek)	pCANTAB 5 E-Variante, in die eine synthetische <i>hisF</i> -Bibliothek über zwei asymmetrische <i>SfiI</i> -Restriktionsschnittstellen eingefügt wurde

pASK75 und pASK100

Die pASK-Derivate basieren auf dem ampicillinresistenten pASK75-Vektor (Skerra, 1994), der neben einem mit Tetracyclin regulierbaren tetA Promotor/Operator zwei Ribosomenbindestellen besitzt, um eine effiziente Initiation der Transkription zu gewährleisten. Eine dem Insert vorgeschaltete *ompA*-Signalsequenz vermittelt die Translokation des produzierten Proteins in das Periplasma. In den Varianten der pASK100-Vektoren ist das β -Laktamasegen zur Ampicillinresistenz zerstört, statt ihrer besitzen die Vektoren ein Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen, das eine Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt. Das gewünschte Insert lässt sich in frame an ein zweites, funktionelles β -Laktamasegen klonieren.

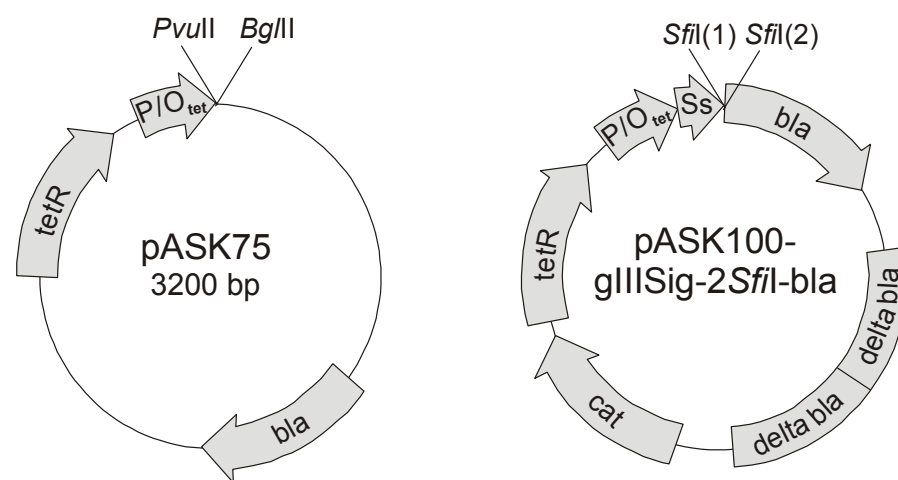


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der pASK-Vektorderivate pASK75 und pASK100, die zur Aufreinigung des periplasmatischen HisFs bzw. zur Selektion der Bibliothek auf Varianten ohne Rasterschubmutationen dienen. Der ursprüngliche pASK100 wurde in diesem Projekt dahingehend modifiziert, dass er eine gIIIp-Signalsequenz und zwei asymmetrische *SfiI*-Restriktionsschnittstellen trägt.

Ss: gIII Signalsequenz: verantwortlich für Translokation des Proteins ins Periplasma; P/O: Promotor/Operator Region; bla: β -Lactamase Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin; cat: Chloramphenicol-Transferase-Gen: vermittelt Resistenz gegenüber Chloramphenicol;

pASK-Vektoren für Klonierungen, Aufreinigung des periplasmatischen HisF und Selektion der Bibliothek auf Varianten ohne Rasterschubmutationen

Für Klonierungen, die Aufreinigung von periplasmatischem HisF über IMAC und Selektion der Bibliothek auf Varianten ohne Rasterschubmutationen wurden folgende pASK-Varianten konstruiert und eingesetzt:

pASK75-hisF_(C9A)-sen-6H

pASK-Variante, die für ein translokierbares tHisF(C9A) codiert, an das ein Sendai-Epitop und ein carboxyterminaler Hexa-Histidintag zur Proteinreinigung über IMAC fusioniert sind.

pASK75-hisJ-sen-6H	Ausgangsvektor zur Konstruktion der pASK-hisF _(C9A) -sen-6H-Variante
pASK100-2 x <i>Sfi</i> I-hisJ-bla	Ausgangsvektor zur Konstruktion der pASK-2 x <i>Sfi</i> I-hisF _(Bibliothek) -bla-Varianten mit einer gIII-Signalsequenz und zwei assymetrische <i>Sfi</i> I-Restriktionsschnittstellen.

2.1.4 Oligodesoxyribonukleotide für Polymerase-Kettenreaktionen

2.1.4.1 Oligonukleotide als Primer zur Amplifikation

JWASKHisFdown	5'-GCCAGCC <u>CAGCTGGGCTCGCT</u> AAAAGAATAATCGCG-3'
JWASKHisFSENDup	5'-GCGCTG <u>AGATCTGGA</u> AGAATCGTATGGTTCAATGTC-3'
JWToxhisFfdown	5'-GCCAGCC <u>AGGCCTCAGCTGCT</u> CGCTAAAAGAATAATCGCG-3'
JWToxhisFup	5'-GCGCGTACA <u>AAGCTTAGATCT</u> CAACCCCTCCAGTCTCACG-3'
SAS-CAN-F-down	5'-CTCGTGGCC <u>CAGCCGGCCATGGCC</u> CTCGCTAAAAGAATAATC-3'
SAS-CAN-F-up(2)	5'-TACAG <u>AGATCTCCCA</u> ACCCCTCCAGTCTCACG-3'
CAN-F-Umb	5'-CAGCTGGCC <u>CAGCCGGCCATGGCC</u> GCTGAGACTGTTGAA <u>ACCGGTCT</u> CGCTAAAAGAATAATCGCG-3'
CAN-F-aF-down	5'-ACCTTAGATCTGGTGC <u>CCGGTGCCG</u> TATCCG-3'
CAN-F-aF-up	5'-GCCTGTAGCATTCCACAGACA-3'
Can-F-spacer	5'-GACCAGGCC <u>CAGCCGGCCATGGCTGCT</u> GAAACTACCGTCTCGCTAAAAGAATAATCGCG-3'
VB01	5'-GTCAGCATGCG <u>GCCAGCCGG</u> -3'
VB38	5'-CGATAGGATCAGATCTCAA <u>CCC</u> -3'
hisF-SfiI(2)	5'GTATGTCCAGATCTGGCCCCGAGGCCGACAAACCCCTCCAGTCTTACATTCAC-3'
PCR-1-Pho	5'-Pho-GTCAGCATGCGGCCAGCCGG-3'

2.1.4.2 Oligonukleotide als Primer für Nukleotidsequenzanalyse

für den pCANTAB-Vektor:

cantupABI	5'-CAACTTTCAACAGTCTATGC-3'
cantdownABI	5'-TTACGCCAAGCTTTGGAGCC-3'
cantosIR	5'-IRD800-CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC-3'
cantusIR	5'-IRD800-AGTCTATGCGGCACGCG-3'
hisF-m-ABI	5'-ACATTCCTTGAAGCCTTCCT-3'

für das pASK100-Vektorderivat:

BLA-rechts-ABI	5'-GTTGAGATCCAGTTCGAT G-3'
PAMA-IR	5'-IRD800-CGCAATTCCTTTAGT TG-3'

2.1.4.3 Oligonukleotide als Primer für PCR-Screens

pCANTAB/*hisF*-spezifisch

shuffel-up	5'-ACAGCCCTCATAGTTAGCGTA-3'
PCR-03	5'-GGCACTAACTTTGAGAACCTGCGTGACAGCGGCGATCCT-3'

pASK/*hisF*-spezifisch

ASK-SS-ABI 5'-GTTATTTTACCACTCCCTATCAG-3'
 36-kurz 5'-CGCAGCATCAGCACCTGCCAGAAATG-3'

2.1.4.4 Oligonukleotide für die Synthese des *hisF*-Gens

st01-AgeI 5'-GTCAGCATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCTGAAACTACCGGTCTC-3'
 st02 5'-Pho-GCTAAAAGAATAATCGCTGCTCTCGATGTGAAGGATGGTCGTGTGGTGAAG-3'
 st03 5'-Pho-GGCACTAACTTTGAGAACCTGCGTGACAGCGCGATCCT-3'
 st04 5'-Pho-GTGGAACTGGGTAAATTCTACTCTGAGATTG-3'
 st05 5'-Pho-GTATAGATGAACTCGTATTCTGGATATCACTGCGTCTG-3'
 st06 5'-Pho-TTGAGAAGAGGAAGACTATGCTGGAAGTGGTTGAGAAGGTG-3'
 st07 5'-Pho-GCCGAGCAGATTGATATTCCGTTCACTGTTGGTG-3'
 st08 5'-Pho-GTGGTATCCATGACTTTGAGACCCGCTCTGAACTGATTCTG-3'
 st09 5'-Pho-CGTGGTGTGACAAGGTGTCTATTGCTGCTGCTGTG-3'
 st10 5'-Pho-GAAAATCCTTCTCTGATTACACAGATCGCTCAAACCTTCGG-3'
 st11 5'-Pho-GAGTCAGGCTGTGTTGTGGCGATAGATGCTAAGAGAGTG-3'
 st12 5'-Pho-GATGGAGAGTTTATGGTATCACCTACAGCGGTAAGAAGAACACGG-3'
 st13 5'-Pho-GTATCCTGCTTAGAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAGAAGAGA-3'
 st14 5'-Pho-GGAGCAGGAGAGATTCTGCTCACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATC
 GGGTTATGATACT-3'
 st15 5'-Pho-GAGATGATTCGTTTCGTGCGTCCACTAACCACA-3'
 st16 5'-Pho-CTTCCGATCATTGCTTCCGGTGGTGGGTAAGATGGAACAT-3'
 st17 5'-Pho-TTCCTTGAGGCATTTCTGGCA-3'
 st18 5'-Pho-GGTGCTGATGCTGCGCTTGCAGCGTCTGTCTTCCACTTTAGA-3'
 st19 5'-Pho-GAGATTGATGTTAGAGAAGTAAAGAGTATCTGAAGAAGCAC-3'
 st20 5'-Pho-GGAGTGAATGTAAGACTGGAGGGTTGAGATCTGATCCTATCG-3'
 st21-AgeI 5'-Pho-AGCGATTATCTTTTAGCGAGACCGGTAGTTTCAGCGGCCATGGCCGGCTGG
 GCCGCATGCTGAC-3'
 st22 5'-Pho-GGTTCTCAAAGTTAGTGCCCTTACCACACGACCATCCCTCAC-3'
 st23 5'-Pho-ATTTACCCAGTTCACAGGATCGCCGCTGTCACGCA-3'
 st24 5'-Pho-AAATACGAGTTCATCTATACCAATCTCAGAGTAGA-3'
 st25 5'-Pho-TCCAGCATAGTCTTCTCTTCTCAACAGACGAGTGATATCCAG-3'
 st26 5'-Pho-GAATATCAATCTGCTCGGCCACCTTCTCAACCACT-3'
 st27 5'-Pho-GCGGTCTCAAAGTCATGGATACCACCACCAACAGTGAACG-3'
 st28 5'-Pho-GACACCTTGTGACAGCACCACGCAGAATCAGTTCAGAG-3'
 st29 5'-Pho-TGTAATCAGAGAAGGATTTTCCACAGCAGCAGCAATA-3'
 st30 5'-Pho-GCCACAACAACAGCCTGACTCCGAAGTTTGTAGCGATCTG-3'
 st31 5'-Pho-GTGAATACCATAAACTCTCCATCCACTCTTTAGCATCTA TC-3'
 st32 5'-Pho-TCTTAAGCAGGATACCCGTGTTCTTCTTACCCTGTAG-3'
 st33 5'-Pho-AATCTCTCTGCTCCTCTCTTCTTCTACTTCAACCCAG-3'
 st34 5'-Pho-GAAACGAATCATCTCAGTATCATAACCCGA-3'
 st35 5'-Pho-AGCAATGATCGGAAGTGTGGTTAGTGGACGCAC-3'
 st36 5'-Pho-CGCAGCATCAGCACCTGCCAGAAATGCCTCAAGGAAATGTTCCATCTTACC-3'
 st37 5'-Pho-TACTCTTCAGTTCTTAACATCAATCTCTTAAAGTGGAAGACAGACGCCGC
 st38 5'-CGATAGGATCAGATCTCAAACCTCCAGTCTTACATCACTCCGTGCTTCTCAGA-3'

2.1.4.5 randomisierte Oligonukleotid für die Synthese der Bibliothek

st02-mut 5'-Pho-GCTAAAAGAATAATCGCTXXXCTCXXXGTGAAGGATGGTCGTGTGGTGAAG-3'
 st14-mut 5'-Pho-GGAGCAGGAGAGATTXXXCTCXXXAGTXXXGACAGAGACGGCACAXXXTCGGGTT
 ATGATACT-3'
 st16-mut 5'-Pho-CTTCCGATCATTGCTXXXGGTGGTXXXGGTAAGATGGAACAT-3'
 st18-mut 5'-Pho-GGTGCTGATGCTGCGXXXGCGGCTGTCTTCCACTT-3'

2.1.4.6 Oligonukleotide für die Ligation auf der Einzelstrang-DNA

PCR-1-AgeI-Pho 5'-Pho-GTCAGCATGCGGCCAGCCGG-3'
 PCR-13-Pho-anti 5'-Pho-TCTCTTCTACTTCAACCAC-3'
 PCR-38-Bio 5'-Bio-CGATAGGATCAGATCTCAAACCC-3'

2.1.4.7 Deletionsoligonukleotide für die hisF-Del-Variante

02-Del-Pho	5'-Pho-GCTAAAAGAATAATCGCTCTCGTGAAGGATGGTCGTGTGGTGAAG-3'
14-Del-Pho	5'-Pho-GGAGCAGGAGAGATTCTCAGTGACAGAGACGGCACATCGGG TTATGATACT-3'
16-Del-Pho	5'-Pho-CTTCCGATCATTGCTGGTGGTGGTAAGATGGAACAT-3'
18-Del-Pho	5'-Pho-GGTGCTGATGCTGCGGCGGCGTCTGTCTTCCACTTTAGA-3'

Synthese der randomisierten Oligonukleotide: Purimex

Synthese der restlichen Oligonukleotide: Metabion/Sigma-Ark

2.1.5 Enzyme, Antikörper und Proteine

2.1.5.1 Antikörper

Amersham, Freiburg	anti-E-tag-Antikörper
Sigma Deisenhofen	<i>anti-mouse IgG-alkalische Phosphatase conjugate developed in goat</i>
	<i>anti-rabbit IgG-alkalische Phosphatase conjugate developed in goat</i>
nanoTools, Teningen	polyklonaler anti-HisF-Antikörper, Kaninchenserum

2.1.5.2 Enzyme und Proteine

Boehringer Mannheim	Ribonuklease A (RNase A)
MBI-Fermentas, Vilnius, Litauen	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, <i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> , Rinderserumalbumin (BSA)
New England Biolabs, Bad Schwalbach	Restriktionsendonukleasen, Taq-Ligase, Vent- Polymerase™
Novagen, Madison, USA	Strandase™
Promega, Madison, USA	Tfl-DNA-Polymerase™
Roche Diagnostics, Mannheim	Agarase, Taq-Polymerase
Sigma, Deisenhofen	Esterase (<i>from porcine liver</i> , 19 units/mg)
Stratagene, Heidelberg	cloned <i>Pfu</i> ^{turbo} ™ Polymerase
eigene Produktion	Taq-DNA-Polymerase, λ-Exonuklease (Abteilung molekulare Genetik und präparative Molekularbiologie, Göttingen) tHisF, tHisA, tHisH (Arbeitsgruppe Sterner, Institut für Biochemie, Universität Köln)

2.1.6 Chemikalien

2.1.6.1 Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten

AGS GmbH, Heidelberg	Qualex Gold Agarose
Amersham, Braunschweig	Thermo Sequenase Sequenzierungs-kit mit 7-deaza dGTP für das <i>Cycle Sequencing</i> mit Fluoreszenz markierten Primern
Applichem, Darmstadt	Ampicillin (Na-Salz)
Baker, Deventer, Holland	Dimethylformamid (DMF)
Biomol, Hamburg	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat <i>p</i> -Toluidinsalz (BCIP); Isopropyl- β -D-thio-Galactopyranosid (IPTG) 1,4-Dithiothreitol (DTT)
Boehringer Mannheim	Adenosin-5'-triphosphat (ATP); Ampicillin (Natriumsalz); 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
Difco GmbH, Dreieich	Difco, Dreieich: Bacto Agar, Bacto Trypton, Bacto Pepton, Bacto Yeast Extract
Fluka, Neu-Ulm	Bromphenolblau; Dimethylsulfoxid (DMSO); Glycerin, 87%; β -Mercaptoethanol; Saccharose; Coomassie Brilliant Blue G-250
Icn, Meckenheim	Ethylendiamintetraessigsäure DiNa-Salz
MJ Research, Watertown, USA	Chill out® Flüssigwachs
National Diagnostics, Simerville, USA	Protogel™ vorgemischtes Acrylamid/Bisacrylamid (30% : 0.8%); Sequagel™; Sequagel complete™
Pharmacia Biotech	Chelating Sepharose Fast Flow
Riedel-De Haen, Seelze	Ammoniumacetat; Chloroform; Ethanol; Formamid; Kaliumacetat; Methanol; konz. Salzsäure
Serva, Heidelberg	Dithiothreitol (DTT); Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA); D(+)-Glucose (Monohydrat); Glycin; Harnstoff; Natriumdodecylsulfat (SDS); N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Sigma, Deisenhofen	Borsäure; Chloramphenicol; Coomassie Brilliant Blue G250 und R250; Ethidiumbromid; Kanamycin; 4-Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT); Ponceau-S-Concentrate™; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris); Triton X-100 (Octylphenol-polyethylenglykol); Tween 20 (Polyoxyethylen-sorbitan-Mono-laureat); Xylencyanol FF

2.1.6.2 Chemikalien für die Übergangszustandsanalogonsynthese

Lancaster,	
Bairrigg/Lancaster/UK	4-Phosphonobuttersäure, tert-Butylglycinat
Sigma, Deisenhofen	4-Nitrophenol, 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), DMSO
Fluka, Neu-Ulm	N-Hydroxysuccinimid (NHS), 4-Nitrophenylcaprylat, Tetrahydrofuran
Roth, Karlsruhe	2-Propanol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Dichlormethan, Methanol

2.1.7 sonstige Materialien und Kits

2.1.7.1 Längenstandards

DNA-Längenstandards

Die DNA-Längenstandards (MBI-Fermentas) wurden mit TE-Puffer und $6 \times$ loading dye solution auf eine DNA-Konzentration von $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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, <i>Eco47I</i> 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, <i>Eco91I</i> geschnitten	Fragmentlängen in bp: 8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224, 117
λ -DNA, <i>HindIII</i> geschnitten	Fragmentlängen in bp: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125
SmartLadder (Eurogentec)	Fragmentlängen in bp: 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10 000

Protein-Längenstandards

Protein-Längenstandards zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

BioRad Laboratories, München	<i>SDS-PAGE Molecular Weight Standard, High-range</i> <i>SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Mid-range</i>
MBI Fermentas, Vilnius, Litauen	10 kDa <i>Protein Ladder</i> , <i>protein molecular weight marker</i>

2.1.7.2 Kits

Genomed, Bad Oeyenhausen	Jetstar® Plasmid Midiprep Kit
Quiagen, Hilden	Quiagen® Plasmid Midipräp Kit
Macherey-Nagel, Düren	NucleoTrap® und NucleoTrap®CR DNA-Purification Kit
	NucleoSpin® Gel extraction Kit
Amersham, Braunschweig	Thermo Sequinase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP

2.1.8 Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Ethanol (70%); aliquotiert bei -20 °C gelagert
Anhydrotetrazyklin	2 mg/ ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C
APS-Stammlösung	10 % Ammoniumpersulfat, Lagerung bei -20°C
Antiserum-Lösung	1. Antikörper (1:100 verdünnt) bzw. 20 µl anti-HisF-Serum/ 10 ml PBS-Tween
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat <i>p</i> -Toluidin-salz) in Dimethylformamid
Blocklösung	3% (w/v) Milchpulver in PBS
Chloramphenicol-Stammlösung	25 mg/ml in EtOH
dNTP-Stammlösung	je 10 mM dNTP in H ₂ O (N = A, C, G oder T), Lagerung bei -20°C
E1	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
E2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
E3	3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5
E4	600 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0,15% Triton X-100, pH 5,0
E5	800 mM NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0
E6	1,25 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,50
EDTA-Stammlösung	500 mM EDTA unter Zugabe von NaOH-Plättchen in H ₂ O lösen
ELISA-Entwicklungspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , auf 1 ml eine Spatelspitze <i>p</i> -Nitrophenylphosphat zugeben
Esteraseassay-Puffer (I)	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 2 mM 4-Nitrophenylacetat
Esteraseassay-Puffer (II)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 6,2 x 10 ⁻⁴ M Caprylsäure-4-nitrophenylester

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
Formamidfarbmarker	100 ml Formamid, 0,1 g Bromphenolblau, 0,1 g Xylencyanol FF
40 x GBB	2 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 1,68 M Tris, 0,8 M Na-Acetat, 72 mM EDTA
Glutamat-Stammlösung für HisF-Enzymassay	100 mM Glutamat, sterilfiltriert
IMAC-Elutionspuffer:	25 mM; 50 mM; 75 mM; 80 mM, 90 mM, 100 mM; 125 mM, 150 mM; 175 mM, 200 mM; 250 mM und 300 mM Imidazol in IMAC Startpuffer, pH 7,4
IMAC-Startpuffer:	20 mM Na ₂ PO ₄ , 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4
Harnstoff-Proteinprobenpuffer	8 M Harnstoff, 200 mM Tris-HCl, 200 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0,05% Bromphenolblau
IPTG-Stammlösung	1M IPTG in Wasser, sterilfiltriert
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml Kanamycin in Wasser; sterilfiltriert, aliquotiert bei -20 °C gelagert
5 x Lysis-Mix	2 g SDS, 18 ml Wasser, 2 ml 40 x GBB, 40 mg Bromphenolblau, 20 ml Glycerol
NBT-Stammlösung	75 mg/ml NBT (Nitroblautetrazolium Chlorid) in 70% Dimethyl-formamid
PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
PAGE-Färbelösung	0,2% (w/v) Coomassie G250 und R250, gelöst in 50% Ethanol, 10% Eisessig, die Lösung wurde filtriert und lichtgeschützt bei RT gelagert
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-Tween-Puffer	PBS-Puffer mit zusätzlich 0,05% (v/v) Tween 20
PEG/ NaCl-Lösung	200 g PEG 6000, 146.1g NaCl auf 1 l auffüllen, autoklavieren
Phagenelutionspuffer	50 ml H ₂ O + 700 µl Triethylamin
Phenol/Chloroform	25 Vol. Phenol/TE, 24 Vol. Chloroform, 1 Vol. Isoamylalkohol
Phenol/TE	Phenol, mit TE-Puffer saturiert, 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin
Protein-Probenpuffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
RNase A-Stammlösung	10 mg RNase A in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl; Vorbehandlung: 15 min auf 100 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt

Sacchrosegradientenpuffer:	
für DNA	100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 18,5 % (w/v) Sacchrose
für Phagen	1 x TES-Puffer mit 5% Sacchrose bzw. 20% Sacchrose
Schock-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 4 °C
SDS-PAGE-Färbelösung	0,2 % Coomassie G250, 50 % Ethanol, 10 % Eisessig, lichtgeschützte Lagerung bei RT
SDS-Laufpuffer	10x 2,0 M Glycin 1 % SDS 0,25 M Tris
SDS-Gel Sammelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS auf pH 6,8 einstellen
SDS-Gel Trennpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS auf pH 8,8 einstellen
Sucrosefarbmarker	60% (w/v) Saccharose, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% (w/v) Xylencyanol FF, in TAE-Puffer
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 5 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,4
TBE-Puffer	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
TES-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 mM EDTA, 0,1 mM NaCl
Testpuffer für HisF-Enzymassay	50 mM Tris/HCl pH 8,0 sterilfiltriert
Transferpuffer für Western-Blots	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
Reaktionspuffer für Western-Blots	100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ . Unmittelbar vor Gebrauch wurden zu 12,5 ml des Puffers 6,5 µl NBT-Stammlösung und 37,5 µl BCIP-Stammlösung zugegeben.
25 x TES	250 mM Tris/HCl pH 8,0 2,5 mM EDTA 2,5 M NaCl
PEG/NaCl	200 g PEG 6000 146,1 g NaCl auf 1 l mit Wasser auffüllen und autoklavieren.
TE-Puffer	10 mM Tris/ HCl, pH 8,0 0,5 mM EDTA
Phagenelutionspuffer	10 ml H ₂ O + 140 µl Triethylamin oder 0,1 M Glycin, pH 2,2

2.1.9 Nährmedien

Die Medien und alle Lösungen für die Arbeit mit biologischem Material wurden direkt nach der Herstellung im Autoklaven sterilisiert oder sterilfiltriert. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

dYT-Medium	1% (w/v) Hefe Extrakt, 1,6% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) NaCl
dYT-G-Amp	50 ml dYT + Amp + 1,25 ml 40%ige Glucose (sterilfiltriert)
LB-Medium	0,5 % (w/v) Yeast Extract, 1% (w/v) Tryptone, 1% (w/v) NaCl

LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% (w/v) "Bacto-Agar"
M9-Minimalmedium	0,7% (w/v) Na ₂ HPO ₄ :2 H ₂ O, 0,3% (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,1% (w/v) NH ₄ Cl; autoklavieren, vor Benutzung des Mediums Zugabe von: 25 ml Glukose-Lösung 20%ig, 1 ml CaCl ₂ 100 mM, 1 ml MgSO ₄ 1M, 1 ml Thiaminlösung (1 mg/ ml), 5 ml FeCl ₃ 0,1 mM
M9-Minimalagar	M9-Minimalmedium mit 1,5% (w/v) "Bacto-Agar"
SOB-Medium	2% (w/v) Tryptone, 0,5 % (w/v) Yeast Extract, 0,05% (w/v) NaCl
SOC-Medium	2% (w/v) Tryptone, 0,5 % (w/v) Yeast Extract, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, autoklavieren, vor Benutzung des Mediums Zugabe von: 0,01 Volumen MgCl ₂ 1M, 0,01 Volumen MgSO ₄ 1M, 20 ml Glukose-Lösung 20%ig
Top-Agar	SOC-Agar: SOC-Medium mit 1,5% (w/v) "Bacto-Agar" 1% (w/v) Hefe Extrakt, 1,6% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 7% (w/v) Agar

2.1.10 Geräte/ Materialien

2.1.10.1 Geräte/ Materialien für molekularbiologische Arbeiten

Absorptionsspektrophotometer	Uvikon 930 und 933: Kontron, Eiching
Brutschrank	W. C. Heraeus GmbH, Hanau
Cybertech CS-1 elektr.	
Sofortbildkamera	Cybertech, Berlin
DNA-Sequenzer Modell 4000L	LI-COR, Lincoln, USA
Eismaschine	Ziegra, Stockport, England
Elektrophorese-Stromversorger	ECPS 3000/150; Midget
ELISA-Reader	340 ATTC SLT Labsinstruments, Crailsheim:
Ultrafree ^R -20 Nanopore-Wasser-Anlage	MILLIPORE, Eschborn
Gene Pulser [®] und Pulse Controler	BioRad, München
heizbare Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen
Metallblockthermostate	Werkstatt Abt. mol. Genetik und präp.
pH- Elektrode U402-M5	Ingold, Steinsbach/Taunus
pH-Meter-526	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Speedvac Concentrator SVC 100H	Savant Instruments, Farmingdale, NY
Sterilfiltrieraufsatz	Sartorius, Göttingen
Thermocycler	DNA Thermal-Cycler, PTC-150 "Mini-Cycler [™] ": Research, Watertown, USA

Sonifier W-250 und 2200	Heinemann, Schwäb. Gmünd
UVT2035 UV-Leuchttisch	Herolab, Wiesloch
Universal U 4800 P Feinwaage	Sartorius, Göttingen
MC410S Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Vertikalelektrophoresesystem	2117-250 NOVA-BLOT Elektrophoretische
Transfer Apparatur	Pharmacia/LKB, Freiburg
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen:	
Sorvall RC-5C	Sorvall/Kendrew
(Rotoren SS34, GSA)	
Biofuge pico und fresco	Heraeus GmbH, ZU

2.1.10.2 sonstiges

Dialyseschläuche 20/32 (16 mm)	SERVA, Heidelberg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glasplatten für SDS-Gele	Hoefer Scientific, SF, USA
Greiner-Röhrchen (15 ml)	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Hamilton Mikroliterspritze	Hamilton, Banskuduz, Schweiz
Magermilchpulver „Glückskele“	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt a. M.
MaxiSorp™ NuncImmuno™ – Röhrchen	NUNC, Wiesbaden
<i>Micro-Well</i> 96-Loch	
Mikrotiter-Platten	NUNC, Wiesbaden
Minsart NML Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Nitrocellulose-Membranen	Schleicher & Schuell, Dassel
3MM-Filter-papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Parafilm	American National Can., Chicago, USA
PCR-Cups	Biozym, Hess.-Oldendor
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Präzisionsquarzküvetten	Hellma, Mühlheim/Baden
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Skalpell-Klingen	Bayha GmbH, Tuttlingen
Ultrafiltrationsröhrchen	
Centripräp 10 und Centricon 10	AMICON GmbH, Witten

2.1.10.3 Geräte/ Materialien für die Übergangszustandsanalogonsynthese

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄

2.1.11 Software

Chromas©	Version 1.45 (32-bit) ©Mc Carthy
Corel draw©	Version 7.0 Corel Corporation
SigmaPlot®	Version 5.0 SPSS Inc.
Swiss PdbViewer©	Version 3.5 Glaxo Welcome Experimental Research,
Wisconsin Package	Version 10.0 Genetic Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin, USA
Primerfinder	http://eatworms.swmed.edu/~tim/primerfinder/

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Sterilisation von Geräten, Lösungen und Medien

Glasgeräte wurden für 20 min auf 160°C erhitzt. Hitzestabile Lösungen und Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mittels eines Membranfilters (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert.

2.2.1.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

E. coli-Stämme wurden bei 37 °C in dYT-Medium angezogen. Für die Präparation von elektrokompetenten Zellen wurde SOB-Medium verwendet. Bakterien, die zur Titerbestimmung dienen, wurden in M9-Minimalmedium angezogen. Zur Selektion wurde bei plasmidtragenden oder mit Phagen infizierten Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Kulturvolumina bis zu 5 ml wurden in einem Kulturröhrchen im Roller inkubiert, für Volumina bis zu 50 ml wurden 100 ml Erlenmeyerkolben bei 250 Upm geschüttelt. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen Medium verfolgt. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die Bakterienkulturen auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Bakterienstämme wurden dauerhaft in Form von Glycerin-Kulturen gelagert, dazu wurde eine Übernachtskultur auf 50% (v/v) Glycerin eingestellt und konnte so bei -80 °C über mehrere Jahre gelagert werden.

2.2.1.3 Präparation von *Escherichia coli* Zellen für die Elektroporation

2 ml einer Übernachtskultur in dYT-Medium wurden abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, 4°C, 12 000 rpm) und dreimal mit eiskaltem $H_2O_{\text{Millipore}}$ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 40 µl $H_2O_{\text{Millipore}}$ aufgenommen und für die Elektroporation eingesetzt (2.2.1.6).

2.2.1.4 Präparation hochkompetenter Zellen für die Herstellung von Genbibliotheken

400 ml vorgewärmtes SOB-Medium wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,4- 0,5 unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin in Form von 50 ml Aliquots weiterbehandelt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert und in abnehmenden Volumina (50, 25 und 10 ml) eiskaltem $H_2O_{\text{Millipore}}$ vorsichtig resuspendiert, jeweils eine Stunde auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (Hettich Rotana; 4000 rpm; 4°C, 10 min) und der Überstand dekantiert. Nach dem letzten Wasch- und Dekantierschritt wurden die Zellen

in dem zurückfließenden Restwasser aufgenommen und sofort als 200 µl Aliquots für die Transformation verwendet.

2.2.1.5 Vorbereitung der DNA für die Elektroporation

Lag die DNA in einem salzhaltigen Puffer z. B. in einem Ligationsansatz vor, wurden die Ionen durch eine Ethanol-fällung entfernt, da diese bei dem elektrischen Puls in der Küvette einen Kurzschluss auslösen würden.

2.2.1.6 Elektroporation (Dower *et al.* (1988))

Für die Transformation wurden 40 bzw. 200 µl der vorbereiteten *E. coli* Zellen mit nicht mehr als 10 µl salzfreier DNA Lösung gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 2 mm) überführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort mit 800 µl SOB-Medium gemischt und 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf das entsprechende Selektivmedium plattiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA in analytischen Mengen (Mini-Präparation) durch modifizierte alkalische Lyse

Die Mini Präparation von Plasmid-DNA basiert auf dem Prinzip der alkalischen-SDS-Lyse. Die Zellen werden dabei durch Zugabe von Natriumhydroxid und SDS aufgeschlossen und die Proteine zusammen mit der genomischen DNA durch Neutralisation gefällt. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung.

1,5 ml der Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge *pico*, 13000 Upm, 30 s, RT). Das Pellet wurde in 150 µl E1-Puffer resuspendiert, mit 150 µl E2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Fällung der Proteine und der chromosomalen DNA wurden 150 µl E3-Puffer zugegeben, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann abzentrifugiert (Hettich Rotana; 4000 rpm; 4°C, 20 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die verbliebenen Proteine wurden durch eine anschließende Chloroformextraktion entfernt und die Plasmid-DNA durch eine Ethanol-fällung gereinigt und konzentriert. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl steriles Wasser aufgenommen. Das erhaltene Plasmid konnte für Restriktionsendonukleasespaltungen und als PCR-Templat verwendet werden.

Um besonders reine DNA für Sequenzierungsreaktionen zu erhalten, wurde der Überstand nach der Fällung der Proteine und der chromosomalen DNA mit 1 µl RNase-Lösung bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal eine Phenol/

Chloroformextraktion durchgeführt. Nach der Ethanol-fällung wurde die Konzentration der DNA über Agarosegelelektrophorese abgeschätzt.

2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA über Anionenaustauschchromatographie

Zur präparativen Reinigung der Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen in 50 ml dYT-Medium angezogen, die Zellen geerntet und in 4 ml E1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer und Inkubation für 5 min wurden die Zellen lysiert und die Lösung daraufhin durch Zugabe von 4 ml E3-Puffer neutralisiert. Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (Hettich Rotana; 4000 rpm; 4°C, 15 min) pelletiert und der Überstand auf eine mit 10 ml E4-Puffer equilibrierte *JetStar*TM-Säule aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml E5-Puffer gewaschen, die DNA anschließend mit 5 ml E6-Puffer eluiert und mit 4 ml Isopropanol gefällt. Nach der Zentrifugation (Biofuge fresco/Heraeus; 13 000 rpm; 4°C, 30 min) wurde das Pellet in 50 µl steriles Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2.3 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA

DNA kann aus wässrigen Lösungen mit Ethanol oder Isopropanol gefällt werden, um Kontaminationen wie Salze und freie Nukleotide zu entfernen und die DNA zu konzentrieren. Durch die Verwendung von Isopropanol wird die Kopräzipitation von Salzen vermindert. Einzelsträngige DNA kann nur mit Ethanol gefällt werden, da die DNA andernfalls nur schwer in Lösung geht.

2.2.2.3.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetat Lösung und 3 Vol 96%igem Ethanol 5 min auf Eis gefällt und danach abzentrifugiert (Biofuge fresco/Heraeus; 13 000 rpm; 4°C, 10 min). Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die Reaktionsgefäße zum Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur oder 37°C offen stehen gelassen, bis der Ethanol verdunstet war. Die DNA wurde dann in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst.

2.2.2.3.2 Fällung von DNA mit Ethanol und Glycogen

Über diese Methode wurden Oligonukleotide aus einem PCR-Ansatz entfernt. Zu 90 µl eines PCR-Ansatzes wurden 10 µg Glycogen, 9 µl 3 M Na-Acetat-Lösung, pH 5,2 und 60 µl Isopropanol gegeben, gevortext, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (Biofuge pico/Heraeus; 13 000 rpm; RT; 10 min). Das Pellet wurde einmal mit 0,25 ml 70%igem und einmal mit 0,25 ml 98%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl Wasser aufgenommen.

2.2.2.3.3 Fällung von DNA mit Isopropanol

Diese Methode wurde in erster Linie bei der Präparation von Plamid-DNA in präparativen Mengen benutzt. Dabei wurde die Probe mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt und zentrifugiert (Biofuge fresco/Heraeus; 13 000 rpm; 4°C; 30 min). Wie nach der Ethanolfällung wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und die DNA, nachdem das Pellet getrocknet war, in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

2.2.2.4 Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol oder Chloroform

Durch Extraktion einer DNA-Lösung mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) wurden Proteine, Ethidiumbromid oder Reste anderer hydrophober Kontaminationen entfernt. Zur Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase und zur weiteren Denaturierung von Proteinen wurde eine weitere Extraktion mit Chloroform angeschlossen.

Die DNA Lösung wurde mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bzw. Chloroform versetzt und gründlich gemischt. Anschließend wurde der Ansatz zur Beschleunigung der Phasentrennung zentrifugiert (Biofuge pico/Heraeus; 13 000 rpm; RT; 3 min). Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Schluß wurde die DNA durch eine Ethanolfällung (2.2.2.3.1) konzentriert und so von eventuellen Resten der organischen Lösungsmittel befreit.

2.2.2.5 Enzymatische Manipulation von doppelsträngiger DNA

2.2.2.5.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Für analytische Zwecke wurden 300 bis 500 ng DNA mit 2 u Enzym in einem 20 µl-Ansatz gespalten. Sollte die DNA präparativ verwendet werden, wurden 5 µg DNA und mindestens 20 u Enzym in einem 100 µl- Ansatz verwendet. Fand sich für Spaltungen mit zwei Enzymen kein Puffer in dem beide Enzyme volle Aktivität besaßen, wurden die Spaltungsreaktionen nacheinander durchgeführt, wobei nach der ersten Restriktion eine Ethanolfällung (2.2.2.3.1) durchgeführt wurde.

2.2.2.5.2 Ligation von DNA-Enden mittels T4-DNA-Ligase

Soweit nicht anders angegeben, wurden DNA Fragmente in einem sechsfachen molaren Überschuss von Insert-DNA zu Vektor-DNA in Ligase Puffer aufgenommen und mit 2 Einheiten T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 18 h bei 15 °C inkubiert.

2.2.2.5.3 Ligation von DNA-Enden mittels Taq-DNA-Ligase

Im Gegensatz zur T₄-Ligase ist die Taq-Ligase bei Temperaturen von 45°C - 65°C aktiv. Sie wurde für die Ligation von Oligonukleotiden auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA eingesetzt, um durch die höheren Temperaturen Fehlannealing zu vermeiden und darüber hinaus, um, im Zuge einer LCR (*Ligase chain reaction*; Chalmers und Curnow; 2000), durch wiederholte Zyklen von Auftrennen, Hybridisieren und erneuter Reaktion phosphorylierten Oligonukleotiden die Möglichkeit zu geben, bereits hybridisierte aber nicht phosphorylierte Oligonukleotide zu ersetzen. Die Reaktionsbedingungen lassen sich aus Tabelle 2.1 entnehmen:

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
ss-DNA	1-100 pmol	Schritt	Temperatur	Dauer
Oligonukleotide	100 pmol	1.	92°C	30 sec
Taq-Ligase	1 µl (40 u)	2.	92°C	15 sec
10 x Taq-Ligase-Puffer	5 µl	3.	55°C	30 sec
H ₂ O	ad 100 µl	Schritt 1-3 wurden 49 mal wiederholt		

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zur Ligation von DNA-Enden über LCR.

2.2.2.5.4 Herstellung von einzelsträngiger DNA mittels λ-Exonuklease

Zur Synthese der ssDNA wurde die Eigenschaft der λ-Exonuklease genutzt, spezifisch den phosphorylierten Strang einer doppelsträngigen DNA abzubauen.

Zuerst wurde das gewünschte Gen mittels PCR (2.2.2.5.5) amplifiziert, wobei der Primer des abzubauenen Stranges phosphoryliert war. Die DNA wurde nach Methode 2.2.2.3.1 gefällt und in 10 µl Wasser aufgenommen. 8 µl der DNA-Lösung wurden mit 1 µl 10 x Strandase-Puffer und 1 µl Strandase (λ-Exonuklease) für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Inkubation bei 75°C abgebrochen. Die Einzelstrang-DNA wurde dann durch Agraosegelelektrophorese mittels *low-melting-point*-Agarose und Agarose gereinigt und isoliert (2.2.2.1.0).

2.2.2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987)

Mittels Polymerasekettenreaktion können DNA-Fragmente *in vitro*, auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus, spezifisch amplifiziert werden. Die Stränge der Duplex-DNA werden in der Denaturierungsphase durch Erhitzen getrennt. Anschließend wird die Temperatur in der Annealing-Phase abgesenkt, so daß die Oligonukleotid-Primer, die die Zielregion auf gegenüberliegenden Strängen und in entgegengesetzter Richtung flankieren, auf der Matrizen-DNA hybridisieren können. In der darauffolgenden Elongations-Phase werden diese Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase den Matrizensträngen entsprechend verlängert. Durch aufeinanderfolgende Amplifikationszyklen kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung des entsprechenden DNA-Abschnitts. Die Bedingungen für die PCR-

Reaktionen waren abhängig von dem G/C-Gehalt der jeweiligen Primer und der Länge der zu amplifizierenden Sequenz.

Soweit nicht anders erwähnt wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl 100 ng Matrixen-DNA, 100 pmol der entsprechenden Primer, je 200 pmol dNTPs und ein bis fünf Einheiten der entsprechenden Polymerase in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer eingesetzt. Der Ansatz wurde mit Chill-out™ Wachs überschichtet und in einem PCR-Block inkubiert. Wie in Tabelle 2.2 dargestellt, folgte auf eine initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min insgesamt 25 bis 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Hybridisierung bei der für das Primerpaar spezifischen Temperatur und anschließender Elongation mit 1min/kb bei 72°C. Die Hybridisierungstemperatur T_M wurde nach Chester und Marshak (1993) bestimmt; sie berücksichtigt sowohl den GC-Gehalt des Oligonukleotid-Primers als auch dessen Länge:

$$T_{\text{Schmelz}}[\text{°C}] = 69,3 + 0,41 (\% \text{ GC} - 650/\text{Nukleotide}_{\text{Primer}})$$

$$T_{\text{Hybridisierung}} = T_{\text{Schmelz}} - 5 \text{ bis } 10\text{°C}$$

Sollte das DNA-Fragment möglichst fehlerfrei amplifiziert werden, wurde eine Polymerase mit *proofreading*-Aktivität benutzt (z. B. Pfu™- bzw. Vent™-DNA-Polymerase). Für *insert screens* oder falls die PCR-Reaktionen mit den gewünschten Polymerasen nicht funktionierten wurde Taq-Polymerase verwendet.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
DNA-Matrize	50-100 ng	Schritt	Temperatur	Dauer
Primer A (100 pmol/ µl)	1 µl	1.	94°C	2 min
Primer B (100 pmol/ µl)	1 µl	2.	94°C	30 sec
Polymerase	0,5-5 units	3.	<i>annealing</i> °C	30 sec
10 x Polymerase-Puffer	5 µl	4.	72°C	1 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	5.	72°C	5 min
H ₂ O	ad 50 µl	Schritt 2-4 wurden 24-29 mal wiederholt		

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zur Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels PCR.

2.2.2.5.6 *Assembling* der Oligonukleotide über *Primerless-PCR*

Eine Methode, eine größere Anzahl von Oligonukleotiden zu einem Gen zusammenzufügen, ist die *primerless* PCR (Stemmer *et al.*, 1995). Die homologen Bereiche der synthetischen Oligonukleotide, die gleichzeitig als Primer und Matrize dienen, hybridisieren und werden von der Polymerase verlängert, so dass sich in aufeinander folgenden Zyklen das vollständige Gen aufbaut. Die Reaktionsbedingungen lassen sich aus Tabelle 2.3 entnehmen. Üblicherweise wurde in diesem Schritt ein Schmier erhalten, aus dem in einer zweiten PCR mit endständige Primer das vollständig assemblierte Gen amplifiziert wurde. Die Reaktionsbedingungen für diese PCR lassen sich aus Tabelle 2.4

entnehmen. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.7) überprüft. Da sich regelmäßig zwei Banden gebildet hatten, wurde das Produkt über Agarosegelelektrophorese (2.2.2.7) und Nukleotrap aufgereinigt, anschließend mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.2.2.5.1) und kloniert.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
Oligo-Mix (10 pmol/ Oligo)	15 µl	Schritt	Temperatur	Dauer
Vent-Polymerase	1 µl (2 u/µl)	1.	95°C	1 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	2.	95°C	30 sec
10 x Vent-Puffer	2 µl	3.	40°C	30 sec
H ₂ O	ad 20 µl	4.	72°C	1 min
		5.	72°C	10 min
		Schritt 2-4 wurden 49 mal wiederholt		

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zum *assembly* von Oligonukleotiden mittels *primerless*-PCR.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
<i>primerless</i> -PCR-Ansatz	3 µl	Schritt	Temperatur	Dauer
Primer VB 01 (100 pmol/ µl)	1 µl	1.	95°C	1 min
Primer VB 38 (100 pmol/ µl)	1 µl	2.	95°C	30 sec
Taq-Polymerase (hausg.)	0,2 µl	3.	45°C	30 sec
10 x Taq-Puffer	5 µl	4.	72°C	1 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	5.	72°C	10 min
H ₂ O	ad 50 µl	Schritt 2-4 wurden 29 mal wiederholt		

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zur Amplifikation von DNA-Abschnitten über eine *primed*-PCR in Anschluß an eine *primerless*-PCR.

2.2.2.5.7 *Assembly* von teilrandomisierten PCR-Produkten über *primerless*-PCR

Die *bisF*-Bibliothek wurde aus sich überlappenden, über PCR amplifizierten Fragmenten des Gens assembliert. Als Matrize diente die *bisF*_{Del}-Variante (3.2.2.8), die an den zu randomisierenden Stellen Trinukleotiddeletionen enthielt. Als *upstream*-Primer wurden die randomisierten Oligonukleotide verwendet, als *downstream*-Primer die entsprechenden synthetischen Oligonukleotide, die auch zum *assembly* des Gens über *primerless* PCR (3.2.2.4) verwendet wurden.

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese gereinigt, um die Matrizen-DNA zu entfernen. Die Konzentration wurde über ein Agarosegel abgeschätzt und die Genfragmente dann über eine *primerless*-PCR nach denselben Prinzipien wie in Abschnitt 2.2.2.5.6 zusammengefügt.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
PCR-Fragmente	2 pmol/ Fragment	Schritt	Temperatur	Dauer
Pfu ^{Turbo} -Polymerase	1 µl (2,5 u/µl)	1.	94°C	1 min
10 x Pfu-Puffer	5 µl	2.	94°C	30 sec
dNTPs (10 mM)	1 µl	3.	40°C	30 sec
H ₂ O	ad 50 µl	4.	72°C	1 min
		5.	72°C	5 min
		Schritt 2-4 wurden 29 mal wiederholt		

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zum *assembly* von Gen-Fragmenten mittels *primerless*-PCR.

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
<i>primerless</i> -PCR-Ansatz	1 µl	Schritt	Temperatur	Dauer
Primer VB 01 (100 pmol/ µl)	1 µl	1.	95°C	1 min
Primer <i>Sfil</i> (2) (100 pmol/ µl)	1 µl	2.	95°C	30 sec
Taq-Polymerase (hausg.)	0,2 µl	3.	55°C	30 sec
10 x Taq-Puffer	5 µl	4.	72°C	1 min
dNTPs (10 mM)	1 µl	5.	72°C	10 min
H ₂ O	ad 50 µl	Schritt 2-4 wurden 24 mal wiederholt		

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zur Amplifikation von DNA-Abschnitten über eine *primed*-PCR in Anschluß an eine *primerless*-PCR zum *assembly* des Gens.

2.2.2.5.8 *Insert screening*

Um nach einer Transformation Kolonien mit gewünschten Genen schnell identifizieren zu können, wurde ein *insert screen* durchgeführt. Kolonien auf einer Platte wurden mit einem Filzstift auf der Außenseite markiert und nummeriert. Etwas von dem Zellmaterial wurde in Polymerasepuffer suspendiert. Durch einen achtminütigen Hitzeschritt bei 95°C im PCR-Block wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach diesem Schritt wurden die restlichen für eine PCR notwendigen Bestandteile zugegeben, unter anderem Primer, von denen einer spezifisch im Insert, der andere im Plasmid hybridisieren konnte. Nach erfolgter PCR wurden Vorhandensein und Größe des gewonnenen PCR-Produkts durch Agarosegelelektrophorese (2.2.2.7) bestimmt, oder das PCR-Produkt über Analyse des Restriktionsmusters (2.2.2.5.1) untersucht.

2.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Nukleotidsequenzen wurden durch die Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977; Ansorge *et al.*, 1987) analysiert. Dabei wurden in vier Ansätzen fluoreszenzmarkierte Primer verlängert, bis es durch Einbau von jeweils eines der vier zusätzlichen 2',3'-Didesoxynukleotide in der Mischung der 2'-Desoxynukleotide zu zufälligen, basenspezifischen Strangabbrüchen kam. Die Abbruchfragmente wurden

gelelektrophoretisch getrennt und anhand ihrer Fluoreszenz detektiert. Zusätzlich konnte durch das sogenannte *cycle sequencing* die Matrizen-DNA in wiederholten Zyklen von Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation unter Zuhilfenahme einer hitzestabile Polymerase mehrfach genutzt werden, so dass weniger DNA-Matrize benötigt wurde und durch die höhere Temperatur Sekundärstrukturen und damit unspezifische Kettenabbrüche verhindert wurden. Die Bedingungen für die PCR-Reaktionen lassen sich aus Tabelle 2.7 entnehmen:

Reaktionsansatz		Reaktionsbedingungen		
DNA-Matrize	50 ng DNA/ kb Vektor	Schritt	Temperatur	Dauer
Primer IDR800 markiert	1 µl	1.	94°C	2 min
A-, C-, G-, oder T-Mix	2 µl	2.	94°C	15 sec
H ₂ O	ad 8 µl	3.	<i>annealing</i> °C	20 sec
"Chill-out 14"-Wachs	12 µl	4.	70°C	30 sec
		5.	94°C	15 sec
		6.	70°C	20 sec
		Schritt 2-4 und 5-6 wurden 19 mal wiederholt		

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des Ansatzes und Bedingungen zur DNA-Sequenzierung über *cycle sequencing*.

Für die Berechnung der Annealing-Temperatur des verwendeten Primers wurde die in Abschnitt 2.2.2.5.5 aufgeführte Formel verwendet. Jeweils 1 µl der PCR-Ansätze wurde in Formamidpuffer aufgenommen und auf dem LI-COR DNA-Sequencer Model 4000L auf Gelen der Größe 410 x 250 x 0,25 mm oder 660 x 250 x 0,25 mm aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Sequenzgele und die Laufbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Anbieters gewählt.

Meist wurden die Nukleotidsequenzen im Laboratorium für Genomanalyse/Göttingen bzw. bei SeqLab/Göttingen durch Auftragssequenzierung bestimmt. Anstelle von fluoreszenzmarkierten Primern wurden in diesem Fall zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden fluoreszenzfarbstoffmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotide in der *thermal cycle sequencing*-Reaktion (Slatko, 1994) eingesetzt, so dass es während der Strangsynthese zu zufälligen, 3'-terminal fluoreszenzmarkierten Einzelstrangfragmenten kam. Diese Abbruchfragmente wurden ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und die endständigen Nukleotide anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften detektiert. Als Matrize wurden 100 ng Plasmid DNA eingesetzt. Die Primermenge im Ansatz betrug 5 pmol.

Die erhaltenen Daten wurden in beiden Fällen mit dem Programm Chromas© Version 1.45 (32-bit) und dem *GCG Wisconsin Package* ausgewertet.

2.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde für analytische und präparative Zwecke in Agarosegelen mit 1% (w/v) Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol. Sucrosefarbmarker versetzt und bei einer konstanten elektrischen Feldstärke von 5-10 V/cm elektrophoretisch getrennt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Für eine Reinigung wurde das Fragment mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoTrap®-Kits isoliert.

2.2.2.8 Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Oligonukleotide wurden über Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (Dimension 100 x 60 x 0.75 mm) mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Die Gele enthielten 30 % Acrylamid/Bisacrylamid in TBE-Puffer, im Falle der denaturierenden Gele zusätzlich 8 M Harnstoff. Die Oligonukleotide wurden mit 1/3 Vol Formamid-Farbmarker versetzt, für 5 min bei 80°C denaturiert und bei 25 W aufgetrennt. Das Gel wurde dann in einem Färbebad mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt.

2.2.2.9 UV-Shadowing

DNA-Banden konnten auch ohne Zusatz von Ethidiumbromid in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen sichtbar gemacht werden, indem das Gel auf eine mit Zellophanfolie abgedeckte Kieselgel-Platte gelegt wurden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt war, der mit Licht von einer Wellenlänge von 254 nm angeregt werden konnte. Wurde die Platte mit Licht der entsprechenden Wellenlänge bestrahlt, bildeten sich an den Stellen, an denen sich die DNA befand, Schatten.

2.2.2.10 Reinigung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese mittels

low melting point-Agarose und Agarase

DNA lässt sich nur ab ca. 100 bp effektiv über NucleoTrap® aus einem Agarosegel isolieren. Für kürzere DNAs wurden *low melting point*-Agarosegele mit 1% (w/v) Agarose, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und TAE als Laufpuffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit mindestens 1/5 Vol. Sucrosefarbmarker versetzt und bei einer konstanten elektrischen Feldstärke von 5-10 V/cm elektrophoretisch getrennt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit dem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Das Gelstück wurde gewogen, mit 0,04fachem Volumen an 25 x Agarasepuffer versetzt und für 15 min bei 65°C inkubiert, bis es vollständig geschmolzen war. Der Ansatz wurde auf 45°C abgekühlt, pro 100 µg Gelmaterial 1 µg Agarase zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einstündiger Inkubation bei 45°C wurde die DNA über Ethanolfällung isoliert (2.2.2.3.1).

2.2.2.11 Reinigung von DNA-Fragmenten über Saccharosegradienten

Der gespaltene Vektor für Bibliotheken wurde über Saccharosegradienten aufgereinigt, so dass auf Ethidiumbromid und UV-Licht verzichtet werden konnte.

Die Zentrifugenröhrchen wurden mit je 10 ml Saccharosegradientenpuffen befüllt, bei -20°C eingefroren. Indem man dann den Puffer bei Raumtemperatur auftauen ließ, stellte sich automatisch ein Gradient von 10 bis 30 % Saccharose ein. Die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespaltene DNA (2.2.2.5.1) wurde mit Chloroform extrahiert (2.2.2.4), mit Ethanol gefällt (2.2.2.3.1) und in Wasser aufgenommen. Die Saccharoselösung wurde dann mit der DNA-Lösung überschichtet und die Röhrchen mit Parafin bis 3 mm unter den Rand aufgefüllt, auf 1 µg genau austariert und zentrifugiert (Centrikon/Kontron, TST41/14-Rotor; 30 000 rpm; 15°C, 21 h). Anschließend wurden die Röhrchen mit einer Kanüle angestochen, der Gradient ausgetropft und in 0,25 ml Aliquots aufgefangen. Von jeder Fraktion wurden 10 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um die gewünschten Fraktionen zu identifizieren, die dann mit Ethanol gefällt (2.2.2.3.1) und in Wasser aufgenommen wurden.

2.2.2.12 Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen

Die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung wurde über die Absorption bei 260 nm nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht in etwa einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Lösung, in einer proteinfreien DNA-Lösung ist er größer als 1,8.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Induktion mit Anhydrotetracyclin

In den Vektoren der pASK-Reihe steht die Transkription des *bisF*-Gens unter Kontrolle des *tet*-Promotors, darüber hinaus befindet sich auf dem Plasmid das Gen für den *tet*-Repressor, der über die entsprechende Promotor-/Operatorregion die Transkription des unter seiner Kontrolle stehenden Gens reprimiert (Skerra, 1994). Eine Induktion mit Anhydrotetracyclin (aTc) löst den Repressor von der Promotor-/Operatorregion und erlaubt so die Expression des *bisF*. Gegenüber einer Induktion mit IPTG besitzt die Anhydrotetracyclin-Induktion den Vorteil, den Promotor unabhängig vom Zellstoffwechsel zu induzieren, da die Zellen keinerlei natürliche Repressoren o. ä. für den *tet*-Promotor bilden.

Die gewünschten Klone wurden über Nacht in 3 ml des entsprechenden Selektivmediums bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden mit jeweils 50 µl der Zellen 50 ml Hauptkulturen angezogen und bei 37°C geschüttelt, die dann, sobald sie eine OD_{600} von 1,0 erreicht hatten, mit Anhydrotetracyclin (aTc) induziert wurden. Zuerst wurde als Kontrolle ein 2 ml Aliquot entnommen, abzentrifugiert und auf Eis aufbewahrt. Dann wurden 50 µl aTc (200 µg/ml) zu der restlichen Kultur zugegeben, die

daraufhin weiter bei 37°C geschüttelt wurde. Als Kontrollen wurden nach 1 h, 2 h und 3 h Aliquots entnommen und auf Eis gelagert; nach 3-4 h wurden die Zellen abzentrifugiert und dem Versuch entsprechend weiter verarbeitet.

2.2.3.2 Induktion mit IPTG

Die Expression der *bisF-gIIIp*-Genfusion wird im pCANTAB 5E-Vektor durch einen induzierbaren *lac*-Promotor kontrolliert (siehe Abschnitt 2.1.3), als Induktor dient IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid).

Die gewünschten Klone wurden über Nacht in 3 ml des entsprechenden Selektivmediums bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen im Verhältnis von 1:1000 mit Medium verdünnt und bei 37°C geschüttelt. Sobald sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten, wurde IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Zellen weiter bei 37°C wachsen gelassen. Als Kontrollen wurden nach 1 h, 2 h und 3 h Aliquots entnommen und auf Eis gelagert, nach 3-4 h wurden die Zellen abzentrifugiert und dem Versuch entsprechend weiter verarbeitet.

2.2.3.3 Präparation periplasmatischer Proteine aus *E. coli*

Periplasmatische Proteine aus *E. coli* wurden durch einen osmotischen Schock gewonnen. (Neu und Heppel, 1965). Für eine analytische Präparation wurden 2 ml einer (induzierten) Kultur geerntet (Biofuge fresco/Heraeus; 13 000 rpm; 4°C, 5min). Das Pellet wurde in 300 μ l Resuspendierungspuffer aufgenommen, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Schockpuffer resuspendiert, für 20 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert und wieder abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthielt die periplasmatischen Proteinen, die mittels PAGE (2.2.3.5) und Western-Blot (2.2.3.6/2.2.3.7) analysiert wurden. Für eine präparative Periplasmapräparation wurde entsprechend mehr Zellmaterial verwendet.

2.2.3.4 Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)

Histidin besitzt eine hohe Affinität zu zweiwertigen Übergangsmetallen wie z. B. Ni²⁺. Proteine können deshalb nach Fusion mit Oligo-Histidin-Peptiden durch Bindung an immobilisierte Nickelionen aufgereinigt werden.

Säulen wurden mit 4 ml „Chelating Sepharose Fast Flow“ als Säulenmaterial gepackt, das dann mittels 2 Säulenvolumen einer 100 mM NiCl₂-Lösung mit Nickelionen beladen wurde. Die Säule wurde dann mit fünf Säulenvolumen Wasser gewaschen, um überschüssiges Nickel zu entfernen, und dann mit drei Volumen IMAC-Startpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule gegeben, unspezifisch gebundene Moleküle wurden durch Waschen mit drei Volumen Startpuffer entfernt. Das den Hexa-Histag tragende Protein wurde daraufhin durch jeweils ein Volumen von IMAC-

Elutionspuffer, der steigende Konzentrationen von Imidazol enthielt, von der Säule verdrängt. 60 µl einer jeden Fraktion wurden mit 20 µl Proteinprobenpuffer versetzt, für 5 min auf 98°C erhitzt und über SDS-Gelelektrophorese untersucht (2.2.3.5). Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt, mit Glycerin versetzt und für eine weitere Verwendung in flüssigen Stickstoff eingetropft und bei -80°C gelagert.

2.2.3.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinproben wurden über SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Laemmli, 1970). Durch Zusatz des Detergens Natriumdodecylsulfat werden die Proteine denaturiert und die Eigenladungen der Proteine maskiert, so dass die Proteine in der Elektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt werden.

Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (Dimension 100 x 60 x 0.75 mm) mit PAGE- Laufpuffer aufgetrennt. Trenngele enthielten 10-12,5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 1,87 mM Tris-HCl pH 8,8 und 0,1% SDS. Sammelgele enthielten 5% Acrylamid/Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,1% SDS.

Die Proteine wurden mit 1/5 Volumen Protein-Probenpuffer bzw. Harnstoff-Proteinprobenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C denaturiert. Sollten Phagen analysiert werden, wurden ca. 5×10^{11} pfu Phagen mit 5 x Lysismix versetzt und für 30 min auf 98°C erhitzt. Es musste beachtet werden, dass größere Phagenmengen das Laufverhalten der Gele störten.

Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose transferiert (2.2.3.6) oder 15 min mit „Coomassie Brilliant Blue“ gefärbt und durch mehrmaliges Aufkochen mit Wasser entfärbt.

2.2.3.6 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-/PVDF-Membranen

Aufgetrennte Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen (2.2.3.5) wurden auf Nitrocellulose-Membranen nach dem "Semi-dry"-Verfahren transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Auf zwei Lagen Filterpapier (3MM Filterpapier) wurde die Nitrocellulose-Membran, das betreffende Gel und zwei weiteren Lagen Filterpapier gelegt. Alle einzelnen Komponenten wurden vorher mit Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde der Stapel zwischen zwei Graphitelektroden gepresst und die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran transferiert (30 min, 13 V, ca. 4 mA/cm²). Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulose-Membran für 3 min in 25 ml Ponceau-S-Lösung (Ponceau-S-Konzentrat, 1:10 mit H₂O verdünnt) gefärbt. Um überschüssiges Ponceau zu entfernen, wurde die Membran mit Wasser gewaschen; die angefärbten

Banden wurden daraufhin mit einem weichen Bleistift markiert. Die Membran wurde dann bis zur vollständigen Entfärbung mit PBS-Tween-Puffer gewaschen.

2.2.3.7 Immunochemischer Nachweis von transferierten Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Zum immunochemischen Nachweis von Proteinen wurde die Nitrocellulose-Membran (siehe Abschnitt 2.2.3.6) für 30 min in 20 ml PBS-Tween mit 3% (w/v) Milchpulver geschwenkt und anschließend dreimal für jeweils 20 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in 10 ml Antiserum-Lösung bei RT über Nacht leicht geschwenkt und anschließend dreimal je 20 min mit 20 ml PBS-Tween-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran 2 h mit 10 ml einer Lösung eines Alkalische-Phosphatase-konjugierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper (1 : 10 000 in PBS-Tween verdünnt) inkubiert. Der Blot wurde dann dreimal 30 min mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und die Membran kurz in deionisiertem Wasser geschwenkt, um restliches Tween zu entfernen.

Das gewünschte Protein wurde indirekt durch einen Farbniederschlag nachgewiesen, dessen Bildung durch den Alkalische-Phosphatase-konjugierten zweiten Antikörper katalysiert wurde. Für die Farbreaktion wurde die Nitrocellulose-Membran in 12,5 ml Western-Blot-Reaktionspuffer mit 12,5 ml NBT- und 75 ml BCIP-Stammlösung bei RT inkubiert. Nach Auftreten der spezifischen Färbung wurde die Reaktion durch Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt.

Die Alkalische Phosphatase spaltet von der farblosen Verbindung BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) das Phosphat ab, wodurch das blaue Indigo entsteht. NBT dient zusätzlich als Farbverstärker, indem es zu dem blauvioletten Diformazan reduziert wird.

2.2.3.8 Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Die Aminosäure Tryptophan aber auch Tyrosin, Phenylalanin und Disulfidbrücken (Cystine) absorbieren Licht in einem Bereich von 250 bis 300 nm.

Auf dieser Grundlage kann nach Pace *et al.* (1995) für Proteine bekannter Aminosäurezusammensetzung der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{280} berechnet werden:

$$\epsilon_{280} (M^{-1}cm^{-1}) = \sum Trp \cdot 5500 + \sum Tyr \cdot 1490 + \sum Cystine \cdot 125$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann dann über den berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) und die gemessene Absorption (A) die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{A}{\epsilon \cdot d}$$

A = Absorption
c = Konzentration (M)
d = Schichtdicke (cm)

2.2.3.9 HisF-Enzymaktivitätsmessungen

Für die Messung der HisF-Aktivität ist ein gekoppelter Enzymaktivitätstest notwendig, da das 5'-PRFAR instabil ist und deshalb im Reaktionsansatz unter Katalyse von tHisA aus dem 5'-ProFar hergestellt werden muss.

5'-ProFar und 5'-PRFAR besitzen nahezu identische Extinktionskoeffizienten, erst die Spaltung des 5'PRFAR in AICAR und ImGP durch tHisF und tHisH unter Umsetzung von Gln zu Glu kann spektroskopisch detektiert werden. Die Reaktion führt zu einem Abfall der Absorption bei 300 nm und lässt sich über $\Delta\epsilon = (\epsilon_{5'\text{-PRFAR}} - \epsilon_{\text{AICAR}}) = 5,64 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ quantifizieren (Klem & Davisson, 1993).

Alle Assays wurden in 800 μl Testpuffer in einer 1 ml Quarzküvette bei 25°C (Wasserbadtemperierung) am Kontron UVIKON Spektrophotometer 933 durchgeführt. 5'-ProFar (Davisson, 1994) bzw. tHisA, tHisF und tHisH (Reinigung: Thoma, 1999) wurden von der Arbeitsgruppe Sterner (Köln) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration des 5'-ProFar wurde über dessen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{300} = 6,069 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Klem & Davisson, 1993) bestimmt.

Die einzelnen Komponenten wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

tHisH: 1 μM , tHisA: 200 nM, tHisF: 100 nM, Gln: 5 mM, 5'-ProFAR: 10 μM .

Sämtliche Komponenten, mit Ausnahme des tHisA, wurden gemischt; die Reaktion wurde durch Zugabe von tHisA gestartet, sobald eine stabile *baseline* detektiert werden konnte.

2.2.3.10 ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

Der ELISA wurde genutzt, um die polyklonalen, nach den einzelnen *panning*-Runden gewonnenen Phagengemische auf Bindung an das Übergangszustandsanalogon zu testen. Dazu wurden ELISA-Platten mit einer 1 x PBS-Lösung mit 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vom BSA-Übergangszustandsanalogon über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden 3 x mit 1 x PBS-Tween gewaschen, 30 min mit Blockpuffer inkubiert, wiederum 3 x mit PBS-Tween gewaschen und dann mit 5×10^{12} pfu HisF-Phagen in 1 x PBS für 1 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 1 x PBS-Tween wurden die Platten mit der anti-HisF-Antikörperserumlösung (20 μl Serum in 10 ml 1 x PBS-Tween) über Nacht bei RT inkubiert, dann dreimal mit 1 x PBS-Tween gewaschen und für 1 h mit einem anti-Kaninchen Antikörper (1 : 10 000 in PBS-Tween verdünnt) inkubiert. Die Platten wurden daraufhin erneut dreimal mit 1 x PBS-Tween und einmal mit Wasser gewaschen und dann mit ELISA-Entwicklungspuffer inkubiert. Gebundenes Protein kann dabei durch einen gelben Farbumschlag detektiert werden.

2.2.3.11 Assay auf Esteraseaktivität

Der Assay auf Esteraseaktivität (I) basiert auf dem im Verlauf einer Hydrolyse von 4-Nitrophenylacetat freiwerdenden 4-Nitrophenolats, die im Zuge einer photometrischen Messung bei 405 nm detektiert werden kann. Der Assay wurde in 1 ml Esteraseassay-Puffer (I) bei Raumtemperatur am Kontron UVIKON Spektrophotometer 933 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente eine Esterase aus der Schweineleber, die in einer Konzentration von 0,001u/ml eingesetzt wurde.

Für den Esteraseassay (II) zur Detektion der Esteraseaktivität von proteinpräsentierenden Phagen wurden die Phagen mit Esteraseassay-Puffer (II) bei 37°C inkubiert. Dieser Puffer enthielt das Substrat Caprylsäure-4-nitrophenylester. Der Verlauf der Reaktion konnte durch die Freisetzung von 4-Nitrophenolat photometrisch bei 405 nm verfolgt werden.

2.2.4 phage display

Filamentöse Phagen der Ff-Klasse wie M13 besitzen ein einzelsträngiges, ringförmiges Genom, das von einem langen Proteinzyylinder umschlossen wird. Sie nutzen den F-Pilus von *E. coli* als Rezeptor, der dieser Gruppe auch seinen Namen gab, und sind demnach spezifisch für *E. coli*-Zellen, die das F-Plasmid tragen. Die Wirtszellen von M13 und seinen Verwandten werden im Verlauf der Infektion nicht lysiert; statt dessen werden während des *assembling*-Prozesses die entsprechenden Hüllproteine, die als integrale Membranproteine synthetisiert werden, an bestimmten Stellen der Bakterienhülle, an denen sich Cytoplasma- und äußere Membran in engem Kontakt befinden, gegen die DNA-bindenden Proteine auf der einzelsträngigen Phagen-DNA ausgetauscht, wobei der neu entstehende Phage durch die Bakterienhülle geschleust wird, ohne sie zu zerstören. Es werden so lange Hüllproteine an die DNA angelagert, bis ihr Ende erreicht ist, wodurch es möglich wird, ein Phagengenom mit zusätzlichen DNA-Elementen bzw. ein Plasmid, das größer ist als das ursprüngliche Genom, in dem Phagen zu verpacken. Aufgrund von Modifikationen des Helferphagen-Genoms (siehe Abschnitt 2.1.2) wird bevorzugt Plasmid- statt Phagen-DNA in die Phagenpartikel verpackt, so dass Phagen, die das His^F/gIIIp-Fusionsprotein tragen, auch das Plasmid mit dem entsprechenden *hisF*-Gen besitzen. Aus einer phagenpräsentierten Proteinbibliothek können so Varianten des Proteins mit den gewünschten Eigenschaften, z. B. über eine Selektion auf Bindung, isoliert und weiter untersucht bzw. modifiziert werden.

2.2.4.1 Präparation der M13-Phagenvarianten

2.2.4.1.1 Gewinnung von M13-KO7-Helferphagen

Zur Präparation der Helferphagen wurden 50 ml dYT mit *E. coli*-Zellen des Stammes TG1 aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. War eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht, wurden jeweils 200 µl der Zellen in 5 Röhrchen mit je 2,5 ml Top-Agar gegeben, der in der Mikrowelle aufgeschmolzen und bei 47°C im Wasserbad flüssig gehalten worden war. In jedes Röhrchen wurden dann 200 µl einer Verdünnung der „alten“ Helferphagen gegeben (10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹), es wurde kurz gevortext und die Mischung gleichmäßig auf LB-Platten verteilt.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C waren kleine und größere Plaques in dem Zellrasen zu erkennen. Mit einer abgeschnittenen und anschließend autoklavierten Pipettenspitze wurde einer der kleinen Plaques ausgestochen, in 50 ml dYT-Kan⁷⁵-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Präparation der Phagen erfolgte nach 2.2.4.1.2.

2.2.4.1.2 Präparation von proteinpräsentierenden Phagen

50 ml dYT-G-Amp wurden mit *E. coli*-Zellen (TG1 oder WK6) aus einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Sobald eine OD₆₀₀ von ungefähr 0,3 erreicht war, wurden 20 µl der KO7-Helferphagenpräparation zugegeben und die Kultur weiter inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen geerntet (2500 rpm Hettich-Laborzentrifuge, 15 min), der Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen in 2 ml dYT resuspendiert. Jeweils 500 µl der Suspension wurden in 4 x 50 ml dYT-Amp/Kan gegeben und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich-Laborzentrifuge 4000 rpm, 30 min) und der Überstand in SS34-Zentrifugenröhrchen mit 1/5 Vol PEG/NaCl-Puffer gemischt und zwei Stunden auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die gefällten Phagen abzentrifugiert (Sorval, SS34-Rotor, 15 000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand sorgfältig abgenommen. Die Phagen wurden in insgesamt 20 ml TES-Puffer aufgenommen, vereinigt und der Ansatz erneut zentrifugiert (Sorval, SS34-Rotor, 12 000 rpm, 15 min, 4°C), um Zellreste zu entfernen. Die Phagen wurden aus dem Überstand mit 1/5 Vol PEG/NaCl-Puffer zwei Stunden lang auf Eis gefällt, abzentrifugiert (Sorval, SS34-Rotor, 15 000 rpm, 30 min, 4°C) und in 1 ml TES-Puffer aufgenommen. Die Konzentration der Phagen wurde durch eine photometrische Messung (2.2.4.3.2) oder Titration (2.2.4.3.1) bestimmt. Die Phagen konnten einige Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.4.2 Phagenaufreinigung über Saccharosegradienten

Phagenlösungen, die über eine PEG-Fällung gereinigt worden waren, beinhalteten noch immer eine geringe Menge an freiem Protein, das in den Enzymaktivitätsassay das Ergebnis hätte verfälschen können. Die Phagen wurden deshalb für diesen Zweck nach der Fällung über einen Sucrosegradienten gereinigt. Mittels eines Gradientenmischers wurde ein Gradient von 5% bis 20% Saccharose („Saccharosegradientenpuffer für Phagen“) gegossen.

Die Saccharoselösung wurde mit der Phagenlösung überschichtet und die Röhrchen mit Parafin bis 3 mm unter den Rand aufgefüllt und auf 1 µg genau austariert und zentrifugiert (Centrikon/Kontron, TST41/14-Rotor; 30 000 rpm; 15°C, 3,5 h). Anschließend wurden die Röhrchen mit einer Kanüle angestochen, der Gradient ausgetropft und in 0,25 ml Aliquots aufgefangen.

Die Fraktionen mit den höchsten Phagenmengen wurden über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm und anschließender Titration (2.2.4.3.1) bestimmt.

2.2.4.3 Qualitative- und Quantitative Phagenanalysen

2.2.4.3.1 Bestimmung des Phagentiters

Von der phagenhaltigen Lösung wurde eine Verdünnungsreihe in TES-Puffer bis zu einer Verdünnung von 10^{11} hergestellt. Jeweils 200 µl Phagenverdünnung wurden mit 200 µl einer *E. coli* BMH 71-18 oder TG1 Übernachtskultur in Minimalmedium und 600 µl dYT gemischt und zur Infektion 40 min bei 37°C inkubiert.

Jeweils 200 µl der Ansätze wurden auf LB-Platten ausgestrichen, die zur Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden waren. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Titer errechnete sich aus der Verdünnungsstufe unter Berücksichtigung der ausplattierten Menge und der Anzahl der Plaques.

2.2.4.3.2 photometrische Bestimmung des Phagentiters

Der Phagentiter konnte auch photometrisch unter Berücksichtigung des Nukleotidgehaltes der Phagen und einem molekularen Extinktionskoeffizienten von $1,006 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach Formel 2.1 bestimmt werden (Barbas III *et al.*, 2001):

$$\text{Phagenpartikel/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \times (6 \times 10^{16})}{\text{Anzahl der Nukleotide im Phagengenom}}$$

Formel 2.1: Photometrische Bestimmung des Phagentiters.

2.2.4.4 Bestimmung der Konzentration von aktivem, phagenpräsentiertem tHisF über die Menge des umgesetzten Substrats

Um bestimmen zu können, wie groß der Anteil von Phagen, die aktives tHisF trugen, in einer Phagenpopulation war, war es notwendig, den Anteil von aktivem tHisF zu bestimmen. Dieser konnte aus Umsatzkurven über das Lambert-Beer-Gesetz und dem bekannten k_{cat} von tHisF nach Formel 2.2 ermittelt werden.

$$\Delta A = \varepsilon \times c \times d$$

$$\Rightarrow \text{Substratkonzentration} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times d}$$

Über das Lambert-Beersche-Gesetz kann aus der gemessenen Änderung der Absorption die umgesetzte Stoffmenge errechnet werden. Die Abnahme der OD_{300} von 0,05 bei einem $\varepsilon_{5\text{'-ProFAR}}$ von $5,067 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ entspricht $9,9 \mu\text{M}$ 5'-ProFAR.

$$\frac{\text{Substratkonzentration}}{\Delta t} = v_{\text{max}0}$$

$$\Rightarrow \frac{v_{\text{max}}}{\text{Enzymkonzentration}} = k_{\text{cat}}$$

$$\Rightarrow \text{Enzymkonzentration} = \frac{v_{\text{max}}}{k_{\text{cat}}}$$

Aus der Zeit, die benötigt wurde, um das Substrat umzusetzen, ca. 85 min, kann v_{max} bestimmt werden.

Mittels des k_{cat} -Wertes der tHisF_(C9A)-Variante (1,8 [1/s]; Silke Beismann-Driemeyer) kann dann die Enzymkonzentration errechnet werden: $1,09 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ bzw. $8,72 \times 10^{-13} \text{ mol/800 } \mu\text{l}$ oder $5,25 \times 10^{11}$ Teilchen im Ansatz.

Bei $7,6 \times 10^{12}$ Phagen im Reaktionsansatz ergibt sich ein Anteil von 14,5 Phagen / HisF.

Formel 2.2: Berechnung des Anteils der Phagen, der auf seiner Oberfläche aktives tHisF-Protein präsentiert (siehe Abschnitt 3.1.9.2).

2.2.4.5 *Panning* (modifiziert nach Nissim *et al.*, 1994)

2.2.4.5.1 *Panning* gegen anti-HisF-Antikörperserum

Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, wurden für das *panning* Polystyrol-Immuntubes mit $75 \mu\text{l}$ anti-HisF-Antikörperserum in 3 ml PBS über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Röhrchen 3 x mit PBS gewaschen und mit PBS mit 3% (w/v) Milchpulver abgesättigt (2 h, 37°C). Die *tubes* wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, 5×10^{12} pfu Phagen in 3 ml PBS mit 3% (w/v) Milchpulver zugegeben und 30 min unter Schütteln gefolgt von 60 min ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die *tubes* wurden geleert, der Titer der ungebundenen Phagen im Überstand bestimmt (2.2.4.3.1) und die *tubes* mit 10 x mit 1 x PBS/0.1% Tween 20 und 10 x mit

1 x PBS gewaschen. Zur Elution wurde 1 ml des jeweiligen Phagenelutionspuffer in die *tubes* gegeben und 10 min bei RT inkubiert, wobei das *tube* jede Minute 1 mal über Kopf geschüttelt wurde. Die Lösung mit den eluierten Phagen wurde sofort in 500 µl 1 M Tris/HCl pH 7.8 gegeben und gut gemischt. In die leeren *tubes* wurden 300 µl 1 M Tris/HCl pH 7.8 gegeben und die *tubes* 2-3 mal über Kopf geschüttelt.

1 ml der eluierten Phagenlösung wurde zu 9 ml ein TG1-Kultur gegeben ($OD_{600} = 0.5$), zu der Lösung in den *tubes* wurden 3 ml der gleichen TG1-Kultur gegeben und beide 30 min ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Die beiden Kulturen wurden vereinigt und der Phagentiter durch eine Verdünnungsreihe bestimmt (100 µl Kultur zu je 900 µl Medium). Der Rest der Kultur wurde abzentrifugiert (2500 rpm Hettich-Laborzentrifuge, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml dYT aufgenommen, auf einer dYT-G-Amp-Platte ausgestrichen.

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden 1.5 ml dYT/15% Glycerin auf die Platte gegeben und der Zellrasen abgekratzt. Die so gewonnenen Zellen wurden für eine erneute Infektion mit Helferphagen und nachfolgender Präparation von proteinpräsentierenden Phagen eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

2.2.4.5.2 Panning gegen das BSA gekoppelte Übergangszustandsanalogon

Die Polystyrol-Immuntubes wurden beschichtet, indem sie mit 3 ml 300 µg/ml des an das BSA gekoppelten Übergangszustandsanalogons in 1 x PBS-Puffer bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Das *panning* wurde mit 5×10^{12} pfu an Phagen entsprechend Abschnitt 2.2.4.5.1 durchgeführt. Zur Elution diente Triethylamin bzw. 0,1 M Glycin, pH 2.2.

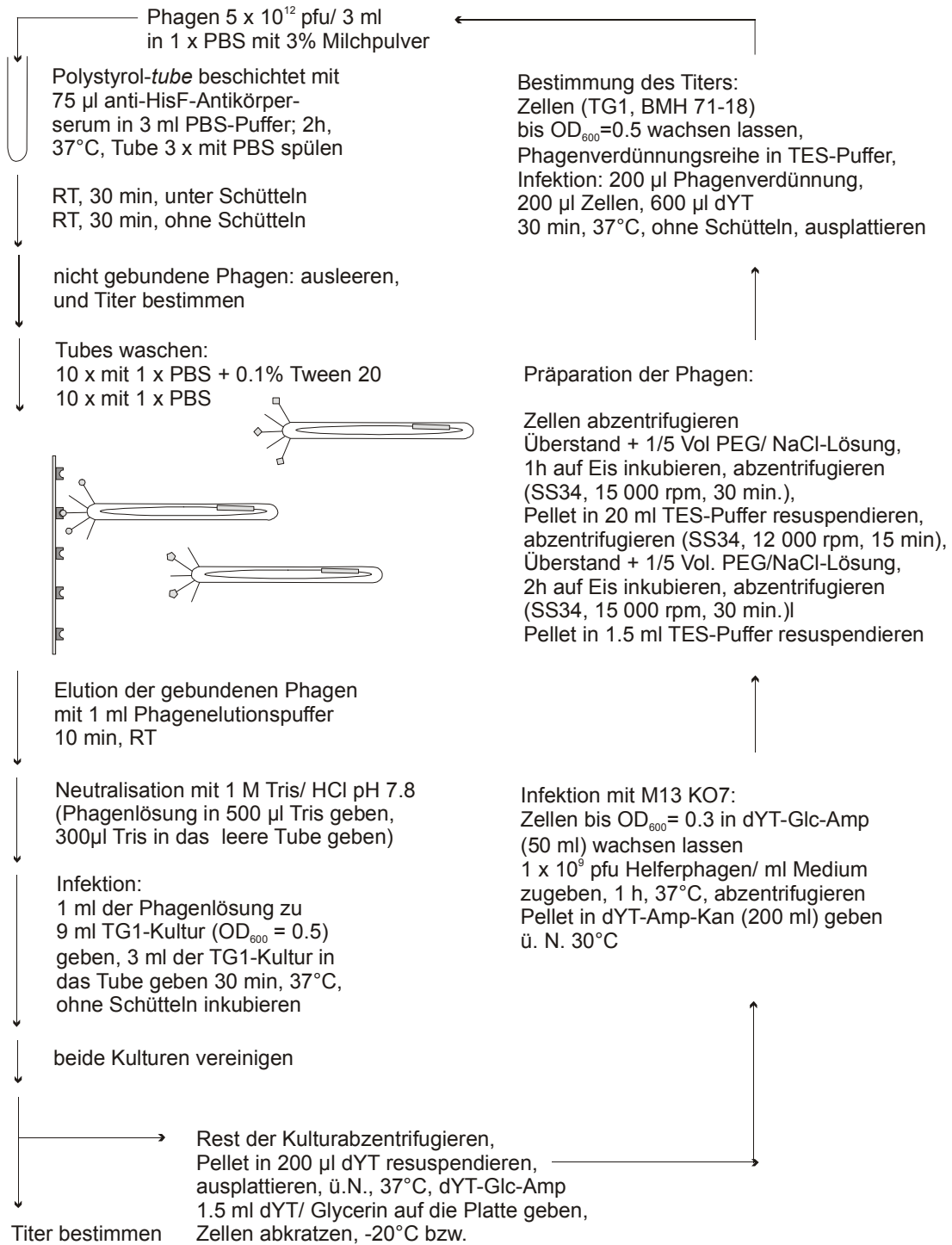


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des *panning*-Prozesses gegen anti-HisF-Antikörperserum. Details siehe Text.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Präsentation von HisF auf Phagen

3.1.1 Phagenpräsentierte tHisF-Bibliotheken: Planung der Vorgehensweise

Eines der Ziele dieses Projekts ist die Präsentation einer Bibliothek eines $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Proteins auf der Oberfläche von M13-Phagen. Das tHisF aus *Thermotoga maritima* wurde zu diesem Zweck ausgewählt, da es diverse Grundvoraussetzungen, die für das Vorhaben nötig sind, erfüllt: Es stammt aus einem thermophilen Organismus, so dass eine voraussichtlich höhere Faltungsstabilität gewährleistet ist, die für das *protein engineering* von Vorteil sein kann. Die DNA-Sequenz ist verfügbar und das Gen lässt sich heterolog in *E. coli* exprimieren. Das Protein liegt in der Zelle vermutlich in monomerer Form vor (Höcker *et al.*, 2001). Eine Struktur des Proteins ist vorhanden, so dass es möglich war, Aminosäuren auszuwählen, die voraussichtlich an der Bindung eines Substrates bzw. an der Katalyse einer Reaktion beteiligt sein können, und die entsprechend im Zuge einer Bibliothekssynthese randomisiert wurden. Für Untersuchungen zur Faltungsstabilität existiert ein einzelner Tryptophanrest und für Aktivitätsbestimmungen ist ein Assay vorhanden. Darüber hinaus ist eine Variante dieses Proteins ohne Cysteinrest (C9A) verfügbar (Beismann-Driemeyer und Sterner, 2000), die eingesetzt wurde, um zu verhindern, dass Faltung und Sekretion durch die Ausbildung ungünstiger Disulfidbrücken behindert werden konnten.

Die Imidazolglyzerinphosphat (ImGP)-Synthase aus *Thermotoga maritima* ist ein 1:1 Bienzymkomplex, der aus der Glutaminase-Untereinheit tHisH und der Synthase-Untereinheit tHisF besteht (Klem, 1993). Wie man in Abbildung 3.1 sehen kann, katalysiert erstere die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und Ammoniak, welcher dann, vermutlich durch einen vom Lösungsmittel abgeschirmten Kanal, auf das tHisF übertragen wird (Thoma, 1998; Beismann-Driemeyer und Sterner, 2001). Der naszierende Ammoniak lagert sich an das PRFAR (*N*'-[(5'-phosphoribulosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) an, das in einem vorangehenden Schritt durch Katalyse von tHisA aus 5'-ProFAR (*N*'-[(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) gebildet wird, woraufhin dann das tHisF die Kondensation beider Komponenten und die nachfolgende Spaltung in ImGP (*imidazole glycerol phosphate*) und AICAR (*5*'-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) katalysiert. Das ImGP wird in nachfolgenden Reaktionsschritten in Histidin umgewandelt, während das AICAR zur *de novo* Synthese von Purinen dient.

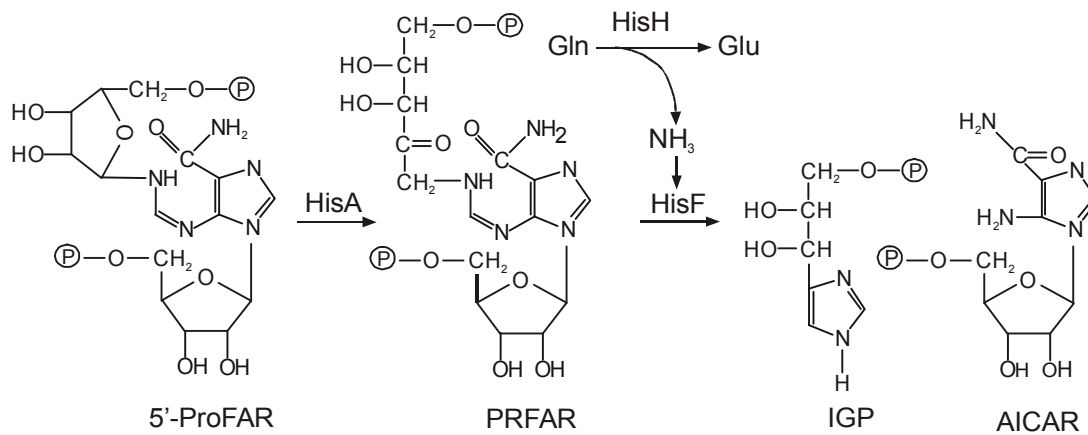


Abbildung 3.1: Die von tHisF katalysierte Reaktion: ein Teil des Histidin-Biosyntheseweges aus *Thermotoga maritima*. ImGP wird in nachfolgenden Reaktionsschritten in Histidin umgewandelt, das AICAR dient zur *de novo* Synthese von Purinen.

5'-ProFar und 5'-PRFAR absorbieren, im Gegensatz zu AICAR und ImGP, Licht bei einer Wellenlänge von 300 nm, aktives tHisF führt in einem Enzymaktivitätsassay demnach zu einem Abfall der Absorption.

Bezeichnungen:

tHisF:	Synthetase-Untereinheit der Imidazol-Glycerinphosphat-Synthetase,
tHisH:	Glutaminase-Untereinheit der Imidazol-Glycerinphosphat-Synthetase,
5'-ProFAR:	<i>N'</i> -[(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
5'-PRFAR:	<i>N'</i> -[(5'-phosphoribulosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AICAR:	5'-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
ImGP:	imidazole glycerol phosphate

Mit Hilfe dieser Reaktion, lässt sich die HisF-Aktivität eines Proteins bestimmen. Da das Substrat des HisF, das 5'-PRFAR, jedoch instabil ist, muss es direkt im Reaktionsansatz unter Katalyse von tHisA aus 5'-ProFar hergestellt werden. 5'-ProFar und 5'-PRFAR besitzen nahezu identische Extinktionskoeffizienten, so dass erst die Spaltung des 5'-PRFAR in AICAR und ImGP durch den Abfall der Absorption bei 300 nm spektroskopisch detektiert werden kann (2.2.3.9).

3.1.2 Test der Membrangängigkeit von tHisF

M13-Phagen werden während der Passage durch die Cytoplasmamembran assembliert, deshalb muss ein Protein, das auf der Phagenoberfläche präsentiert werden soll, diese zunächst passieren. Das tHisF aus *Thermotoga maritima* ist jedoch an der Histidin-Biosynthese beteiligt und dementsprechend im Cytoplasma lokalisiert.

Es musste also getestet werden, ob es dennoch ausreichend membrangängig ist, d. h., ob es in der Lage ist, in das Periplasma translokiert zu werden und dort als funktionsfähiges und damit korrekt gefaltetes Protein vorzuliegen. Dazu wurde eine *thisF*_(C9A)-Variante hergestellt, die auf genetischer Ebene an die DNA-Sequenz eines Signalpeptids, das die Translokation durch die Cytoplasmamembran vermittelt, fusioniert worden war. Mit diesem Konstrukt konnte dann die Lokalisation des entsprechenden Proteins in der Zelle überprüft werden.

Die zu diesem Zweck ermittelten Daten in den Abschnitten 3.1.2.1 – 3.1.2.3 wurden von Vera Boege im Rahmen eines Großpraktikums „Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie“ erarbeitet.

3.1.2.1 Konstruktion des pASK-hisF_(C9A)-sen-6H-Vektors

Zur Konstruktion einer membrangängigen tHisF-Variante wurde das, von Silke Beismann-Driemeyer aus der AG Sterner zu Verfügung gestellte, *thisF*_(C9A)-Gen mit den Primern *JWASKhisFdown* und *JWASKhisFup* aus dem Vektor pET-11c-hisF_(C9A) amplifiziert (2.2.2.5.5), wobei *upstream* eine *Pvu*II- und *downstream* eine *Bgl*II-Schnittstelle gefolgt von einem carboxyterminalen Sendai-Epitop eingeführt wurde (Abbildung 3.2). Nach einer Ethanol-fällung (2.2.2.3.1) wurde das Gen über die Schnittstellen *Pvu*II und *Bgl*II in den Expressionsvektor pASK75 (Skerra, 1994) ligiert (2.2.2.5.2). In dem so entstandenen Vektor pASK-*thisF*_(C9A)-sen-6H liegt vor dem *thisF*-Gen das Gen für eine OmpA-Leader-Sequenz, die eine Translokation des Proteins in das Periplasma vermittelt; hinter dem Gen folgen dann sechs Codone, die für einen Hexa-Histidin-*tag* codieren, und somit eine Reinigung des Proteins über IMAC ermöglichen.

Der Vektor pASK75 verfügt über einen *tet*-Promotor, der die Transkription des *hisF*-Gens kontrolliert. Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid das Gen für den *tet*-Repressor, der über die entsprechende Promotor-/Operatorregion die Transkription des unter seiner Kontrolle stehenden Gens reprimiert (siehe auch 2.1.3).

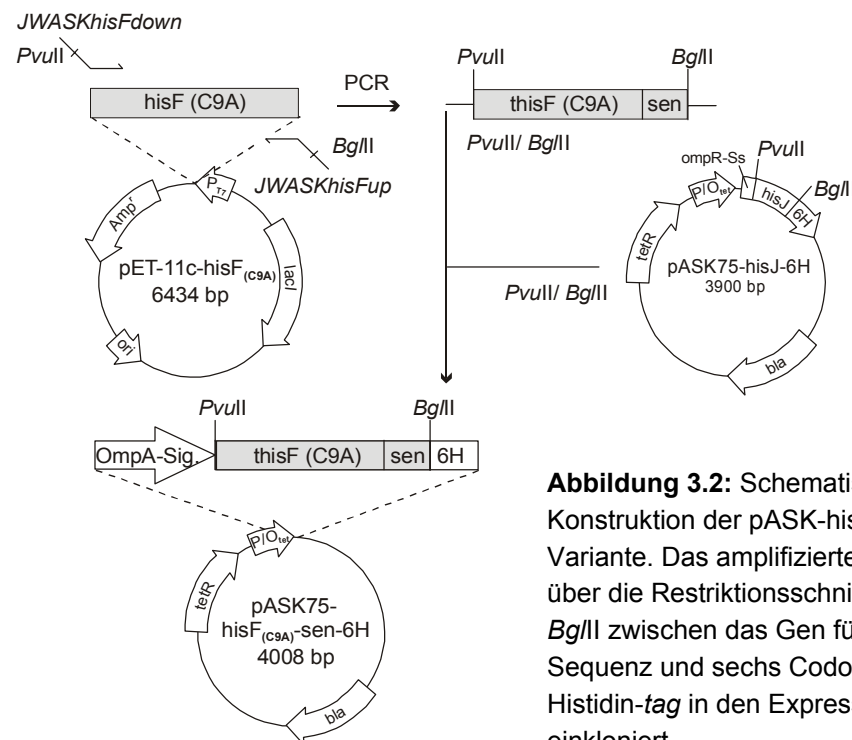


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Konstruktion der pASK-hisF_(C9A)-sen-6H-Variante. Das amplifizierte *thisF*_(C9A)-Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *Pvu*II und *Bgl*II zwischen das Gen für die OmpA-Leader-Sequenz und sechs Codonen für einen Hexa-Histidin-*tag* in den Expressionsvektor pASK75 einkloniert.

E. coli-Zellen des Stammes HS 1018 (Shuman, 1982) wurden mit dem Vektor pASK-*thisF*_(C9A)-sen-6H transformiert (2.2.1.3) und auf Selektivagar (Amp50) ausgestrichen. Die Plasmid-DNA zweier auf der Platte gewachsener Klone wurde isoliert (2.2.2.1) und die Sequenz des *thisF*_(C9A) nach einer Analyse des Restriktionsmusters (2.2.2.5.1) über DNA-Sequenzanalyse (2.2.2.6) überprüft.

Es zeigt sich, dass die Vektoren das korrekte *thisF*-Gen mitsamt der Signalsequenz und dem 6-His-*tag* enthielten.

3.1.2.2 Lokalisation des an eine Signalsequenz fusionierten tHisF

Das in dem Vektor pASK-*thisF*_(C9A)-sen-6H vorliegende *thisF*_(C9A)-Gen wurde nach Induktion mit Anhydrotetracyclin (aTc) exprimiert (2.2.3.1). Cytoplasmatische und periplasmatische Proteinpräparationen (2.2.3.3) im analytischen Maßstab wurden daraufhin über SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.5) aufgetrennt und über Western-Blot-Analyse (2.2.3.6/2.2.3.7) auf Anwesenheit des Sendai-Epitopes getestet. (Abbildung 3.3 zeigt ein vergleichbares Ergebnis in dem das tHisF mit Hilfe eines anti-HisF-Antikörperserums nachgewiesen wurde).

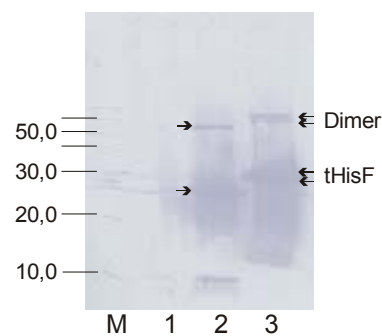


Abbildung 3.3: Immunochemischer Nachweis von tHisF in periplasmatischen und cytoplasmatischen Proteinfraktionen (Nachweis mittels anti-tHisF-Kaninchenserum)

M: 10 kDa-Leiter;
Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)
1.: tHisA (Negativkontrolle)
2.: tHisF; cytoplasmatisch/ohne Signalsequenz ($M_r \times 10^{-3}$: 27.8/ Dimer: 55.6)
3.: tHisF-Sen-6H; periplasmatisch, gereinigt über IMAC ($M_r \times 10^{-3}$: 29.7/ Dimer: 59.5)

In der periplasmatischen Proteinpräparation lässt sich eine Doppelbande erkennen, von der vermutet wurde, dass es sich dabei um erfolgreich translokiertes tHisF (Molekulargewicht ca. 29 800) und unvollständig prozessiertes tHisF mit der nicht abgespaltenen Signalsequenz (Molekulargewicht zusammen ca. 32 100) handelt. Eine cytoplasmatische Proteinpräparation eines tHisF ohne Signalsequenz zeigt nur eine einfache Bande.

3.1.2.3 Überprüfung der Aktivität des periplasmatischen tHisF

Um einen ersten qualitativen Eindruck zu erhalten, ob das tHisF nach Translokation in das Periplasma noch aktiv und damit korrekt gefaltet ist, wurde periplasmatisches tHisF im präparativen Maßstab isoliert (2.2.3.3) und anschließend über seinen carboxyterminalen Hexahistidin-*tag* mittels IMAC (2.2.3.4) aufgereinigt.

Die HisF-Aktivität dieser Proteinpräparation wurde über einen gekoppelten Enzymaktivitätsassay nach Methode 2.2.3.9 mit einer Konzentration von 0,05 mM 5'-ProFAR durchgeführt. Sobald sämtliche Komponenten des Messansatzes, mit Ausnahme des tHisF, gemischt waren und eine stabile Basislinie detektiert werden konnte, wurde die Reaktion durch Zugabe von tHisF gestartet. Die Umsatzkurve ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

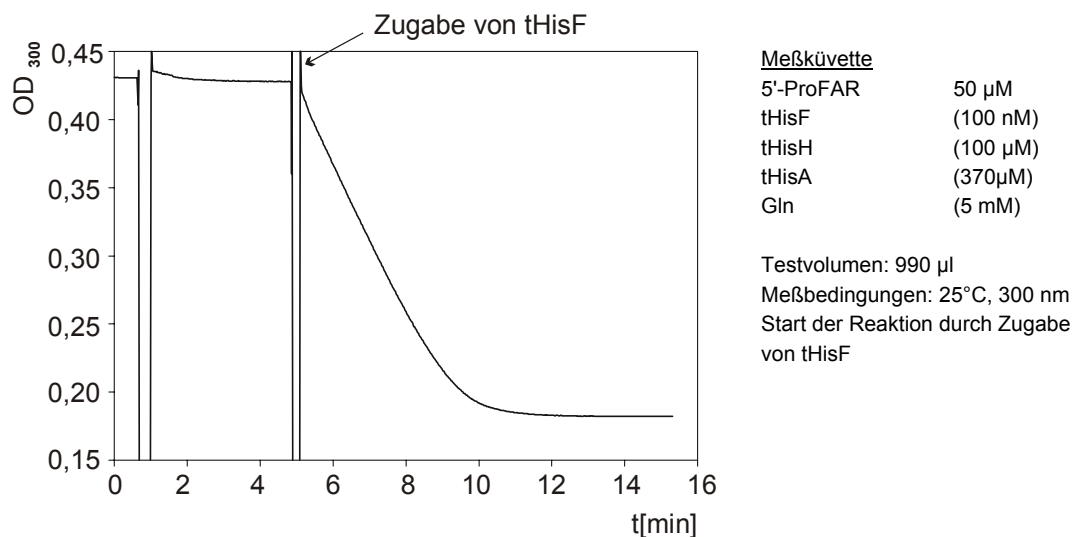


Abbildung 3.4: Test des periplasmatischen tHisF auf HisF-Aktivität. Nach Zugabe von tHisF nahm die Absorption bei 300 nm ab – das PRFAR wurde demnach gespalten und das periplasmatische tHisF war demzufolge aktiv.

Die Menge des umgesetzten Substrates lässt sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz über die Veränderung der OD_{300} und dem Extinktionskoeffizienten des 5'-ProFar bestimmen (2.2.3.9). Daraus ergibt sich, dass 0,041 mM an Substrat umgesetzt worden waren, unter Berücksichtigung von Messungenauigkeiten durch das Herausnehmen der Küvette, Zugabe von Enzym und dem anschließenden Mischen entspricht dies der eingesetzten Konzentration von 0,05 mM 5'-ProFar. Dies bedeutet, dass das tHisF nach der Translokation in das Periplasma und trotz der unter Umständen unvollständig prozessierten Signalsequenz aktiv ist und damit auch korrekt gefaltet vorliegt.

3.1.2.4 Aminoterminalen Ansequenzieren des periplasmatischen tHisF

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Doppelbande, die sich bei der elektrophoretischen Auftrennung des tHisF mit der Signalsequenz zeigt, tatsächlich um prozessiertes bzw. unprozessiertes tHisF handelt (siehe Abschnitt 3.1.2.2), wurde die periplasmatische Proteinfraction erneut elektrophoretisch aufgetrennt und durch *blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen (2.2.3.6). Die Membran wurde dann zum Anfärben der Proteinbanden in Commassie-Lösung geschwenkt. Beide Banden wurden von Bernhard Schmidt (BiochemieII, Medizinische Fakultät) einzeln aminoterminal ansequenziert (Tabelle 3.1).

unprozessierte Sequenz		Signalsequenz (OmpA)	HisF
		M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A	L A K R...
obere Bande	(80%)	M K K T A	
	(20%)	? R F(G)?	
untere Bande	(50%)	A G F A T	
	(50%)	A T V A Q	
		A L	

Tabelle 3.1: Ergebnis der aminoterminalen Sequenzanalyse der beiden Banden des über Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten, periplasmatischen tHisF_(C9A). Abgebildet ist der Anfang der Aminosäuresequenz des unprozessierten tHisF einschließlich der OmpA-Signalsequenz und die entsprechenden detektierten Sequenzfragmente der einzelnen Banden.

Wie man aus Tabelle 3.1 entnehmen kann, entspricht die obere Bande zum größten Teil dem unprozessierten tHisF, dazu kommt noch eine Verunreinigung mit einer unbekanntem Sequenz. Bei der unteren Bande handelt es sich um tHisF mit einer teilweise abgespaltenen Signalsequenz.

Die Signalsequenz wird demnach zwar abgetrennt, jedoch mit einer geringen Effizienz und weder direkt am Anfang des tHisF noch an einer einzelnen definierten Prozessierungs-Stelle. Dennoch besitzt das periplasmatische tHisF, wie in Abschnitt 3.1.2.3 geschildert, enzymatische Aktivität und sollte deshalb korrekt gefaltet im Periplasma vorliegen.

3.1.3 Test des pCANTAB-thisF(C9A)-Konstruktes auf Präsentation des tHisFs auf M13-Phagen

Die M13-Phagen werden während der Passage durch die Cytoplasmamembran assembliert. Ein Protein, das auf ihrer Oberfläche präsentiert werden soll, muss deshalb in der Lage sein, diese zu durchqueren. Dementsprechend sollte der Anteil an präsentiertem Protein von der Effizienz dieser Membranpassage abhängen.

Um zu überprüfen, ob sich der Anteil an prozessiertem tHisF erhöht, sobald anstelle der OmpA-Signalsequenz die gIIIp-Signalsequenz des pCANTAB-Vektors verwendet wird, wurde das *thisF* mit den Primern *SAS-CAN-F-down* und *SAS-CAN-F-up(2)* aus dem pASK-ompA-thisF_(C9A)-6H-Konstrukt amplifiziert (2.2.2.5.5). Das PCR-Produkt wurde dann mittels einer Ethanol-fällung gereinigt (2.2.2.3.1) und über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Bgl*II in den pCANTAB-Vektor ligiert (Abbildung 3.5).

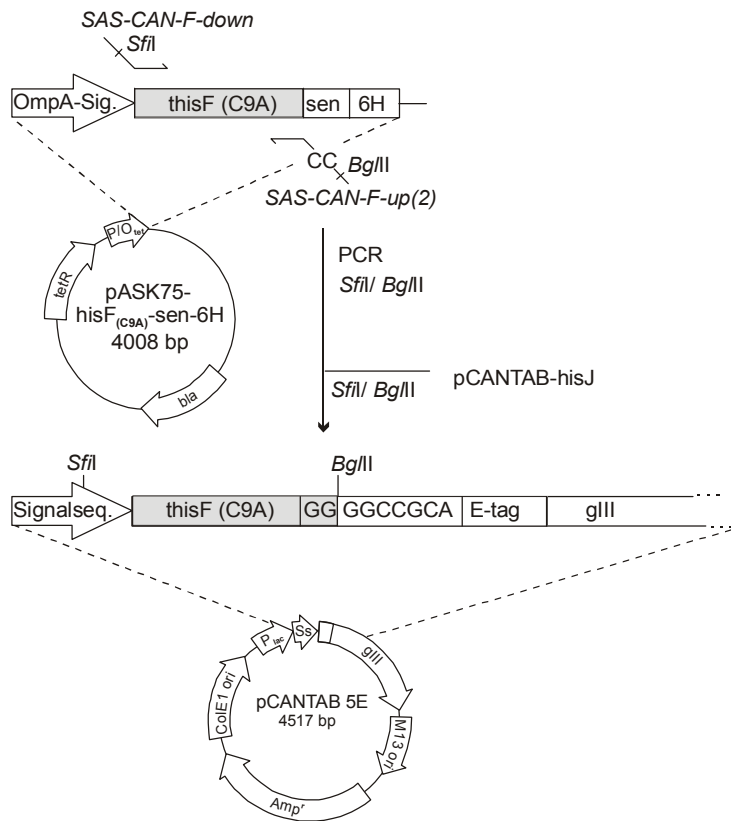


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Konstruktion der pCANTAB-hisF_(C9A)-Variante. Das *thisF* wurde über die pASK-ompA-*thisF*_(C9A)-6H-Matrize amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Bgl*II in den pCANTAB-Vektor ligiert. Die zwei zusätzlichen Basen hinter dem *thisF*-Gen halten das Gen für den Immunotag und das *gIII* im Leserahmen.

E. coli Zellen des Stammes TG1, der auch später zur Gewinnung der Phagen dienen sollte, wurden mit dem erhaltenen pCANTAB-*thisF*_(C9A)-Konstrukt transformiert (2.2.1.3) und auf (Amp50) ausgestrichen. Die Plasmid-DNA zweier auf der Platte gewachsener Klone wurde isoliert (2.2.2.1) und die Sequenz des *thisF*_(C9A) nach einer Analyse des Restriktionsmusters (2.2.2.5.1) über DNA-Sequenzanalyse (2.2.2.6) überprüft. In dem pCANTAB-Vektor steht das Fusionsgen unter Kontrolle des *lac*-Promotors, über Induktion mit IPTG (2.2.3.2) konnte demnach Protein produziert werden. Die periplasmatischen Proteinfraktionen wurden präpariert (2.2.3.3) und über SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.5) aufgetrennt. Im folgenden Western-Blot (2.2.3.6/2.2.3.7) fand sich jedoch wieder eine Doppelbande, die dem Protein mit prozessierter und unprozessierter Signalsequenz entsprach (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Kompatibilität der pCANTAB-Konstrukte mit dem ToxR-System

In dieser Abteilung wird das ToxR-System (Kolmar *et al.*, 1995) genutzt, um die Interaktion von Proteinen im Periplasma zu untersuchen. Für eine Arbeit, die aus diesem Projekt hervorgegangen ist, sollte eine Kompatibilität zwischen dem *phage display*- und dem ToxR-System geschaffen werden. Um einen einfachen Austausch der Genkassetten zu ermöglichen, mussten zwei Guanine zwischen dem *hisF*-Gen und der *Bgl*II-Schnittstelle entfernt werden, entsprechend musste dann durch eine weitere Deletion hinter der Schnittstelle das Einhalten des Leserahmens gewährleistet werden, wodurch

das Konstrukt gleichzeitig an den ursprünglichen Vektor der Firma Pharmacia angepasst wurde (Abbildung 3.6).

Das *hisF*-Gen wurde mit den Primern *SAS-CAN-F-down* und *Can-F-Umbau* aus dem pCANTAB-*thisF*_(C9A)-Konstrukt amplifiziert (2.2.2.5.5). Ebenso wurde der *E-tag* und ein Teil der *gIII*-Sequenz mit Hilfe der Primer *Can-a.F.down* und *Can-a.F.up* amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden nach einer Ethanol-fällung (2.2.2.3.1) nacheinander über die Schnittstellen *Sfi*I/*Bgl*II bzw. *Bgl*II/*Bsm*I in den mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen pCANTAB-Vektor ligiert (2.2.2.5.2). Die Sequenz wurde dann nach Plasmidminipräparation (2.2.2.1) und Analyse des Restriktionsmusters (2.2.2.5.1) über DNA-Sequenzierung (2.2.2.6) überprüft.

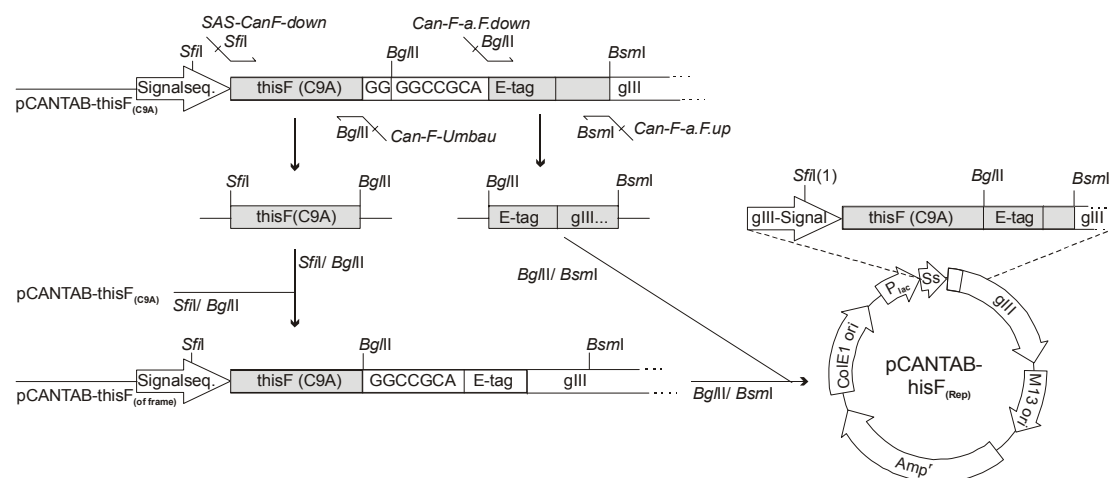


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Konstruktion der pCANTAB-*hisF*_(Rep)-Variante, die die Kompatibilität mit dem Tox-System gewährleistet und zur Adaption des Plasmids an den original pCANTAB-Vektor dient.

3.1.5 Test pCANTAB-*hisF*_(C9A)-Rep-Konstrukt zur Präsentation von tHisF auf M13-Phagen

Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, besitzen filamentöse Phagen wie M13 ein einzelsträngiges, ringförmiges Genom, das von einem langen Proteinzylinder umschlossen wird. Für die Präsentation von HisF auf Phagen werden *E. coli*-Zellen mit einem Plasmid transformiert, auf dem das *thisF*-Gen als Fusion mit dem *gIII* vorliegt, das für eines der Phagenhüllproteine codiert. Da die beiden Gene durch ein Amber-Stop-Codon getrennt werden, wird in einem Amber-Suppressor-Stamm wie z. B. TG1 das Fusionsprotein produziert. Sobald solche Zellen zusätzlich mit einem Helferphagen infiziert werden, der die restlichen Phagenproteine liefert, können Phagen gebildet werden, die neben dem wildtyp *gIII*-Protein auch das Fusionsprotein tragen und die damit das HisF auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Wird für die Expression der Genkassette auf dem Plasmid ein nicht-Amber-Suppressor-Stamm gewählt, so wird alleine das HisF-Protein produziert, das dann aufgrund der Signalsequenz im Periplasma lokalisiert ist.

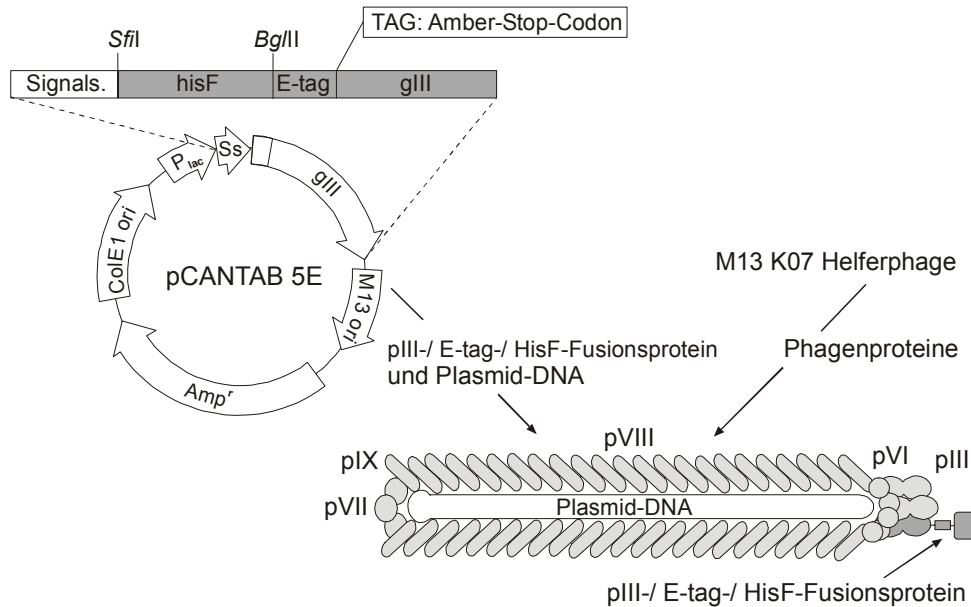


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des pCANTAB-5E-Vektorkonstruktes und des M13-Phagen mit präsentiertem Fusionsprotein. Der Vektor liefert das mit der Signalsequenz versehene Fusionsprotein, das zusammen mit den von dem Helferphagen gelieferten restlichen Phagenproteinen und der Plasmid-DNA zum vollständigen Phagen zusammengefügt wird.

Für den *assembling*-Prozess des Phagen ist es essentiell, dass das Protein, das auf der Phagen-Oberfläche präsentiert werden soll, in der Lage ist, die Cytoplasmamembran zu durchqueren. Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass weitere Faktoren, z. B. eine sperrige Struktur, das *assembling* behindern und damit die Präsentation eines translokierbaren Proteins erschweren oder unmöglich machen. Das Konstrukt pCANTAB-*hisF*_(C9A)-Rep wurde deshalb daraufhin getestet, ob sich mit seiner Hilfe das tHisF, trotz unvollständiger Prozessierung seiner Signalsequenz, erfolgreich auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentieren lässt. Zellen des *E. coli*-Amber-Suppressor-Stammes TG1 wurden mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (2.2.1.3), die Phagen präpariert (2.2.4.1.2), die Phagenproteine über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.3.5) und dann mittels Western-Blot mit monoklonalem anti-E-tag-Antikörper und alkalische Phosphatase gekoppeltem zweiten Antikörper untersucht (2.2.3.6/2.2.3.7). Nach der Farbreaktion konnte auf der Nitrozellulosemembran jedoch keine Bande, die dem tHisF-/E-tag-/gIIIp-Fusionsprotein entsprochen hätte, detektiert werden. Auch weitere Versuche tHisF-präsentierende Phagen über modifizierte Protokolle zur Phagenpräparation herzustellen (TB-Medium, Wachstum bei 30°C, kürzeres/längeres Wachstum, unterschiedliche Helferphagenkonzentrationen) blieben erfolglos.

3.1.6 Modifikation der Signalsequenz

Für eine Translokation durch die Cytoplasmamembran benötigen Proteine ein aminoterminaleres Signalpeptid, das meist aus 15-30 Aminosäuren besteht. Die ersten 5-8 Aminosäuren dieser Sequenz sind positiv geladen, ihnen folgt ein hydrophobes *core* und schließlich 5-8 eher polare Aminosäuren, die die Schnittstelle der *leader*-Peptidase bilden. An den Positionen -1 und -3 (von der Schnittstelle aus gesehen) finden sich meist Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie z. B. Alanin. Sämtliche theoretischen Voraussetzungen für einen erfolgreichen Transport werden von der gIIIp-Signalsequenz des pCANTAB-Vektors erfüllt, trotzdem konnte das tHisF weder vollständig oder an einer definierten Stelle prozessiert noch auf der Phagenoberfläche detektiert werden.

Es fanden sich allerdings Hinweise in der Literatur, dass nicht nur die Signalsequenz sondern auch die eigentliche Sequenz des Proteins einen Einfluss auf die Translokation haben kann.

So wurde z. B. der Anfang der Proteinsequenz des PhoA mutiert, um die Auswirkung einer Änderung seiner Nettoladung zu untersuchen. Während die ersten fünf Aminosäuren des gut translokierbaren Wildtyp-Proteins eine Nettoladung von null aufweisen, wurde der Transport durch die Cytoplasmamembran durch eine Zunahme an positiven Ladungen stark behindert (Li *et al.*, 1988).

In einer anderen Arbeitsgruppe wurde die Triosephosphat-Isomerase aus dem Hühnermuskel an die Signalsequenz der β -Laktamase fusioniert – eine Sekretion in das Periplasma von *E. coli* konnte nicht nachgewiesen werden. Erst nachdem die Nettoladung der ersten Aminosäuren durch einen Austausch gegen neutrale Reste verringert wurde, konnte das Protein erfolgreich durch die Cytoplasmamembran translokiert werden (Summers *et al.*, 1989).

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass eine hohe positive Nettoladung der ersten Aminosäuren des zu sekretierenden Proteins die Translokation durch die Cytoplasmamembran behindern kann. Betrachtet man den Beginn der tHisF-Sequenz, findet man an Position drei und vier die ebenfalls positiven Aminosäuren Lysin und Arginin. Um den Abstand dieser positiven Ladungen zur Prozessierungs-Stelle zu erhöhen, wurde, wie man in Abbildung 3.8 erkennen kann, eine Sequenz aus den fünf Aminosäuren AETTG eingefügt. Die ersten drei Aminosäuren entsprechen denen des gIII-Proteins, wobei das Glutamat zusätzlich eine negative Ladung bereitstellt. Die letzten beiden Aminosäuren korrespondieren mit der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *AgeI*, dem einzigen, das eine unique Schnittstelle im pCANTAB-hisF_(C9A)-Vektor besitzt, welche nicht gleichzeitig für positiv geladene Aminosäuren kodiert.

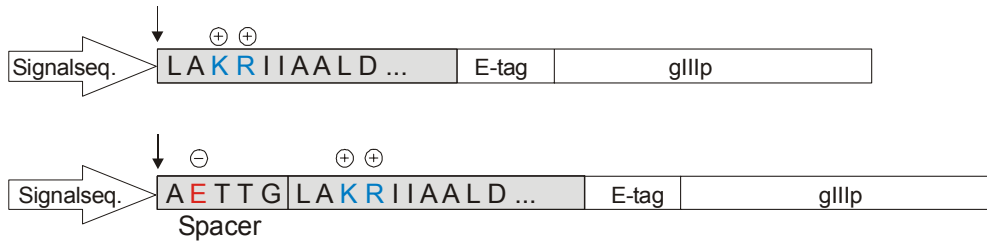


Abbildung 3.8: Modifikation des tHisF-Aminoterminus. Zwischen der Signalsequenz und dem tHisF wurde ein negativ geladener AETT_G-Spacer eingefügt, um den Abstand zwischen der Prozessierungsstelle der *leader*-Peptidase und der positiven Nettoladung am Anfang des tHisF zu erhöhen bzw. um die positive Ladung teilweise zu kompensieren.

3.1.6.1 Konstruktion der pCANTAB-hisF_(Spacer)-Variante

Für die Klonierung wurde, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, das hisF_(C9A) aus dem Vektor pCANTAB-hisF_(C9A)-Rep mit den Primern *Can-F-Spacer* und *Can-F-Umbau* amplifiziert (2.2.2.5.5). Der Primer *Can-F-Spacer* trägt die Information für die zusätzliche AETT_G-Sequenz zwischen dem Signalpeptid und dem eigentlichen tHisF. Das PCR-Produkt wurde mit Ethanol gefällt (2.2.2.3.1) und über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Bgl*II in den Vektor pCANTAB-hisF_(C9A)-Rep ligiert. Nach Plasmidpräparation (2.2.2.1) und Restriktionsanalyse (2.2.2.5.1) wurde die Sequenz des erhaltenen Konstrukts pCANTAB-hisF_(Spacer) über DNA-Sequenzanalyse (2.2.2.6) überprüft.

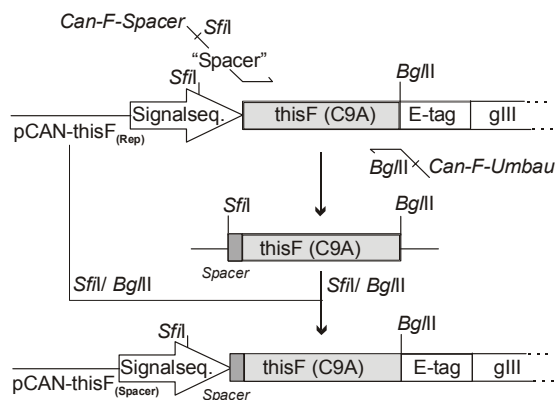


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Konstruktion der pCANTAB-hisF_(Spacer)-Variante. Der *upstream*-Primer trägt die Information für die zusätzliche AETT_G-Sequenz zwischen dem Signalpeptid und dem eigentlichen tHisF. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Bgl*II in den Vektor pCANTAB-hisF_(C9A)-Rep ligiert.

3.1.6.2 Test des pCANTAB-hisF(Spacer)-Konstrukts auf Präsentation von tHisF auf M13-Phagen

Es wurde nun getestet, ob der zusätzliche Spacer eine Präsentation des Fusionsproteins auf den Phagen ermöglicht. Dazu wurden Zellen des *E. coli*-Stammes TG1 mit dem Vektor pCANTAB-hisF_(Spacer) transformiert. Die Proteine der aus diesen Zellen präparierten Phagen wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.2.3.5) und mittels Western-Blot-Analyse (2.2.3.6/2.2.3.7) auf Anwesenheit des tHisF-/E-tag-/gIIIp-Fusionsproteins getestet. Wie in Abbildung 3.10 zu sehen ist, ließen sich nun mit dem

anti-HisF-Antikörperserum und dem anti-E-*tag*-Antikörper spezifische Banden für das Fusionsprotein detektieren. Zum Vergleich wurden Phagen, die Hirudin präsentierten und die ebenfalls aus TG1-Zellen gewonnen wurden, mit auf das Gel aufgetragen.

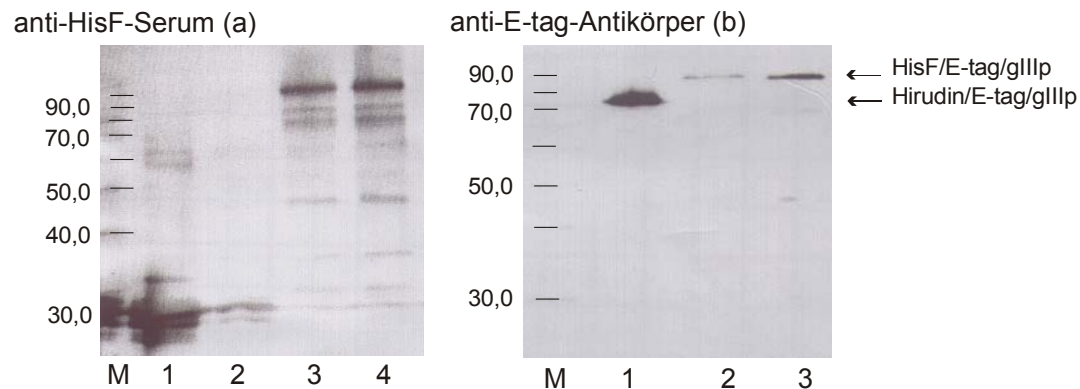


Abbildung 3.10: Immunochemischer Nachweis des gIIIp-Fusionsproteins von Hirudin- bzw. tHisF-präsentierenden Phagen.

(a) Detektion mit anti-tHisF-Kaninchenserum

(b) Detektion mit anti-E-tag-Antikörper

M: 10 kDa-Leiter; Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)

1.: periplasmatisches tHisF (Positivkontrolle)

2.: Hirudin-Phagen; 5×10^{-11} pfu

3.: HisF-Phagen; 3×10^{-11} pfu

4.: HisF-Phagen; 7×10^{-11} pfu

M: 10 kDa-Leiter; Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)

1.: Hirudin-Phagen; 5×10^{-11} pfu

2.: HisF-Phagen; 3×10^{-11} pfu

3.: HisF-Phagen; 7×10^{-11} pfu

M_r Hirudin/E-tag/gIIIp: 53 000 (läuft bei ca. 62 000-78 000)
tHisF/E-tag/gIIIp: 73 900 (läuft bei ca. 90 000 -100 000)

Für das tHisF-/E-tag-/gIIIp-Fusionsprotein konnte eine Bande detektiert werden, die einem Molekulargewicht von ca. 90 000- 100 000 entspricht; der errechnete Wert liegt jedoch bei einem M_r von ca. 74 000. Es ist jedoch bekannt, dass die Banden von Proteinen, die als Fusion mit dem gIII-Protein vorliegen, aufgrund des hohen Glycingehalts dieses Proteins langsamer sind, als für eine Bande eines Protein mit einem entsprechenden errechneten Wert zu erwarten wäre (NEB-Informationseite). Um dennoch sicher zu gehen, dass keine Duplikationen o. ä. stattgefunden haben, wurde das Plasmid über eine Restriktionsanalyse (2.2.2.5.1) und Agarosegelelektrophorese (2.2.2.7) untersucht. Abbildung 3.11 zeigt die Restriktionsanalyse und das Schema der verwendeten Schnittstellen des pCANTAB-hisF_(spacer)-Vektors.

Darüber hinaus kann man erkennen, dass sich im Gegensatz zu Hirudin-präsentierenden Phagen die tHisF-präsentierenden Phagen nur schlecht mit dem anti-E-tag-Antikörper nachweisen lassen; vermutlich behindert das relativ große und kompakte $(\beta\alpha)_8$ -barrel die Bindung des Antikörpers an den E-*tag*, der zwischen gIII-Protein und präsentiertem Protein liegt.

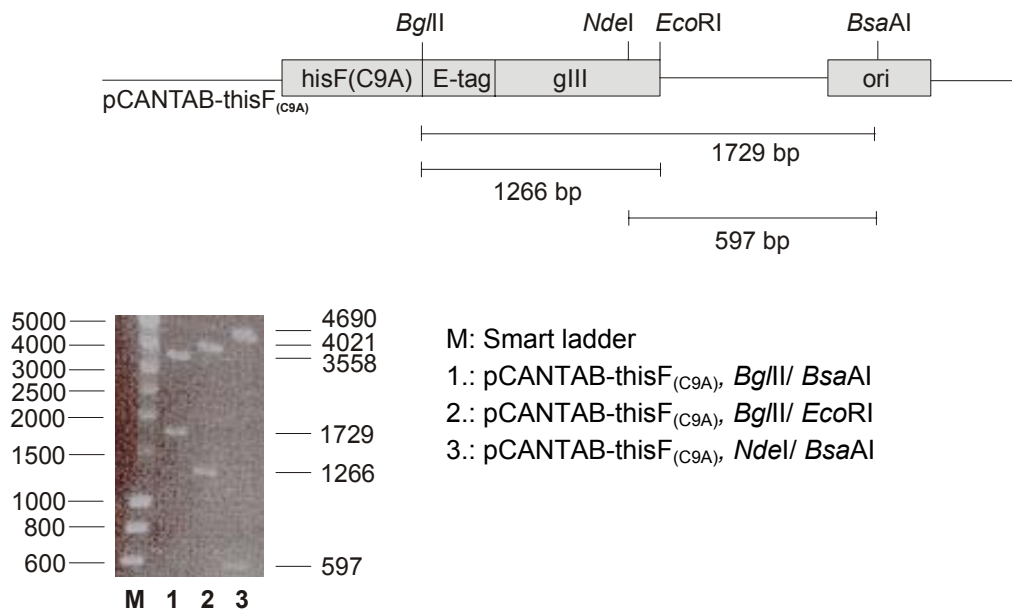


Abbildung 3.11: Restriktionsanalyse des pCANTAB-thisF_(Spacer). Wie in dem oben gezeigten Schema zu erkennen ist, wurde der Vektor mit *Bgl*III/*Bsa*AI, *Bgl*III/*Eco*RI und *Nde*I/*Bsa*AI gespalten. Die Längen sämtlicher beobachteter Restriktionsprodukte stimmen mit den erwarteten Werten überein.

Es zeigte sich, dass die Längen sämtlicher erhaltener Genfragmente mit den erwarteten Werten übereinstimmten; es fanden also keine Gen-Duplikationen oder ähnliche Ereignisse statt.

3.1.7 *Panning* eines HisF-/Hirudinphagengemisches gegen anti-tHisF-Antikörperserum

Aufgrund der Ergebnisse der Western-Blot-Analysen aus Abschnitt 3.1.6.2 kann davon ausgegangen werden, dass das tHisF auf den M13-Phagen präsentiert werden kann. Um zu überprüfen, ob es auch für eine Selektion mittels *phage display* geeignet ist, wurden tHisF- und Hirudinphagen im Verhältnis 1: 10 000 gemischt und versucht, tHisF-präsentierende Phagen über Bindung an anti-tHisF-Antikörperserum anzureichern. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, wurde eine feste Matrix (Polystyrol-Röhrchen) mit dem anti-tHisF-Antikörperserum beschichtet und nachfolgend mit dem Phagengemisch inkubiert. Nachdem die nicht-bindenden Phagen über einen Waschschritt entfernt wurden, konnten die gebundenen Phagen mittels einer Ethylaminlösung eluiert und für eine erneute Infektion von TG1-Zellen verwendet werden. Unter den aus diesen Zellen isolierten Phagen sollte sich ein höherer Anteil an Bindern und damit tHisF-präsentierenden Phagen befinden. Eine detaillierte Beschreibung des *panning*-Prozesses findet sich in Abschnitt 2.2.4.5.

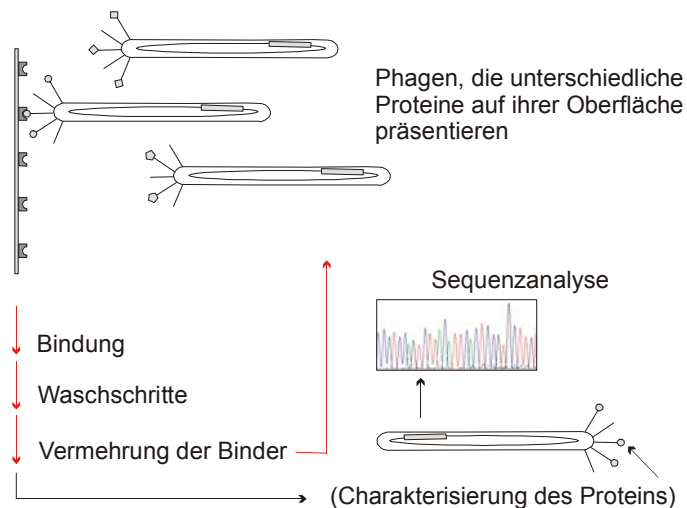


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des *panning*-Prozesses. tHisF-präsentierende Phagen binden an das, an einer Polystyrol-Matrix immobilisierte, anti-HisF-Antikörperserum und können nach einem Waschschrötte eluiert und entweder analysiert oder erneut selektiert werden.

Das tHisF- und Hirudinphagengemisch wurden nach dem oben beschriebenen Schema für vier Runden *panning* eingesetzt. Der Phagentiter der gebundenen und nicht gebundenen Phagen wurde nach jeder Runde bestimmt, so dass aus den erhaltenen Werten, wie in Tabelle 3.2 dargestellt, das Verhältnis der nicht gebundenen zu den gebundenen Phagen und der daraus resultierende Anreicherungsfaktor bestimmt werden konnte:

<i>panning</i> -Runde	gebundene Phagen	ungebundene Phagen	ungebundene/gebundenen Phagen	Anreicherungsfaktor
1	$1,2 \times 10^6$	$4,0 \times 10^{12}$	$4,0 \times 10^6$	80
2	$2,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{13}$	$5,0 \times 10^4$	26
3	$7,9 \times 10^8$	$1,5 \times 10^{12}$	$1,9 \times 10^3$	4,1
4	$3,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{12}$	$4,6 \times 10^2$	
				gesamt: 8320

Tabelle 3.2: Anreicherung von tHisF-präsentierenden Phagen aus einem Hirudin-tHisF-Phagengemisch über Bindung an anti-tHisF-Antikörperserum. Eingesetzte Phagenmenge/Runde: 5×10^{12} pfu.

Man kann erkennen, dass sich der Anteil der gebundenen Phagen mit jeder Runde erhöht hat. Der Anteil der ungebundenen zu den gebundenen Phagen betrug nach der ersten *panning*-Runde allerdings nur ca. 10^6 ; bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 läge der erwartete Wert bei ca. 10^4 . Diese Diskrepanz könnte verschiedene Ursachen haben, z. B. könnte die Menge des immobilisierten Antikörpers zu gering gewesen sein, ebenso könnte nur ein Teil des HisF in einer korrekt gefalteten Form vorliegen. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass nur ein Teil der eingesetzten HisF-Phagen auch tatsächlich ein Fusionsprotein trug (siehe auch Abschnitt 3.1.9.3). Dennoch konnten die bindenden und deshalb voraussichtlich tHisF-präsentierenden Phagen mit einem Faktor von 8 320 über vier Runden *panning* angereichert werden.

3.1.8 Nachweis einer Anreicherung von tHisF-Phagen über *panning* mittels

Western-Blot-Analyse

Um die Annahme zu überprüfen, dass es sich bei den angereicherten Bindern tatsächlich um tHisF-präsentierende Phagen handelte, wurden die Proteine der nach jeder *panning*-Runde isolierten Phagen über SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.5) aufgetrennt und, wie in Abbildung 3.13 dargestellt, über Western-Blot (2.2.3.6/2.2.3.7) und Detektion mit anti-HisF-Serum bzw. anti-E-tag-Antikörper analysiert:

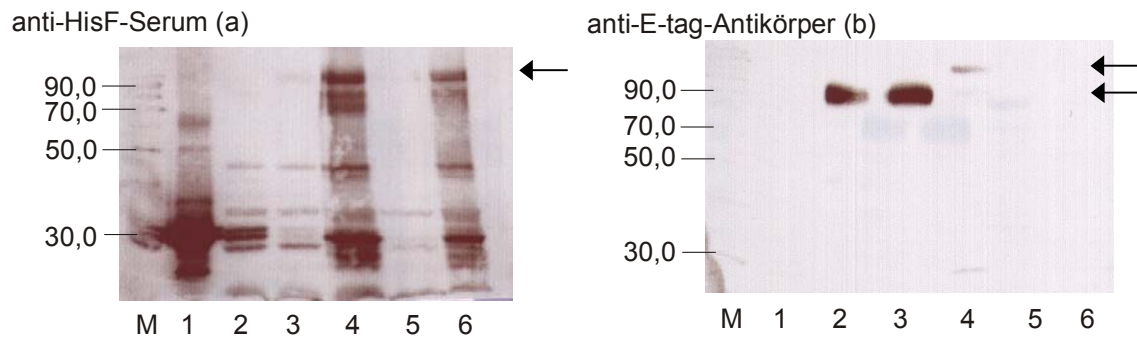


Abbildung 3.13: Immunochemischer Nachweis mittels anti-E-tag-Antikörper bzw. anti-tHisF-Kaninchenserum von Hirudin bzw. tHisF-gIIIp-Fusionsprotein nach verschiedenen Runden des *panning* der 1: 10 000 mit Hirudin-Phagen verdünnten HisF-Phagen gegen das anti-HisF-Antikörperserum. Die Pfeile markieren die Höhe für die Banden von HisF- (oberer Pfeil) bzw. Hirudin- (unterer Pfeil) Fusionsprotein.

(a) Detektion mit anti-tHisF-Kaninchenserum

(b) Detektion mit anti-E-tag-Antikörper

M: 10 kDa-Leiter; Molekulargewichtsstandard (M, $\times 10^{-3}$)
 1.: periplasmatisches tHisF (Positivkontrolle)
 2.: tHisF-/ Hirudinphagen 1: 10 000
 3.: Runde (1); 4.: Runde (2); 5.: Runde (3); 6.: Runde (4)
 (je 5×10^{10} - 2×10^{11} pfu)

M: 10 kDa-Leiter; Molekulargewichtsstandard (M, $\times 10^{-3}$)
 1.: periplasmatisches tHisF (Negativkontrolle)
 2.: tHisF-/ Hirudinphagen 1: 10 000
 3.: Runde (1); 4.: Runde (2); 5.: Runde (3); 6.: Runde (4)
 (je 5×10^{10} - 2×10^{11} pfu)

In den Spuren mit den Phagen aus dem Startgemisch (tHisF-/Hirudinphagen; 1: 10 000) und den Phagen nach der ersten *panning*-Runde, kann man Banden in der für das Hirudin-/E-tag/gIIIp-Fusionsprotein erwarteten Höhe erkennen. In den folgenden Spuren wird diese Bande von der Bande, die der für das tHisF-/E-tag/gIIIp-Fusionsprotein entspricht, abgelöst. Im weiteren Verlauf des *panning* scheint dann der Anteil von HisF-präsentierenden Phagen zurückzugehen, da mit höheren *panning*-Runden auch weitere Effekte als nur eine Selektion auf Bindung an den Antikörper (z. B. Selektion auf „Plastik-Binder“, die reich an aromatischen Resten sind) zum tragen kommen.

Man kann zusätzlich erkennen, dass sich, wie in Abschnitt 3.1.6.2 beschrieben, das tHisF-Fusionsprotein im Gegensatz zu Hirudin/gIIIp-Fusionen schlechter mit dem anti-E-tag-Antikörper detektieren lässt.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem mit dem anti-HisF-Serum detektierten tHisF um vollständiges Protein und nicht z. B. um verkürzte Varianten handelt, wurden Klone von TG1-Zellen, die mit den Phagen der vierten *panning*-Runde infiziert worden waren, mittels *insert screen* (2.2.2.5.8) untersucht, wobei Primer verwendet wurden, die am Anfang und am Ende des Gens hybridisierten (*Oligo VB01* und *Oligo VB 38*). Es traten ausschließlich PCR-Produkte auf, die der Größe des *thisF*-Gens entsprachen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die tHisF-präsentierenden Phagen durch *panning* gegen anti-tHisF-Antikörperserum anreichern lassen, während die Konzentration der Hirudin-Phagen abnimmt.

3.1.9 Enzymatische Aktivität von tHisF-präsentierenden M13-Phagen

Um nachzuweisen, dass das tHisF trotz Translokation durch die Cytoplasmamembran und nachfolgender Präsentation auf der Phagenoberfläche korrekt gefaltet und damit funktionsfähig ist, wurde die HisF-Aktivität von tHisF-präsentierenden Phagen untersucht.

3.1.9.1 Aufreinigung der tHisF-Phagen über Sucrosegradienten

In dem Pharmacia-Vektor pCANTAB 5 E ist das *thisF*-Gen über ein Amber-Stop-Codon mit dem Gen für das gIII-Hüllprotein verbunden (siehe Abbildung 3.7). In einem Amber-Suppressor-Stamm, der eine mutierte tRNA trägt, die in der Lage ist, an das Terminations-Codon UAG zu binden, kann so das Fusionsprotein produziert und in den Phagen eingebaut werden. Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stamm TG1 besitzt den *supE*-Phänotyp, bei dem für ein Amber-Codon die Aminosäure Glutamin eingebaut wird. Die Effizienz dieser Suppression liegt jedoch, abhängig von der Sequenzumgebung, nur bei 0,8-20% (Miller, 1992) – es entsteht also neben dem Fusionsprotein auch freies tHisF.

In Western-Blot-Analysen von Phagenpräparationen kann man dementsprechend eine deutliche Bande auf der Höhe des freien tHisF (M_r ca. 30 000) erkennen (Abschnitt 3.1.6.2), darüber hinaus besitzen die *E. coli* Wirtszellen eine eigene HisF-Aktivität. Um bei einem Test der Phagen auf HisF-Aktivität auszuschließen, dass die Enzymaktivität durch freies tHisF aus der Präparation und nicht durch die tHisF-präsentierenden Phagen selbst verursacht wurde, wurden die Phagen über Sucrosegradienten aufgereinigt (2.2.4.2). Die relative Menge an Phagen in den einzelnen Fraktionen wurde über deren Absorption bei 260 nm bestimmt. Von den Fraktionen, in denen sich ausreichend Phagen befanden, wurde der Titer bestimmt (2.2.4.3.1) und die Reinheit der Phagen, wie es in Abbildung 3.14 anhand einiger Fraktionen beispielhaft dargestellt ist, über Western-Blot analysiert (2.2.3.6/2.2.3.7).

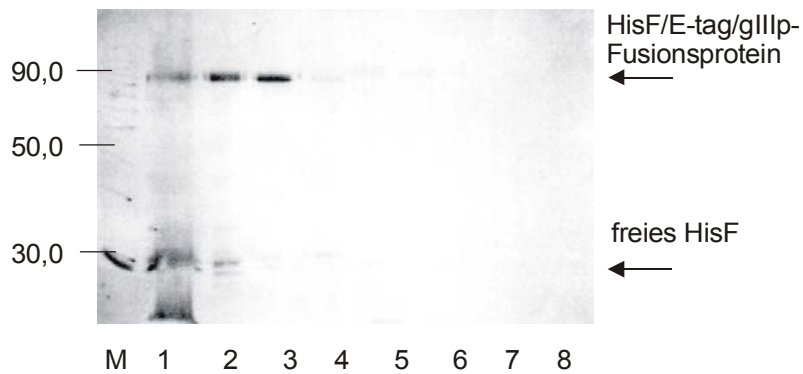


Abbildung 3.14: Immunochemischer Nachweis von tHisF-gIIIp-Fusionsprotein nach Reinigung über Sucroседichte-gradientenzentrifugation.

Detektion mit anti-tHisF-

M: 10 kDa-Leiter; Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)

Phagen aus TG1-Zellen: 1.: ungereinigt; 2.: Fraktion (4); 3.: Fraktion (20); 4.: Fraktion (30)

Phagen aus WK6-Zellen: 5.: ungereinigt; 6.: Fraktion (2); 7.: Fraktion (10); 8.: Fraktion (15)

(je ca. $2,9 \times 10^{10}$ pfu)

Unerwarteterweise fand sich die Doppelbande für prozessiertes und unprozessiertes freies tHisF in den Fraktionen mit höherer Dichte, u. U. kann es sich dabei um präzipitiertes Protein handeln. Da sich aber in den darauffolgenden Fraktionen keine weiteren Banden neben der Bande für das Fusionsprotein zeigten, wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt, die Phagen über PEG-Fällung einkonzentriert (2.2.4.1.2) und damit gleichzeitig von der Saccharose befreit. Die so gereinigten Phagen wurden erneut über Western-Blot-Analyse untersucht. In der Abbildung 3.15 kann man erkennen, dass sich in der Phagenpräparation ohne anschließenden Sucrosegradienten neben der Bande für das Fusionsprotein (M_r von ca. 90 000) auch noch ein Schmier und eine Doppelbande auf der Höhe des freien Proteins (mit und ohne Signalsequenz; Höhe bei M_r von ca. 32 000 bzw. 29 000) fand; die gereinigten Phagen verursachten eine einzelne Bande für das Fusionsprotein:

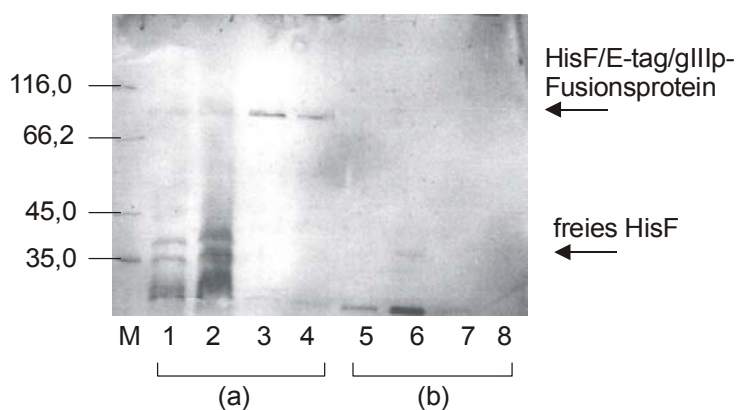


Abbildung 3.15: Immunochemischer Nachweis von tHisF-gIIIp-Fusionsprotein nach Reinigung der Phagen über Sucroседichte-gradientenzentrifugation und anschließender PEG-Fällung.

Detektion mit anti-tHisF-Kaninchenserum

M: Protein Molecular Weight Marker (MBI); Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)

(a) Phagen aus TG1-Zellen: 1./2.: ungereinigt; 3./4.: vereinigte, gefällte Fraktionen.

(b) Phagen aus WK6-Zellen: 5./6.: ungereinigt; 7./8.: vereinigte, gefällte Fraktionen.

(je ca. $5,8 \times 10^9$ pfu)

Um zusätzlich auszuschließen, dass verschlepptes tHisF aus den Phagenpräparationen den HisF-Aktivitätsassay beeinflussen konnte, wurden als Negativkontrolle für den Assay Phagen verwendet, die aus dem Nicht-Amber-Suppressor-Stamm WK6 gewonnen wurden, der ebenfalls mit dem pCANTAB-hisF_(spacer)-Konstrukt transformiert wurde. In diesem Stamm können zwar Phagen produziert werden, aber statt eines Fusionsproteins wird nur freies tHisF gebildet. In Western-Blot-Analysen der entsprechenden Phagenpräparationen aus dem WK6-Stamm konnte man, bei Titern, die denen der Phagen aus den TG1-Zellen entsprachen, bis auf schwache Banden auf Höhe des freien tHisF, keine weiteren Banden erkennen; nach einem Saccharosegradienten, der auf die Präparation folgte (2.2.4.2), ließen sich dann bei gleicher aufgetragener Phagenmenge keine Banden mehr detektieren (siehe Abbildung 3.15).

3.1.9.2 HisF-Aktivitätsassays

Wie in Abschnitt 3.1.1 bereits dargestellt, lässt sich die enzymatische Aktivität des HisF über einen photometrischen Assay ermitteln, indem die Abnahme der Lichtabsorption bei 300 nm gemessen wird, die durch die Spaltung von PRFAR durch das HisF verursacht wird (2.2.3.9).

Um die Aktivität der tHisF präsentierenden Phagen zu bestimmen, wurde in dem Messansatz das wildtyp-tHisF durch tHisF-Phagen ersetzt. Nach Erreichen einer konstanten Basislinie wurde die Reaktion dann durch Zugabe von tHisA gestartet. In der Referenzküvette befanden sich die Phagen, die in dem WK6-Stamm produziert wurden und die demnach kein Fusionsprotein präsentierten; auch hier wurde tHisA zugegeben.

Um in Meß- und Referenzküvette eine äquivalente Phagenkonzentration zu gewährleisten, wurde die Konzentration der infektiösen Phagenpartikel in den gereinigten Phagenpräparationen als pfu/ml ermittelt (*plaque forming units*; 2.2.4.3.1). Sowohl in Mess- als auch Referenzküvette wurden jeweils $7,6 \times 10^{12}$ pfu eingesetzt, was einer Konzentration von 15,8 nM an Phagen entsprach. Es ist bekannt, dass, abhängig von präsentiertem Protein und Expressionssystem, nicht alle Phagen ein Fusionsprotein tragen. Nimmt man an, dass z. B. nur jeder fünfte Phage ein Protein präsentiert, waren in dem Ansatz schätzungsweise 3 nM HisF enthalten; eine Konzentration, die als gerade noch messbar gilt (AG Sterner, persönliche Kommunikation).

Um zu überprüfen, ob die Infektiösität der Phagen, die zur Bestimmung der pfu dient, tatsächlich mit der Phagenmenge korrelierte, wurde die Phagenkonzentration zusätzlich über die Absorption bestimmt (2.2.4.3.2). Nach dieser Methode betrug die Konzentration der Phagenpartikel in der Messküvette $3,5 \times 10^{13}$ /ml (bei $1,9 \times 10^{13}$ pfu/ml) und in der Referenzküvette $4,8 \times 10^{13}$ /ml (bei $1,9 \times 10^{13}$ pfu/ml). Es lag also allenfalls ein leichter Überschuss an Phagen in der Referenzküvette vor.

Wie in Abbildung 3.16 gezeigt, wurde der HisF-Assay zuerst mit dem Substrat 5'-ProFAR und sämtlichen verwendeten Enzymen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes aktiv waren. Sowohl die Messküvette, als auch die Referenzküvette enthielt tHisF. Die Reaktion wurde durch Zugabe von tHisA in die Messküvette gestartet, während in die Referenzküvette statt des tHisA eine entsprechende Menge Puffer gegeben wurde.

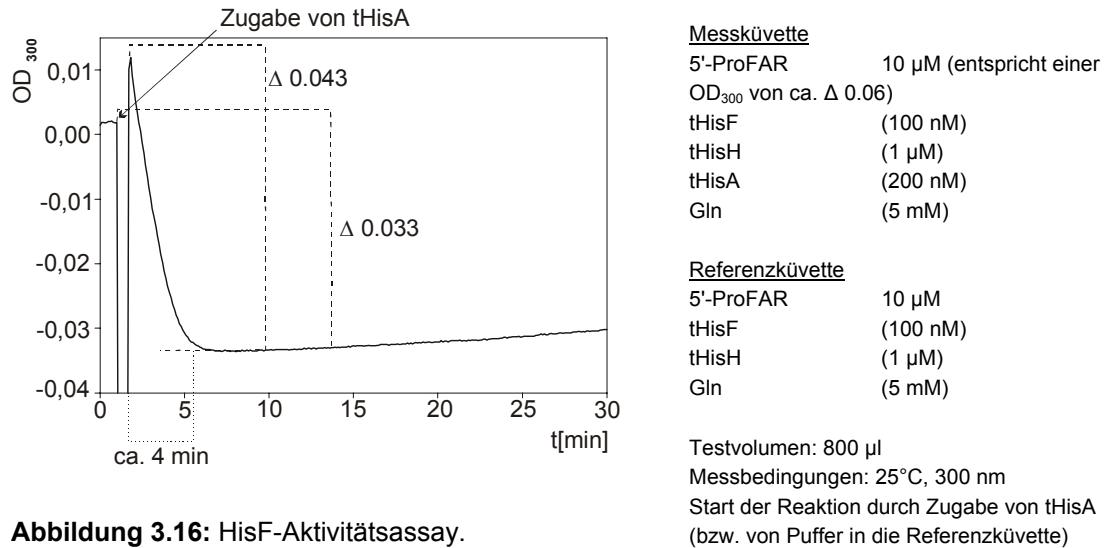


Abbildung 3.16: HisF-Aktivitätsassay.
Test des 5'-ProFARs und der verwendeten Enzyme.

Man kann erkennen, dass bei dem Test der einzelnen Komponenten die OD₃₀₀ im Laufe der Reaktion abnahm – das Substrat wurde demnach abgebaut, woraus man schließen kann, dass alle Bestandteile des Assays funktionsfähig waren.

In Abbildung 3.17 sieht man den Assay auf Aktivität der tHisF-präsentierenden Phagen. Die Küvette enthielt anstelle von rekombinantem tHisF gereinigte tHisF-präsentierende Phagen. Die Reaktion wurde wiederum durch Zugabe von tHisA gestartet. In die Referenzküvette wurde ebenfalls tHisA gegeben.

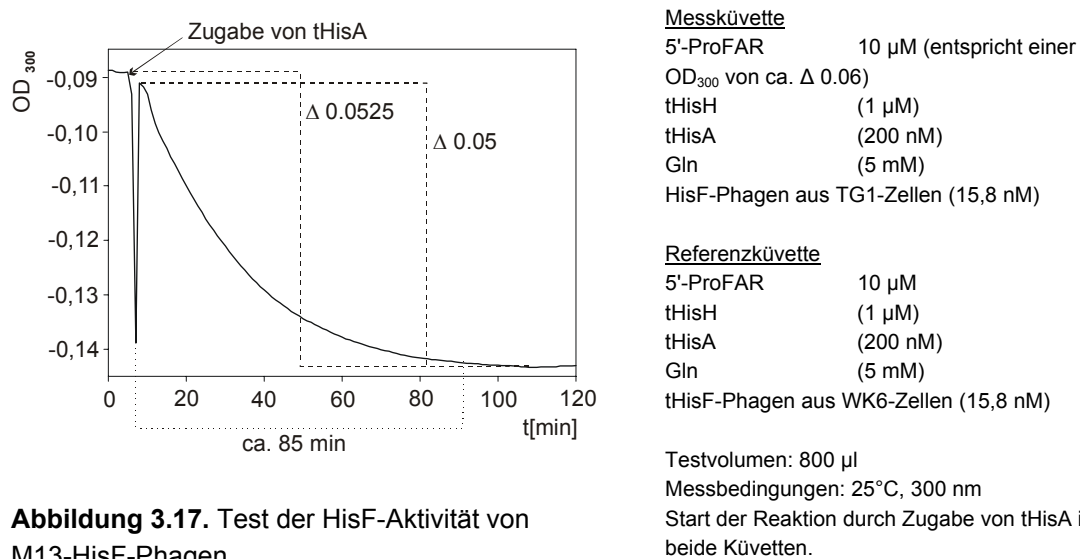


Abbildung 3.17. Test der HisF-Aktivität von M13-HisF-Phagen.

Relativ zur Referenzküvette kam es, wie in dem Assay in Abbildung 3.17 gezeigt, zu einer Abnahme der OD_{300} , woraus man schließen kann, dass die tHisF-Phagen, im Gegensatz zu den gleichbehandelten Phagen aus den WK6-Zellen, HisF-Aktivität aufwiesen. Die Reaktion benötigte jedoch mit ca. 85 min bedeutend länger im Vergleich zu der Reaktion mit freiem tHisF, bis das Substrat vollständig umgesetzt worden war. Dieses Ergebnis ist aber nicht weiter verwunderlich, da die Konzentration der Phagen um ein vielfaches geringer ist als die des eingesetzten freien tHisF.

Nach der Reaktion wurde rekombinantes tHisF in die Meßküvette gegeben (Abbildung 3.18), wodurch die OD_{300} sich nur noch geringfügig veränderte:

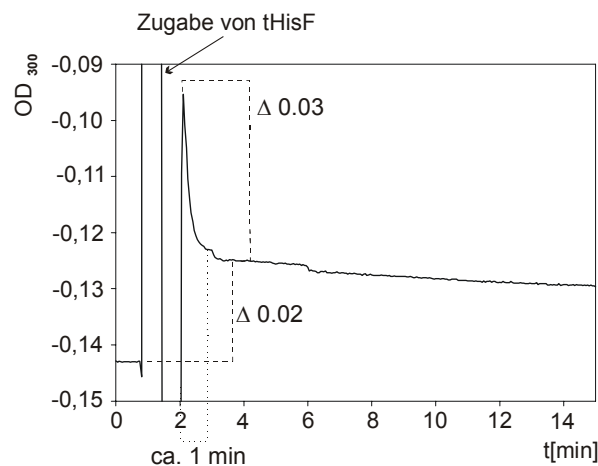


Abbildung 3.18: Test auf verbliebenes 5'-ProFAR in der Messküvette.

Messküvette: tHisF (100 nM)
Kontrollküvette: entsprechende Menge an Puffer
Messbedingungen: 25°C, 300 nm

Man kann aus diesem Ergebnis schließen, dass nahezu das gesamte 5'-ProFAR durch die Aktivität von rekombinatem tHisA und den tHisF-präsentierenden M13-Phagen umgesetzt wurde. Die leichte Änderung der Absorption lässt sich durch Messungenauigkeiten, die durch das Herausnehmen der Küvetten, der Zugabe des tHisF und dem Mischen verursacht wurden erklären. Wie man in Abbildung 3.19 sehen kann, wurde anschließend tHisF in die Referenzküvette gegeben, um zu testen, ob die Phagenpräparation aus den WK6-Zellen doch HisF-Aktivität besaß.

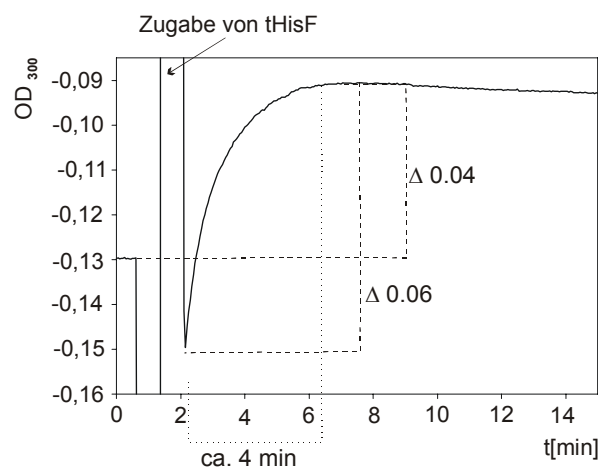


Abbildung 3.19: Test auf verbliebenes 5'-ProFAR in der Kontrollküvette.

Meßküvette: entsprechende Menge an Puffer
Kontrollküvette: tHisF (100 nM)
Meßbedingungen: 25°C, 300 nm

Man kann erkennen, dass die OD_{300} zunimmt. Da die Absorption über die Mess- und nicht über die Referenzküvette gemessen wurde, entspricht dies einer Abnahme der OD_{300} in der Referenzküvette. Darüber hinaus entspricht eine Differenz der OD_{300} von 0,06 der eingesetzten 5'-ProFAR-Konzentration von $10 \mu\text{M}$, so dass man schlussfolgern kann, dass es während des Aktivitätsassays mit den HisF-Phagen nicht nur zu einer relativen Abnahme der OD_{300} kam, sondern dass die Phagen aus den WK6-Zellen im Gegensatz zu denen aus den TG1-Zellen tatsächlich keinerlei tHisF-Aktivität besaßen, da in der Referenzküvette das Substrat durch die Phagen nicht abgebaut werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das auf den Phagen präsentierte tHisF aktiv war. Weder die Translokation, noch die Fusion an das gIII-Protein scheinen mit seiner enzymatischen Aktivität interferiert zu haben.

3.1.9.3 Anteil der tHisF-präsentierenden Phagen an der Phagengesamtmenge

Aus der Abnahme der OD_{300} , die durch die Spaltung von 5'-ProFAR durch tHisA und tHisF-präsentierende Phagen verursacht wurde, konnte der Anteil der Phagen, die korrekt gefaltetes und funktionstüchtiges tHisF präsentierten, ermittelt werden.

Aus der erhaltenen Umsatzkurve (Abbildung 3.17), lässt sich die Menge des umgesetzten Substrates sowie die Zeit, die für die Reaktion notwendig war, ablesen; aus diesen Werten konnte v_{max} berechnet werden. Über den bekannten k_{cat} (tHisF_C9A: $k_{\text{cat}} = 1,8 [1/\text{s}]$; Silke Beismann-Driemeyer, persönliche Kommunikation) konnte dann die Enzymkonzentration berechnet werden (2.2.4.4).

Aus der Rechnung ergab sich, dass gut jeder 15. Phage im Ansatz ein tHisF trug. Es ist bekannt, dass der Anteil an Phagen, die ein präsentierte Protein tragen, mit der Art des Proteins, dem Expressionssystem und auch der Methode zum Nachweis der Präsentation von 1,5% (Saggio *et al.*, 1995) bis beispielsweise 30% (Verhaert *et al.*, 1999) variiert.

3.1.10 Zusammenfassung

In diesem Projekt sollte eine Bibliothek aus teilweise randomisierten tHisF-Varianten auf der Oberfläche von M13-Phagen präsentiert werden. Dazu musste zuerst gezeigt werden, dass sich das Protein selbst auf den Phagen präsentieren lässt und für eine Selektion mittels *phage display* verwendet werden kann.

Nachdem das tHisF auf genetischer Ebene zwischen eine Signalsequenz und das Hüllprotein gIIIp des Phagen M13 fusioniert worden war und zusätzlich die Nettoladung seines Aminoterminus verringert wurde, konnte es auf der Phagenoberfläche nachgewiesen werden.

Der Einbau des tHisF/gIIIp-Fusionsproteins in die M13-Phagenpartikel konnte gezeigt werden, indem die Proteine der entsprechenden isolierten Phagen über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden und das Fusionsprotein im Western-Blot mit einem HisF-spezifischen Antikörperserum detektiert werden konnte.

Über einen HisF-Aktivitätsassay, in dem anstatt des tHisF-Proteins gereinigte tHisF-präsentierende Phagen eingesetzt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass das präsentierte tHisF aktiv war. Eine Kontrolle mit Phagen, die aus Wirtszellen eines Nicht-Amber-Supressor-Stammes gewonnen wurden, zeigte, dass diese Aktivität weder von dem vom pCANTAB-Vektor produzierten freien tHisF noch von einem entsprechenden *E. coli* Enzym verursacht wurde.

Phagen, die das Fusionsprotein trugen, konnten darüber hinaus aus einer HisF-/Hirudin-Phagenmischung mittels *phage display* über Bindung an ein anti-HisF-Antikörperserum angereichert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte man davon ausgehen, dass das tHisF-Protein zur Synthese einer phagenpräsentierten $(\beta\alpha)_8$ -barrel-Proteinbibliothek geeignet ist und dass sich unter geeigneten Selektionsbedingungen aus einem solchen Repertoire Proteinvarianten mit den gewünschten Eigenschaften über *phage display* isolieren lassen sollten.

3.2 Kombinatorische Synthese des *hisF*-Genrepertoires

Ziel dieses Projektes war es, eine neue enzymatische Aktivität in das $(\beta\alpha)_8$ -*barrel*-Protein tHisF einzuführen. Zu diesem Zweck sollten Varianten dieses Proteins, die die gewünschte Aktivität aufwiesen, über Selektion und *screening* aus einer entsprechenden Bibliothek isoliert werden.

3.2.1 Planung der Synthese

Die Wahrscheinlichkeit in einer Proteinbibliothek eine Variante mit den gewünschten Eigenschaften zu finden, wächst mit ihrer Größe – praktisch ist es jedoch nicht möglich, ein Gen vollständig zu randomisieren:

Um jede Position eines Gens auf Nukleotidbasis zu randomisieren, würden 64 ($4 \times 4 \times 4$) verschiedene Nukleotidsequenzen pro Codon benötigt, zusätzlich würde die Bibliothek aufgrund der Degeneration des genetischen Codes hinsichtlich bestimmter Aminosäuren verzerrt werden, während gleichzeitig die Repertoiregröße durch auftretende Stop Codone verringert würde.

Diese Redundanz und die Anzahl der Stop-Codone kann eingeschränkt werden, indem eine Nukleotidmischung verwendet wird, bei der an der dritten Position eines jeden Codons nicht mehr alle Basen zugelassen werden (z. B. NNG/C, NNG/T; Barbas III *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 1985). Da für einige Aminosäuren aber noch immer mehrere Codone existieren und sich auf diese Weise auch das TAG-Stop-Codon nicht vermeiden lässt, ist die Aminosäureverteilung nach wie vor ungleichmäßig und die Komplexität der Bibliothek eingeschränkt.

Werden chemisch vorgefertigte Trinukleotidmischungen, die den 20 Codonen der natürlich vorkommenden Aminosäuren entsprechen, zur Synthese der Oligonukleotide eingesetzt, können sowohl redundante Codone als auch die Stop-Codone vermieden werden. Darüber hinaus können Subsätze, die eine gewünschte Zusammensetzung von Trinukleotiden enthalten, verwendet werden, so dass wie z. B. in diesem Projekt auf eine unter Umständen problematische Aminosäure wie Cystein verzichtet werden kann.

Mit dieser Methode ergeben sich jedoch für eine vollständig randomisierte Sequenz von nur acht Codonen noch immer $2,56 \times 10^{10}$ (20^8) mögliche Kombinationen. Die Größe von Bibliotheken wird aber von der Effizienz gängiger Klonierungs- und Transformationsprotokolle limitiert und liegt bei etwa 10^8 - 10^9 unabhängigen Klonen. Ein Protein vollständig zu randomisieren ist demnach praktisch nicht möglich und darüber hinaus auch nicht sinnvoll, da Mutationen in Regionen, die die Faltung beeinflussen, negative Auswirkungen auf die Stabilität des Proteins haben können.

Um dennoch ein möglichst großes Repertoire potentiell aktiver Proteine zu generieren, wurde deshalb die Zufallsmutagenese des *hisF*-Gens auf diejenigen Positionen beschränkt, die voraussichtlich einen Einfluss auf die Funktion des Proteins haben.

Da aber auch diese ausgewählten Aminosäuren die Faltungsstabilität potentiell beeinträchtigen können und die Größe der Bibliothek noch immer zu groß wäre, um sie zu realisieren, wurden diese Positionen nicht vollständig randomisiert, indem den Trinukleotidmischungen ein Anteil des jeweiligen Wildtypcodons zugefügt wurde.

3.2.1.1 Auswahl der potentiell an Substratbindung und/oder Katalyse beteiligten Aminosäuren

Um nur diejenigen Aminosäuren auszutauschen, die voraussichtlich in der Lage sind, mit einem Substrat zu interagieren, mussten diese zunächst identifiziert werden. Es liegt zwar eine Struktur des tHisFs vor (Lang *et al.*, 2000) – jedoch ohne sein Substrat PRFAR, so dass die Aminosäuren, die mit dem Substrat wechselwirken, nicht genau bekannt sind. Darüber hinaus müssen diese auch nicht mit denen identisch sein, die für die Katalyse einer anderen Reaktion nötig sind.

Um Reste, die einen möglichen Einfluss auf die Interaktion mit einem neuen Substrat haben können, zu identifizieren, diente deshalb das in Abbildung 3.20 gezeigte Modell einer möglichen Bindung von PRFAR an das tHisF (erstellt von M. Hennig, Basel) als Grundlage.

Diejenigen Aminosäuren, die sich innerhalb eines Radius von ca. 5 Å um das PRFAR herum befinden, wurden mit Hilfe des Programms Swiss-PDB-Viewer der Firma Glaxo Wellcome identifiziert. Im Bereich von 5 Å liegt der maximale Abstand, bei dem Wechselwirkungen zwischen Molekülen möglich sind.

Darüber hinaus wurden nur Positionen auf einer Seite des tHisF ausgewählt, da das Übergangszustandsanalogon bzw. das entsprechende Substrat einer 4-Nitrophenylester-Hydrolyse bedeutend kleiner ist als das natürliche Substrat 5'-PRFAR. Zusätzlich wurden von den ausgewählten Aminosäuren diejenigen ausgeschlossen, deren Seitenketten in das Innere des Moleküls weisen, da diese an der Faltung des Proteins beteiligt sein könnten.

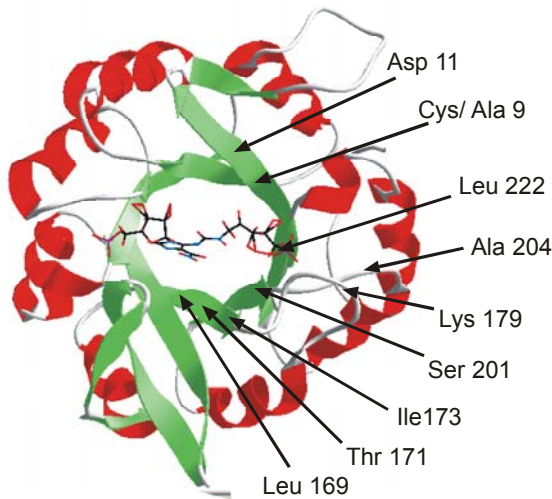


Abbildung 3.20: tHisF mit dem gemodelten Substrat 5'ProFAR (Michael Hennig, Basel). Eingezeichnet sind die Positionen der neun Aminosäuren, die im Zuge der Bibliothekssynthese randomisiert wurden.

3.2.1.2 Planung der Oligonukleotide zur Synthese der *hisF*-Bibliothek

Um die Zufallsmutationen in das Gen einzuführen, sollte das *thisF*-Repertoire aus synthetisch hergestellten und teilweise randomisierten Oligonukleotiden aufgebaut werden. Dazu wurde die DNA-Sequenz des tHisF in 38 Abschnitte unterteilt. Die entsprechenden Oligonukleotide besaßen eine durchschnittliche Länge von 45,7 Basen – die längste Sequenz maß 63 und die kürzeste 21 Basen. Sämtliche Abschnitte wurden so gewählt, dass sie sich um mindestens 15 Basenpaare überlappten. Alle Oligonukleotide besaßen, mit Ausnahme der äußeren, eine 5'-Phosphatgruppe, so dass die Möglichkeit bestand, sie nach Hybridisierung der komplementären Bereiche über Ligation miteinander zu verbinden.

Mit Hilfe des Programms *Primerfinder* (University of Texas Southwestern Medical Center) wurden die Sequenzen der Oligonukleotide unter Erhalt der Aminosäuresequenz modifiziert, so dass Dimerbildungen bzw. das Ausbilden von Sekundärstrukturen wie *hairpins*, die in beiden Fällen auf partiell homologen Sequenzabschnitten basieren, unterbunden wurden. Gleichzeitig wurde die Nukleotidsequenz teilweise dahingehend verändert, dass sie der *codon usage* stark exprimierter Gene aus *E. coli* entsprach.

Darüber hinaus wurde die aminoterminalen der beiden gegenüberliegenden Phosphatbindestellen entfernt, indem die daran beteiligten Aminosäure-Codone auf DNA-Ebene gegen Alanin-Codone ersetzt wurden (N103A,T104A). Die Aminosäuren der carboxyterminalen Phosphatbindestelle (D176, G177, G203, A224, S225), die in der Nachbarschaft der für die Randomisierung ausgewählten Reste liegen, wurden beibehalten, in der Hoffnung, dass sie die Bindung des Übergangszustandsanalogons unterstützen könnten, da dieses als zentrales Motiv eine Phosphonsäuregruppe besitzt, die in Struktur und Ladungsverteilung mit der Phosphatgruppe verwandt ist (vgl. Abbildung 1.1).

Wie in Abbildung 3.21 zu sehen ist, trugen vier der zwanzig Oligonukleotide, die den oberen, codierenden Strang der *hisF*-Genvarianten bilden sollten, die für die Randomisierung ausgewählten Codone. Diese Codone verursachten zwischen den achtzehn Oligonukleotiden des nicht-codierenden Stranges einzelsträngige Bereiche.

Die randomisierten Codone wurden nur im codierenden Strang eingesetzt, da dies den Aufwand für die Synthese verringerte; darüber hinaus war geplant, die Oligonukleotide über Ligation zusammenzufügen, so dass eine unsymmetrische Amplifikation, die zu einer Überrepräsentation bestimmter Varianten geführt hätte, hätte vermieden werden können. Die einzelsträngigen Bereiche sollten dann nach der Ligation von einer Polymerase mit den zu ihnen komplementären Basen aufgefüllt werden.

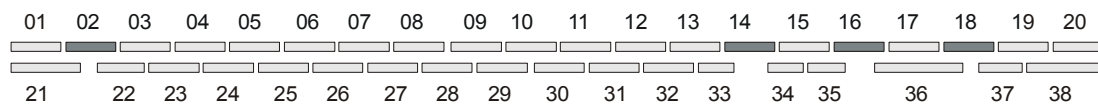


Abbildung 3.21: Das *hisF*-Gen wurde aus 38 synthetisch hergestellten Oligonukleotiden aufgebaut, die sich dachziegelartig überlappen. Über die dunkel dargestellten Oligonukleotide wurden an definierten Stellen Mutationen in das Gen eingeführt. Anzahl der randomisierten Positionen (in Klammern) pro Oligonukleotid: 02 (2), 14 (4), 16 (2), 18 (1).

Das Oligonukleotid, das das 5'-Ende des synthetischen *hisF*-Gens bildete, trug eine *Sfi*I-Schnittstelle, das entsprechende für das 3'-Ende eine *Bgl*II-Schnittstelle, so dass es möglich war, das assemblierte Gen in einen Vektor mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen zu ligieren.

3.2.1.3 Planung der Populationsstruktur des Repertoires

Zur Bibliothekssynthese wurden neun Positionen ausgewählt, von denen vermutet wurde, dass sie für die Interaktion mit einem Substrat verantwortlich sein könnten (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Diese sollten, wie in Abschnitt 3.2.1 ausgeführt, nur teilweise randomisiert werden. Zur Synthese der partiell randomisierten Oligonukleotide wurden deshalb definierte Mischungen von Trinukleotiden, die den Wildtyp- und Fremdcodonen entsprachen, verwendet.

Um einen geeigneten Anteil an Wildtypcodonen zu ermitteln, wurde der theoretische Anteil der Mutantenklassen (0-9 Austausch) am Gesamtrepertoire für Bibliotheken mit neun randomisierten Positionen und unterschiedlichen durchschnittlichen Austauschhäufigkeiten entsprechend der Binomialverteilung (Formel siehe 5.1.1) bestimmt. Abbildung 3.22 zeigt einen Vergleich der Anteile der verschiedenen Mutantenklassen am Gesamtrepertoire für eine Bibliothek mit einer durchschnittlichen Anzahl (μ) von fünf bzw. sechs Codonaustauschen:

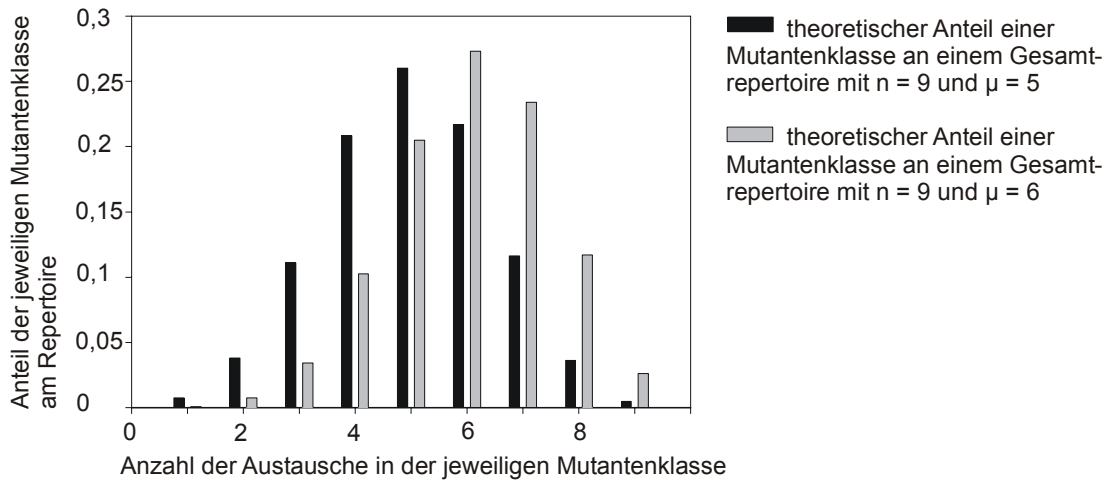


Abbildung 3.22: Binominalverteilungen für fünf bzw. sechs durchschnittliche Codonaustausche bei neun zu randomisierenden Positionen.

Eine Austauschwahrscheinlichkeit/Position von $p = 0,56$ ($5/9$), die der Verteilung mit fünf durchschnittlichen Codonaustauschen entspricht, wurde zur Synthese der Oligonukleotide ausgewählt. Wildtyp und Fremdcodon müssten demnach jeweils in einem molaren Verhältnis von 0,44 zu 0,56 eingesetzt werden. Da aber zur besseren Handhabung für die Synthese der Oligonukleotide eine 19er Trinukleotidmischung verwendet wurde, die eine äquimolare Mischung aller Codone der natürlichen Aminosäuren abzüglich Cystein und damit auch das jeweilige Wildtypcodon enthielt, entsprach die tatsächliche durchschnittliche Wahrscheinlichkeit nicht 5 sondern 4,74 durchschnittlichen Austauschen (für 55,6% Fremdcodone abzüglich $1/19$ an Wildtypcodon). Die daraus resultierende theoretische Zusammensetzung der Bibliothek ist in Abbildung 3.23 bzw. Tabelle 3.3 dargestellt. Zusätzlich ist der Umfang einer jeweiligen Mutantenklasse und die Häufigkeit, mit der eine einzelne Variante einer Klasse in der Gesamtbibliothek erwartet werden kann, angegeben:

	[1]	[2]	[3]	[4]
0	0,0012	1	$1,2 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^5$
1	0,0119	162	$7,3 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^4$
2	0,0532	$1,2 \times 10^4$	$4,5 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^3$
3	0,138	$4,9 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^2$
4	0,2303	$1,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^1$
5	0,2563	$2,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{-9}$	$6,8 \times 10^{-1}$
6	0,1901	$2,9 \times 10^9$	$6,6 \times 10^{-11}$	$4,1 \times 10^{-2}$
7	0,0907	$2,2 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{-12}$	$2,5 \times 10^{-3}$
8	0,0252	$9,9 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^{-13}$	$1,6 \times 10^{-4}$
9	0,0031	$2,0 \times 10^{11}$	$1,6 \times 10^{-14}$	$9,9 \times 10^{-6}$

Tabelle 3.3: Berechnete, theoretische Populationsstruktur einer Bibliothek mit 9 randomisierten Positionen und 4,74 durchschnittlichen Austauschen.

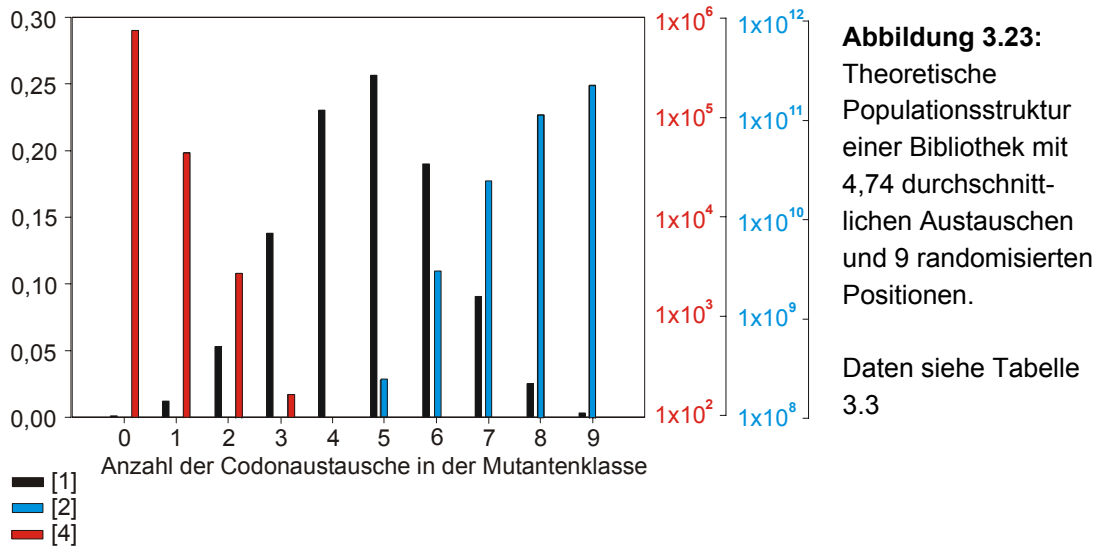
0-9: Anzahl der Codonaustausche in der jeweiligen Mutantenklasse

[1]: Erwarteter Anteil der jeweiligen Mutantenklasse an der Gesamtbibliothek (Rechnung 5.1.1, Binomialverteilung)

[2]: Umfang der jeweiligen Klasse (Rechnung 5.1.5)

[3]: Erwarteter Anteil einer einzelnen Variante einer Klasse an der Gesamtbibliothek ([2]: [3])

[4]: Erwartete Häufigkeit einer einzelnen Variante einer Klasse in der Gesamtbibliothek ([3] x Anzahl unabhängiger Klone in der generierten Bibliothek ($6,2 \times 10^8$))



[1]: Erwarteter Anteil der jeweiligen Mutantenklasse an der Gesamtbibliothek (Rechnung 5.1.1, Binomialverteilung)

[2]: Umfang der jeweiligen Klasse (Rechnung 5.1.5)

[4]: Erwartete Häufigkeit einer einzelnen Variante einer Klasse in der Gesamtbibliothek ([3] x Anzahl unabhängiger Klone ($6,2 \times 10^8$))

In Tabelle 3.3 bzw. Abbildung 3.23 kann man unter [4] erkennen, dass ab der Mutantenklasse vier die Häufigkeit, mit der man eine einzelne Variante einer Mutantenklasse in der Gesamtbibliothek erwarten kann, sehr kleine Werte annimmt, so dass sich nur noch zufällige Subsets an Einzelspezies finden werden. In zukünftigen Experimenten würde man deshalb eine höhere Austauschwahrscheinlichkeit/Position wählen, so dass sich die theoretischen Anteile der einzelnen Mutantenklassen am Gesamtrepertoire bei Mutantenklassen mit einer größeren Anzahl von Austauschen erhöhen.

3.2.2 Synthese der Bibliothek

3.2.2.1 Synthese der randomisierten Oligonukleotide

Die randomisierten Oligonukleotide wurden von der Firma Purimex synthetisiert. Um ihre Qualität zu testen, wurden sie zusammen mit ihren von der Firma Metabion synthetisierten nicht-randomisierten Entsprechungen über Polyacrylamid-Harnstoffgelelektrophorese (2.2.2.7) aufgetrennt. (Abbildung 3.24):

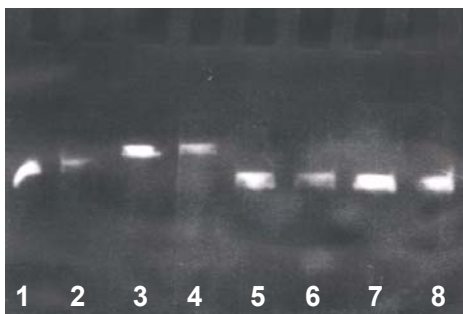


Abbildung 3.24: Gegenüberstellung der unmutagenisierten und mutagenisierten Oligonukleotide. Es wurden jeweils 30 nmol DNA auf das Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen.

1./2.: Oligo st02 (51 Basen); unmutagenisiert/ mutagenisiert

3./4.: Oligo st14 (63 Basen); unmutagenisiert/ mutagenisiert

5./6.: Oligo st16 (42 Basen); unmutagenisiert/ mutagenisiert

7./8.: Oligo st18 (42 Basen); unmutagenisiert/ mutagenisiert

Man sieht, dass das Laufverhalten der einander äquivalenten Oligonukleotide miteinander korrespondiert, ebenso erkennt man, dass sowohl die randomisierten wie auch die nicht-randomisierten Oligonukleotide jeweils nur eine Bande auf dem Gel bilden und demnach keine Verunreinigungen oder Abbauprodukte enthalten.

3.2.2.2 Ligation von *hisF*-Genvarianten und *hisF*-Bibliotheken in Expressionsvektoren

Für Sequenzanalysen mussten Klone, die das richtige Insert enthielten, identifiziert werden; zusätzlich war es notwendig, die Effizienz, mit der sich das Insert in den Expressionsvektor ligieren ließ, zu bestimmen, da von dieser nicht zuletzt die Größe und Qualität der Bibliothek abhängt. Für diesen Zweck wurde ein Vektor verwendet, der vor der Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen das *hisJ*-Gen enthielt. Wie man in Abbildung 3.25 sehen kann, lässt sich auf diese Weise über einen *insert screen* (2.2.2.5.8) mit einem Vektor- und einem *hisF*-spezifischen Primer der Ligationshintergrund bestimmen, ebenso können mit dieser Methode positive Klone identifiziert werden.

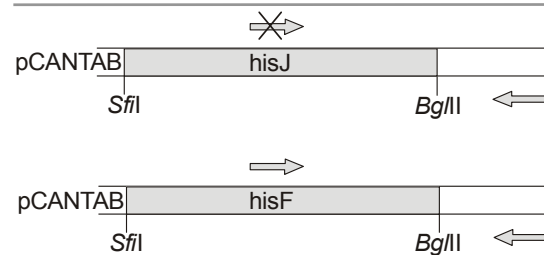


Abbildung 3.25: Zur Präparation des geschnittenen Vektors für die Klonierungen der Bibliotheken wurde ein pCANTAB-*hisJ*_(Rep.)-Vektor verwendet, so dass die erhaltenen Transformanten über einen PCR-*screen* auf Vorhandensein des korrekten *hisF*-Inserts getestet werden konnten.

Der Vektor wurde mittels Plasmid-Midi-Präparation (2.2.2.2) isoliert, anschließend über Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) und Ethanol-fällung (2.2.2.3.1) aufgereinigt und über Nacht mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten (2.2.2.5.1). Nachdem die Enzyme über eine weitere Chloroform-Extraktion entfernt wurden und die DNA über eine Ethanol-fällung einkonzentriert wurde, konnte der Vektor über Sucrosedichtegradienten-Zentrifugation gereinigt werden (2.2.2.11). Zur Synthese der Bibliotheken wurden für die Ligationen jeweils 300 ng des gereinigten Vektors, ein sechsfacher molarer Überschuss an Insert und 30 u T₄-Ligase (Ligase mit 30 u/μl) verwendet. Es wurden jeweils zehn Ligationen parallel angesetzt, für 20-24 h bei 15°C inkubiert und vor der Transformation (2.2.1.4) über Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

3.2.2.3 Synthese des *hisF*-Gens aus Oligonukleotiden über Ligation

Wie in Abbildung 3.26 gezeigt, war es ursprünglich geplant, das *hisF*-Gen aus sich überlappenden Oligonukleotiden über Hybridisierung und Ligation zusammenzufügen. Um die Bedingungen für das *assembly* zu ermitteln, wurden nicht-randomisierte Oligonukleotide verwendet.

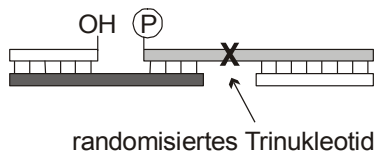


Abbildung 3.26: Die dachziegelartig überlappenden Oligonukleotide sollten aneinander hybridisiert und mit Hilfe einer Ligase verbunden werden. Die durch die *random* Oligonukleotide verursachten einzelsträngigen Bereiche sollte dann von einer Polymerase aufgefüllt werden.

Diverse Versuche, ein vollständiges Gen über Ligation zu erhalten, blieben jedoch erfolglos (z. B. Verwendung von T_4 - bzw. Taq-Ligase; Einsatz eines Thermocyclers, um unterschiedliche Zeitspannen bzw. Temperaturen für das Annealing und die Enzymreaktion zu ermöglichen; LCR; etc.). Darüber hinaus zeigte sich, dass sich einige Subsets an Oligonukleotiden nicht miteinander ligieren ließen. Da dieses Problem auch bei anderen Projekten in dieser Abteilung auftrat (Eva Kansy bzw. Wilfried Kramer/persönliche Kommunikation), wurde eine alternative Methode gewählt, um das Gen aus Oligonukleotiden zusammenzufügen: die *primerless* PCR.

3.2.2.4 Zusammenbau des *hisF*-Gens aus Oligonukleotiden über *primerless* PCR

Eine Methode, ein Gen aus Oligonukleotiden zu synthetisieren, ist die *primerless* PCR. Wie man in Abbildung 3.27 erkennen kann, dienen bei diesem Verfahren die überlappenden Bereiche der Oligonukleotide als Primer, wodurch sich das Gen über wiederholte Zyklen von Trennung, Annealing und Polymerasereaktionen sukzessive aufbaut. Das vollständige Gen wird dann in einer *primed* PCR mit Hilfe von endständigen Primern, die die Information für Restriktionsschnittstellen tragen, amplifiziert und kann daraufhin in einen geeigneten Vektor kloniert werden.

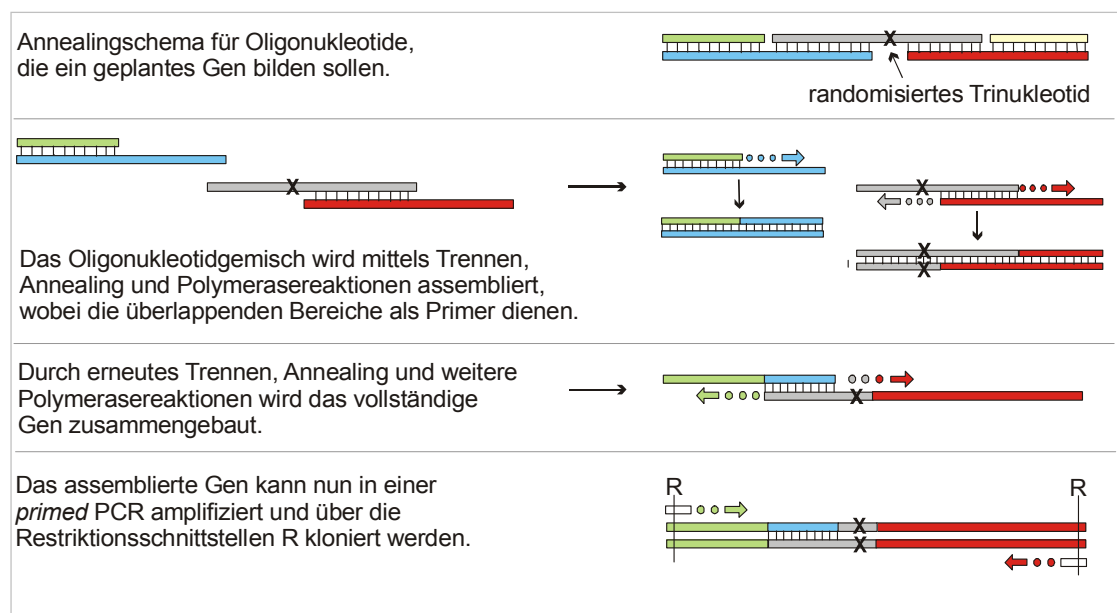


Abbildung 3.27: Schematische Darstellung der Synthese eines Gens aus Oligonukleotiden über *primerless* PCR.

Der Arbeitsgruppe Stemmer war es mit dieser Methode möglich, ein Gen aus 56 Oligonukleotiden mit jeweils 40 Basen bzw. ein Plasmid aus 134 Oligonukleotiden mit jeweils 40 Basen zusammenzusetzen (Stemmer *et al.*, 1995).

Über das ursprüngliche Protokoll konnte mit den 38 Oligonukleotiden für das *hisF*-Gen jedoch zuerst kein PCR-Produkt erhalten werden. Erst nachdem das Verfahren modifiziert wurde, indem für die *primerless* PCR anstelle einer Taq- die Vent®-Polymerase verwendet wurde, die Konzentration der (unrandomisierten) Oligonukleotide von 1 auf 3 μ M und die Zahl der Zyklen von 40 auf 50 erhöht wurde, konnte schließlich, wie in Abbildung 3.28 zu sehen ist, über eine *primed* PCR mit den Primern *VB01* und *VB38*, die im vorderen und hinteren Bereich des *hisF*-Gens hybridisieren, ein Produkt erhalten werden. Die Bedingungen für die einzelnen PCR-Reaktionen finden sich unter Methode 2.2.2.5.6.

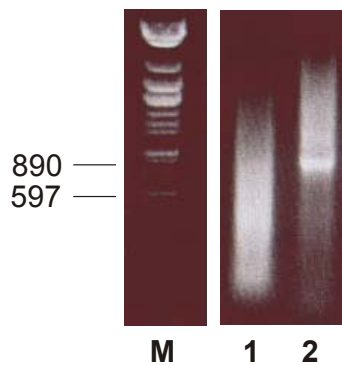


Abbildung 3.28: *Assembling* über *primerless* PCR.
 M: Marker: λ -DNA, geschnitten mit *Eco47I*
 1.: Ansatz nach der *primerless* PCR
 2.: PCR-Produkt nach der *primed* PCR zur Amplifikation des *hisF* (synthetisches *hisF* –Gen inklusive Restriktionsschnittstellen und Überhängen: 801 bp)

Um die Qualität des Zusammenbaus über *primerless* PCR zu prüfen wurde das PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *BglII* in den pCANTAB-Vektor, der in diesem Fall vorher das wildtyp-*hisF* enthielt, ligiert (2.2.2.5.2) und Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α mit dem Konstrukt transformiert (2.2.1.3).

Wie man in der Schemazeichnung in Abbildung 3.29 sehen kann, unterscheidet sich das Restriktionsmuster des synthetischen *thisF* von seinem Wildtyp-Äquivalent, so dass die Klone, die das künstliche Gen enthielten, mit Hilfe von Plasmid-Minipräparation (2.2.2.1) und einem anschließenden Restriktionsverdau (2.2.2.5.1) mit *BsaI* identifiziert werden konnten.

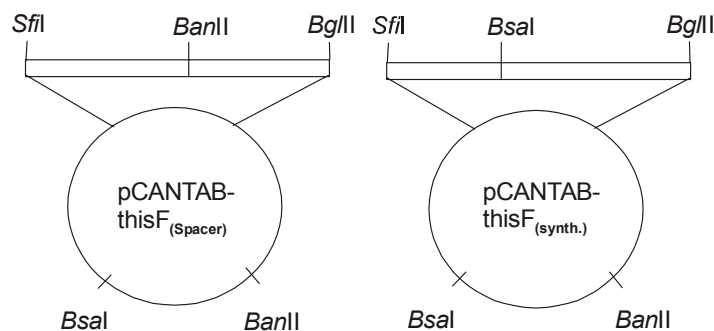


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung des Restriktionsmusters des wildtyp (rechts) und des synthetischen *thisF*-Gens (links) im Vektorkontext. *BanII* bzw. *BsaI* sind im *thisF*- bzw. *hisF*_{synth}-Gen unique.

Die Plasmid-DNA von zwölf Klonen, die der Restriktionsanalyse nach das synthetische Gen enthielten, wurde sequenziert (2.2.2.6). Es fanden sich allerdings bei zehn der zwölf Sequenzen Baseninsertionen oder Deletionen, darüber hinaus traten zusätzlich Basenaustausche auf. Nur ein Klon besaß ein Plasmid mit dem fehlerfreien, synthetischen *hisF*-Gen.

3.2.2.5 Expression des synthetischen *hisF*-Gens

Die *hisF*-Bibliotheken sollten aus synthetischen Oligonukleotiden generiert werden, deren Sequenzen unter Erhalt der Aminosäuresequenz dahingehend verändert wurden, dass *Hairpin*- und Dimerbildungen weitgehend vermieden werden konnten, ein neues Restriktionsmuster entstand, die *codon usage* teilweise optimiert und eine Phosphatbindestelle im Protein zerstört wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.2).

Um zu überprüfen, ob sich das synthetische *hisF*-Gen nach wie vor in *E. coli* exprimieren ließ und ob das entsprechende Protein auf den Phagen präsentiert werden konnte, wurden TG1-Zellen mit pCANTAB-Vektoren transformiert, die das synthetische bzw. das natürliche *hisF*-Gen enthielten. Nachdem Phagen präpariert wurden und deren Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde die Präsentation des HisF auf den Phagen dann über Western-Blot überprüft.

Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, ergab das tHisF/gIIIp-Fusionsprotein, das von dem synthetischen Gen exprimiert wurde, eine ebenso deutliche Bande, wie das von dem Wildtyp-Gen produzierte Protein.

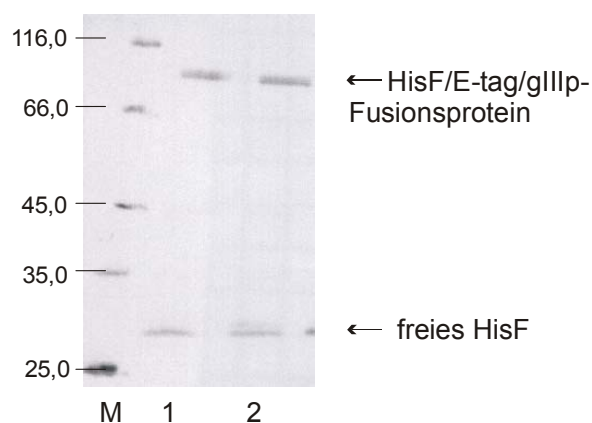


Abbildung 3.30: Immunochemischer Nachweis des HisF-gIIIp-Fusionsproteins nach Expression von synthetischem *hisF* bzw. *Thermotoga maritima-hisF*(C9A) mittels anti-tHisF-Kaninchenserum.

M: *Protein Molecular Weight Marker* (MBI);
Molekulargewichtsstandard ($M_r \times 10^{-3}$)
1.: Phagen aus Zellen mit pCANTAB-*hisF*(_{Spacer})
2.: Phagen aus Zellen mit pCANTAB-*hisF*(_{Synth.})

Das synthetische *hisF*-Gen lässt sich demzufolge ebenso gut wie der Wildtyp in *E. coli* exprimieren.

3.2.2.6 Synthese einer *hisF*-Gen-Bibliothek aus Oligonukleotiden über *primerless PCR*

Der Versuch wurde mit Oligonukleotiden wiederholt, die die randomisierten Trinukleotide enthielten. Die Oligos wurden über *primerless PCR* zusammengefügt (2.2.2.5.6), die Gen-Bibliothek über die Primer *VB01* und *VB38* amplifiziert (2.2.2.5.5) und ebenfalls über *SfiI* und *BglII* in den pCANTAB-Vektor kloniert (siehe Abschnitt 3.2.2.2). TG1-Zellen wurden mit dem Vektor, der die Bibliothek enthielt, transformiert (2.2.1.3). Eine Sequenzanalyse von sieben Transformanten zeigte, dass zwar das *hisF*-Gen erfolgreich zusammengefügt wurde und die zu mutagenisierenden Positionen die *random*-Trinukleotide enthielten, aber jeder der Klone wies mindestens eine Basendeletion oder Insertion auf. Diese hohe Rate an Rasterschubmutationen wurde in weiteren Experimenten von Zhenlian Ling (diese Abteilung) und Eva Kansy (Kansy, 2003) bestätigt.

3.2.2.7 Ligation auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA

Das bis dahin einzig erfolgreiche Verfahren – die Oligonukleotide mittels *primerless PCR* zu einem vollständigen Gen zusammenzufügen – besaß, neben der großen Anzahl an Rasterschubmutationen den Nachteil zweier aufeinander folgender Polymerase-Kettenreaktionen mit 50 bzw. 30 Zyklen.

Werden Bibliotheken über PCR amplifiziert, besteht die Gefahr, dass bestimmte Varianten bevorzugt vermehrt werden. Um dieses Problem zu umgehen und gleichzeitig den großen Anteil an Deletionen bzw. Insertionen in den aus den Oligonukleotiden assemblierten Genen zu verringern, sollte ein neues Verfahren erprobt werden: die Ligation auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA.

Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, wurden dazu die synthetisch hergestellten, phosphorylierten Oligonukleotide, die dem oberen Strang des *thisF*-Gens entsprachen, zuerst auf einer einzelsträngigen DNA hybridisiert. Die Einzelstrang-DNA wurde mit Hilfe der λ -Exonuklease hergestellt, die, ausgehend von einem phosphorylierten 5'-Terminus, einen DNA-Strang in 5' \rightarrow 3' Richtung abbaut. Als Substrat diente ein PCR-Produkt, das mit einem phosphorylierten und einem unphosphorylierten Primer amplifiziert worden war.

Nachdem die Oligonukleotide auf den ihnen komplementären Bereichen gebunden hatten, konnten die verbleibenden *nicks* mit Hilfe einer Ligase geschlossen werden. Über eine Spaltung mit einem Restriktionsenzym konnte dann ein neues 5'-Phosphat auf dem Matrizenstrang bereitgestellt werden, der dann, ebenfalls mittels λ -Exonuklease, abgebaut wurde. Nachdem der untere Strang durch eine Polymerase wieder aufgefüllt worden war, konnte das nun vollständige Gen kloniert werden.

Da die synthetischen Oligonukleotide jedoch an den zu randomisierenden Positionen einen Anteil von Wildtyp-Codonen besaßen (siehe Abschnitt 3.2.1), stand zu befürchten,

dass diese Varianten bevorzugt an dem Matrizenstrang hybridisieren könnten. Um dies zu verhindern, wurde über Ligation auf einer Einzelstrang-DNA eine *thisF*-Mutante hergestellt, die an den zu randomisierenden Stellen Codondeletionen besaß. Ausgehend von dieser Variante wurde dann eine neue einzelsträngige *thisF*-Matrize hergestellt, auf der die synthetischen Oligonukleotide gleich gut binden konnten, unabhängig davon, ob sie Wildtyp- oder Fremdcodone besaßen.

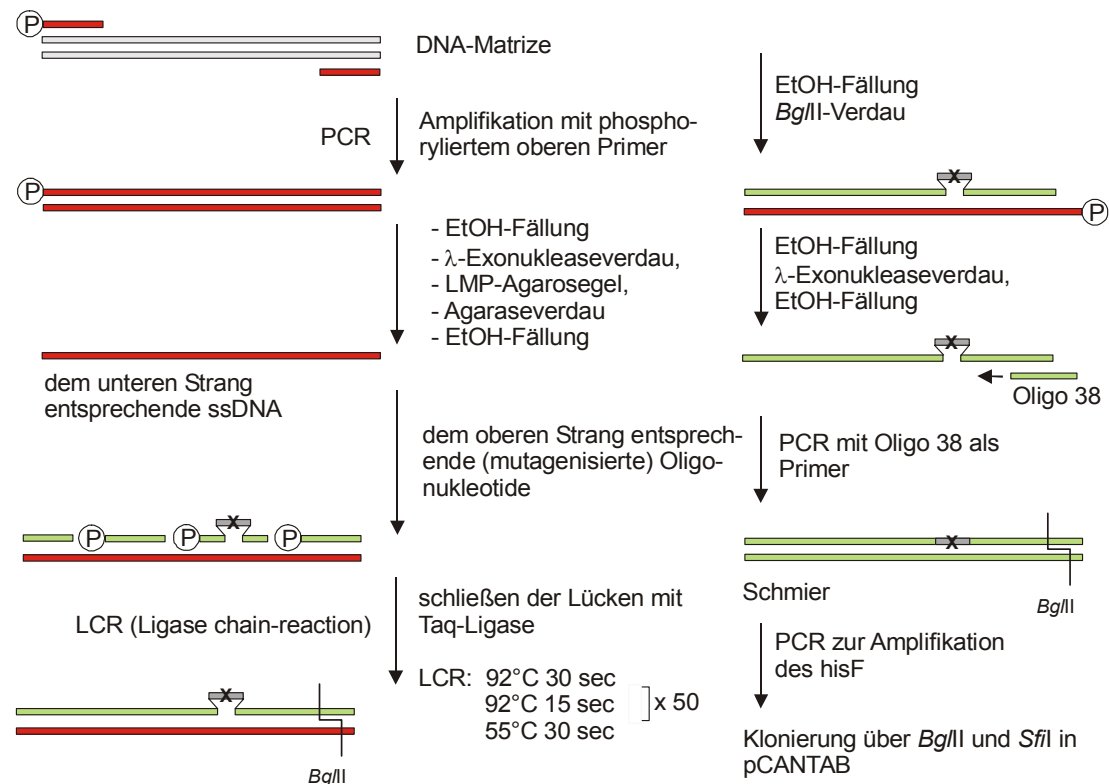


Abbildung 3.31: Schematische Darstellung der Synthese des *thisF*-Gens über Ligation von Oligonukleotiden auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA.

3.2.2.8 Konstruktion der *hisF_{Del}*-Variante über Ligation auf einer Einzelstrang-DNA

Wie in Abschnitt 3.2.1.2 dargestellt, weicht die DNA-Sequenz des synthetischen *thisF* von der des Wildtyp-*thisF*-Gens ab. Damit die synthetischen Oligonukleotide, einschließlich derjenigen mit den Codon-Deletionen, effektiv auf der einzelsträngigen DNA hybridisieren konnten, musste diese deshalb von einer synthetischen *thisF*-Matrize hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde die *thisF_{synth}*-Variante verwendet, die über *primerless* PCR aus den synthetischen Oligonukleotiden assembliert worden war (siehe Abschnitt 3.2.2.4). Das synthetische *thisF*-Gen wurde dazu mit dem Primer *V/B38* und dem phosphorylierten Primer *PCR-1-P_{ho}* mittels PCR amplifiziert und die Einzelstrang-

DNA nach Methode 2.2.2.5.4 präpariert. Wie in Abbildung 3.32 gezeigt, wurde jedoch nicht die gesamte DNA zu Einzelstrang-DNA abgebaut:

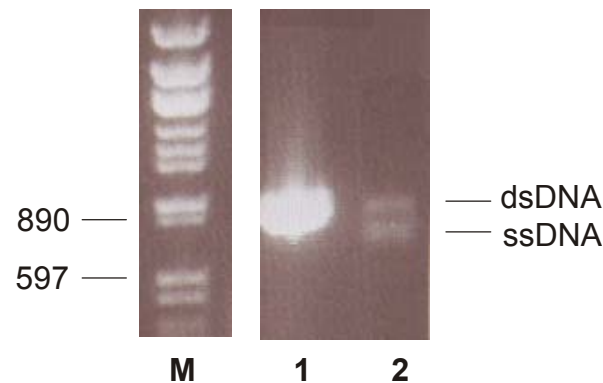


Abbildung 3.32: Das mit einem phosphorylierten und einem unphosphorylierten Primer amplifizierte tHisF nach der PCR (1) und nach der Inkubation des PCR-Produkts mit λ -Exonuklease (2). Marker: λ -DNA, geschnitten mit *Eco47I*.

Auch nachdem der Versuch mit einem neuen phosphorylierten Primer von der Firma Purimex wiederholt wurde, fand sich keine höhere Ausbeute an einzelsträngiger DNA (Daten nicht gezeigt).

Die entstandene Einzelstrang-DNA wurde deshalb über LMP-Agarosegelelektrophorese von der verbliebenen Doppelstrang-DNA getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Agaraseverdau (2.2.2.7) und anschließender Ethanol-fällung (2.2.2.3.1) aus dem Gel isoliert.

Da aufgrund des unvollständigen Abbaus der Doppelstrang- zu Einzelstrang-DNA mittels λ -Exonuklease davon ausgegangen werden konnte, dass die Oligonukleotide nicht vollständig phosphoryliert waren, wurde zur Ligation des oberen Stranges die LCR (*ligase chain reaction*, 2.2.2.5.3) gewählt. Bei dieser Methode wird mit Hilfe einer thermostabilen Ligase durch wiederholte Zyklen von Auftrennen, Hybridisieren und erneuter Enzymreaktion phosphorylierten Oligonukleotiden die Möglichkeit gegeben, bereits auf dem Matrizenstrang hybridisierte aber nicht phosphorylierte Oligonukleotide zu ersetzen. Außerdem wird die Möglichkeit eines Fehlannealings geringer, da die Taq-Ligase bei Temperaturen von 45°C-65°C aktiv ist, so dass insgesamt bei höheren Temperaturen gearbeitet werden kann.

Da nach der LCR auf einem analytischen Agarosegel (2.2.2.7) nur ein Schmier anstelle einer Bande zu erkennen war, wurde der LCR-Ansatz als Matrize für eine PCR verwendet, um so, mit den Primer VB01/VB38, das vollständige *hisF*-Gen zu amplifizieren. Es wurden zwei Banden als PCR-Produkt erhalten, von denen die obere die erwartete Größe für die *hisF*-Deletionsvariante besaß. Das gesamte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *BglII* gespalten (2.2.2.5.1), über ein Agarosegel gereinigt (2.2.2.7), mittels dem NucleoTrap®-Kit aus dem Gelmaterial isoliert und in den ebenfalls mit *SfiI* und *BglII* geschnittenen pCANTAB-Vektor ligiert (2.2.2.5.2). Zellen des Stammes DH5 α wurden daraufhin mit dem gewonnenen Konstrukt transformiert (2.2.1.3).

Da, wie man in Abbildung 3.33 sehen kann, durch eine der Codondeletionen eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym *BssSI* entstand, konnte die DNA der Deletionsvariante von der des Wildtyp und des synthetischen *thisF*-Gens über eine analytische Spaltung unterschieden werden:

48 - GCT GCT CTC GAT GTG AAG	synthetisches <i>thisF</i>
48 - GCT <u>CTC GTG</u> AAG	<i>thisF</i> -Deletionsvariante
<i>BssSI</i>	

Abbildung 3.33: Zu sehen ist ein Sequenzbereich aus dem synthetischen *thisF*-Gen und der entsprechende Abschnitt aus der Variante mit den Codon-Deletionen und der neu entstandenen *BssSI*-Restriktionsschnittstelle. Die deletierten Codone sind fett dargestellt.

Die *thisF*-Genvarianten aus verschiedenen Klonen wurden im Zuge eines *insert screens* durch Kolonie-PCR (2.2.2.5.8) amplifiziert und mit *BssSI* verdaut. Unter 12 Klonen fanden sich zwei, die die neue Schnittstelle besaßen und deren Sequenzen über eine DNA-Sequenzanalyse bestimmt wurden (2.2.2.6). Es zeigte sich, dass das Gen des einen Klons eine Rasterschubmutation besaß, der andere jedoch entsprach der fehlerfreien, gewünschten Variante mit den Codondeletionen („pCANTAB-*hisF*_(Del)“) und konnte demnach als Matrize für eine Bibliothekssynthese über Ligation auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA verwendet werden.

3.2.2.9 Synthese von Bibliotheken über Ligation auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA

Zur Synthese einer *thisF*-Bibliothek wurde der Versuch mit einer einzelsträngigen DNA-Matrize, die von dem pCANTAB-*hisF*_(Del)-Konstrukt hergestellt wurde, und den randomisierten Oligonukleotide, die dem oberen, codierenden DNA-Strang entsprachen, wiederholt.

Das Verfahren wurde entsprechend 3.2.2.8 mit verschiedenen molaren Verhältnissen von einzelsträngiger DNA und Oligonukleotiden durchgeführt. Die Effizienz des Einbaus der Mutagenese-Oligonukleotide in den so erhaltenen Test-Bibliotheken wurde über eine DNA-Sequenzanalyse von insgesamt 18 Klonen überprüft. Es zeigte sich aber, dass die Codondeletionen nur in unzureichendem Maße durch Fremdcodone ausgetauscht wurden. Es wurde vermutet, dass einige der Oligonukleotide durch einen mangelhaften Einbau der Trinukleotide bereits Codondeletionen beinhaltet haben könnten, wodurch diese Varianten bevorzugt auf dem Einzelstrang gebunden hätten. Um solche fehlerhaften Oligonukleotide zu entfernen, wurde der Versuch mit Oligos wiederholt, die über Harnstoff/Acrylamidgelelektrophorese (2.2.2.8) mit anschließendem UV-*shadowing* (2.2.2.9) aufgereinigt wurden, um so eventuell vorhandene verkürzte Varianten zu entfernen. Mit Hilfe dieser gereinigten Oligonukleotide wurde eine weitere Test-

Bibliothek hergestellt. Eine DNA-Sequenzanalyse von drei Klonen zeigte aber auch hier, dass der Austausch von Codondeletionen gegen Fremdcodone unvollständig war.

Da in fast allen Fällen die Bereiche mit Codondeletionen bzw. erfolgreich eingebauten Trinukleotiden mit denen identisch waren, die von den Mutagenese-Oligonukleotiden abgedeckt wurden, also entweder alle Positionen eines Oligonukleotids ausgetauscht wurden oder keine, kann man davon ausgehen, dass die Ursache der Deletionen nicht in den Oligonukleotiden begründet liegt, sondern während des *assembling*- und Amplifikationsprozess über die *template*-DNA eingeführt wurde.

Da darüber hinaus bei der Konstruktion der *hisF*-Codondeletions-Variante unter den zwölf untersuchten Klonen nur zwei zu finden waren, die die neue Restriktionsschnittstelle besaßen, die durch eine der Codondeletionen verursacht wurde (siehe Abschnitt 3.2.2.8), kann man davon ausgehen, dass es zwar prinzipiell möglich ist, Oligonukleotide auf einem Gerüst aus Einzelstrang-DNA zu assemblieren, der Einbau aber für eine Synthese von Bibliotheken zu ineffizient ist.

3.2.2.10 Selektion von *hisF*-Varianten ohne Rasterschubmutationen

Wie in Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben besaß ein Großteil der aus den synthetischen Oligonukleotiden hergestellten *hisF*-Genvarianten Rasterschubmutationen. Um diese über Selektion zu entfernen, wurde der Vektor pASK-2 x *Sfi*I-*hisJ*-*bla* konstruiert, in welchem das *hisF*-Gen *in frame* an die Sequenz der β -Laktamase fusioniert war (Klonierungsschema: Eva Kansy, 2003). Varianten mit Deletionen oder Insertionen konnten demnach keine funktionsfähige β -Laktamase produzieren, wodurch es möglich wurde, sie über Selektion gegen Ampicillin aus der Bibliothek zu entfernen.

Zusätzlich wurde der Vektor dahingehend geplant, dass die Bibliothek nicht mehr über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Bgl*II einkloniert wurde, sondern über zwei asymmetrische *Sfi*I-Schnittstellen: Wie in Abbildung 3.34 gezeigt, erlaubt es die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Sfi*I, Schnittstellen mit unterschiedlicher Sequenz zu konstruieren, die dennoch von demselben Enzym erkannt werden.

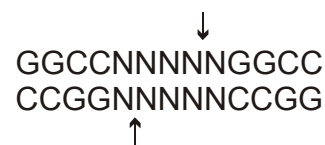


Abbildung 3.34: Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *Sfi*I.

Da *Sfi*I als Tetramer an die DNA bindet, sollte durch die zwei auf einem DNA-Strang liegenden Schnittstellen die Effizienz der Spaltung und damit auch die Ausbeute an Ligationsprodukt und Transformanten erhöht werden. Entsprechend wurde ein neuer pCANTAB-Vektor mit zwei asymmetrischen *Sfi*I-Schnittstellen konstruiert, in den die Bibliothek nach der Selektion umkloniert werden konnte (Abbildung 3.35).

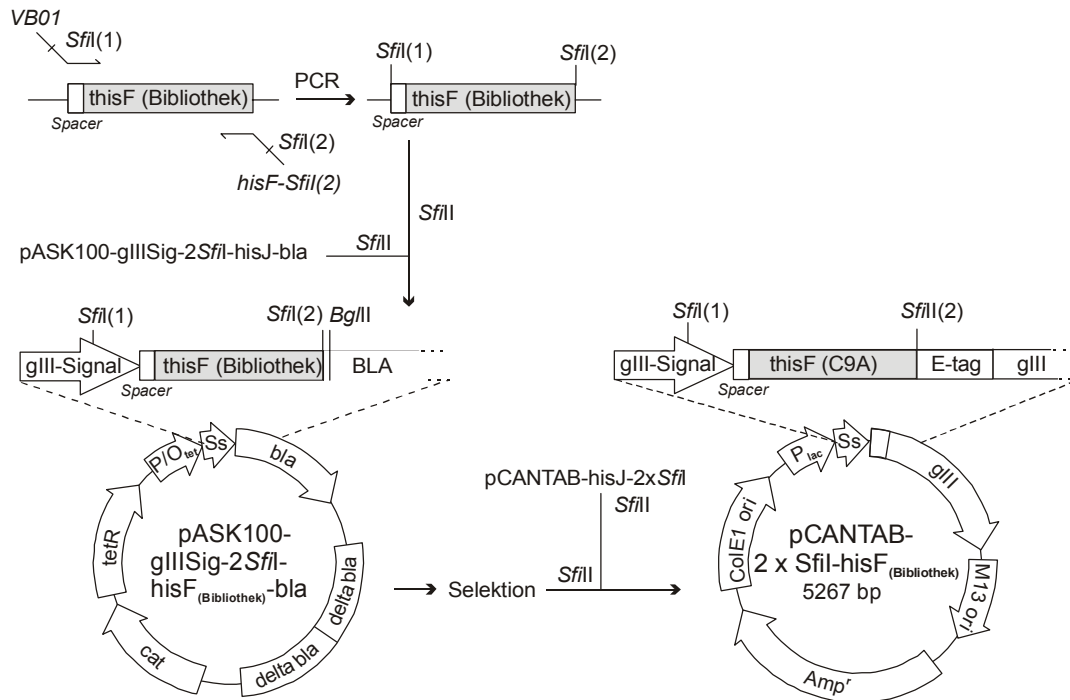


Abbildung 3.35: Prinzip der Selektion auf rasterschubfreie *hisF*-Genvarianten. Die Bibliothek wurde in das pASK-Vektorderivat kloniert. Nach Expression des Fusionskonstruktes aus *hisF*-Genvariante und β -Laktamase-Gen überlebten nur diejenigen Klone die Selektion auf Ampicillin-Resistenz, die ein rasterschubmutationsfreies Gen trugen. Die gereinigte Bibliothek wurde dann in den pCANTAB-Vektor umkloniert, um für das *phage display* zur Verfügung zu stehen.

3.2.2.11 *Assembling* der Bibliothek aus Gen-Fragmenten amplifiziert mit teilweise randomisierten Primern

Es wurde vermutet, dass die Ursache für die große Anzahl an Rasterschubmutationen in den synthetischen Oligonukleotiden liegt: Bei Polynukleotiden, die über die Phosphoramidit-Methode synthetisiert worden waren, fand sich eine Nukleotiddeletions-Rate von 0,007 (Hecker und Rill; 1997). Die Polynukleotide besaßen in diesem Fall zwar eine Länge von ca. 100 Basen, weshalb die Fehlerrate vermutlich höher war, als die bei den kürzeren Oligonukleotiden, die in diesem Promotionsprojekt verwendet wurden, da das synthetische *hisF*-Gen aber aus insgesamt 1518 Nukleotiden besteht (2 x 759 Nukleotide), kann man davon ausgehen, dass auch eine geringere Fehlerrate zu einer hohen Anzahl an Nukleotiddeletionen führt.

Um den Sequenzanteil, der aus den synthetisch hergestellten Oligonukleotiden gebildet wurde, möglichst gering zu halten, wurde ein weiteres Verfahren getestet, um eine Bibliothek zu generieren: Ein *assembling* der Bibliothek aus Gen-Fragmenten, die mit teilweise randomisierten Primern amplifiziert wurden.

Wie man in Abbildung 3.36 erkennen kann, waren über weite Bereiche des *hisF*-Gens keine Mutationen geplant, so dass diese Abschnitte über PCR von einer fehlerfreien

Matrize einer synthetischen *hisF*-Variante generiert und anschließend über eine *primerless*- und eine *primed*-PCR zu den vollständigen Genvarianten zusammengefügt werden konnten. Als *upstream*-Primer für die PCRs dienten die teilweise randomisierten Oligonukleotide, als *downstream*-Primer entsprechende Oligonukleotide, die für die Synthese des synthetischen *hisF* hergestellt worden waren.

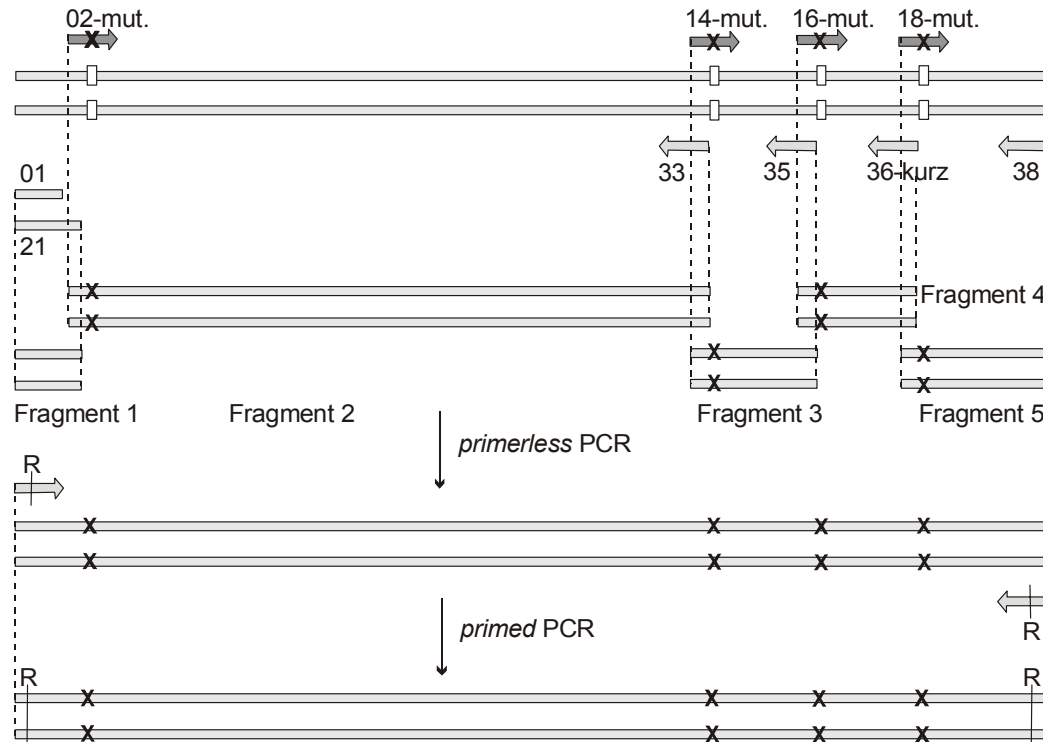


Abbildung 3.36: Schematische Darstellung der Synthese der sich überlappenden randomisierten PCR-Fragmente, aus denen die *hisF*-Bibliothek zusammengefügt wurde. R: Restriktionsschnittstellen.

Die individuellen Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen Genfragmente wurden mit nicht-randomisierten Primern ermittelt. Mit den Oligos 16/36 konnte erst ein PCR-Produkt erhalten werden, als ein verkürzter Primer anstelle des längeren Oligonukleotids, das ursprünglich zur Synthese des Gens über Ligation definiert worden war, eingesetzt wurde. Als Matrize diente in allen Fällen 50 ng der pCANTAB-*hisF*_(Del)-Variante, die an den zu randomisierenden Positionen Trinukleotiddeletionen besaß, so dass gewährleistet werden konnte, dass die Fremdcodone mit derselben Wahrscheinlichkeit hybridisieren konnten wie die Wildtypcodone. Taq-Polymerase wurde in den Fällen verwendet, in denen mit Vent[®]-Polymerase kein PCR-Produkt erhalten werden konnte. Die PCRs wurden anschließend mit den random-Primern der Firma Purimex wiederholt. Um die Matrizen-DNA, deren *hisF*_(Del)-Gen in der abschließenden *primed* PCR ebenfalls amplifiziert worden wäre, zu entfernen, wurden alle Genfragmente über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Das Gen-Fragment 2 wurde mittels Nucleotrap aus dem Gel isoliert. Die kürzeren Fragmente 3, 4 und 5 wurden mit Hilfe von Agarase und Ethanol fällung aus einem *low melting point*- (LMP) Agarosegel isoliert, da

sich DNA-Abschnitte mit weniger als 100 bp Länge schlecht von der Glasmilchmatrix der Nucleotrap-Suspension eluieren lassen.

Das Fragment 1 wurde ohne Matrize durch Auffüllen der Oligos 01/21 erhalten und ebenfalls über ein *low melting point*-Agarosegel gereinigt.

Die individuellen Bedingungen für die Amplifikation und Aufreinigung der einzelnen Genfragmente, lassen sich aus Tabelle 3.4 entnehmen:

Fragment	Länge [bp]	Primer	Polymerase	Annealingtemperatur	Aufreinigung über
# 1	63	st01/st21	Vent-	65°C	LMP-Agarosegel/Agarase
# 2	495	02-mut/st33	Taq-	60°C	Agarosegel/ Nucleotrap
# 3	111	14-mut/st35	Vent-	65°C	LMP-Agarosegel/Agarase
# 4	78	16-mut/36-kurz	Taq-	58°C	LMP-Agarosegel/Agarase
# 5	125	18-mut/st38	Vent-	65°C	LMP-Agarosegel/Agarase

Tabelle 3.4: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen Gen-Fragmente.

Die Konzentration der isolierten PCR-Produkte wurde photometrisch bestimmt und jeweils 2 pm eines jeden Genfragments für die *primerless* PCR eingesetzt (2.2.2.5.7). Die erhaltenen *hisF*-Varianten wurden dann über eine *primed* PCR mit den endständigen Primern *VB01* und *hisF-SfiI(2)* amplifiziert, wobei der Primer *hisF-SfiI(2)* die Sequenzinformation für die assymetrische, zweite *SfiI*-Schnittstelle trug.

Es zeigte sich, dass nur dann ein einziges PCR-Produkt erhalten werden konnte, wenn die *primed* PCR sofort im Anschluss an die *primerless* PCR durchgeführt wurde. Sobald der Ansatz, beispielsweise für die Dauer einer Test-PCR mit anschließender analytischer Agarosegelelektrophorese, bei Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert wurde, traten bei nachfolgenden PCR-Reaktionen zusätzliche Banden auf. Diese Nebenprodukte hätten eine weitere Reinigung über Agarosegelelektrophorese notwendig gemacht; erfahrungsgemäß verringert eine solche Reinigung jedoch die Effizienz von Ligation und Transformation – vermutlich durch DNA-Schäden, die durch das Ethidiumbromid bzw. UV-Licht zur Detektion der DNA nach der Gelelektrophorese verursacht werden.

Die aufgereinigten PCR-Produkte und der folgende Assemblierungs- und Amplifikationssprozess sind in Abbildung 3.37 dokumentiert.

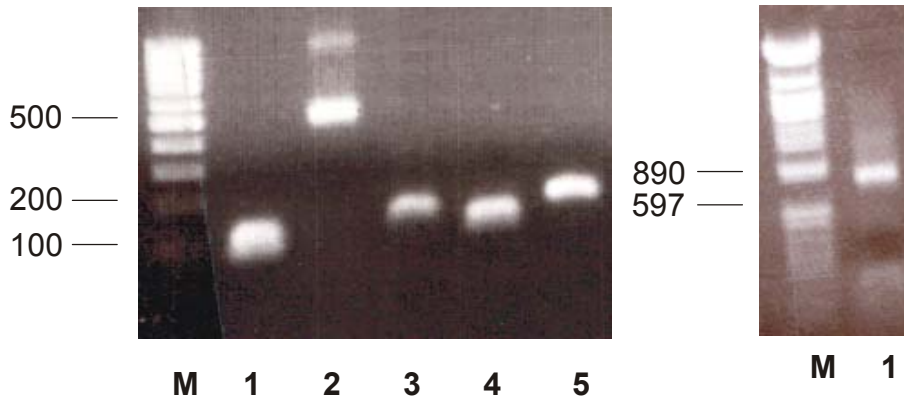


Abbildung 3.37

links: Die aufgereinigten einzelnen Genfragmente aus denen die *hisF*-Bibliothek assembliert wurde. Bei der zusätzlichen Bande in Spur 2 handelt es sich vermutlich um das Dimer.

rechts: Die aus den sich überlappenden Gen-Fragmenten assemblierte und nachfolgend amplifizierte *hisF*-Genbibliothek (synthetisches *hisF*-Gen inklusive Restriktionsschnittstellen und Überhängen: 801 bp)

links:

M: 100 bp-Leiter

1.: Fragment 01/21

2.: Fragment 02-mut/st33

3.: Fragment 14-mut/st35

4.: Fragment 16-mut/36-kurz

5.: Fragment 18-mut/st38

rechts:

M: λ -DNA, *Eco47I* geschnitten

1.: assemblierte und amplifizierte
hisF-Genbibliothek

Das Produkt der *primed* PCR wurde über Phenol-/Chloroform-Extraktion (2.2.2.4) und Ethanol-fällung gereinigt (2.2.2.3.1), mit *SfiI* gespalten (2.2.2.5.1), über Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung von dem Restriktionsenzym befreit und in den, ebenfalls mit *SfiI* gespaltenen, über Phenol-/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung mit nachfolgender Sucrosegradienten-Zentrifugation (2.2.2.11) gereinigten pASK- 2 x *SfiI*-bla-Vektor, ligiert. Nachdem das Ligationsprodukt über Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt wurde, wurde es verwendet, um TG1-Zellen zu transformieren (2.2.1.4).

Während der auf die Transformation folgenden Kur, wurde dem Medium Anhydro-Tetrazyklin zur Induktion zugesetzt, so dass Varianten ohne Rasterschubmutationen das β -Laktamasegen produzieren konnten. Die Zellen wurden anschließend auf SOC-Medium-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Es wurden $7,9 \times 10^8$ Transformanten erhalten. Da Verdünnungen des Transformationsansatzes sowohl auf SOC^{Cm}- als auch auf SOC^{Amp/Cm}-Platten ausgestrichen wurden, konnte der Anteil der Klone, der aufgrund des *in frame* liegenden β -Laktamasegens sowohl Ampicillin- als auch Chloramphenicol-resistent war, an der Gesamtmenge der Transformaten – also sämtliche Klone, die gegenüber Chloramphenicol resistent waren – bestimmt werden. Es zeigte sich, dass der

Anteil der Klone mit Ampicillin- und Chloramphenicol-Resistenz bei 52% lag. Die Methode, die *hisF*-Varianten aus mit teilweise randomisierten Primern amplifizierten Gen-Fragmenten zu assemblieren, ergab also ca. fünfmal mehr korrekte Sequenzen als die Methode das Gen vollständig aus Oligonukleotiden zusammenzufügen (Abschnitt 3.2.2.4). Man kann daraus schließen, dass der Ursprung der zahlreichen Nukleotiddeletionen tatsächlich in der Synthese der Oligonukleotide begründet ist.

Die erhaltenen Klone wurden mit einem Glasspatel von den Platten gekratzt und für eine anschließende Plasmid-Midi-Präparation (2.2.2.2) eingesetzt. Die *hisF*-Bibliothek wurde mittels *Sfi*I aus dem pASK-Vektor geschnitten, über Agarosegelelektrophorese (2.2.2.7) aufgetrennt, anschließend mit dem Nucleotrap-Kit aus dem Gel isoliert und in den, ebenfalls mit *Sfi*I gespaltenen und entsprechend Abschnitt 3.2.2.2 behandelten, pCANTAB-2 x *Sfi*I-Vektor ligiert. Nach Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurden TG1-Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert. Es wurden $6,2 \times 10^8$ Zellen erhalten.

3.2.3 DNA-Sequenzanalyse und statistische Datenanalyse der *hisF*-Genbibliothek

3.2.3.1 Experimentell ermittelte Eigenschaften des synthetischen *hisF*-Genrepertoires

Die erhaltene *hisF*-Genbibliothek im pCANTAB-Vektor besaß eine Größe von $6,2 \times 10^8$ Klonen. Ein *insert screen* (2.2.2.5.8) zeigte, dass 39 von 40 getesteten Klonen eine Variante des *hisF*-Gens besaßen, dies entspricht einem Anteil von 97,5% positiven Klonen am Gesamtrepertoire. Zur statistischen Analyse wurden die Sequenzen von 100 zufällig ausgewählten Klonen ausgewertet. Ein Alignment dieser Sequenzen findet sich in Abschnitt 5.3.3.

Betrachtung der nicht-randomisierten Positionen

Außerhalb der randomisierten Positionen fanden sich zwei Codondeletion, darüber hinaus wurden zwei *hisF*-Varianten beobachtet, von denen die eine drei einzelne, unabhängige Nukleotiddeletionen besaß, während die andere zwei einzelne Nukleotiddeletionen und eine einzelne Insertionen aufwies. Zusätzlich fand sich eine Sequenz mit einer einzelnen Nukleotiddeletion (Sequenz Bib_18 siehe Alignment Abschnitt 5.3.3). Es besteht die Möglichkeit, dass diese *hisF*-Variante durch zusätzliche Deletionen oder Insertionen in den nicht-sequenzierten Bereichen wie z.B. der Signalsequenz die Selektion gegen das Ampicillin überleben konnte. Bei 64 Klonen traten außerhalb der randomisierten Positionen Punktmutationen auf. Die Anzahl dieser zusätzlichen Mutationen reichte von einer Mutation bei 28 Klonen bis zu maximal vier Mutationen bei einem Klon; insgesamt wurden 112 Punktmutationen beobachtet.

Betrachtung der randomisierten Positionen

An den randomisierten Positionen fanden insgesamt 405 Codonaustausche statt; unter diesen wurden acht Codondeletionen beobachtet und 18 Codone, die nicht in der Fremdcodonmischung vorhanden waren. Diese „nicht-ingesetzten“ Fremdcodone könnten durch Punktmutationen entstanden sein. Der aus der Anzahl der Punktmutationen in den nicht-randomisierten Regionen ermittelte Wert lässt jedoch eine um den Faktor vier geringere Häufigkeit von Punktmutationen an den randomisierten Positionen erwarten. (Aus der Anzahl der betrachteten Sequenzen (100) multipliziert mit der Länge des *bisF*-Gens ohne die randomisierten Positionen (723 bp) ergeben sich 72 300 betrachtete Basenpaare, ins Verhältnis gesetzt zu der Anzahl der beobachteten Punktmutationen (112) ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit für eine Mutation von 1: 645 pro Position. Bei 100 betrachteten Sequenzen sind demnach ca. 4,2 Punktmutationen innerhalb der randomisierten Positionen zu erwarten.)

Tabelle 3.5 zeigt die Anzahl sämtlicher beobachteter Austausche einzelner Codone an den neun zu randomisierenden Positionen. Man kann sowohl erkennen, dass an allen Positionen Austausche stattgefunden haben, als auch, dass jedes der in dem Fremdcodon-Gemisch vorgegebenen Codone im Zuge der Synthese eingebaut wurde. Eine weitere statistische Betrachtung findet sich in den folgenden Abschnitten.

		A/C9 GCT	D11 GAC	L169 CTG	T171 ACC	I173 ATC	K179 AAA	S201 TCT	A204 GCT	L222 CTG	Σ
K	AAA	8	4	2	6	1	X	4	1	-	26
N	AAC	3	2	-	1	2	5	3	2	6	24
T	ACC	1	1	1	X	3	1	-	-	2	9
I	ATC	3	-	8	1	X	1	2	1	1	17
M	ATG	2	5	4	3	2	4	6	1	7	34
H	CAC	2	1	3	1	3	1	1	1	-	13
Q	CAG	1	-	1	3	1	1	2	1	2	12
P	CCG	-	-	1	-	-	2	2	1	2	8
R	CGT	2	2	3	2	-	-	1	-	6	16
L	CTG	2	3	X	1	2	-	1	3	X	12
E	GAA	1	2	5	2	6	3	1	4	1	25
D	GAC	3	X	1	1	-	2	2	2	1	12
A	GCT	X	3	3	5	2	3	1	X	3	20
G	GGT	1	1	2	2	3	-	2	5	2	18
V	GTT	3	2	2	4	2	1	1	7	1	23
Y	TAC	3	5	2	6	4	4	6	4	1	35
S	TCT	-	2	-	3	3	2	X	6	1	17
W	TGG	-	2	3	1	2	1	1	1	1	12
F	TTC	5	10	7	2	6	2	5	4	5	46
-	Del.	2	-	1	1	-	-	2	-	2	8

Tabelle 3.5: Anzahl der Austausche gegen die einzelnen Fremdcodone an den zu randomisierenden Positionen. Nicht in der Fremdcodonmischung vorhandene Codone wurden nicht berücksichtigt.

3.2.3.2 Vergleich der theoretischen und experimentell ermittelten Häufigkeiten für Codonaustausche

Aus der Anzahl der Codonaustausche ließ sich über die Formel 5.1.3 die durchschnittliche Austauschhäufigkeit ermitteln, die einem Wert von $\mu = 4,05$ entspricht. Abbildung 3.3.8 zeigt einen Vergleich des experimentell bestimmten Anteils der jeweiligen Mutantenklasse am Gesamtrepertoire mit dem theoretischen Anteil einer Mutantenklasse an einem Repertoire mit neun randomisierten Positionen und durchschnittlich vier Codonaustauschen ($\mu = 4$), der über die Formel 5.11 bestimmt wurde.

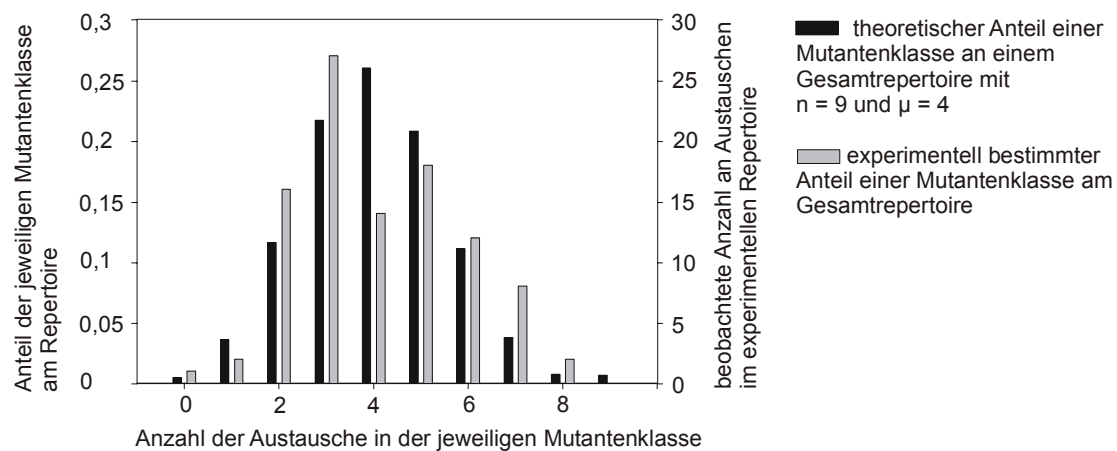


Abbildung 3.38: Vergleich des experimentell bestimmten Anteils einer Mutantenklassen am Repertoire mit dem theoretischen Anteil einer Mutantenklasse an einem Repertoire mit neun randomisierten Positionen und durchschnittlich vier Codonaustauschen ($\mu = 4$). Zusätzlich ist die tatsächlich beobachtete Anzahl an Austauschen im experimentellen Repertoire gezeigt (siehe 5.3.3).

Der experimentell ermittelte Anteil an Austauschen folgt annähernd einer Binomialverteilung, jedoch sollte die umfangreichste Mutantenklasse 4,74 Austausche besitzen (siehe Abschnitt 3.2.1.3), die experimentell ermittelte umfangreichste Klasse war aber, wie man in Abbildung 3.3.8 sehen kann, mit 27 von 100 Sequenzen diejenige mit 3 Codonaustauschen.

In Tabelle 3.6 findet sich eine Zusammenfassung und Gegenüberstellung der theoretischen und experimentell ermittelten Werte für die Austauschwahrscheinlichkeiten bzw. für die durchschnittliche Anzahl von Codonaustauschen:

vorgegebene Werte zur Synthese der Bibliothek	
Anteil der Wildtypcodone in den Codonmischungen (q)	0,47
Anteil der Fremdcodone in den Codonmischungen (p)	0,53
Anzahl der Fremdcodone in den Trinukleotidmischungen	18
resultierende theoretische Merkmale der Bibliothek	
Austauschwahrscheinlichkeit an einer einzelnen Position	0,53
durchschnittliche Anzahl an Codonaustauschen im Repertoire	4,74
experimentell ermittelte Merkmale der Bibliothek	
Größe des Repertoires (N_R)	$6,2 \times 10^8$
Austauschwahrscheinlichkeit an einer einzelnen Position (p_{exp})	0,45
durchschnittliche Anzahl an Codonaustauschen im Repertoire (μ_{exp})	4,05

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der theoretischen und experimentell ermittelten Mutationsraten bzw. der durchschnittlichen Anzahl von Codonaustauschen.

Die experimentell ermittelte durchschnittliche Mutationsrate lag mit 0,45 für alle Austausche – bzw. mit 0,42 für alle Austausche mit Ausnahme der Codondeletionen und der nicht für die Synthese eingesetzten Codone – niedriger als der erwartete Wert von 0,53 (4,74/9).

3.2.3.3 Kinetische Durchsetzungsfähigkeit der einzelnen Fremdcodone im *hisF*-Repertoire

Um die Häufigkeit der einzelnen Fremdcodone im Repertoire zu bestimmen, wurden die absoluten Werte für die gefundenen Codone durch die Anzahl der Codonpositionen, an denen das jeweilige Codon als Fremdcodon auftreten kann, dividiert. Zusätzlich wurden die Werte auf eins normiert.

Aus Abbildung 3.39 kann man entnehmen, dass die Codonhäufigkeiten relativ unsymmetrisch verteilt sind. Das häufigste Codon TTC (Phe) wurde unter den 100 sequenzierten Klonen 46-mal gefunden, das seltenste Codon CCG (Pro) 8-mal (siehe auch Tabelle 3.5). Die durchschnittliche relative Häufigkeit eines Fremdcodons betrug 45%.

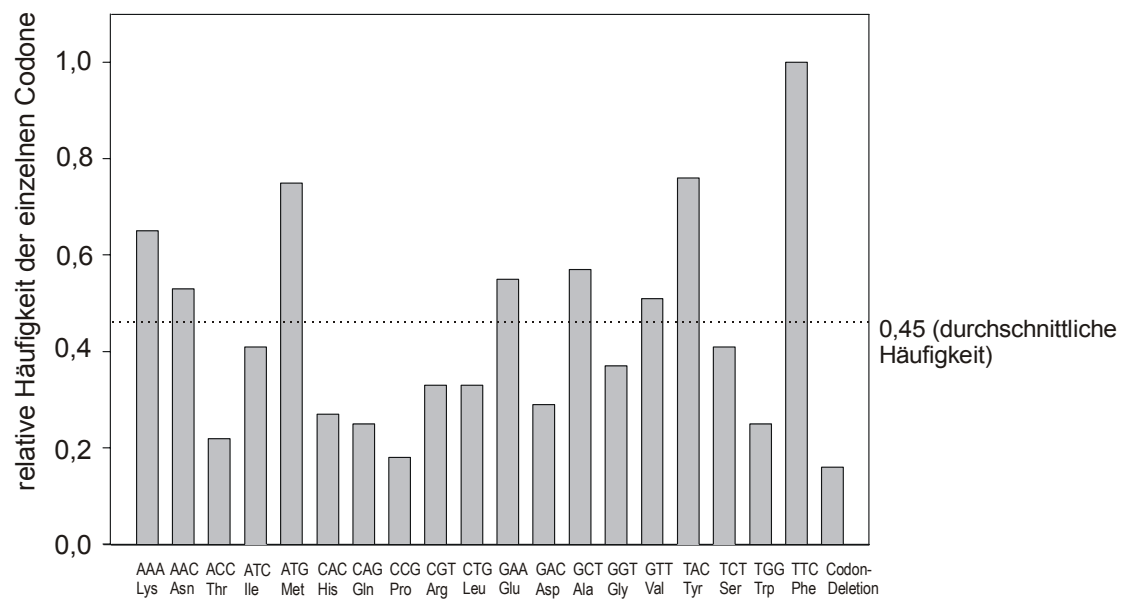


Abbildung 3.39: Relative kinetische Durchsetzungsfähigkeit der einzelnen Fremdcodone im *hisF*-Repertoire. Bei der Bestimmung der Häufigkeiten der einzelnen Fremdcodone wurde das Auftreten von Wildtypcodone an den zu randomisierenden Positionen berücksichtigt.

Eine Erklärung für den ungleichmäßigen Einbau der unterschiedlichen Fremdcodone könnte in den Kopplungseffizienzen der für die Synthese der Oligonukleotide eingesetzten Trinukleotide liegen. So ist aus früheren Arbeiten (Hartsch, 1998; Kansy 2003) bekannt, dass Thymidin-reiche Codone, wie das mit 46 Austauschen am häufigsten vertretene TTC bzw. das mit 35 Austauschen vertretene TAC als zweithäufigstes Codon, höherer Kopplungseffizienzen und Einbauraten aufweisen als z. B. Guanin-reiche Codone (eine eingehende Diskussion findet sich unter Kansy, 2003).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass während der Selektion gegen die Rasterschubmutationen (Abschnitt 3.2.2.10) eine weitere Selektion gegen Varianten, die sich schlecht translokieren ließen, stattfand, während bestimmte Codone bevorzugt wurden.

3.2.3.4 Häufigkeit der Austausche an den einzelnen Positionen des Repertoires

In Abbildung 3.40 sind die Häufigkeiten der Austausche an den einzelnen zu randomisierenden Positionen des Repertoires dargestellt. Man kann erkennen, dass sich die Häufigkeit eines Austausches an den unterschiedlichen Positionen nur geringfügig unterscheidet.

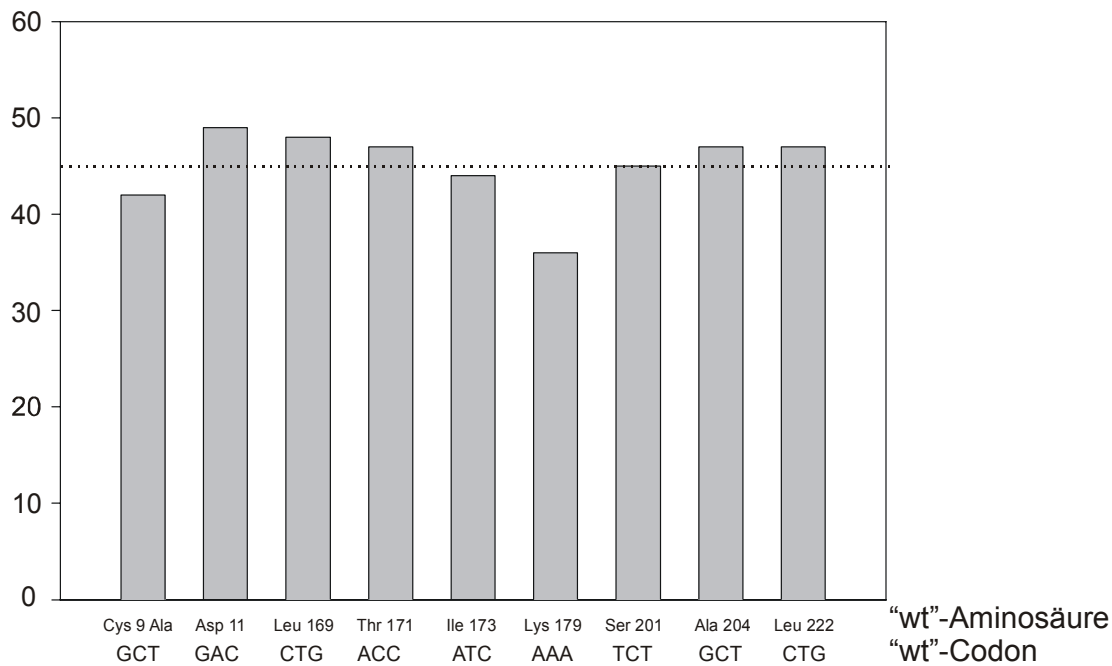


Abbildung 3.40: Häufigkeit von Austausch unter 100 untersuchten Klonen an den einzelnen Positionen des *hisF*-Genrepertoires
Die gepunktete Linie zeigt den beobachteten Durchschnittswert für einen Austausch an einer Position an.

3.2.4 Zusammenfassung

Um auf der Basis des tHisF eine möglichst große Bibliothek von Proteinen zu generieren, die potentiell in der Lage sind, ein Übergangszustandsanalogon einer Esterhydrolyse zu binden bzw. um die entsprechende Reaktion zu katalysieren, wurden nur diejenigen Bereiche des *hisF*-Gens randomisiert, die für Aminosäuren codieren, die voraussichtlich in der Lage sind, mit einem Substrat zu interagieren.

Eine Gen-Bibliothek konnte über eine *primerless* und eine anschließende *primed* PCR aus Gen-Fragmenten zusammengefügt werden. Die einzelnen Fragmente wurden über PCR-Reaktionen hergestellt, für die als *upstream*-Primer Oligonukleotide eingesetzt wurden, für deren Synthese an den zu randomisierenden Positionen Trinukleotid-Mischungen eingesetzt worden waren, die eine definierte Zusammensetzung an Wildtyp- und Fremdcodonen enthielten. Varianten mit Basendeletionen bzw. Insertionen, die Rasterschubmutationen verursachten, konnten durch Fusion an eine β -Laktamase und anschließender Selektion auf Ampicillin-Resistenz aus dem Repertoire entfernt werden.

Es wurde eine Bibliothek von *hisF*-Varianten im pCANTAB-Vektor erhalten, die eine Größe von $6,2 \times 10^8$ Klonen besaß. Eine statistische Auswertung der *hisF*-Sequenzen von 100 zufällig ausgewählten Klonen zeigte, dass an sämtlichen randomisierten Positionen Codonaustausche stattgefunden hatten und dass die Codone sämtlicher für die Synthese eingesetzter Trinukleotide gefunden wurden, wobei im Durchschnitt ca. vier Codone pro Sequenz ausgetauscht worden waren.

3.3 Selektion potentiell katalytisch aktiver HisF-Varianten über *phage display*

3.3.1 4-Nitrophenyl-Phosphonat als Übergangszustandsanalogon einer Esterhydrolyse

Ziel dieses Projektes war es, ein Protein an den Übergangszustand einer abiotischen Reaktion anzupassen. Da Übergangszustände Punkte höchster Energie entlang der Reaktionskoordinate darstellen und damit nicht als stabile Verbindungen fassbar sind, musste zu diesem Zweck ein chemisch stabiles Struktur analogon (ÜZA, Übergangszustandsanalogon) des Übergangszustandes der entsprechenden Reaktion synthetisiert werden.

Als einfache chemische Modellreaktion bot sich die in Abbildung 3.41 dargestellte Hydrolyse eines 4-Nitrophenylesters an, die sich photometrisch über das im Zuge der Reaktion freigesetzte 4-Nitrophenol verfolgen lässt (ϵ_{405} des 4-Nitrophenolat-Anions: $17\,500 \text{ [l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$; Tawfik *et al.*, 1993).

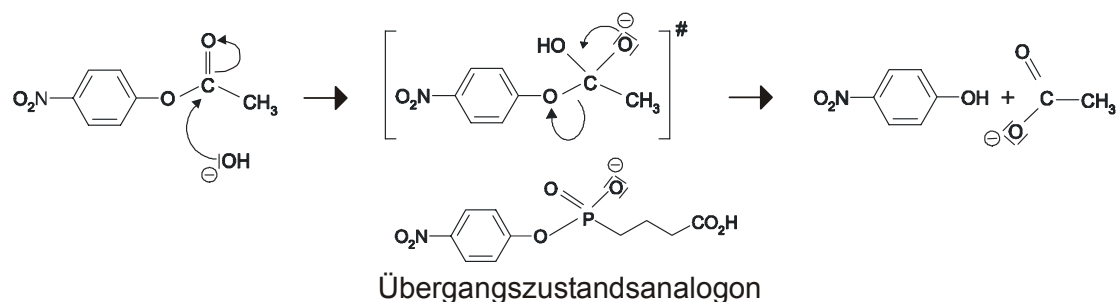


Abbildung 3.41: Schematische Darstellung der Hydrolyse eines 4-Nitrophenylesters und der entsprechende Phosphonsäureester, der als Übergangszustandsanalogon der Reaktion diente.

Die Struktur des Übergangszustandes einer solchen Esterhydrolyse ist bekannt. Darüber hinaus konnten aus Mäusen, die mit dem ebenfalls in Abbildung 3.41 gezeigten Phosphonsäureester – einem Übergangszustandsanalogon dieser Reaktion – immunisiert worden waren, bereits katalytisch aktive Antikörper mit der entsprechenden Esteraseaktivität gewonnen werden (Tawfik *et al.*, 1990). Mittlerweile sind über 50 anti-Phosphonat-Antikörper bekannt, die in der Lage sind die Hydrolysen solcher und verwandter Ester zu katalysieren (Gigant *et al.*, 1997).

Zusätzlich sind diese katalytisch aktiven Antikörper mittlerweile gut charakterisiert worden; so wurde z. B. die Struktur eines Antikörpers, der 4-Nitrophenylester hydrolysiert, aufgeklärt (Golinelli-Pimpaneau *et al.*, 1994), ebenso sind die Strukturen dreier Abzyme, die die Hydrolyse eines 4-Nitrobenzylesters katalysieren, bekannt (Charbonnier *et al.*, 1997). Diese Reaktion ist mit der Hydrolyse eines 4-Nitrophenylesters

weitgehend verwandt, auch wenn der Ester in diesem Fall nicht über die 4-Nitrophenylgruppe aktiviert wird. Da die Struktur eines dieser Antikörper zusätzlich im Komplex mit dem Übergangszustandsanalogon (Charbonnier *et al.*, 1997), im Komplex mit einem Substratanalogon und im Komplex mit einem Produkt der Reaktion aufgeklärt wurde, konnten Rückschlüsse auf den genauen Ablauf der Reaktion gezogen werden (Gigant *et al.*, 1997).

Die Darstellung des Phosphonsäureester (modifiziert nach Tawfik *et al.*, 1993) ist in Abbildung 3.42 zusammengefasst. Einzelheiten zur Synthese des 4-Nitrophenyl-Phosphonats finden sich in Abschnitt 5.2.1.

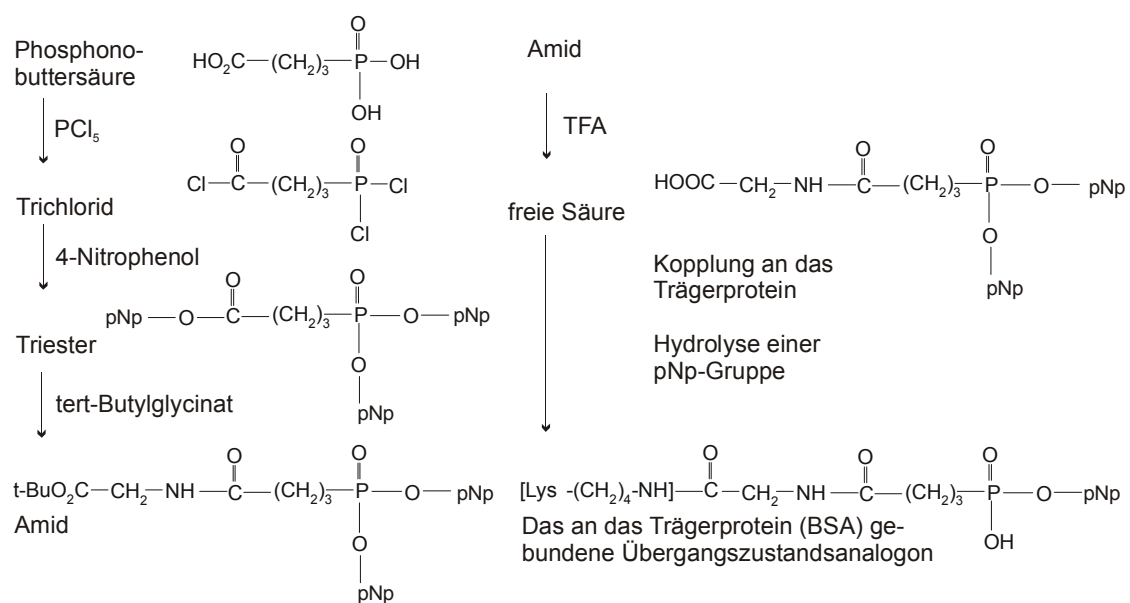


Abbildung 3.42: Schematische Zusammenfassung der Synthese des Übergangszustandsanalogons:

4-Phosphonobuttersäure wurde mit PCl_5 in das Trichlorid überführt. Im folgenden Schritt wurden die Chloratome durch 4-Nitrophenylgruppen ersetzt. Die entstandene Verbindung wurde dann unter Katalyse von 4-Dimethylaminopyridin über eine Peptidbindung an tert-Butylglycinat gekoppelt. Nachdem die tert-Butylgruppe mit Trifluoressigsäure entfernt wurde, konnte die freie Carbonsäure an Lysinreste des BSA, das als Trägerprotein diente, gekoppelt werden.

3.3.2 Test des tHisF auf intrinsische Esteraseaktivität

Nicht nur katalytisch aktive Antikörper sind in der Lage, 4-Nitrophenylester zu hydrolysieren, auch viele natürlich vorkommende Enzyme besitzen eine entsprechende Esteraseaktivität. Deshalb musste zuerst untersucht werden, ob das tHisF nicht schon von sich aus in der Lage ist, den Ester zu hydrolysieren.

Dazu wurde tHisF mit einer Endkonzentration von 67 μM in HisF-Reaktionspuffer zusammen mit dem Substrat 4-Nitrophenylacetat, das mit einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt wurde, inkubiert und die Reaktion photometrisch verfolgt (Methode 2.2.3.11; Daten nicht gezeigt). Das tHisF zeigte keinerlei Esteraseaktivität, wohingegen eine Esterase aus der Schweineleber, die als Positivkontrolle diente, in der Lage war, das 4-Nitrophenylacetat zu hydrolysieren.

Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass das tHisF höchstens eine marginale Esteraseaktivität (vergleiche Abschnitt 3.3.9) besitzt und deshalb als Strukturgerüst zur Konstruktion eines artifiziellen, Ester hydrolysierenden polypeptidischen Katalysators verwendet werden kann, ohne dass auf eine vorhandene Esteraseaktivität Rücksicht genommen werden müsste.

3.3.3 Selektion potentiell hydrolytisch aktiver HisF-Varianten über *phage display*

Varianten des HisF-Proteins, die eine potentielle Esteraseaktivität besitzen, sollten über Bindung an ein Übergangszustandsanalogon aus der phagenpräsentierten HisF-Bibliothek isoliert werden. Dazu wurde das Übergangszustandsanalogon an ein Trägerprotein gekoppelte und über Bindung an ein Polystyrol-Immuntube immobilisiert. Nach Inkubation mit einer phagenpräsentierten Proteinbibliothek wurden diejenigen Phagen, die Proteinvarianten trugen, die nicht in der Lage waren, das Übergangszustandsanalogon zu binden, durch verschiedene Waschschriffe entfernt. Die Binder wurden eluiert und konnten dann, nach einer Vermehrung in Bakterienzellen, als Subpopulation erneut zum *panning* oder zur genaueren Charakterisierung der präsentierten Proteine bzw. der zugehörigen Gene eingesetzt werden (eine genauere Beschreibung dieses Verfahrens findet sich unter 2.2.4.5).

3.3.4 *Panning* der phagenpräsentierten HisF-Bibliothek gegen das Übergangszustandsanalogon

Die Polystyrol-Immuntubes wurden mit dem Übergangszustandsanalogon beschichtet. Dazu wurden sie mit jeweils 3 ml einer 1 x PBS-Lösung, die 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ an BSA mit dem gekoppelten Übergangszustandsanalogon enthielt, bei 4°C über Nacht inkubiert.

Das *panning* wurde entsprechend Methode 2.2.4.5.2 durchgeführt. Es wurden für jede Runde 5×10^{12} pfu Phagen eingesetzt; zur Elution der gebundenen Phagen diente eine 0,1 M Glycin-Lösung mit einem pH-Wert von 2.2.

Der Titer sowohl der gebundenen als auch der ungebundenen Phagen wurde ermittelt (2.2.4.3.1) und das Verhältnis der ungebundenen zu den gebundenen Phagen und der daraus resultierende Anreicherungsfaktor bestimmt (Tabelle 3.7):

<i>panning</i>-Runde	gebundene Phagen	ungebundene Phagen	ungebundene/ gebundenen Phagen	Anreicherungsfaktor
1	$9,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{11}$	$5,6 \times 10^5$	
2	$8,9 \times 10^5$	$3,6 \times 10^{12}$	$4,0 \times 10^6$	0,14
3	$1,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^7$	0,31
4	$1,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^{12}$	$1,4 \times 10^6$	9,3

Tabelle 3.7: Anteil der bindenden bzw. der nicht-bindenden Phagen und der entsprechenden Anreicherungsfaktoren der einzelnen *panning*-Runden.

Man erkennt, dass in den Runden zwei und drei nicht nur keine Anreicherung stattfand, sondern der Anteil der bindenden Phagen entgegen den Erwartungen sogar abnahm. Erst von Runde drei auf vier zeigte sich eine leichte Zunahme an Bindern, wobei bei solch höheren *panning*-Runden aber auch weitere Effekte als nur Selektion auf Bindung an das Übergangszustandsanalogon (z. B. Selektion auf „Plastik-Binder“, die reich an aromatischen Resten sind etc.) zum tragen kommen können. Um den beobachteten Effekt zu untersuchen, wurde deshalb eine eingehendere Analyse durchgeführt.

3.3.5 Test der polyklonalen Phagen auf Bindung

Die polyklonalen, nach den einzelnen Runden gewonnenen, Phagengemische wurden mittels ELISA gemäß Abbildung 3.43 (2.2.3.10) auf Bindung getestet. Es wurden 5×10^{12} pfu Phagen/*well* verwendet. Die für die Beschichtung eingesetzte BSA/Übergangszustandsanalogon-Konzentration entsprach der des *pannings* mit Polystyrol-Immunotubes. Eine Bindungsaktivität konnte nicht detektiert werden. Ein Grund könnte darin liegen, dass die Bindungsaktivität der unter Umständen selektierten Varianten nicht ausreichte, um die verschiedenen Waschschrte zu überstehen.

Darüber hinaus ist es kaum möglich, mehr als die verwendeten 5×10^{12} pfu an Phagen in die 200 μ l fassenden Vertiefungen der ELISA-Platten zu füllen, diese Menge entspricht einer Konzentration von ca. 40 nM an Phagen. Die Konzentration des an BSA gekoppelten Übergangszustandsanalogons lässt sich zwar nicht ohne weiteres ermitteln und auch der Verstärkungseffekt durch die Antikörper und die alkalische Phosphatase ist nicht bekannt, aber die geringe Phagenkonzentration lässt ein positives ELISA-Signal

erst bei hohen Bindungsaffinitäten erwarten. Da durch eine Phagenselektion jedoch die Anreicherung von Liganden mit einer Affinität vom sub-nanomolaren bis hin zum millimolaren Bereich ermöglicht wird (NEB-Informationseite), ist es möglich, dass zwar Binder angereichert wurden, diese jedoch zu schwach sind, um durch einen ELISA nachgewiesen zu werden.

Zusätzlich fehlte eine geeignete Positivkontrolle, mit der die Bedingungen für den Assay (Proteinkonzentrationen etc.) ermittelt werden konnten.

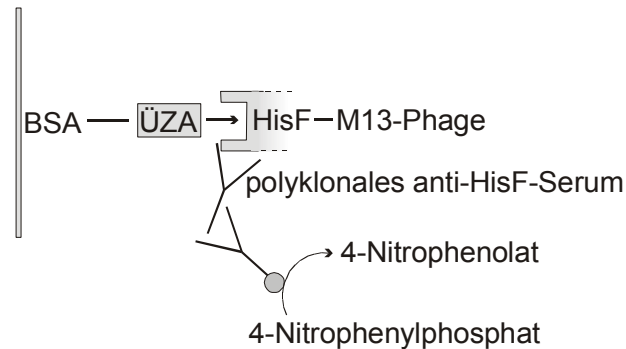


Abbildung 3.43: Schema des ELISAs zur Detektion von bindenden Phagen.

Bindende Phagen können an das immobilisierte ÜZA binden und über anti-HisF-Serum und einen zweiten an alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden.

3.3.6 PCR-Screen auf Anwesenheit des *hisF*-Gens

Um zu überprüfen, ob die fehlende Anreicherung bindender Phagen auf den Verlust der *hisF*-Genvarianten im Laufe der *panning*-Runden zurückzuführen ist, wurden jeweils 20-40 Kolonien von TG1-Zellen, die mit Phagen aus den verschiedenen Runden infiziert waren, mittels *insert screen* (2.2.2.5.8) gemäß Abbildung 3.44 auf Anwesenheit des *hisF*-Gens getestet.



Abbildung 3.44: Schematische Darstellung des PCR-screens: Nur mit Varianten, die ein *hisF*-Gen im pCANTAB-Vektor besitzen, kann ein PCR-Produkt der richtigen Länge erhalten werden.

Wie man aus Tabelle 3.8 entnehmen kann, nahm der Anteil der Phagen, die das vollständige *hisF*-Gen trugen, im Laufe des *panning*-Prozesses stetig ab. Nach Runde vier konnten keine Phagen mehr detektiert werden, die das *hisF*-Gen besaßen. Es wurde demnach vermutet, dass eine Selektion gegen Anwesenheit des HisF-Proteins stattgefunden hat. Bereits bei der ersten Produktion von Phagen für das *panning* („Start-Phagen“), kann eine Selektion gegen bestimmte Varianten stattgefunden haben – z. B. gegen solche mit positiven Ladungen, die die Translokation oder das Phagen-*assembling* erschweren.

panning-Runde					
Bibliothek in pCANTAB	Start-Phagen/P0	P1	P2	P3	P4
98%	59%	54%	33%	8%	0%

Tabelle 3.8: Anteil der Phagen, die das vollständige *hisF*-Gen tragen, an den polyklonalen Phagenmischungen, die nach den einzelnen *panning*-Runden gewonnen wurden (P0-P4). Bei der „Bibliothek in pCANTAB“ handelt es sich um die ursprüngliche Bibliothek aus Abschnitt 3.2.3.1; bei den „Start-Phagen/P0“ handelt es sich um TG1-Kolonien, die mit den Phagen, die als Ausgangsphagen für das *phage display* dienten, infiziert worden waren.

3.3.7 Western-Blot-Analyse der polyklonalen Phagen der einzelnen *panning*-Runden

Um den Anteil der HisF-tragenden Phagen nach den jeweiligen *panning*-Runden zu bestimmen, wurden jeweils 5×10^{11} pfu Phagen über SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.5) aufgetrennt und über Western-Blot (2.2.3.6/2.2.3.7) analysiert. Das HisF/gIIIp-Fusionsprotein wurde über anti-HisF-Serum und einen alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Wie man in Abbildung 3.45 sehen kann, nahm auch hier, entsprechend Tabelle 3.8, der Anteil der Phagen, die eine HisF-Variante trugen, ab, so dass schon nach Runde drei kein Fusionsprotein mehr zu erkennen ist.



Ein ähnlicher Effekt ist aus der Literatur bekannt, so kam es beim *panning* einer phagenpräsentierten Antikörperbibliothek gegen Tumorzellen ebenfalls zu einer Anreicherung an Insert-freien Phagenvarianten (Tur *et al.*, 2001).

3.3.8 Test auf 4-Nitrophenylesterhydrolyse-Aktivität der polyklonalen Phagen

Nach mehreren Runden Selektion konnte keinerlei Anreicherung von Phagen detektiert werden, die in der Lage gewesen wären, das Übergangszustandsanalogon zu binden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass der Anteil von Phagen, die das *hisF*-Gen enthielten bzw. die das entsprechende Protein präsentierten, im Laufe des *panning*-Prozesses sukzessive abnahm.

Es bestand aber die Möglichkeit, dass in der Bibliothek zwar keine starken Binder vorhanden waren, es aber zu einer leichten Anreicherung von nur schwachen Bindern gekommen sein könnte, die dann durch die Zunahme von Varianten ohne *bisF* überlagert wurde. Diese beiden gegenläufigen Effekte hätten dann eine zwischenzeitliche Anreicherung von Varianten verdeckt, die trotz ihrer schwachen Bindungsfähigkeit katalytische Aktivität besessen hätten.

Darüber hinaus könnten Binder, die das Übergangszustandsanalogon stark binden, auch in der Lage sein, das strukturell verwandte Produkt ebenfalls fest zu binden. Aus Versuchen mit katalytisch aktiven Antikörpern weiß man, dass gerade die schwachen Binder oftmals diejenigen sind, die enzymatisch aktiv sind; starke Binder sind hingegen meist Inhibitoren der korrespondierenden Reaktion. Beispielsweise wurde versucht, die enzymatische Aktivität eines katalytisch aktiven Antikörpers zu erhöhen, indem dessen Bindung an ein Übergangszustandsanalogon über *phage display* optimiert wurde. Es zeigte sich, dass Varianten, die in der Lage waren, das Analogon stärker zu binden, nicht auch gleichzeitig bessere Katalysatoren waren. Eine schwächer bindende Variante hingegen wies eine höhere Aktivität auf (Baca *et al.*, 1997).

Der 4-Nitrophenolester-Hydrolyse-Assay ist extrem sensitiv, deshalb sollte untersucht werden, ob die polyklonalen Phagemischungen, die von den verschiedenen *panning*-Runden gewonnen wurden, Esterase-Aktivität besaßen.

Zu diesem Zweck wurden jeweils $4,8 \times 10^{13}$ pfu Phagen mit Esteraseassay-Puffer (II) bei 37°C inkubiert. Dieser Puffer enthielt das in Abbildung 3.46 gezeigte Substrat Caprylsäure-4-nitrophenylester. Die Reaktionsansätze besaßen ein Volumen von jeweils 200 μl , dies entspricht einer Phagenkonzentration von 0,4 μM . In Anbetracht der Tatsache, dass voraussichtlich nicht jeder Phage ein Protein trug (vgl. Abschnitt 3.1.9.3) und es sich darüber hinaus um eine Phagemischung polyklonalen Ursprungs handelte, wurde eine lange Reaktionszeit (4 h) gewählt.

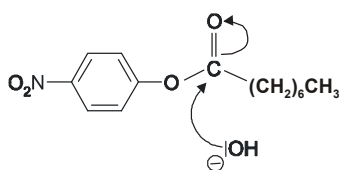


Abbildung 3.46: Das Substrat Caprylsäure-4-nitrophenylester. Durch die Hydrolyse des Esters wird das intensiv gelbe 4-Nitrophenol frei.

Es wurden drei parallele Versuche durchgeführt; als Negativkontrollen dienten Phagenpräparationen von KO7-Helferphagen bzw. von M13-Phagen, die das nicht-randomisierte tHisF präsentierten. Das durch die Reaktion freigesetzte 4-Nitrophenolat konnte durch Messung der Absorption bei 405 nm detektiert werden (Abbildung 3.47).

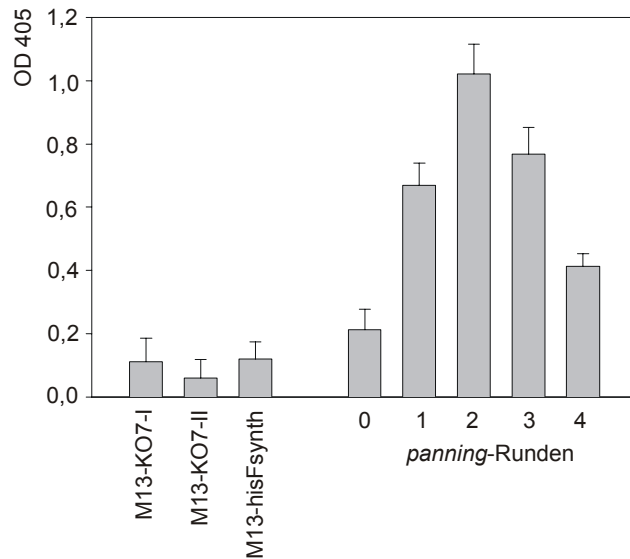


Abbildung 3.47: Test auf Hydrolaseaktivität der polyklonalen Phagenpräparationen aus den verschiedenen *Panning*-Runden.

Negativkontrollen:

M13-KO7: Helferphagen

M13-hisFsynth: HisF präsentierende Phagen

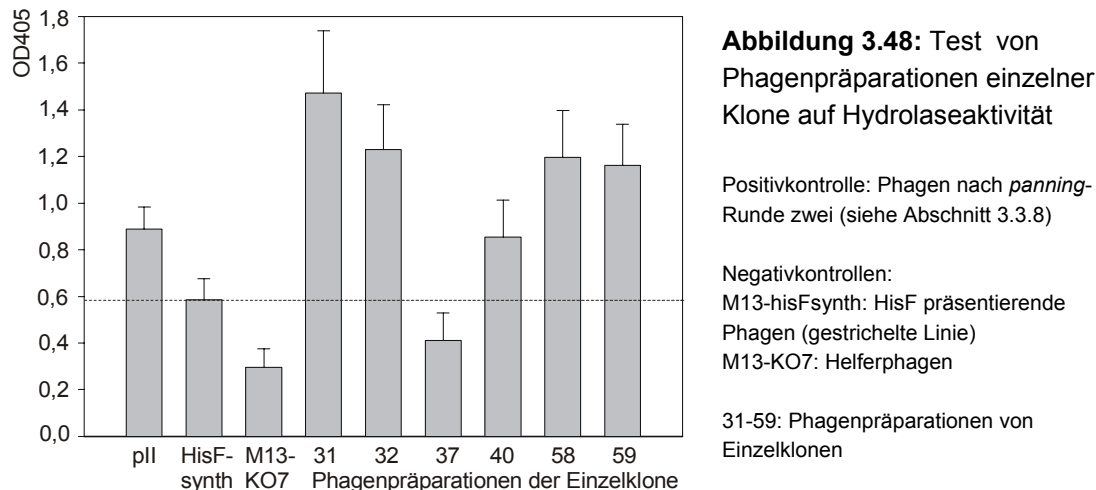
0-4: Phagen der verschiedenen *Panning*-Runden

Man erkennt, dass mit ansteigender *panning*-Runde die Hydrolase-Aktivität des polyklonalen Phagengemisches zunimmt; sie erreicht nach Runde zwei ein Maximum, um dann wieder abzufallen.

3.3.9 Test von Phagenpräparationen isolierter Klone auf Hydrolaseaktivität

Um im Rahmen eines *screens* Einzelklone mit Hydrolaseaktivität zu isolieren, sollte der Hintergrund an Klonen, die Plasmide ohne ein *hisF*-Insert trugen, verringert werden. Dazu wurden die isolierten Phagen aus den einzelnen *panning*-Runden entsprechend Abschnitt 3.1.7 für ein weiteres *panning* gegen das anti-HisF-Antikörperserum eingesetzt, so dass Phagen, die kein HisF auf ihrer Oberfläche präsentierten, aus den Phagenmischungen entfernt werden konnten.

In einem *insert screen* (2.2.2.5.8) zeigte sich, dass von den so behandelten Phagen, nahezu alle aus der *panning*-Runde drei positiv waren und dementsprechend ein *hisF*-Gen trugen (Daten nicht gezeigt). Für einen ersten *screen* auf Esteraseaktivität wurden von diesen deshalb Einzelklone gepickt und zur Präparation von Phagen eingesetzt (2.2.4.1.2). Die Esteraseaktivität dieser Präparationen wurde in drei parallelen Versuchen entsprechend Abschnitt 3.3.8 getestet, so dass Einzelklone identifiziert werden konnten, die, wie man in Abbildung 3.48 erkennen kann, eine hydrolytische Aktivität besitzen. Da die Phagenkonzentration mit 64 nM geringer war als in Abschnitt 3.3.8, wurde die Reaktionszeit auf 5 h verlängert.



Man kann erkennen, dass Phagen, die von den Klonen 31, 32, 40, 58 und 59 präpariert wurden, eine zwar geringe aber dennoch signifikante Esteraseaktivität besaßen. Im Vergleich zu dem Experiment in Abschnitt 3.3.8 ist das Signal, das von den HisF_{synth}-präsentierenden Phagen verursacht wird, stärker. Da aber eine geringere Phagenkonzentration eingesetzt worden war, musste die Reaktionszeit verlängert werden, wodurch eine eventuelle geringfügige intrinsische Esteraseaktivität des tHisF stärker zum tragen kommen konnte. Ebenso hat die hydrolytische Aktivität der Phagen aus der *panning*-Runde zwei leicht abgenommen; dies kann auf einen zwischenzeitlichen proteolytischen Abbau des präsentierten Enzyms zurückgeführt werden.

Da sämtliche betrachteten Klone eine nur geringe bzw. keine Esteraseaktivität aufwiesen, sollten in der Population noch Varianten vorhanden sein, die eine sehr starke Aktivität besitzen und somit den gemessenen durchschnittlichen Wert (siehe Abbildung 3.47) für die Aktivität der polyklonalen Phagemischung verursachen konnten.

3.3.9.1 Abschätzung enzymkinetischer Parameter

Geht man davon aus, dass eine OD₄₀₅ von 1,2 – ein Wert, der um den Faktor zwei über dem von den HisF_{synth}-Phagen verursachten Hintergrund liegt – als signifikant betrachtet werden kann, dann kann man über die umgesetzte Substratkonzentration und die vorhandene Enzymkonzentration die dafür notwendige *turnover number* (k_{cat}) ermitteln: Eine OD₄₀₅ von 1,2 entspricht einer umgesetzten Substratkonzentration von $6,9 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ (bei $\epsilon_{405} = 17\,500 \text{ [l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$ für das 4-Nitrophenolat-Anion); bei einer Reaktionszeit von ca. 5 h ergibt sich daraus ein v_{max} -Wert von 3,8 nM/sec ($v_{max} = [S_{umgesetzt}] \times \Delta t^{-1}$). Geht man davon aus, dass jeder fünfzehnte Phage eine HisF-Variante trägt (siehe Abschnitt 3.1.9.3), befanden sich in dem Assay ca. 4,3 nM potentiell aktives Enzym; zusammen mit dem v_{max} -Wert ergibt sich damit ein k_{cat} -Wert von 0,88 [1/sec] ($k_{cat} = v_{max} \times [E]^{-1}$), so dass man von einer tatsächlichen enzymatischen Aktivität sprechen kann.

3.3.10 DNA-Sequenzanalyse der *hisF*-Varianten mit Esteraseaktivität

Die DNA-Sequenzen der aktiven Klone wurden über DNA-Sequenzanalyse ermittelt und sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Von dem Klon #59 wurde aufgrund technischer Probleme keine Sequenz erhalten.

Überraschenderweise fanden sich in den Klonen #31 und #32 Deletionen, die sich über weite Teile des Gens erstrecken und darüber hinaus Rasterschubmutationen verursachen, trotzdem waren die entsprechenden Phagenpräparationen, auch mit Phagen aus unterschiedlichen Präparationen (Daten nicht gezeigt), in den Esteraseassays aktiv. Klon #58 besitzt ein zusätzliches Amber-Stopcodon, das jedoch in einem Amber-Suppressor-Stamm wie z. B. dem verwendeten Stamm TG1 teilweise als Glutaminocodon gelesen wird (siehe Abschnitt 3.1.9.1) und den Anteil der präsentierten HisF-Variante nicht zu beeinflussen scheint (siehe Abschnitt 3.3.11).

Klon	Aminosäureaustausche										
	Wild-typ	A9	D11	L169	T171	I173	K179	S201	A204	L222	weitere Austausch
# 40	N	D	L	T	F	F	S	P	L		A216S
# 37	D	D	A	S	I	M	S	A	L		-
# 58	A	Q	L	T	Q	E	R	A	L		K58Amber-Stop L211P
# 31	Deletionen mit Rasterschubmutationen										
# 32	A	Deletionen mit Rasterschubmutationen									

Tabelle 3.9: Aminosäureaustausche in den HisF-Varianten mit Esteraseaktivität. Austausch einer Wildtypamino-säure gegen eine Fremdaminosäure sind rot dargestellt.

3.3.11 Western-Blot-Analyse von Phagen mit HisF-Varianten mit Esteraseaktivität

Von den Phagenpräparationen der Klone mit Esteraseaktivität wurden jeweils ca. 5×10^{11} pfu Phagen über SDS-Gelelektrophorese (2.2.3.5) aufgetrennt und über Western-Blot (2.2.3.6/2.2.3.7) analysiert. Das HisF/gIIIp-Fusionsprotein wurde über anti-HisF-Serum und einen alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Wie man in Abbildung 3.49 sehen kann, konnte das Fusionsprotein bei den Phagenpräparationen der Klone #40, #58 und #59, die Esteraseaktivität aufwiesen, detektiert werden. Auch in dem Klon #58, der ein Amber-Stop innerhalb seiner Sequenz für die *hisF*-Genvariante besitzt, wurde eine vergleichbare Menge an Fusionsprotein produziert.

In der Spur von Klon #37 findet sich keine Bande für das Fusionsprotein, dieser besitzt – trotz vollständiger *hisF*-Genvariante – auch keine Esteraseaktivität (vgl. Abbildung 3.48). Es besteht die Möglichkeit, dass diese Variante ein nicht korrekt gefaltetes Protein bildet, das dann u. U. proteolytisch abgebaut wird.

Die Varianten #31 und #32 zeigen, wie das Ergebnis der DNA-Sequenzanalyse vermuten lässt, ebenfalls kein Fusionsprotein im Wester-Blot, obwohl eine Esteraseaktivität detektiert werden konnte.

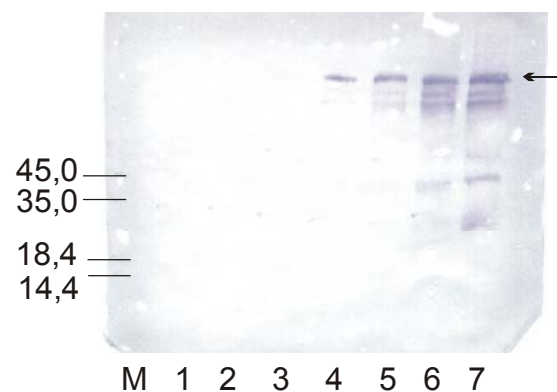


Abbildung 3.49: Western-Blot-Analyse der Phagenpräparationen von Klonen mit Esteraseaktivität.

gefärbt mit anti-HisF-Serum/ anti-Kaninchen-AK

Der Pfeil markiert das HisF/gIIIp-Fusionsprotein

M: *protein molecular weight marker* ($10^{-3} \times M_r$)

- 1.: Phagenpräparation von Klon #31
- 2.: Phagenpräparation von Klon #32
- 3.: Phagenpräparation von Klon #37
- 4.: Phagenpräparation von Klon #40

- 5.: Phagenpräparation von Klon #58
- 6.: Phagenpräparation von Klon #59
- 7.: Phagenpräparation von HisFSynth-präsentierenden Phagen

3.3.12 Zusammenfassung

Ziel dieses Projektes war es, eine 4-Nitrophenylesterase-Aktivität in das $(\beta\alpha)_8$ -barrel Protein tHisF einzuführen. Dazu sollten Varianten dieses Proteins, die in der Lage waren ein 4-Nitrophenyl-Phosphonat zu binden, über *phage display* aus einer phagenpräsentierten HisF-Bibliothek angereichert werden.

Es zeigte sich, dass während des *panning*-Prozesses keine Anreicherung von bindenden Phagen, wie sie in Abschnitt 3.1.7 beobachtet wurde, detektiert werden konnte, ebenso konnte in einem ELISA keine Bindung der polyklonalen Phagenmischungen, die nach den einzelnen *panning*-Runden isoliert wurden, beobachtet werden. Darüber hinaus nahm der Anteil an Phagen, die das *hisF*-Gen enthielten bzw. die das HisF auf ihrer Oberfläche präsentierten, während des *pannings* sukzessive ab.

Da aber die Möglichkeit bestand, dass eine Anreicherung von schwachen Bindern mit katalytischer Aktivität durch eine generelle Abreicherung durch das Überwachsen der Population mit Varianten ohne *hisF* überlagert wurde, wurden die polyklonalen

Phagenpräparationen auf 4-Nitrophenylesterase-Aktivität getestet. Es zeigte sich, dass die Aktivität tatsächlich zunahm, nach Runde zwei ein Maximum erreichte und dann wieder abfiel. In zukünftigen Experimenten soll deshalb nach jeder Runde *panning* auf Bindung einer Substanz eine weitere Runde *panning* auf Bindung an einen gegen das präsentierte Enzym gerichteten Antikörper eingeschoben werden, so dass Varianten, die kein Protein präsentieren, aus der Population entfernt werden können.

Aus der polyklonalen Phagenmischung aus *panning*-Runde drei konnten einzelne Varianten isoliert werden, die eine – wenn auch nur marginal signifikante – Esteraseaktivität aufwiesen.

Im weiteren Verlauf des Projektes sollen die entsprechenden Gen-Varianten in einen Expressionsvektor umkloniert werden, in dem die jeweilige *hisF*-Variante als Fusion mit einer Sequenz, die für einen His-tag codiert, vorliegt, so dass ausreichende Mengen an gereinigtem Protein für eine weitere proteinchemische Charakterisierung zur Verfügung gestellt werden können. Zusätzlich sollen weitere aktive HisF-Derivate über einen erneuten *screen* isoliert werden, zumal vermutet werden kann, dass sich in der Population noch Varianten befinden, die eine hohe Esteraseaktivität aufweisen und deshalb in der Lage waren, die, im Vergleich zu den bisher betrachteten Einzelklonen, hohe Aktivität der polyklonalen Phagenmischungen zu verursachen. Diese können dann, zusammen mit den bereits gefundenen, über *DNA-shuffling* rekombiniert und auf aktivere Varianten untersucht werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Aus einer Bibliothek partiell randomisierter Varianten des $(\beta\alpha)_8$ -*barrel*-Proteins tHisF – der Synthetase-Untereinheit der Imidazol-Glyzerinphosphat-Synthetase aus *Thermotoga maritima* – konnte durch Selektion auf Bindung an ein Übergangszustandsanalogon einer 4-Nitrophenylester-Hydrolyse eine polyklonale Phagenmischung mit einer entsprechenden Hydrolaseaktivität isoliert werden.

Das tHisF_(C9A) wurde auf genetischer Ebene zwischen eine Signalsequenz und das Hüllprotein gIIIp des Phagen M13 fusioniert. Nachdem die Nettoladung des Bereiches, der direkt auf die Prozessierungs-Stelle der *Leader*-Peptidase folgt, verringert worden war, konnte das Protein erfolgreich auf der Phagenoberfläche nachgewiesen werden.

Durch einen HisF-Aktivitätsassay konnte gezeigt werden, dass tHisF_(C9A)-präsentierende Phagen die entsprechende enzymatische Aktivität besitzen; zusätzlich konnten solche Phagen mittels Phage-Display über Bindung an ein polyklonales anti-HisF-Antikörperserum aus einer HisF-/Hirudin-Phagenmischung angereichert werden.

Basierend auf der *thisF*-Sequenz wurde ein Genrepertoire synthetisiert; dazu wurden sich überlappende Fragmente des *hisF*-Gens über eine *primerless* und eine anschließende *primed* PCR zusammengesetzt. Die einzelnen Gen-Abschnitte wurden mittels *upstream*-Primern amplifiziert, die mit Codonmischungen aus definierten Zusammensetzungen an Wildtyp- und Fremdcodonen über die Trinukleotidphosphoamidit-Methode synthetisiert worden waren, so dass es möglich war, das Gen gezielt partiell zu mutagenisieren und eine vorgegebene Populationsstruktur zu erhalten. Die neun randomisierten Positionen entsprachen Aminosäureresten, die voraussichtlich an einer Interaktion des Proteins mit einem beliebigen Substrat beteiligt sein könnten.

Varianten mit Basendeletionen bzw. Insertionen, die Rasterschubmutationen verursachen, konnten durch Fusion an eine β -Laktamase und eine anschließende Selektion auf Ampicillin-Resistenz aus dem Repertoire entfernt werden.

Es wurde ein Genrepertoire mit $6,2 \times 10^8$ Klonen erhalten. Die DNA-Sequenzen von 100 zufällig ausgewählten Klonen wurden analysiert. Es zeigte sich, dass an sämtlichen randomisierten Positionen Codonaustausche stattgefunden haben, wobei der experimentell ermittelte Anteil an Austauschen annähernd einer Binomialverteilung entspricht. Die durchschnittliche Austauschhäufigkeit (μ) lag mit 4,05 Austauschen unter der theoretisch erwarteten von 4,74 Austauschen.

Nach Tawfik *et al.*, 1993 konnte ein stabiles Übergangszustandsanalogon einer 4-Nitrophenylester-Hydrolyse synthetisiert und an das Trägerprotein BSA gekoppelt werden.

Durch *Panning* der phagenpräsentierten HisF-Bibliothek gegen das immobilisierte Übergangszustandsanalogon konnten polyklonale Phagenmischungen selektiert werden, die eine 4-Nitrophenylester-Hydrolase-Aktivität aufwiesen. Aus diesen konnten dann individuelle Klone mit einer – wenn auch nur marginal signifikanten – Aktivität isoliert werden.

5 ANHANG

5.1 Mathematischer Anhang

Verwendete Variablen

n	Anzahl der randomisierten Positionen (in dieser Arbeit: $n = 9$)
x	Anzahl der Mutationen in einer Mutantenklasse (in dieser Arbeit: $x = 0, 1, 2, \dots, 9$)
P	Anteil der jeweiligen Mutantenklasse am gesamten Repertoire
p	erwartete Mutationsrate an einer randomisierten Position bzw. Anteil der Fremdcodons in der entsprechenden Codonmischung
$(1-p)$	Anteil des Wildtypcodons in der entsprechenden Codonmischung
\bar{p}_{exp}	Experimentell bestimmte Rate der Codonaustausche
k	Anzahl der ausgewerteten Klone (in dieser Arbeit: $k = 100$)

Binomialverteilung

$$P(x / p, n) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x} = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{n-x} \quad 5.1.1$$

$$\text{Mittelwert } \mu = n \cdot p \quad 5.1.2$$

durchschnittliche, experimentell bestimmte Rate für Codonaustausche im *hisF*-Repertoires \bar{p}_{exp}

$$\bar{p}_{\text{exp}} = \frac{\sum \text{Austausche}}{n \cdot k} \quad 5.1.3$$

durchschnittliche, experimentell bestimmte Anzahl der Mutationen im Repertoire

μ_{exp}

$$\mu_{\text{exp}} = n \cdot \bar{p}_{\text{exp}} \quad 5.1.4$$

Umfang der jeweiligen Mutantenklasse (N_i)

$$N_i = \binom{n}{x} \times y^x = \frac{n!}{(n-x)! \times x!} \times y^x \quad 5.1.5$$

$n = 9$ Anzahl der randomisierten Positionen

$x = 0-9$ Anzahl der Mutationen in einer Mutantenklasse

$y = 18$ Anzahl der eingesetzten Fremdcodons

Erwartete Größe der jeweiligen Mutantenklasse (N_m) im experimentellen Repertoire

$$N_x = P_{n,x} \cdot N_R \quad 5.1.6$$

$N_R = 6,2 \times 10^8$ Größe des *bisF*-Genrepertoires bzw. Anzahl der unselektierten Klone

5.2 Chemischer und molekularbiologischer Anhang

5.2.1 Darstellung des mit dem Übergangszustandsanalogon gekoppelten Rinderserumalbumins (modifiziert nach Tawfik *et al.*, 1993)

Wie in der Zusammenfassung der Synthese in Abbildung 3.42/ Abschnitt 3.3.1 gezeigt, wurde 4-Phosphonobuttersäure mit PCl_5 in das Trichlorid überführt. Im folgenden Schritt wurden die Chloratome im Zuge einer nukleophilen Substitution durch 4-Nitrophenylgruppen ersetzt. Die entstandene Verbindung wurde dann unter Katalyse von 4-Dimethylaminopyridin über eine Peptidbindung an tert-Butylglycinat gekoppelt und, nachdem die tert-Butylgruppe mit Trifluoressigsäure entfernt wurden, über Lysinreste an das Trägerprotein BSA gekoppelt.

5.2.1.1 Vorbereiten der Lösungsmittel, Lösungen und Geräte

Sämtliche Glasgeräte wurden im Trockenschrank oder mittels eines Föns ausgeheizt

Lösungsmittel wurden durch Destillation gereinigt und von eventuell vorhandenen Wasserspuren befreit, oder, im Falle des Tetrahydrofurans, als wasserfreies Lösungsmittel gekauft und über Molekularsieb aufbewahrt.

Das 4-Nitrophenol wurde getrocknet, indem 100 ml einer Stammlösung von 4-Nitrophenol (2,5 M) in Tetrahydrofuran mit 20 ml Dichlormethan versetzt wurden, welches dann im Rotationsverdampfer wieder entfernt wurde. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, wodurch eventuell vorhandenes Wasser azeotrop aus der Lösung geschleppt wurde.

5.2.1.2 Darstellung des Phosphonobuttersäure-Trichlorids (I)

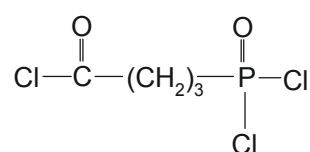


Abbildung 5.1: Struktur des Phosphonobuttersäure-Trichlorids (I)

59,9 mmol 4-Phosphonobuttersäure (10 g; M_r : 168) wurden in 50 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst und nach Zugabe von 178,5 mmol PCl_5 (32,2 g; M_r : 208,5 g/mol), das in 100 ml trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst wurde, unter Rückfluss über Nacht bei 45°C unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr; CaCl_2) gerührt.

Die Lösung wurde mit trockenem N_2 begast, um Reste des entstandenen HCl zu entfernen. Das Trichlorid (I) wurde schließlich zu einem gelblichen Öl eingengt und

über Vakuumdestillation (Mikrodestille, Ölpumpe mit Kühlfallen) gereinigt, wobei der Siedepunkt bei 98°C lag. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: Die Reinheit der 4-Phosphonobuttersäure wurde vom Hersteller mit 85% angegeben, die theoretische Ausbeute lag dementsprechend bei 50,9 mmol (11,4 g). Nach der Destillation wurden 34,7 mmol (7,75 g) an Öl erhalten, was einer Ausbeute von 68% entspricht.

5.2.1.3 Darstellung des Triesters (II)

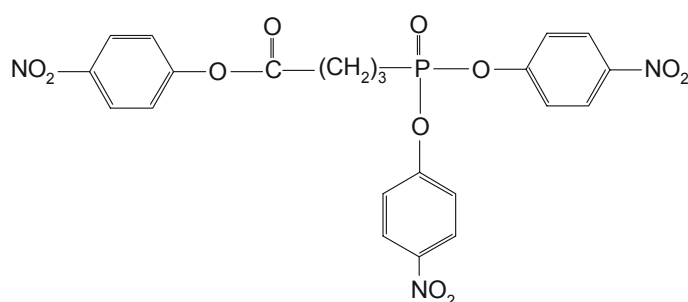


Abbildung 5.2:
Struktur des Triesters (II)

(4-Nitrophenyl 4-[Bis(4-nitrophenoxy)phosphoryl]-butyrat)

114,5 mmol 4-Nitrophenol als wasserfreie 4-Nitrophenol-Stammlösung (44,36 ml; 2,5 M, siehe oben) und 114,5 mmol Ethyldiisopropylamin (19,6 ml; M_r : 129,24; $\delta = 0,73$ g/ml) wurden in 20 ml trockenem Tetrahydrofuran vorgemischt, langsam zu einer Lösung von 34,7 mmol (7,75 g) 4-Phosphonobuttersäure-Trichlorid (I) in 250 ml trockenem Tetrahydrofuran getropft und über Nacht bei RT gerührt, wobei Ethyldiisopropylamin-Hydrochlorid als weißes Salz ausfiel.

Die Mischung wurde filtriert und das Hydrochlorid mit trockenem Tetrahydrofuran gewaschen. Die Tetrahydrofuranlösung, die den Triester enthielt, wurde eingeeengt, wobei der Triester (II) in Form eines braungelben Öls zurückblieb. Das Öl wurde in wenig Tetrahydrofuran gelöst und der Triester aus heißem Tetrahydrofuran/Isopropanol umkristallisiert. Die ausgefallenen Kristalle wurden abfiltriert, mit Ethylether gewaschen und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet.

Die Ausbeute betrug 62,2% (11,46 g; 21,6 mmol; M_r : 531). Die Identität des Triesters, die in Vorversuchen durch 1H NMR (DMSO) und DCI-Massenspektroskopie bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt), wurde, wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, über ihr Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9 : 1(v/v)); $R_f = 0,95$) überprüft:

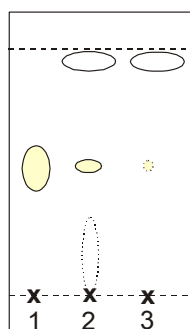


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Dünnschichtchromatographien zur Synthese des Triesters (II) (Laufmittel Chloroform/10% Methanol).

- 1.: 4-Nitrophenol
2.: Ansatz nach der Reaktion zur Substitution der Chloratome durch 4-Nitrophenolatgruppen

Man kann erkennen, dass nach der Reaktion noch vorhandenes 4-Nitrophenol und weitere Verunreinigungen durch die Umkristallisation abgetrennt werden konnten. Der beobachtete R_f -Wert entsprach dem aus den Vorversuchen bekannten von ca. 0,95.

5.2.1.4 Darstellung des Amids (III)

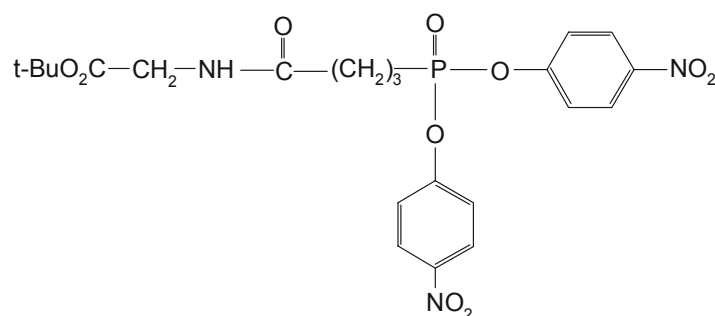


Abbildung 5.4: Struktur des Amids (III)

(N-(tert-Butoxycarbonylmethyl)-4-[bis(4-nitrophenoxy)phosphoryl]butyramid)

21,6 mmol (11,46 g) des Triesters (II) und 26 mmol (3542,4 μ l; $\delta = 0,96$ g/mol; Mr: 131,2) des tert-Butylglycinats wurden in 200 ml trockenem Dichlormethan gelöst; zu dem Ansatz wurden 21,6 mmol 4-Dimethylaminopyridin (DMAP; 2635,2 mg; Mr: 122,17 g/mol) gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die erfolgreiche Umsetzung des Triesters wurde über Dünnschichtchromatographie überprüft. Die Lösung wurde daraufhin mit halbkonzentrierter NaHCO_3 -Lösung, Natriumphosphatpuffer (200 mM, pH 7,0) und Ammoniumchlorid-Lösung extrahiert, um das 4-Dimethylaminopyridin zu entfernen. Die Lösung wurde eingengt und es wurde versucht, das ölige tert-Butylglycinatamid (III) aus heißem Ethylacetat/Cyclohexan umzukristallisieren. Da das Amid als Öl ausfiel und Reste von DMAP in beiden Phasen vorhanden waren, wurde verbliebenes DMAP mittels Säulenchromatographie mit Dichormethan/5% Isopropanol als Laufmittel und 1 bar Überdruck abgetrennt. Das Amid wurde in Einzelportionen von je 1 g gereinigt, wobei jeweils 100 g Kieselgel 60 als Matrix verwendet wurden.

Die eluierten Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9 : 1(v/v); $R_f = 0,8$) analysiert, diejenigen, die das Amid enthielten, wurden vereinigt und eingengt. Es wurde ein gelblicher Sirup erhalten, aus dem nach Lagerung bei 4°C ein gelblicher Feststoff ausfiel. Der ölige Überstand wurde

mit einer Pipette entfernt und der Feststoff über Dünnschichtchromatographie, ^1H NMR (DMSO; 5.10) und Massenspektroskopie (5.9) untersucht.

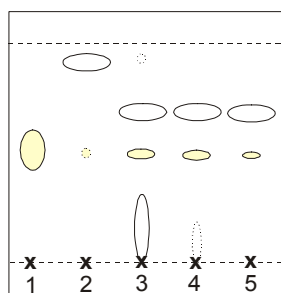


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Dünnschichtchromatographien zur Synthese des Amids (III) (Laufmittel Chloroform/10% Methanol).
1.: 4-Nitrophenol,
2.: der gereinigte Triester

Man erkennt, dass der beobachtete R_f -Wert in etwa dem aus der Literatur bekannten von ca. 0,8 entspricht (Tawfik *et al.*, 1993). Durch Extraktion und Säulenaufreinigung konnte das noch vorhandene hydrophile DMAP und ein Teil des freien 4-Nitrophenols abgetrennt werden.

5.2.1.5 Darstellung der freien Säure (IV)

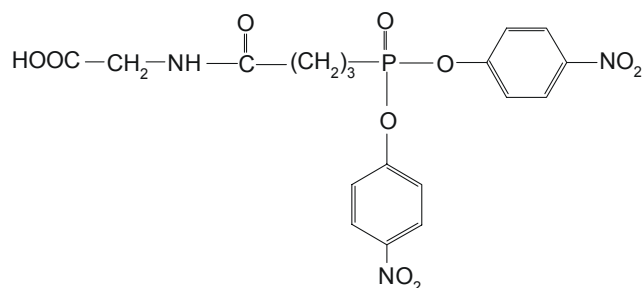


Abbildung 5.6:
Struktur der freien Säure (IV)

Zur Entschützung wurden 330 mg des Amids (III) in 2 ml Dichlormethan gelöst, mit 2 ml Trifluoressigsäure versetzt und für 40 min inkubiert. Der Verlauf der Reaktion wurde, wie in Abbildung 5.7 dargestellt, über Dünnschichtchromatographie verfolgt (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9 : 1(v/v)); $R_{f_unentschützt} = 0,8$, $R_{f_entschützt}$: ca. 0,4). Aufgrund der freien Carboxygruppe verringert sich der R_f -Wert des freien Übergangszustandsanalogons:

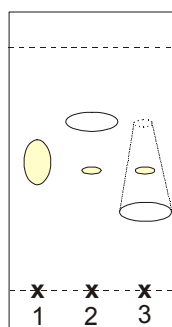


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Dünnschichtchromatographien zur Synthese des fertigen Übergangszustandsanalogons (Laufmittel Chloroform/10% Methanol).

1.: 4-Nitrophenol

Nachdem das Lösungsmittel und die Trifluoressigsäure im Rotationsverdampfer abgezogen wurden, blieb ein weißlicher Feststoff zurück.

5.2.1.6 Reinigung der freien Säure des Übergangszustandsanalogons

Das entschlützte Übergangszustandsanalogon (IV) wurde über eine Säulenchromatographie aufgereinigt. Als Säule diente eine abgesägte 25 ml-Glaspipette mit etwas Glaswolle, um das Säulenmaterial am Auslaufen zu hindern. Als Matrix wurden 10 g Kieselgel 60 verwendet; die Elution erfolgte über einen Gradienten aus Dichormethan mit 3,5-14% Methanol. Die Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie untersucht (Kieselgel; Chloroform : Methanol (9 : 1(v/v); R_f : ca. 0,4). Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und das Lösungsmittel abgezogen (Ausbeute 170 mg). Das Produkt wurde über Massenspektroskopie analysiert (Abbildung 5.11).

5.2.1.7 Kopplung des Übergangszustandsanalogons an Rinderserumalbumin und Hydrolyse einer der 4-Nitrophenolgruppen

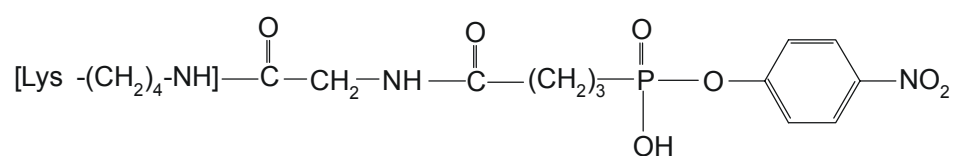


Abbildung 5.8: Struktur des an das Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelten Übergangszustandsanalogons nach der Hydrolyse einer der 4-Nitrophenolgruppen.

Das aufgereinigte Übergangszustandsanalogon (IV) wurde mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid) an das Trägerprotein Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelt (Hermanson; 1996). Dazu wurden $2,4 \times 10^{-5}$ des in DMSO gelösten Übergangszustandsanalogons (IV) mit EDC im 10fach molaren Überschuss und NHS (Endkonzentration im Gesamtansatz: 5 mM) vorinkubiert. Der Ansatz wurde dann zu einer BSA-Lösung von $4,16 \times 10^{-7}$ mol in 1 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,4 gegeben. Nach 3 h bei RT wurde zur Hydrolyse der

zweiten 4-Nitrophenolgruppe gegen eine 2%ige NaCO_3 -Lösung dialysiert. Das NaCO_3 und freies 4-Nitrophenol wurden dann durch Dialyse 1 x PBS entfernt.

Um das Verhältnis von BSA zu gekoppeltem Übergangszustandsanalogon zu ermitteln, wurde ein Aliquot der BSA-ÜZA-Lösung bei 96°C mit 10 M NaOH hydrolysiert und die Menge des freigewordenen 4-Nitrophenols photometrisch bestimmt ($\epsilon_{405} = 17\,500$). Das Verhältnis von BSA zu freigewordenem 4-Nitrophenol lag bei 1: 8,7.

5.2.1.8 Massen- und ^1H NMR-Spektren zur Synthese des Übergangszustandsanalogons

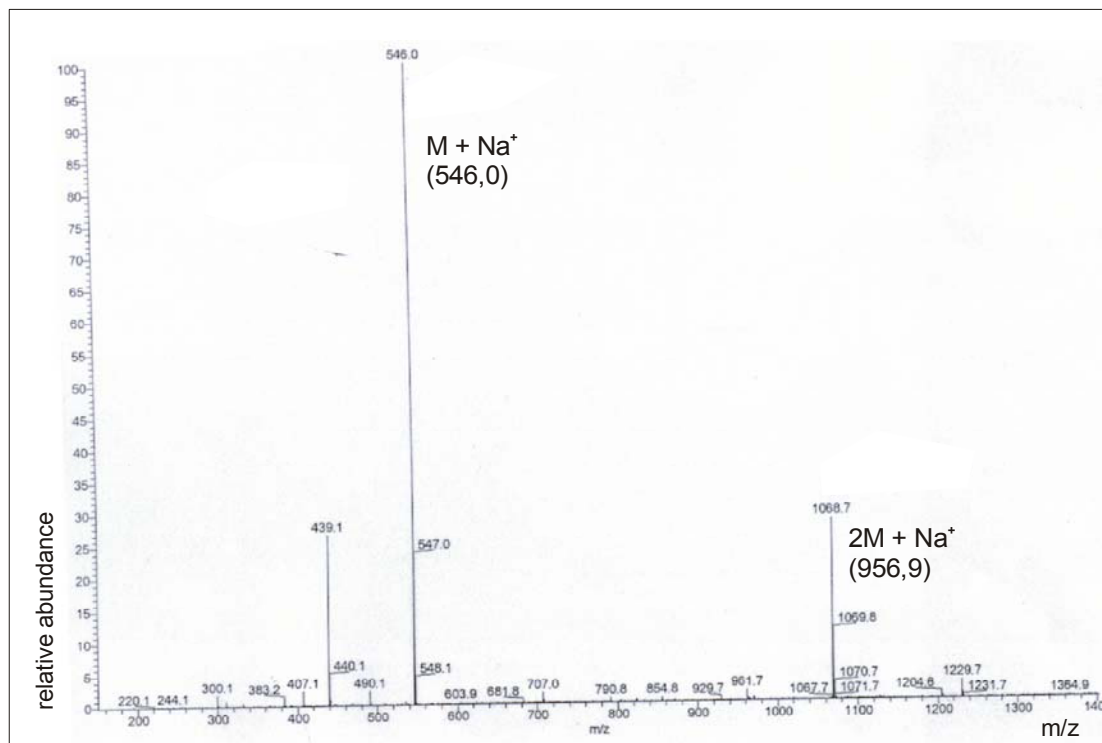


Abbildung 5.9:

Ergebnis der Massenspektroskopischen Untersuchung des tert-Butylglycinatamids mittels ESI

M_r tert-Butylglycinatamid: 523 g/mol

M_r tert-Butylglycinatamid + Na^+ : 546 g/mol

M_r 2 x tert-Butylglycinatamid + Na^+ : 1069 g/mol

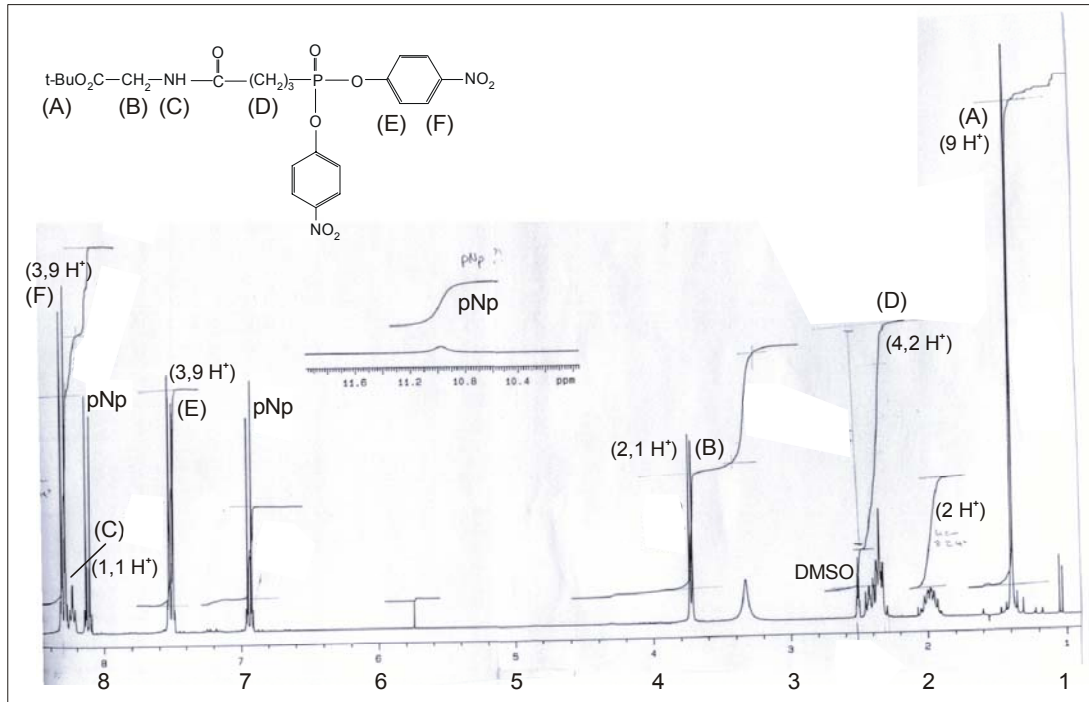


Abbildung 5.10: ¹H-NMR-Spektrum des tert-Butylglycinamids

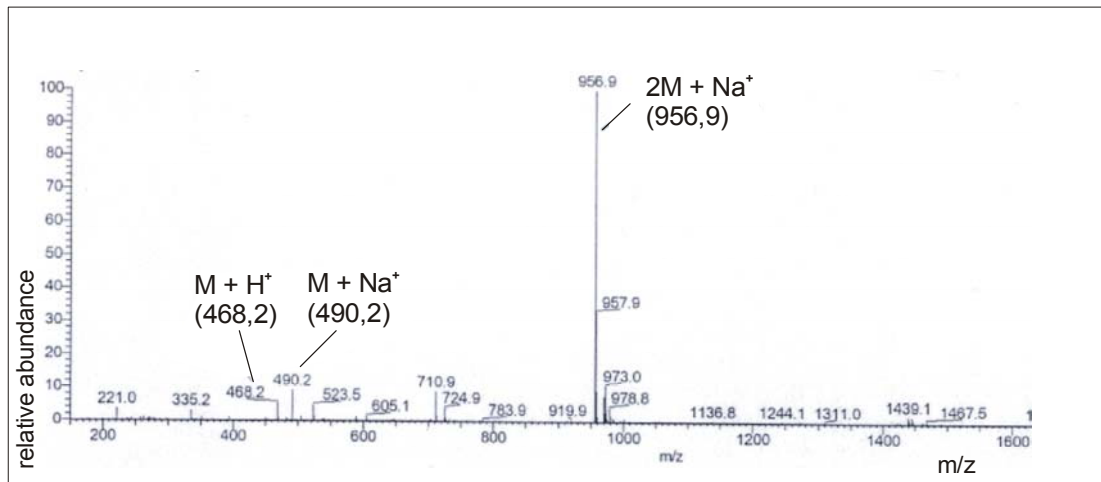


Abbildung 5.11: Ergebnis der Massenspektroskopischen Untersuchung des freien Übergangszustandsanalogons mittels ESI

M_r : 468 g/mol

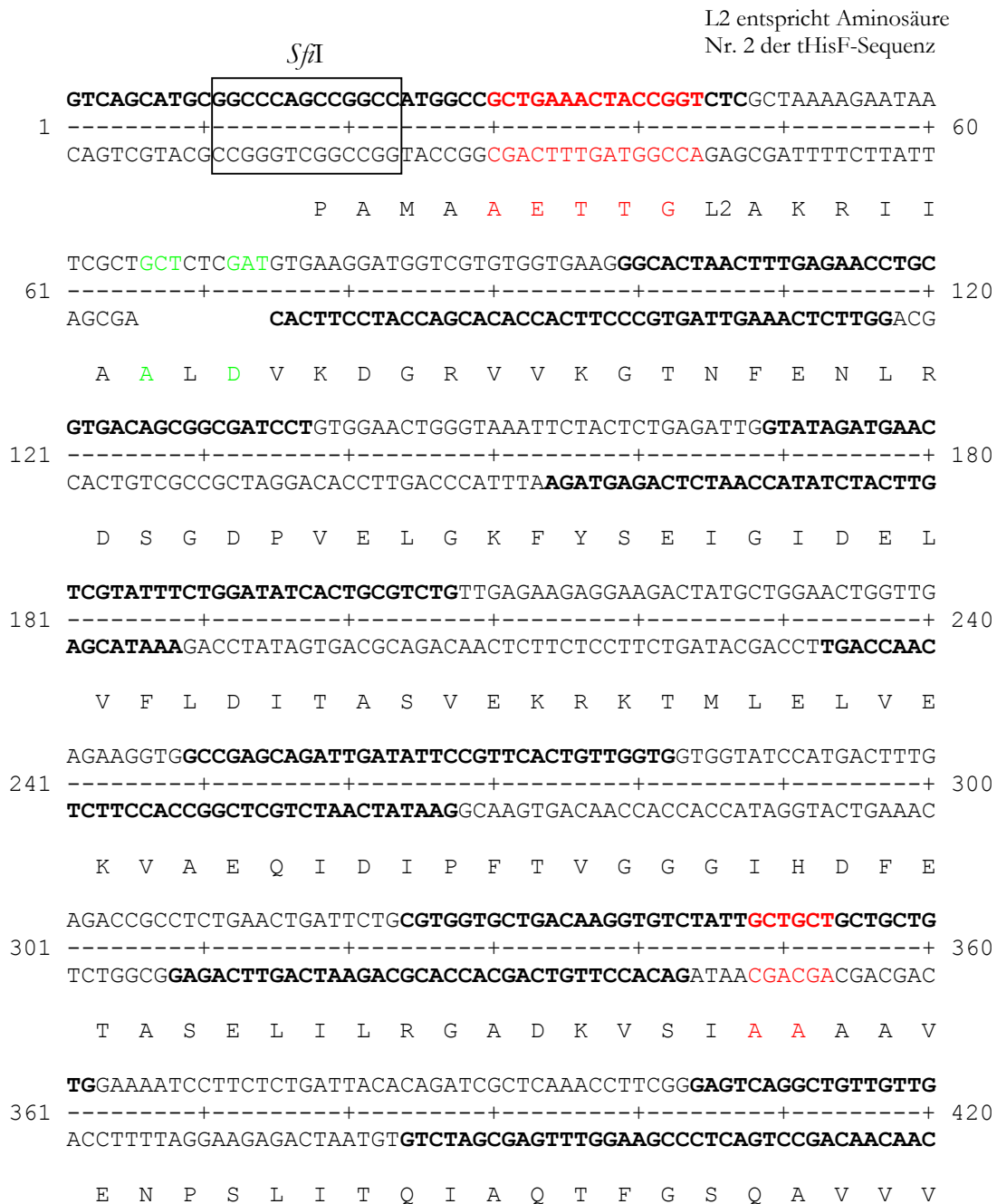
$M_r + Na^+$: 490 g/mol

$2 \times M_r + Na^+$: 957 g/mol

5.3 Nukleotidsequenzen

5.3.1 Nukleotidsequenz des synthetischen *hisF*-Gens

Nukleotidsequenz des aus den synthetischen Oligonukleotiden zusammengesetzten *hisF*-Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des HisF_{synth} im Einbuchstaben-Code. Die Oligonukleotide sind alternierend fett und nicht-fett dargestellt. Die Codone der aminoterminalen Phosphatbindestelle, die gegen Alanin-Codone ausgetauscht wurden, und der *Spacer* zwischen Signalsequenz und *hisF*-Gen sind rot, die randomisierten Codone grün hervorgehoben. Die *Sfi*I- und *Bgl*II-Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.



TGGCGATAGATGCTAAGAGAGTGGATGGAGAGTTTATGGTATTCACCTACAGCGGTAAGA
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
ACCGCTATCTACGATTCTCTCACCTACCTCTCAAATACCATAAGTGGATGTGCGCCATTCT
 A I D A K R V D G E F M V F T Y S G K K
 AGAACACGG**GTATCCTGCTTAGAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAGAAGAGAGGAGCAGGAG**
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
TCTTGTGCCCATAGGACGAATCTCTGACCCACCAACTTCATCTCTTCTCTCCTCGTCCTC
 N T G I L L R D W V V E V E K R G A G E
 AGATT**CTGCTCACCCAGTATCGACAGAGACGGCACAA**AAATCGGGTTATGATACT**GAGATGA**
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 TCTAA **AGCCCAATACTATGACTCTACT**
 I L L T S I D R D G T K S G Y D T E M I
TTCGTTTCGTGCGTCCACTAACCACACTTCCGATCATTGCT**TCCGGTGGTGCGGGTAAGA**
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
AAGCAAAGCACGCAGGTGATTGGTGTGAAGGCTAGTAACGA **CCATTCT**
 R F V R P L T T L P I I A S G G A G K M
 TGGAACAT**TTCCCTTGAGGCATTTCTGGCAGGTGCTGATGCTGCGCTT**GCGGCGTCTGTCT
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ACCTTGTAAGGAACTCCGTAAAGACCGTCCACGACTACGACGC CGCCGCAGACAGA
 E H F L E A F L A G A D A A L A A S V F
 TCCACTTTAGAG**GAGATTGATGTTAGAGAACTGAAAGAGTATCTGAAGAAGCACGGAGTGA**
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 AGGTGAAATCTCTCTAACTACAATCTCTTGACTTTCTCAT**AGACTTCTTCGTGCCTCACT**
 H F R E I D V R E L K E Y L K K H G V N
 ATGTAAGACTGGAGGGTTT**GAGATCTGATCCTATCG**
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACATTCTGACCTCCCAACTCTAGACTAGGATAGC
 V R L E G L *Bg*II

5.3.2 Nukleotidsequenz des *hisF*-Gens

Nukleotidsequenz des *hisF*(C9A)-Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des tHisF(C9A) im Einbuchstaben-Code.

```

ATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTTCGTGTGGTGAAGGGA
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACGAGCGATTTTCTTATTAGCGCCGAGAGCTACACTTTCTGCCAGCACACCACTTCCCT

M L A K R I I A A L D V K D G R V V K G

ACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTTCGAACTGGGAAAGTTCTATTCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
TGCTTGAAGCTTTTGGAGTCCCTGTCGCCACTAGGACAGCTTGACCCTTTCAAGATAAGG

T N F E N L R D S G D P V E L G K F Y S

GAAATTGAATAGACGAACTCGTTTTTCTGGATATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAA
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTTTAACCTTATCTGCTTGAGCAAAAAGACCTATAGTGGCGCAGGCAACTCTTCTCCTTT

E I G I D E L V F L D I T A S V E K R K

ACCATGCTGGAACGGTTCGAAAAGGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGA
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
TGGTACGACCTTGACCAGCTTTTCCACCGGCTCGTCTAGCTGTAAGGCAAGTGACAACCT

T M L E L V E K V A E Q I D I P F T V G -

GGAGGTATCCACGACTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTCCATAGGTGCTGAAGCTTTGCCGGAGCCTCGAGTAAGAGGCACCACGCCTGTTCCAC

G G I H D F E T A S E L I L R G A D K V

AGCATAAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCTTTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCGTATTTGTGCCGCCGACACCTCTTAGGAAGAACTAGTGTGTCTAGCGAGTTTGAAAA

S I N T A A V E N P S L I T Q I A Q T F

GGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGAGAGTTCATGGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCCTCAGTCCGGCAACAGCACCGCTATCTACGTTTTTCTCACCTACCTCTCAAGTACCAG

G S Q A V V V A I D A K R V D G E F M V

TTCACCTACTCCGAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGAGAGACTGGGTGGTTGAAGTA
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
AAGTGGATGAGGCCTTTCTTCTTGTGCCCGTATGAAGACTCTCTGACCCACCAACTTCAT

F T Y S G K K N T G I L L R D W V V E V

GAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTCACCGATATCGACAGAGACGGCACAAAATCG
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
CTTTTCTCTCCTCGTCTCTTAGGACGAGTGGTCATAGCTGTCTCTGCCGTGTTTTAGC

E K R G A G E I L L T S I D R D G T K S

```

```

GGTTACGATACGGAGATGATAAGGTTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CCAATGCTATGCCTCTACTATTCCAAGCACTCCGGTGATTGGTGTGAAGGGTAGTAGCGA

G Y D T E M I R F V R P L T T L P I I A

TCCGGTGGTGCGGGAAAAATGGAACATTTCTTGAAGCCTTCTGGCAGGTGCCGACGCT
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
AGGCCACCACGCCCTTTTTACCTTGTAAGGAACTTCGGAAGGACCGTCCACGGCTGCGA

S G G A G K M E H F L E A F L A G A D A

GCCCTTGCGGCTTCTGTCTTTCACTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAAGTAAAGAGTAC
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
CGGGAACGCCGAAGACAGAAAGTGAAGTCTCTCTAGCTGCACTCTCTTGACTTTCTCATG

A L A A S V F H F R E I D V R E L K E Y

CTCAAAAAACACGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTG
721 -----+-----+-----+-----+ 759
GAGTTTTTTGTGCCTCACTTGCACTCTGACCTCCCCAAC

L K K H G V N V R L E G L

```

5.3.3 Alignment der sequenzierten Klone der *hisF*-Genbibliothek

Der folgende Abschnitt zeigt ein Alignment der 100 sequenzierten Klone, das als Grundlage für die statistische Analyse der aus Gen-Fragmenten assemblierten *hisF*-Genbibliothek diente.

Die randomisierten Bereiche sind durch einen roten Rahmen hervorgehoben, Basenaustausche sind grün, Rasterschubmutationen blau gekennzeichnet. Die vorletzte Spalte gibt die Anzahl der Codonaustausche in der jeweiligen Sequenz an; in der letzten Spalte findet man die Anzahl der Basenaustausche.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Messwerte bzw. vorgegebene Größen werden in dieser Arbeit in SI-Einheiten (*Système International d'unités*) angegeben. Enzym- und Aminosäurebezeichnungen werden gemäß IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) verwendet.

AICAR	<i>5'-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aTc	Anhydrotracyclin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat (<i>p</i> -Toluidinsalz)
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicolacetyl-Transferase
Cm	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxy-Nucleosid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Nucleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ϵ_x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium-Salz
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
f1	Replikationsursprung des Phagen f1
G	Gibbs-Energie bzw. freie Enthalpie
gp	Genprodukt
gIIIp	Genprodukt III; Hüllprotein des Phagen M13
HisF	Synthetase-Untereinheit der Imidazol-Glyzerinphosphat Synthetase aus <i>Thermotoga maritima</i>
<i>hisF</i>	Gen für die Synthetase-Untereinheit der Imidazol-Glyzerinphosphat Synthetase aus <i>Thermotoga maritima</i>
<i>hisJ</i>	Gen des Histidin-Bindeproteins aus <i>E. coli</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion chromatography</i>
ImGP	<i>imidazole glycerol phosphate</i>
ImGP-Synthase	Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LCR	<i>ligase chain reaction</i>
LMP-Agarose	<i>low melting point agarose</i>

M	Molar
M_r	relative Molmasse
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
O.D. _x	Optische Dichte bei x nm
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
p. a.	<i>pro analysis</i> , zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> , Phosphat gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming units</i> , Anzahl der Plaque bildenden Phagen
5'-PRFAR	<i>N'-(5'-phosphoribulosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>
5'-ProFAR	<i>N'-(5'-phosphoribosyl)formimino]-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide</i>
RF-Wert	<i>ratio of front</i> ; beschreibt das Laufverhalten in Dünnschichtchromatographien
RT	Raumtemperatur
ssDNA	Einzelstrang-DNA
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumlaurylsulfat
StEP	<i>staggered extension process</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris/Acetat-Puffer
TBE	Tris/Borsäure-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
TES	Tris/EDTA/NaCl („Salz“-Puffer
TIM-barrel	auch $(\beta\alpha)_8$ -barrel; Proteinfaltungstyp; Name abgeleitet von der Triosephosphatisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TrpF	<i>N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase</i>
u	<i>unit</i> , Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V_{\max}	Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams MW, Perler FB, Kelly RM (1995) Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. *Biotechnology (N Y)*, (7):662-8.

Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M (1987) Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 15(11):4593-602.

Arkin MR, Wells JA (1998) Probing the importance of second sphere residues in an esterolytic antibody by phage display. *J Mol Biol.*, 284(4):1083-94.

Babbitt PC, Hasson MS, Wedekind JE, Palmer DR, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, Gerlt JA (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the alpha-protons of carboxylic acids. *Biochemistry*, 35(51):16489-501

Baca M; Scanlan, TS; Stephenson, RC; Wells, JA (1997) Phage display of a catalytic antibody to optimize affinity for transition-state analog binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(19): 10063-8

Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley SG. (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature*, 255(5510):609-14

Barbas III, C, Burton D, Scott J, Silverman G (2001) Phage Display: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*

Beismann-Driemeyer S, Sterner R (2001) Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex. *J Biol Chem.*, 276(23):20387-96.

Branden und Tooze (1999) Introduction to Protein Structure. Second Edition Garland Publishing, Inc., New York

Chalmers FM, Curnow KM (2001) Scaling up the ligase chain reaction-based approach to gene synthesis. *Biotechniques*, 30(2):249-52. No abstract available.

Chang CC, Chen TT, Cox BW, Dawes GN, Stemmer WP, Punnonen J, Patten PA. (1999) Evolution of a cytokine using DNA family shuffling. *Nat Biotechnol.*, (8):793-7.

Charbonnier J; Golinelli-Pimpaneau, B; Knossow M; Gigant B; Tawfik D (1997) Structural Convergence in the active sites of a family of catalytic antibodies. *Science*, 275, 1140-1142

- Chester N, Marshak DR** (1993) Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*; Mar;209(2):284-90
- Climie S, Ruiz-Perez L, Gonzalez-Pacanowska D, Prapunwattana P, Cho SW, Stroud R, Santi DV** (1990) Saturation site-directed mutagenesis of thymidylate synthase. *J Biol Chem.*, 265(31):18776-9.
- Cramer A, Raillard SA, Bermudez E, Stemmer WP** (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature*, 391(6664):288-91.
- Crick, F H C, Barnett, L, Brenner, S, Watts-Tobin, RJ** (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192, 1227-1232
- Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS** (2001) Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Chem Biol.*, (2):144-51
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW** (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, 16(13):6127-45.
- Farber GK, Petsko GA** (1990) The evolution of alpha/beta barrel enzymes. *Trends Biochem Sci*, 15(6):228-34
- Farber GK** (1993) An ($\beta\alpha$)₈-barrel full of evolutionary trouble. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 409-412
- Fersht** (1999) Structure and mechanism in protein science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W. H. Freeman and Company, New York
- Gerlt JA** (2000) New wine from old barrels. *Nat Struct Biol.*, (3):171-3.
- Gerlt JA, Raushel FM** (2003) Evolution of function in (beta/alpha)₈-barrel enzymes. *Curr Opin Chem Biol.* 2003 Apr;7(2):252-64. Review.
- Gigant B, Charbonnier JB, Eshhar Z, Green BS, Knossow M** (1997) X-ray structures of a hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15):7857-61.
- Golinelli-Pimpaneau B, Gigant B, Bizebard T, Navaza J, Saludjian P, Zemel R, Tawfik DS, Eshhar Z, Green BS, Knossow M** (1994) Crystal structure of a catalytic antibody Fab with esterase-like activity. *Structure*, 2(3):175-83.
- Griffiths AD, Tawfik DS** (2000) Man-made enzymes--from design to in vitro compartmentalisation. *Curr Opin Biotechnol.* 11(4):338-53

- Griffiths AD, Tawfik DS** (2003) Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization. *EMBO J.*, 22(1):24-35.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983, 166(4):557-80.
- Hartsch, T.** (1998) Kombinatorische, codonweise Strukturgensynthese zur Gewinnung einer konformationell stabilisierten, disulfidfreien Variante der menschlichen Immunglobulin-domäne REI_v. Promotionsschrift, Universität Göttingen.
- Haynes, M; Stura, E; Hilvert, D; Wilson, I** (1994) Routes to catalysis: structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart. *Science*, 263, 646652
- Hermanson G** (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press
- Hocker B, Beismann-Driemeyer S, Hettwer S, Lustig A, Sterner R** (2001) Dissection of a (beta alpha)₈-barrel enzyme into two folded halves. *Nat Struct Biol.*, 8(1):32-6.
- Hough DW, Danson M.J** (1999) Extremozymes. *Curr Opin Chem Biol.*, (1):39-46.
- Huber R, Huber H, Stetter KO** (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiol Rev.*, 24(5):615-23.
- Hwang KY, Song HK, Chang C, Lee J, Lee SY, Kim KK, Choe S, Sweet RM, Suh SW** (1997) Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol Cells*, 7 (2):251-8
- Jaenicke R, Böhm G** (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol.*, (6):738-48.
- Jencks WP** (1969) Catalysis in Chemistry and Enzymology. McGraw-Hill, New York, p. 288
- Joerger AC, Mayer S, Fersht AR** (2003) Mimicking natural evolution in vitro: an N-acetylneuraminidase mutant with an increased dihydrodipicolinate synthase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(10):5694-9
- Jurgens C, Strom A, Wegener D, Hettwer S, Wilmanns M, Sterner R** (2000) Directed evolution of a (beta alpha)₈-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18):9925-30
- Kansy E** (2003) Kombinatorische Synthese einer Genbibliothek und Analyse ihrer statistischen Struktur. Promotionsschrift, Universität Göttingen

Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S (1999) Novel family shuffling methods for the in vitro evolution of enzymes. *Gene*, 236(1):159-67.

Kikuchi M, Ohnishi K, Harayama S (2000) An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene*, 243(1-2):133-7.

Klem TJ, Davisson VJ (1993) Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry*, 32(19):5177-86.

Kolmar H, Hennecke F, Gotze K, Janzer B, Vogt B, Mayer F, Fritz HJ (1995) Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures. *EMBO J.*;14(16):3895-904.

Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.*, 10(3-4):203-9.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685

Lang D, Thoma R, Henn-Sax M, Sterner R, Wilmanns M (2000) Structural evidence for evolution of the beta/alpha barrel scaffold by gene duplication and fusion. *Science*; 289(5484):1546-50

Le Gouill C, Parent JL, Rola-Pleszczynski M, Stankova J (1994) Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem*, 219(1):164. No abstract available.

Li P, Beckwith J, Inouye H (1988) Alteration of the amino terminus of the mature sequence of a periplasmic protein can severely affect protein export in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(20):7685-9.

Lonn A, Gardonyi M, van Zyl W, Hahn-Hagerdal B, Otero RC (2002) Cold adaptation of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. Gene cloning and protein characterization. *Eur J Biochem.*, 269(1):157-63.

Luger K, Hommel U, Herold M, Hofsteenge J, Kirschner K (1989) Correct folding of circularly permuted variants of a beta alpha barrel enzyme in vivo. *Science*, 243(4888):206-10

Miller, J (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory Press

Miller BG, Wolfenden R. (2002) Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu Rev Biochem.* 71:847-85. Review.

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-50. No abstract available.

NEB-Informationseite: www.neb.com/neb/faqs/faqs_phd.htm

Neu HC, Heppel LA (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem*, 240(9):3685-92. No abstract available.

Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, Flynn G, Midgley C, Lane D, Winter G (1994) Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.*, 13(3):692-8.

Orengo CA, Jones DT, Thornton JM. (1994) Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature*, 372(6507):631-4.

Pace CN, 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.

Patten PA, Howard RJ, Stemmer WP (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr Opin Biotechnol.* (6):724-33.

Pollack, SJ ; Jacobs, JW und Schultz, PG (1986) Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*, 234, 1570-1573

Powell M.J, Hansen D. E. (1989) Catalytic antibodies - a new direction in enzyme design. *Protein Eng.*, 3(2):69-75.

Reardon D und Faber GK (1995) The structure and evolution of ($\beta\alpha$)₈-barrel proteins *FASEB J.* 9: 497-503

Saggio I, Gloaguen I, Laufer R (1995) Functional phage display of ciliary neurotrophic factor. *Gene*, 152(1):35-9.

Sambrook, J, Fritsch, F & Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12):5463-7. No abstract available.

Schmidt DM, Mundorff EC, Dojka M, Bermudez E, Ness JE, Govindarajan S, Babbitt PC, Minshull J, Gerlt JA. (2003) Evolutionary potential of (β / α)₈-barrels: functional promiscuity produced by single substitutions in the enolase superfamily. *Biochemistry*;42(28):8387-93.

Shoichet BK, Baase WA, Kuroki R, Matthews BW (1995) A relationship between protein stability and protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A*;92(2):452-6.

- Shumann, H A** (1982) Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J. Biol.Chem.*, 257, 5455-5461
- 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.
- Slatko BE** (1994) Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Methods Mol Biol.*; 31:35-45. Review.
- Smith GP** (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*;228(4705):1315-7
- Summers RG, Harris CR, Knowles JR** (1989) A conservative amino acid substitution, arginine for lysine, abolishes export of a hybrid protein in *Escherichia coli*. Implications for the mechanism of protein secretion. *J Biol Chem.*, 264(33):20082-8.
- Tanaka F** (2002) Catalytic antibodies as designer proteases and esterases. *Chem Rev.* 102(12):4885-906. Review.
- Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D** (1996) Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J. Biol. Chem.* 271(26): 15682-6
- Tawfik D, Eshhar Z, Bentolila A, Green, B** (1993) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undecene Mediated Transesterification of p-Nitrophenyl Phosphonates: A novel route to phosphono esters. *Synthesis*: 968
- Tawfik D, Zemel R, Arad-Yellin R, Green B, Eshhar Z** (1990) Simple Method for selecting catalytic monoclonal antibodies that exhibit turnover and specificity. *Biochemistry* 29: 9916-9921
- Thoma** (1998) The isomerase of the histidine and tryptophane biosynthetic pathway from the hyperthermophilic organism *Thermotoga maritima*. Inaugural-Dissertation, Universität Basel
- Thoma R, Obmolova G, Lang DA, Schwander M, Jenö P, Sterner R, Wilmanns M** (1999) Efficient expression, purification and crystallisation of two hyperthermostable enzymes of histidine biosynthesis. *FEBS Lett.* ;454(1-2):1-6.
- Thoma R, Schwander M, Liebl W, Kirschner K, Sterner, R.** (1998) A histidine gene cluster of the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: sequence analysis and evolutionary significance. *Extremophiles* 2: 379-389
- Tramontano, A; Janda, KD und Lerner, RA** (1986) Catalytic antibodies. *Science*, 234, 1566-1570

Tur MK, Huhn M, Sasse S, Engert A, Barth S (2001) Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *Biotechniques*, 30(2):404-8, 410, 412-3.

Verhaert RM, Van Duin J, Quax WJ (1999) Processing and functional display of the 86 kDa heterodimeric penicillin G acylase on the surface of phage fd. *Biochem J.* 342 (Pt 2):415-22.

Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* ;153:3-11

Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofer G, Moroney SE (1994) Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*; 22(25):5600-7.

Wells JA, Powers DB (1986) In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *J Biol Chem.*, 261(14):6564-70.

Wierenga RK (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.*, 492(3):193-8.

Wolfenden, R und Radzicka, A (1991) Transition-state analogues. *Curr. Opin. Struct. Biol.*1, 780-787

Zalkin H, Smith JL. (1998) Enzymes utilizing glutamine as an amide donor. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*;72:87-144.

8 DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz für die Überlassung dieses spannenden Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, seinen motivierenden Optimismus und ganz besonders für seine wertvolle Hilfe bei der Synthese des Übergangszustandsanalogons.

Herrn PD Dr. Harald Kolmar danke ich für die Übernahme des Korreferates und die vielen nützlichen Ratschläge, die so manches Problem lösten.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner und den übrigen „Kölnern“ danke ich für die Überlassung der *thiF*(C9A)-Variante, für das tHisF, tHisA, tHisH und das 5'-ProFAR – und natürlich für die diversen spannenden und hilfreichen Arbeitsberichtsseminare in Köln.

Prof. Dr. Diederichsen danke ich für die Möglichkeit, das Übergangszustandsanalogon in seiner Abteilung zu synthetisieren. Ganz besonderen Dank schulde ich dabei Markus Hoffmann für seine Hilfe bei allen Problemen mit der angewandten organischen Chemie.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Labors 304 bzw. 306 möchte ich für das hervorragende Arbeitsklima danken. Ganz besonderer Dank geht dabei an Christiane Preiß für die unzähligen PCRs, Gele und Phagenpräparationen.

Vera Boege und Viola Baradari haben im Rahmen ihrer GPII-Praktika wertvolle Arbeit für dieses Projekt geleistet.

Rainer Merkl danke ich für seine Hilfe bei allen Problemen mit Computern und statistischen Fragen.

Allen Mitarbeitern der Abt. Molekulare Genetik danke ich für ihre Kameradschaftlichkeit, Diskussionsbereitschaft, Hilfe bei diversen Problemen sowie für die netten Mensa- und Kaffeerunden.

Dem MBM des Klinikums Göttingen danke ich für die HiWi-Stelle, die mich in den letzten beiden Jahren meiner Promotion mit Lohn und Einblicken in Patentrecherchen und Markanalysen versorgte.

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Fonds der chemischen Industrie gefördert.

Lebenslauf

Name: Stina Alexandra Schiller
Geburtsdatum: 19.02.1975
Geburtsort: Hildesheim
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

1981-1985 Grundschule in Nordstemmen

1985-1987 Orientierungsstufe Ost in Hildesheim

1987-1994 Scharnhorst-Gymnasium in Hildesheim, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1994-1999 Studiengang Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität, Göttingen

1996 Diplomvorprüfung am 16.10.1996 in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie

1998 mündliche Diplomhauptprüfung im Hauptfach Molekulare Genetik und den Nebenfächern Mikrobiologie und Organische Chemie

1998-1999 Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Fritz,
Thema: „Antikörperpräsentation auf *S. cerevisia*.“

Seit 1999 Promotionsarbeit in der Abteilung Molekulare Genetik und Präparative Molekularbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Fritz.